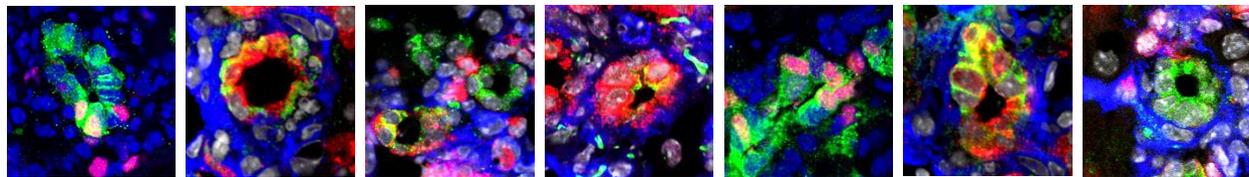




VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



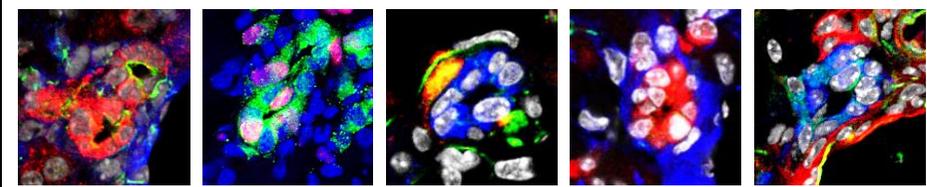
Papel de IRS2 en la reparación del daño hepático y cáncer



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en
Biomedicina y Biotecnología

Papel de IRS2 en la
reparación del daño
hepático y cáncer

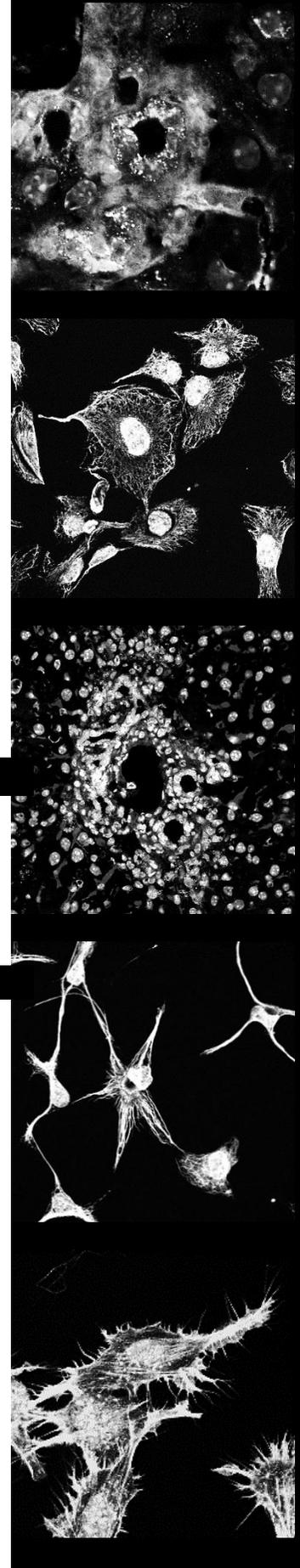


TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Fátima Manzano Núñez

Director: Dr. Luke Adam Noon
Tutor: Dr. José Enrique O'Connor Blasco

Octubre 2019





VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Papel de IRS2 en la reparación del daño hepático y cáncer

Tesis doctoral presentada por

Fátima Manzano Núñez

Dirigida por Dr. Luke Adam Noon

Tutorizada por Dr. José Enrique O'Connor Blasco

Octubre 2019



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

El Dr. Luke Adam Noon jefe del laboratorio de Factores de Crecimiento Metabólico y Medicina Regenerativa del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, como director de esta tesis doctoral, y el Dr. José Enrique O'Connor Blasco Catedrático de Bioquímica y Bilogía Molecular de la Universidad de Valencia, como tutor de esta tesis doctoral.

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación presentado bajo el título “Papel de IRS2 en la reparación del daño hepático y cáncer” ha sido realizado por Fátima Manzano Núñez bajo nuestra dirección y asesoramiento. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su depósito y presentación como tesis doctoral para optar al título de Doctora en Biomedicina y Biotecnología por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a todos los efectos, firman la presente certificación:

Fdo: Luke Adam Noon (Director)

Fdo: José Enrique O'Connor Blasco (Tutor)

Valencia, Octubre 2019

La investigación desarrollada en esta tesis doctoral ha sido llevada a cabo en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, Valencia, España) dentro del laboratorio de Señales Metabólicas de Crecimiento y Medicina Regenerativa. Este trabajo se ha realizado con el apoyo económico de los proyectos de investigación MINECO:

- The regulation of Progenitor Cells by Insulin/IRS2 Signalling: Implications for Metabolic Diseases. SAF2011-28331

- Señalización de Insulina Localizada en el Hígado (SIL-ver). BFU2014-58686-P

Fátima Manzano Núñez ha disfrutado de un contrato de investigación del Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) 301/440 (CNV-301-PRF-440) constituido a iniciativa del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad) (enero del 2015 - junio del 2016) y de una beca predoctoral de la Comunidad Valenciana (ACIF/2016/ 020) (julio 2016- julio 2019). También ha realizado una breve estancia de 261 horas en el laboratorio de Oncología Molecular dirigida por el Dr. Yasuyuki Fujita en el Instituto de Medicina Genética de la Universidad de Hokkaido, gracias a la beca *Special Joint Reseach Program* otorgada por dicha universidad.



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

ciberdem
Centro de Investigación Biomédica en Red
Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas



HOKKAIDO
UNIVERSITY



GENERALITAT
VALENCIANA

CONSELLERIA D'EDUCACIÓ,
INVESTIGACIÓ, CULTURA I ESPORT



Agradecimientos

Principalmente quiero agradecer a mi director, Luke. Gracias por haberme dado la oportunidad de hacer esta tesis, por haberme guiado, enseñado con máxima paciencia, por tu dedicación, por no haber escatimado tiempo ni detalles en tus explicaciones, por valorar el trabajo y el esfuerzo, por siempre tener palabras de ánimo y gratitud, por tu comprensión, por siempre ver el lado bueno de un resultado inesperado. Gracias por intentar transmitirnos a MJ y a mi tu pasión por la ciencia y no desesperar, incluso llegando a los límites de las explicaciones con los campos de patatas. Gracias por darme la confianza para discutir contigo mis dudas e ideas, por hacer que quiera seguir investigando después del doctorado y que tenga ganas e ilusión por empezar de nuevo (eso ya es decir mucho). Gracias por ser parte de todos mis méritos durante la tesis. No he podido tener un mejor director y por ello te estoy y estaré infinitamente agradecida.

También agradecerle a mi tutor de tesis, el Dr. José Enrique O'Connor por haber hecho de nexo con la universidad y por su disposición.

Quiero agradecerle a la Dra. Deborah Burks, por toda su ayuda, por sus consejos científicos y sus aportaciones, que me han ayudado a avanzar y a pensar mejor en mis resultados.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, a "MJ" (raper), mi compi de laboratorio, tesis, bancada, campana, bolis (forzosamente), de alegrías, tristezas, desesperaciones... Gracias por estar siempre ahí para todo lo que he necesitado, por tu ayuda, tus consejos, por escuchar mis historias una y otra vez, por cuidar de mi hasta en los autobuses, por alentarme a decir lo que pienso, incluso por tus audios infinitos. Sabes que eres la culpable de mis pesadillas en las que no puedo decir que no a un nuevo estudiante de prácticas. Igual que yo soy la culpable de que ahora te digas a ti misma "tú puedes, céntrate" o que tengas bolis de bata y de

escritorio (ahí va mi pequeña aportación a tu salud mental y física). Supongo que durante la tesis se crean grandes vínculos, y tú probablemente seas el mayor de todos. Gracias por convertirte en una amiga. Gracias a Aran por ser la Goku del laboratorio, por ayudarme siempre en mil cosas, desde lo básico del laboratorio hasta lo personal. Gracias por enseñarme a cuidar de las células y mil técnicas de laboratorio. Por tartarme con paciencia, cariño, bondad, por ser tan solidaria con tu tiempo y por siempre tener palabras de ánimo. Gracias por cuidar de mi y por ser tú la primera que salió de debajo de la bancada aquella tarde. Gracias a Carlos por siempre poner la chispa de humor, por tus frases míticas como “noventa, se sienta...”, por enseñarme a ser más paciente y despreocupada, por hacer del laboratorio un lugar más ameno de trabajo y por tus consejos de ciencia (y de no ciencia). Gracias a Amparo por tu trabajo y aportaciones en los experimentos, por tus consejos, por tu revisión de la tesis, por los momentos de risas y por siempre contar con nosotros en los FBRs, también por preocuparte por mi futuro y venderme cual hija casadera a otros jefazos, aunque me muera de vergüenza. Gracias a Espe por ayudarme revisando la tesis, tu tiempo, tus consejos, por sacarme a pasear al río, aunque a veces el paseo se convirtiese en cervecita, esas veces las agradezco más. Gracias por tu amistad.

Gracias a mi grupo de amigos predocs. Conoceros ha sido un extra por el que estoy muy agradecida. Cada cual con vuestras peculiaridades, Arantxi con su fuerza, liderazgo, autenticismo y su obsesión con los unicornios, José Miguel con su conocimiento sobre toda clase de cosas, su amor por los animales y su humor negro, Candela con su cariño, sus gifts, su preocupación continua, sus plataneras y nuestro amor compartido por el carnaval, Andrea con su bondad, todo el cariño que da, las aficiones que hemos compartido y sus sueños, Juan Diego con su dedicación, cariño por sus animales y no me quiero ni imaginar con su bebé y Jesús con su humor y su dedicación a la ciencia (aun con alergia). Gracias por animar muchas tardes, por escuchar siempre mis historias repetitivas, por los momentos de risas, por los viajes compartidos (Murcia, Utrecht, Amsterdam, Viena y Mislata en fallas) y por convertirnos en amigos. Os quiero.

Gracias a todas las personas del CIPF que siempre que han podido me han ofrecido su ayuda como Bea, Carol, Rosa, Alí, Marcos, Mario e Irene especialmente, por todo su trabajo y por enseñarme con paciencia a usar los equipos de histología. A todos los servicios que han colaborado en la realización de los experimentos, el Dr. Forteza especialmente por su amabilidad ofreciendo el servicio de anatomía patológica y por su asesoramiento junto con el Dr. Vidal Vanaclocha, a Alicia y Domingo en citometría, Alberto con el confocal, Viviana, Nerea y Amparo en el animalario, Vicente y Jhosland por su rapidez, eficacia y buen humor. Gracias a Pilar y Albert por recibirme siempre con la mejor de sus sonrisas. Y a muchos más que me dejo en el tintero.

Thanks to Dr. Yasuyuki Fujita for letting me be part of his lab and also to his lab members for their invaluable amability and support during my time in Sapporo.

Gracias a Diana y Caro por alegrarme en los viernes de vermut, aconsejándome y siempre ofreciéndome vuestra ayuda incondicional.

Gracias a mis amigas “de la mutis”, Ana, Julia, Magali y Miriam por siempre estar ahí y apoyarme durante todos estos años.

Gracias al universo/casualidades/destino/suerte infinita o lo que sea, porque fuera de los laboratorios la tesis también me ha hecho conocer o reencontrar a personas que han sido mi apoyo en Valencia y mi vía de escape. Nuria, Silvia, Cristina en blablar, Maria compartiendo piso o incluso en el bus de camino al CIPF. Gracias por aguantarme fuera del laboratorio, por escucharme, por alejarme de las preocupaciones, por vuestro cariño, por darme ánimos, hacerme reir y convertirnos en mi vida más allá de la tesis.

Finalmente gracias a mi familia, en especial a mis padres y mi hermana, por vuestro apoyo incondicional, por cuidarme desde la distancia, por darme fuerzas y ánimo cuando he flaqueado, por vuestros esfuerzos en entender de lo que hablo y por hacer de mí quien soy y de mis logros los vuestros.

Resumen

La resistencia a insulina es una característica típica de la diabetes tipo 2 y la obesidad, patologías vinculadas a un alto riesgo del desarrollo de enfermedades crónicas hepáticas y hepatocarcinoma. Sin embargo, se desconoce el papel que la resistencia a insulina pueda ejercer durante el daño hepático crónico y durante la hepatocarcinogénesis, por lo que se ha abordado esta cuestión a través del estudio del substrato receptor de insulina 2 (IRS2), principal promotor de la señalización de insulina en el hígado.

La experimentación llevada a cabo durante este proyecto muestra que la delección del gen *Irs2* en el modelo murino *Irs2*^{-/-} impide la inducción de *Fgf7* en células estromales durante el daño crónico hepático y reduce la expresión de su receptor epitelial *Fgfr2-IIIb* en células progenitoras, dando lugar a fallos en la comunicación estromal-epitelial en el nicho progenitor. Además, retrasa la expansión de células de origen progenitor, da lugar a una mayor pérdida hepatocítica y frena la generación de hepatocitos 2c (carga genética diploide), reduciendo así la reepitelización hepática. Por otra parte, durante la hepatocarcinogénesis, la pérdida de expresión de IRS2 está asociada con un fenotipo más mesenquimal, migratorio y metastásico, mientras que su sobreexpresión reduce la migración tumoral e induce procesos de transición mesenquimal epitelial (MET) así como la expresión de *FGFR2-IIIb*.

En conclusión, los resultados alcanzados en esta tesis indican que la señalización sistémica de insulina/IGF-1 actúa a nivel local a través de IRS2 en el nicho progenitor durante la reparación del daño crónico hepático. La expresión de la proteína IRS2 regula de forma positiva la comunicación entre células estromales y epiteliales además de promover procesos MET, favoreciendo la reparación epitelial y reduciendo la migración tumoral intrahepática.

Índice

Resumen.....	I
Índice.....	III
Lista de figuras.....	VII
Lista de tablas.....	XI
Abreviaturas.....	XIII
1 Introducción	1
1.1 Señalización de Insulina/IGF-1	1
1.1.1 Insulina.....	1
1.1.2 Factor de crecimiento insulínico (IGF)	2
1.1.3 Receptores de insulina e IGF-1.....	2
1.1.4 Proteínas sustrato receptor de insulina (IRS).....	4
1.1.5 Cascada de señalización insulina/IGF-1	7
1.2 Resistencia a insulina, diabetes mellitus tipo 2 y obesidad	8
1.3 Resistencia a insulina y patologías hepáticas	10
1.4 Fisiología del hígado.....	13
1.4.1 Función	13
1.4.2 Anatomía del hígado	13
1.4.3 Tipos celulares	15
1.5 Regeneración hepática a partir de células progenitoras.....	21
1.5.1 El nicho progenitor	23
1.6 Relación entre la reparación del daño crónico hepático y cáncer.....	24
1.7 Hepatocarcinoma (HCC)	25
1.8 Hepatoblastoma (HB)	26
1.9 Heterogeneidad y clasificación de HCCs.....	27
1.10 EMT y cáncer	28
1.11 Implicación de proteínas IRSs en cáncer	29
1.12 Señalización IGF en HCC.....	32
1.12.1 Terapias anti-IGF-1R. Paradigma actual.....	33
1.13 Factores de crecimiento fibroblástico (FGFs)	33
1.13.1 FGFs y regeneración hepática	35
1.13.2 FGFs y cáncer.....	36

2 Hipótesis y objetivos	37
3 Materiales y métodos	39
3.1 Experimentación animal	39
3.1.1 Modelos animales	39
3.1.2 Inducción de daño hepático	40
3.1.3 Generación de xenoinjertos	40
3.1.4 Ensayo de migración bazo-hígado.....	41
3.1.5 Recolección de muestras biológicas	42
3.2 Cultivos celulares	43
3.3 Inactivación de células estrelladas con Mitomicina C (MitoC)	46
3.4 Infección lentiviral de líneas celulares	47
3.5 Estimulación con insulina/IGF-1	49
3.6 Separación celular por citometría de flujo “cell sorting”	49
3.7 Análisis de enzimas de daño hepático en suero	50
3.8 Inmunohistoquímica	50
3.9 Tinción por inmunofluorescencia	51
3.9.1 Tejidos criopreservados	51
3.9.2 Cultivos celulares	51
3.10 Análisis cuantitativo de imagen	53
3.10.1 Análisis cuantitativo de intensidad de tinción	53
3.10.2 Análisis cuantitativo celular	54
3.10.3 Distribución hepática por área nuclear	55
3.10.4 Estimación de ploidía hepatocítica.....	56
3.10.5 Análisis de granularidad de Spp1.....	59
3.11 Inmunodetección de proteínas por <i>Western blot</i>	59
3.12 Análisis de expresión génica por RT-qPCR	63
3.12.1 Meta-análisis de expresión de IRS2 en tejido hepático humano	65
3.13 Ensayo de viabilidad y crecimiento celular MTT	66
3.14 Ensayo de proliferación con 5-Bromo-2-Dexosiidina (BrdU)	67
3.15 Ensayo de herida (<i>wound healing</i>)	67
3.16 Ensayo de migración e invasión por <i>transwell</i>	68
3.17 Ensayo de clonogénesis.....	69
3.18 Análisis estadístico	70
4 Resultados	71
4.1 Bloque 1: El papel de IRS2 durante la reparación del daño hepático	71
4.1.1 Estudio de la respuesta al daño crónico hepático en animales <i>Irs2^{-/-}</i>	73

4.1.1.1	La ausencia de <i>Irs2</i> altera la capacidad de atenuación del daño hepático crónico.....	73
4.1.1.2	La ausencia de <i>Irs2</i> acentúa la pérdida de hepatocitos pequeños durante el daño crónico hepático.....	74
4.1.1.3	La delección de <i>Irs2</i> aumenta el número de núcleos de hepatocitos Ki67 positivos durante el tratamiento DDC	76
4.1.1.4	La falta de <i>Irs2</i> reduce la capacidad de inducción de la población hepatocítica 2c durante el daño crónico hepático	78
4.1.1.5	La inducción de la fracción celular no parenquimal se ve retardada en animales <i>Irs2</i> ^{-/-} durante el daño crónico hepático.....	81
4.1.1.6	La deficiencia en <i>Irs2</i> reduce la expansión y proliferación de células progenitoras hepáticas.....	83
4.1.1.7	La inducción de <i>Fgf7</i> durante el daño hepático con DDC es dependiente de <i>Irs2</i>	87
4.1.1.8	La expresión de GFAP en el hígado se reduce en el modelo <i>Irs2</i> ^{-/-} durante el tratamiento DDC	90
4.1.1.9	Los animales <i>Irs2</i> ^{-/-} poseen un microambiente fibrótico diferencial durante el daño crónico con DDC	92
4.1.2	Estudio del papel de IRS2 en hCEHs.....	96
4.1.2.1	La expresión de IRS2 no altera la proliferación, migración ni estado de activación de células estrelladas activadas	96
4.1.2.2	La inactivación mitótica de líneas de CEHs humanas induce la expresión de FGF7	99
4.1.2.3	IRS2 promueve la supervivencia de células estrelladas inactivadas productoras de FGF7	101
4.1.2.4	La falta de IRS2 disminuye la capacidad de reducción de α -SMA durante la inactivación de LX-2	103
4.2	Bloque 2: El papel de IRS2 durante el avance tumoral hepático.....	104
4.2.1	La expresión de IRS2 se reduce en estadios avanzados de HCC y en tumores menos diferenciados y con peor pronóstico	104
4.2.2	El silenciamiento de IRS2 no altera la capacidad proliferativa de la línea Huh6.....	106
4.2.3	La formación de colonias aisladas de mayor tamaño incrementa al reducir los niveles de IRS2.....	107
4.2.4	El silenciamiento de IRS2 en Huh6 induce cambios en el citoesqueleto de actina	109
4.2.5	La tasa migratoria e invasiva de Huh6 aumenta tras el silenciamiento de IRS2 <i>in vitro</i>	110
4.2.6	El silenciamiento de IRS2 promueve las capacidades metastásicas de células Huh6	112
4.2.7	La falta de IRS2 en la línea epitelial Hep3B promueve el crecimiento de xenoinjertos subcutáneos	115

4.2.8 El silenciamiento de IRS2 no es suficiente para promover una EMT <i>in vitro</i>	117
4.2.9 La expresión de IRS2 es necesaria para la epitelización de Huh6 tras la metástasis <i>in vivo</i>	120
4.2.10 La sobreexpresión de IRS2 promueve MET <i>in vitro</i>	123
4.2.11 La expresión de FGFR2-IIIb aumenta al sobreexpresar IRS2 en las líneas Huh6 y HepG2 <i>in vitro</i>	126
4.2.12 La sobreexpresión de IRS2 reduce la capacidad de migración <i>in vivo</i> y formación de tumores intrahepáticos de células Huh6	128
5 Discusión	131
5.1 El papel de IRS2 durante la reparación del daño hepático.....	131
5.2 El papel de IRS2 durante el avance tumoral hepático.....	143
5.3 IRS2 como factor clave en procesos de reparación y cáncer hepático.....	150
6 Conclusiones	153
7 Bibliografía.....	155
8 Anexos.....	179

Lista de figuras

Figura 1. Representación esquemática de los receptores de insulina e IGF-1...	3
Figura 2. Estructura de las proteínas IRSs..	5
Figura 3. Ruta de señalización de insulina/IGF-1 a través de Ras-MAPK y PI3K- AKT esquematizada..	8
Figura 4. Esquema de la progresión del daño hepático.....	11
Figura 5. Representación del lobulillo hepático.	14
Figura 6. Esquema representativo de los tipos celulares residentes en el hígado.....	15
Figura 7. Transición fenotípica de las células estrelladas hepáticas..	20
Figura 8. Trayectoria recorrida por las células durante el ensayo de migración bazo-hígado.....	42
Figura 9. Líneas celulares utilizadas en el estudio	45
Figura 10. Representación de poblaciones celulares pIRS2-GFP separadas mediante <i>cell sorting</i>	50
Figura 11. Máscaras celulares aplicadas en el análisis de imagen mediante IN Cell.	55
Figura 12. Modelo de estimación del contenido de ADN.....	57
Figura 13. Ilustración de las posibles estimaciones de ploidía inferiores a las reales.....	58
Figura 14. Modelo de experimentación de daño hepático crónico utilizado.....	72
Figura 15. <i>Irs2</i> es necesario para reducir los niveles de daño hepático durante la dieta DDC..	74
Figura 16. La falta de <i>Irs2</i> incrementa la reducción de células HNF4 α positivas durante el tratamiento con dieta DDC.....	75
Figura 17. Inducción de núcleos Ki67 HNF4 α doble positivos en animales <i>Irs2</i> ^{-/-} tras 21 días de daño hepático.....	77
Figura 18. Análisis de ploidía hepática en animales control siguiendo el método desarrollado.....	79

Figura 19. Incapacidad de repoblación de núcleos HNF4α 2c en animales <i>Irs2</i> ^{-/-} durante el daño hepático.	80
Figura 20. Reducción de CNPs en animales <i>Irs2</i> ^{-/-} tras 14 días de daño hepático.	81
Figura 21. La falta de <i>Irs2</i> no afecta a la proliferación de CNPs que aumenta tras periodos largos de daño hepático.	82
Figura 22. Los animales <i>Irs2</i> ^{-/-} reducen el número de CPHs alrededor de venas portales.	84
Figura 23. La falta de <i>Irs2</i> reduce la capacidad proliferativa y altera la distribución de <i>Spp1</i>	85
Figura 24. La expresión de <i>SPP1</i> está vinculada a la expresión de <i>IRS2</i> en células humanas progenitoras.	87
Figura 25. Los animales <i>Irs2</i> ^{-/-} reducen la expresión de <i>Fgf7</i> alrededor de CPHs.	88
Figura 26. La expresión <i>Fgf7</i> y su receptor <i>Fgfr2-IIIb</i> se reduce en los ductos de los animales <i>Irs2</i> ^{-/-}	89
Figura 27. Pérdida parenquimal y periportal de células <i>Gfap</i> positivas durante el daño hepático en los animales <i>Irs2</i> ^{-/-}	91
Figura 28. Marcadores de células mesenquimales se mantienen en niveles equivalentes mientras que los de células mesenquimales no estrelladas aumentan en los animales <i>Irs2</i> ^{-/-}	93
Figura 29. Diferencias en la disposición de células <i>THY1</i> positivas entre hígados <i>WT</i> e <i>Irs2</i> ^{-/-} tratados durante 14 días con dieta DDC.	94
Figura 30. Aumento de células estromales derivadas de la médula ósea en los animales <i>Irs2</i> ^{-/-}	95
Figura 31. El silenciamiento de <i>IRS2</i> no produce cambios en la viabilidad de células estrelladas humanas	97
Figura 32. La capacidad de migración de células estrelladas no se ve afectada por el silenciamiento de <i>IRS2</i>	98
Figura 33. La expresión de α-SMA como marcador de miofibroblastos no se altera ante la falta de <i>IRS2</i> en células estrelladas humanas.	99
Figura 34. El uso de MitoC inactiva mitóticamente células estrelladas humanas e induce la expresión de <i>FGF7</i>	100
Figura 35. El silenciamiento de <i>IRS2</i> aumenta la muerte celular de células estrelladas humanas inactivadas.	101

Figura 36. La inhibición de las proteínas IRSs en la línea primaria de hCEHs induce la muerte celular.....	102
Figura 37. La falta de IRS2 reduce la capacidad de disminuir la expresión de α -SMA ante la inactivación de células estrelladas humanas.	103
Figura 38. Muestras humanas de HCC de carácter avanzado y con un perfil de menor diferenciación y supervivencia reducen los niveles de <i>IRS2</i>	105
Figura 39. El silenciamiento de IRS2 en Huh6 no altera la proliferación celular..	107
Figura 40. La falta de IRS2 en Huh6 promueve la formación de colonias de mayor tamaño y mayor dispersión.....	108
Figura 41. La reducción de expresión endógena de IRS2 en Huh6 promueve la formación de colonias de mayor tamaño.....	109
Figura 42. El silenciamiento de IRS2 en Huh6 altera la morfología del citoesqueleto celular.....	110
Figura 43. El silenciamiento de IRS2 en la línea Huh6 promueve la migración e invasión celular.....	111
Figura 44. La falta de IRS2 en la línea celular Huh6 promueve la migración <i>in vivo</i>	112
Figura 45. El silenciamiento de IRS2 en tumores intrahepáticos reduce la necrosis tumoral y la expresión de <i>P53</i>	114
Figura 46. El silenciamiento de IRS2 en la línea Hep3B no afecta a la proliferación celular pero aumenta el número de colonias de mayor tamaño.....	115
Figura 47. El silenciamiento de IRS2 en la línea Hep3B aumenta el peso y volumen tumoral	116
Figura 48. Análisis de expresión de ARNm de IRS2 y marcadores epiteliales y mesenquimales de las diferentes líneas utilizadas en el estudio.....	118
Figura 49. El silenciamiento de IRS2 promueve cambios en la expresión de marcadores característicos de una EMT en las líneas HepaRG (A) y Huh6 (B).	119
Figura 50. El silenciamiento de IRS2 en tumores intrahepáticos y xenoinjertos subcutáneos reduce su epitelización.....	122
Figura 51. La sobreexpresión de IRS2 de origen murino en HepG2 promueve la señalización de insulina/IGF-1.....	124

Figura 52. La sobreexpresión de IRS2 promueve cambios en la expresión de distintos marcadores característicos de una MET en las líneas HepaRG (A), Huh6 (B) y HepG2 (C)..	125
Figura 53. Inducción de la expresión de <i>FGFR2-IIIb</i> sobreexpresando IRS2.	127
Figura 54. La sobreexpresión de IRS2 en la línea celular Huh6 reduce la migración <i>in vivo</i> y su expresión tras la formación de tumores intrahepáticos..	129
Figura 55. Modelo esquemático representativo del papel de <i>Lrs2</i> en el nicho progenitor durante el daño hepático crónico.....	151
Figura 56. Modelo esquemático representativo del papel de IRS2 en hepatocarcinogénesis.....	152

Lista de tablas

Tabla 1. Especificidad de ligando de receptores FGF [200].	35
Tabla 2. Listado de líneas celulares de origen humano utilizadas en el estudio.	43
Tabla 3. Vectores lentivirales utilizados para generar líneas celulares estables.	47
Tabla 4. Anticuerpo primario utilizado para la detección proteica por inmunohistoquímica.	51
Tabla 5. Listado de anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia.	52
Tabla 6. Longitud de onda de los filtros de excitación y emisión utilizados en los protocolos de adquisición de imagen con <i>IN Cell Analyzer</i>	54
Tabla 7. Componentes de la fase de separación de geles de poliacrilamida. Los volúmenes a añadir de cada reactivo se detallan en función del porcentaje de acrilamida final del gel.	61
Tabla 8. Componentes de la fase de estancamiento de geles de poliacrilamida.	61
Tabla 9. Listado de anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por <i>western blot</i>	62
Tabla 10. Lista de parejas de cebadores utilizados en el ensayo de RT-qPCR.	65
Tabla 11. Listado de condiciones de experimentación para el ensayo MTT según la línea celular usada.	66

Abreviaturas

- 2D:** dos dimensiones.
3D: tres dimensiones.
ADN: ácido desoxirribonucleico.
ADNc: ácido desoxirribonucleico codificante.
AFP: alfa-fetoproteína.
AH: arteria hepática.
AKT/PKB: proteína quinasa B, del inglés *protein kinase B*.
ARN: ácido ribonucleico.
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
ASV: virus de sarcoma aviar, del inglés *avian sarcoma virus*.
BCA: ácido bicinconínico, del inglés *BiCinchoninic Acid*.
BSA: suero de albúmina bovina, del inglés *bovine serum albumin*.
CB: conducto biliar.
CD3: grupo de diferenciación 3, del inglés *cluster of differentiation 3*.
CD45: grupo de diferenciación 45, del inglés *cluster of differentiation 45*.
CDE: deficiente en colina y suplementada con etionina.
CEH: célula estrellada hepática.
CEHa: célula estrellada hepática activada.
CEHi: célula estrellada hepática inactivada.
CEHq: célula estrellada hepática quiescente.
CK19: citoqueratina 19.
CNP: célula no parenquimal.
CPH: célula progenitora hepática.
DDC: 3.5-Dietoxicarbinol-1.4-dihidrocolina.
DEN: dietilnitrosamina.
dH₂O: agua destilada.
DMEM: medio Dulbecco modificado, del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.
DMSO: dimetilsulfóxido.
DO: densidad óptica.
E-Cadherina: cadherina epitelial.
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*.
EHNA: esteatohepatitis hepática no alcohólica.
EMT: transición epitelio-mesenquimal, del inglés *epithelial-mesenchymal transition*.
Epcam: molécula de adhesión celular epitelial, del inglés *epithelial cell adhesion molecule*.
ERK: quinasa regulada por señal extracelular, del inglés *extracellular signal-regulated kinase*.
EtOH: etanol.
FBS: suero fetal bovino, del inglés *fetal bovine serum*.

FCIII: clon fetal III, del inglés *fetal clone III*.

FGF: factor de crecimiento fibroblástico, del inglés *fibroblast growth factor*.

FGFR: receptor de factor de crecimiento fibroblástico, del inglés *fibroblast growth factor receptor*.

FOXO1: del inglés *forkhead box protein O1*.

FP: fibroblasto portal.

GDP: guanosín difosfato.

GFAP: proteína ácida fibrilar glial, del inglés *glial fibrillary acidic protein*.

GFP: proteína verde fluorescente, del inglés *green fluorescent protein*.

GLUT4: transportador de glucosa tipo 4, del inglés *glucose transporter type 4*.

Grb2: adaptador del receptor del factor de crecimiento 2 del inglés *growth factor receptor-bound protein 2*.

GSK3β: glucógeno sintasa quinasa 3 beta, del inglés *glycogen synthase kinase 3 beta*.

GTP: guanosín trifosfato.

HB: hepatoblastoma.

HCC: hepatocarcinoma.

hCEH: célula estrellada hepática humana.

HGNA: hígado graso no alcohólico.

HNF4α: factor nuclear 4 α de hepatocito, del inglés *hepatocyte nuclear factor 4α*.

HP: hepatectomía parcial.

HRP: peroxidasa de rábano, del inglés *horseradish peroxidase*.

IGF-1/IGF-2: factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2, del inglés *insulin-like growth factor 1 y 2*.

IGF-1R: receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1, del inglés *insulin-like growth factor 1 receptor*.

IR: receptor de insulina, del inglés *insulin receptor*.

IRKO: delección del receptor de insulina, del inglés *insulin receptor knockout*.

IRS: sustrato receptor de insulina, del inglés *insulin receptor substrate*.

Irs1^{-/-}: ratón deficiente del gen *Irs1*.

Irs2^{-/-}: ratón deficiente del gen *Irs2*.

KRLB: dominio de unión a quinasa reguladora, del inglés *kinase regulatory-loop binding*.

LIRKO: delección específica de hígado del receptor de insulina, del inglés *liver insulin receptor knockout*.

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, del inglés *mitogen-activated protein kinases*.

MEK 1/2: quinasa de la quinasa regulada por señal extracelular 1/2, del inglés *mitogen-activated protein kinase or extracellular signal-regulated kinase 1/2*.

MET: transición mesenquimal-epitelial del inglés *mesenchymal-epithelial transition*.

Mic1-1c3: citoquina inhibidora de macrófagos 1-1c3, del inglés *macrophage inhibitory cytokine 1-1c3*.

MitoC: mitomicina C.

MMP: metaloproteínasa.

MOI: multiplicidad de infección, del inglés *multiplicity of infection*.

mTOR: diana de la rapamicina en mamíferos, del inglés *mammalian target of rapamycin*.

N-cadherina: cadherina neural.

NNM: N-nitroso morfolina.

NP-40: Nonidet P-40.

OCT: compuesto de temperatura óptima de corte del inglés *optimal cutting temperature*.

OCT: temperatura óptima de corte, del inglés *optimum cutting temperature*.

OD: densidad óptica, del inglés *optical density*.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: tampón fosfato salino, del inglés *phosphate-buffered saline*.

PFA: paraformaldehído.

PH: dominio pleckstrin homólogo.

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa, del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*.

PIP: proteína inducible por prolactina.

PKC: proteína quinasa C, del inglés *protein kinase 3*.

PLL: polilisina, del inglés poly L- lysine.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo, del inglés *phenylMethylSulfonyl fluoride*.

PTB: dominio de unión a fosfo-tirosina del inglés phospho-tyrosine binding.

PVDF: fluoruro de polivinilideno, del inglés *PolyVinyl DiFluoride*.

RAF: proteína de fibrosarcoma acelerado rápidamente, del inglés *rapidly accelerated fibrosarcoma*.

RAS: proteína del sarcoma de rata, del inglés *rat sarcoma*.

Rpm: revoluciones por minuto.

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés *quantitative real-time polymerase chain reaction*.

SDS: dodecilsulfato sódico, del inglés *sodium dodecyl sulfate*.

SDS-PAGE: gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS, del inglés *SDS-polyAcrylamide gel electrophoresis*.

SH2: dominio 2 de la proteína SRC.

shRNA: ARN de horquilla corta, del inglés *short hairpin RNA*.

SOS: del inglés *son of sevenless homolog*.

SPF: libre de agentes patógenos específicos, del inglés *specific pathogen free*.

Spp1: osteopontina 1 o fosfoproteína secretada 1, del inglés *secreted phosphoprotein 1*.

TBST: tampón fosfato salino con tween, del inglés *tris buffered saline tween 20*.

TGF-β: factor de crecimiento transformante β, del inglés *transforming growth factor β*.

THY1: antígeno celular del timo 1, del inglés *thymus cell antigen 1*.

TNF: factor de necrosis tumoral, del inglés *tumor necrosis factor*.

TrisHCL: hidrocloreuro de tris, del inglés *tris hydrochloride*.

UR: unidades relativas.

VC: vena central.

VHB: virus de la hepatitis B.

VHC: virus de la hepatitis C.

VP: vena porta.

WT: fenotipo salvaje, del inglés *wild type*.

α-SMA: α-actina del músculo liso del inglés *α-smooth muscle actin*.

#c: número de copias genéticas. Ejemplo 2c, carga genética diploide; 4c, tetraploide; 8c, octaploide; 16c hexaploide.

Introducción

1.1 Señalización de Insulina/IGF-1

1.1.1 Insulina

La insulina es una hormona secretada en respuesta a altos niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), permitiendo la captación de glucosa por los diferentes tejidos y manteniendo así un estado de homeostasis, de acuerdo a las necesidades del organismo. Es sintetizada en el páncreas por las células β que se encuentran en los islotes de Langerhans, siendo liberada a la vena porta hepática, donde llega directamente al hígado [1]. Junto con el flujo sanguíneo de la arteria hepática (AH), viaja por los sinusoides hepáticos abandonando el hígado a través de las venas hepáticas. El hígado es uno de los principales tejidos diana de la insulina y se encuentra altamente expuesto a esta hormona, pues a su paso por este órgano, se clarifica entre el 50-80% de la insulina producida [2, 3]. Esta reduce la liberación de glucosa, inhibiendo su liberación a partir de glucógeno (glucogenólisis) y promoviendo la síntesis de glucógeno a partir de glucosa (glucogénesis). Además también promueve la síntesis y almacenamiento de ácidos grasos como fuente energética futura [4]. La insulina restante que es liberada por las venas hepáticas al torrente sanguíneo, llegando a otros tejidos clave como el músculo o el tejido adiposo. En estos, la insulina estimula la captación de glucosa, produciéndose así la glucogénesis en el músculo, y la lipogénesis en el tejido adiposo. Además, a nivel celular también ha sido descrita su actuación promoviendo el crecimiento, la proliferación, supervivencia y diferenciación [4].

1.1.2 Factor de crecimiento insulínico (IGF)

Las hormonas IGF de tipo I (IGF-1) y de tipo II (IGF-2) comparten una similitud del 50% con la proinsulina [5]. Durante los periodos prenatales, es IGF-2 la que se expresa en mayor medida, promoviendo el crecimiento embrionario, mientras que en etapas postnatales IGF-1 aumenta su expresión adquiriendo un papel predominante [6].

IGF-1 se produce en todos los tejidos del cuerpo, aunque mayoritariamente en el hígado (75%) ante el estímulo de la hormona del crecimiento [7]. IGF-2 sin embargo, se expresa en multitud de tejidos y no es regulada por la hormona del crecimiento [8]. IGF-1 está implicado principalmente en el crecimiento celular, pero también está involucrada en procesos metabólicos, reparación tisular y estados patológicos. Por ejemplo, ante infecciones crónicas de hepatitis B o C (VHB o VHC) y ante estados de cirrosis hepática, los hepatocitos inducen la expresión del receptor de IGF-1 (IGF-1R). Los pacientes con enfermedad crónica del hígado, presentan altos niveles de la hormona del crecimiento, aunque sus niveles de IGF-1 en sangre son bajos en comparación con sujetos sanos [9, 10] sugiriendo así un papel de IGF-1 en estados patológicos hepáticos. En hepatocarcinogénesis, también numerosos estudios han demostrado que la expresión de IGF-1 se reduce, mientras que los niveles de su receptor aumentan, dando lugar al crecimiento y proliferación de células cancerígenas [11].

1.1.3 Receptores de insulina e IGF-1

El receptor de insulina (IR) y el IGF-1R se componen de dos unidades α extracelulares y dos unidades β transmembrana con dominios quinasa, unidos entre si por puentes disulfuro, compartiendo una similitud del 60% [10]. El IGF-1R tiene una gran afinidad por IGF-1 e IGF-2, aunque la insulina también tiene la capacidad de activarlo con una menor afinidad (entre 50 y 100 veces menor) [12]. Por otra parte, debido a un procesamiento alternativo del ARNm, el IR puede encontrarse en su forma α o β . La isoforma IR- α se expresa de forma predominante durante el periodo prenatal y en el

cerebro adulto, poseyendo gran afinidad por insulina y también por IGF-2. Por otra parte, IR- β está expresado predominantemente en tejidos adultos y tiene una mayor afinidad por la insulina, aunque también pueden señalar a través de él con menor afinidad IGF-1 e IGF-2 [13]. Además, existe un tipo de receptor híbrido en el que una de las cadenas α - β pertenece al IR y otra al IGF-1R, poseyendo este una mayor afinidad por las IGFs que por la insulina [14] (Figura 1).

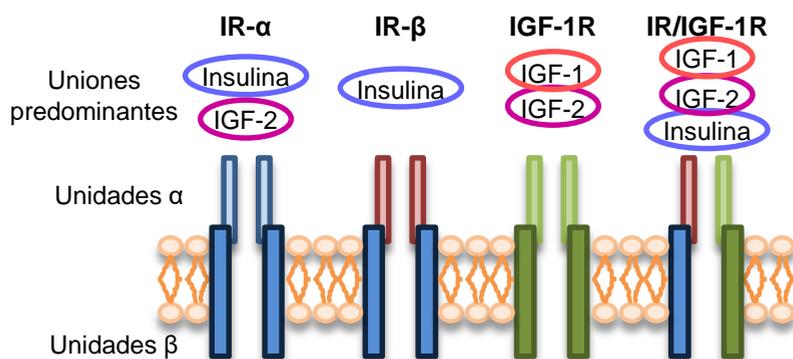


Figura 1. Representación esquemática de los receptores de insulina e IGF-1. Cada receptor está compuesto por dos unidades extracelulares α que interactúan de forma específica con cada hormona, activando la actividad tirosina quinasa de las unidades transmembrana β . IR- α , isoforma α del receptor de insulina; IR- β , isoforma β del receptor de insulina; IGF-1R, receptor de IGF-1; IGF-1 e IGF-2, factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2.

Tras la unión de estas hormonas a la cadena α de sus receptores, se origina un cambio conformacional que da lugar a la autofosforilación de los dominios tirosina quinasa de la subunidad β intracelular. De esta manera, se activa la actividad tirosina quinasa del receptor, activando una cascada de fosforilación [10].

Mediante el estudio del fenotipo de animales carentes de ambos receptores se ha demostrado que la señalización a través de ellos es crucial para la vida, relacionándose principalmente la señalización de insulina con la respuesta metabólica y la de IGF-1 con el crecimiento. El modelo murino carente del receptor de insulina (IRKO) muere entre las 48-72 horas después de su nacimiento debido a una hiperglucemia severa y cetoacidosis diabética [15]. Por otra parte, el modelo murino carente del receptor de insulina

específico del hígado (LIRKO) sobrevive, aunque muestra un cuadro de resistencia a insulina e incapacidad de mantener la homeostasis de glucosa, presentando altos niveles de insulina (hiperinsulinemia) [16]. Por otra parte, el modelo murino carente de IGF-1R tampoco es viable, exhibiendo una reducción en peso del 55% y muriendo tras pocas horas de vida debido a una insuficiencia respiratoria [17]

1.1.4 Proteínas substrato receptor de insulina (IRS)

Las proteínas efectoras de las rutas de señalización intracelular no son directamente fosforiladas por los IR e IGF-1R, sino que son activadas por medio de unas proteínas conocidas como los substratos receptores de insulina (IRS), propagando así la señalización intracelular de diferentes vías de señalización. Se han descrito seis tipos de proteínas IRSs, poseyendo todas ellas una gran similitud estructural en la zona N-terminal, conteniendo dos dominios de unión a IR e IGF-1R, el dominio pleckstrin homólogo (PH) y dominio de unión fosfotirosina (PTB) [18]. El dominio PH promueve uniones proteína-proteína, facilitando la unión de las IRSs con los receptores y las uniones proteína-fosfolípidos, promoviendo la interacción de las IRSs con la membrana celular [19, 20] Por otra parte, el dominio PTB promueve la interacción con IR e IGF-1R activados [21]. Estos dominios actúan como adaptadores, permitiendo la interacción transitoria de las proteínas IRSs con sus receptores. La zona C-terminal ha sido descrita como la más variable entre las distintas proteínas IRSs. Esta posee múltiples residuos tirosina que tras la activación y autofosforilación de los IR e IGF-1R, se fosforilan, promoviendo la unión con otras proteínas intracelulares efectoras mediante homología con el dominio 2 de la proteína SRC (SH2), que reconoce y se une a fosfotirosinas específicas, activando diferentes cascadas de señalización [22, 23]. Además, IRS2 contiene un dominio único que otorga especificidad de unión al receptor IR, conocido como dominio de unión a quinasa reguladora (KRLB) [21] (Figura 2).

De las seis proteínas IRSs descritas hasta la fecha, cinco se expresan en humanos, todas excepto IRS3, que se expresa únicamente en

roedores [24]. Las IRSs se expresan de forma diferencial entre los distintos tejidos demostrándose que IRS1 e IRS2 son las que poseen un papel principal en la homeostasis de la glucosa y el crecimiento [18].

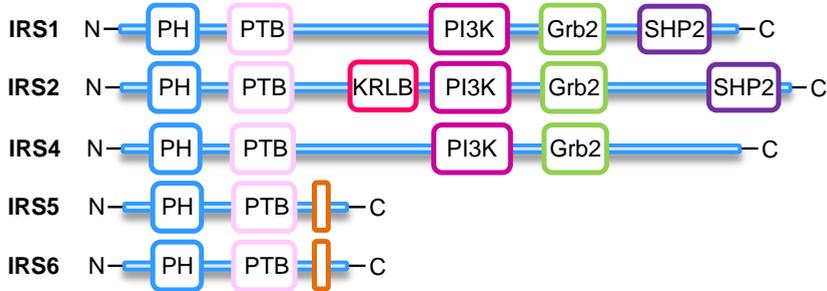


Figura 2. Estructura de las proteínas IRSs. Representación de las proteínas IRSs de origen humano, desde su extremo N-terminal (N) al C-terminal (C), conteniendo dominios de unión PH y PTB comunes. La zona C-terminal es la más heterogénea con diferentes dominios SH2 (PI3K, Grb2 y SHP2). La proteína IRS2 además contiene un dominio KRLB y las IRS5/6 contienen dominios homólogos en la zona C-terminal. Imagen modificada de [18]. N, extremo N-terminal; C, extremo C terminal; IRS, substrato receptor de insulina; PH, dominio pleckstrin homólogo; PTB, dominio de unión a fosfo-tirosina; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinasa; Grb2, adaptador del receptor del factor de crecimiento 2; SHP2 (dominio SH2 proteína-tirosina fosfatasa-2); KRLB, dominio de unión a quinasa reguladora.

El modelo murino carente de *Irs1* (*Irs1*^{-/-}) muestra una tolerancia normal a la glucosa, pero presenta retraso en el crecimiento, un aumento en la longevidad y fallos en la señalización de insulina. Este desarrolla resistencia a insulina, especialmente en el músculo pero sin llegar a progresar a un fenotipo diabético debido a un aumento en la secreción de insulina como medida compensatoria [25]. Por este motivo, IRS1 ha sido atribuido a una señalización predominante de IGF-1. Además, cabe destacar que la re-expresión de IRS1 en el hígado de estos animales permite normalizar la sensibilidad a insulina [26].

Por otra parte, el modelo murino carente de *Irs2* (*Irs2*^{-/-}), al contrario del de *Irs1*^{-/-}, presenta un deterioro progresivo de la homeostasis de glucosa. A medida que los animales son más longevos los niveles de glucosa en sangre se elevan, desarrollando diabetes de forma progresiva. En etapas adultas (6-8 semanas) presentan intolerancia a la glucosa, mostrando un fenotipo diabético a las 10 semanas de vida. Este se da debido al desarrollo de resistencia a insulina en el músculo esquelético y el hígado junto con una

pérdida de la masa de células β pancreáticas. A causa de este fenotipo la vida máxima de los machos suele ser de 12 semanas, mientras que en las hembras la diabetes progresa de forma más lenta, sobreviviendo hasta las 24 semanas de vida. Cabe mencionar, que aunque la resistencia a insulina en este modelo se dé particularmente a nivel hepático, el desarrollo del hígado es aparentemente normal, mostrando defectos en el crecimiento del cerebro y testículos principalmente [27].

El estudio de IRS1 e IRS2 en el desarrollo embrionario del hígado en ratas ha demostrado que IRS2 se expresa en mayor medida y promueve la señalización de insulina durante esta etapa [28]. En etapas adultas, diferentes estudios han relacionado IRS1 con una actividad mayoritaria en el músculo esquelético, mientras que IRS2 ejercería un papel predominante en el hígado, grasa y músculo [29, 30]. Además, IRS2 ha sido identificado como el mayor efector a través de fosfoinositol-3 quinasa (PI3K) de la señalización de insulina en los hepatocitos, e IRS1 como el principal mediador de las señales a través de IGF-1 [31]. Estos datos indican que a pesar de la similitud proteica entre IRS1 e IRS2, su regulación y mecanismo de acción es diferencial.

Por otra parte, la proteína IRS3 se expresa mayoritariamente en el tejido adiposo, hígado, pulmones y en el cerebro de roedores. Sin embargo, no está presente en humanos [32]. El modelo murino carente de *Irs3* (*Irs3*^{-/-}), no produce un fenotipo alterado en la señalización de insulina/IGF-1 [33].

La proteína IRS4 tampoco parece tener un gran papel en la transmisión de la señalización de insulina/IGF-1, pues el modelo murino carente de esta muestra efectos mínimos en el crecimiento y en la tolerancia de la glucosa [34].

Finalmente, las proteínas IRS5 e IRS6 (también conocidas como DOK4 y DOK5 respectivamente) poseen una expresión muy limitada. La zona N-terminal es similar al resto de las proteínas IRSs, sin embargo, la zona C-terminal por la que se unen a las proteínas efectoras de la señalización insulina/IGF-1 se encuentra truncada [18].

1.1.5 Cascada de señalización insulina/IGF-1

Las proteínas IRSs fosforiladas en los residuos tirosina modulan diferentes cascadas de señalización de insulina/IGF-1 mediante la unión con proteínas efectoras a través de los dominios SH2 (Figura 3). Las principales rutas de activación son las siguientes:

Ruta PI3K-AKT: Esta ruta es la principal responsable del papel metabólico de la insulina, promoviendo la síntesis de glucógeno y la internalización celular de glucosa. PI3K es activada por las proteínas IRSs junto con GRB2. Esta fosforila a otras proteínas aguas abajo que darán lugar a la fosforilación tanto de AKT (también conocida como proteína quinasa B, PKB) como de la proteína quinasa C (aPKC). AKT fosforila a la proteína glucógeno sintasa quinasa 3- β (GSK3 β), quedando inactiva e induciendo así la síntesis de glucógeno, vía diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR). Además, AKT también fosforila al factor de transcripción *forkhead box protein O1* (FOXO1), produciéndose su traslocación desde el núcleo al citoplasma, inhibiéndose así rutas proapoptóticas y promoviendo rutas de crecimiento celular, proliferación y diferenciación. La señalización de PI3K a través de AKT y PKC, también induce la traslocación de la proteína transportadora de glucosa tipo 4 (GLUT4) a la membrana plasmática, permitiendo el transporte extracelular de glucosa [18]. Por otra parte, la fosforilación de mTOR a partir de la activación de PI3K induce una cascada de señalización que controla la formación de ribosomas y la síntesis de proteínas, entre ellas c-MYC y ciclina D, promoviendo por tanto la proliferación y crecimiento celular [35].

Ruta RAS-MAPK: Las IRSs fosforiladas se unen tanto a GRB2 como a *son of sevenless homolog* (SOS), desencadenando una cascada de señalización resultante en la activación de RAS. Esta induce a su vez otra cascada que promueve la fosforilación de MEK1/2 (proteínas quinasa activadas por mitógenos) que fosforilan a ERK1/2 (quinasas reguladas por señales extracelulares). Una vez fosforiladas, se traslocan al núcleo activando distintos factores de transcripción. Esta ruta promueve la supervivencia celular, el crecimiento y la división [35].

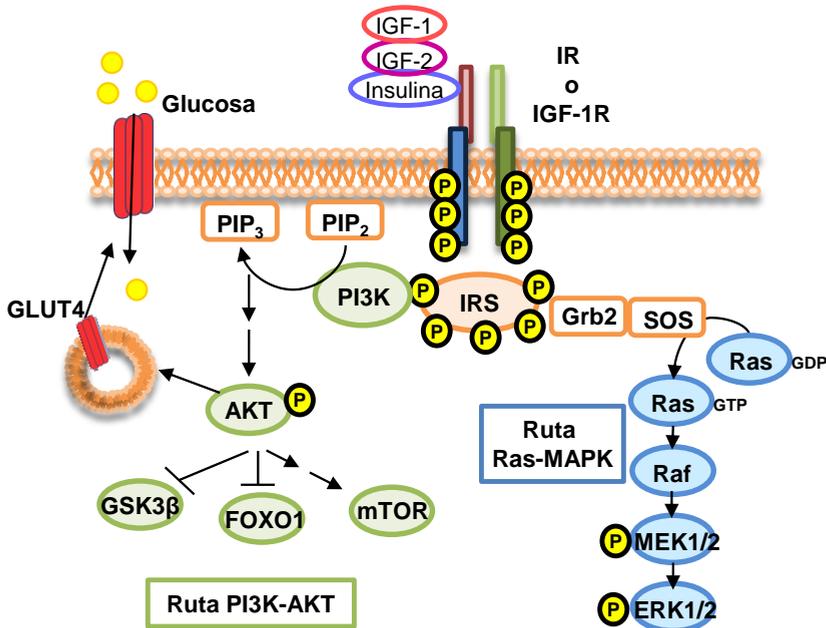


Figura 3. Ruta de señalización de insulina/IGF-1 a través de Ras-MAPK y PI3K-AKT esquematizada. Imagen modificada de [36] y [37]. IGF-1 e IGF-2, factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2; IR, receptor de insulina; IGF-1R, receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1; PIP, proteína inducible por prolactina; GLUT4, transportador de glucosa tipo 4; AKT, proteína quinasa B; GSK3β, glucógeno sintasa quinasa 3 beta; FOXO1, *forkhead box protein O1*; mTOR, diana en mamíferos de la rapamicina; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinasa; IRS, substrato receptor de insulina; Grb2, adaptador del receptor del factor de crecimiento 2; SOS, son of sevenless homolog; Ras, proteína del sarcoma de rata; GDP, guanosin difosfato; GTP, guanosin trifosfato; Raf, proteína de fibrosarcoma acelerado rápidamente; MEK 1/2, quinasa de la quinasa regulada por señal extracelular 1/2; ERK, quinasa regulada por señal extracelular; P, grupo fosfato.

1.2 Resistencia a insulina, diabetes mellitus tipo 2 y obesidad

La resistencia a insulina se define como una condición en la que se necesitan altos niveles de insulina para mantener el estado de normoglucemia (niveles normales de glucosa en sangre) y en la que se produce una falta de respuesta por parte del hígado, músculo esquelético y del tejido adiposo a esta hormona. La resistencia a insulina es un rasgo clave en pacientes con diabetes tipo 2 u obesidad, patologías que se caracterizan por suponer un alto riesgo en el desarrollo de enfermedades crónicas hepáticas [38].

Durante el desarrollo de la diabetes tipo 2, los tejidos diana de la insulina reducen la sensibilidad a esta, como consecuencia se produce un aumento de los niveles normales de secreción de insulina por el páncreas a modo de compensación para tratar de alcanzar un estado normoglucémico. Esta condición es conocida como hiperinsulinemia y se la relaciona con el desarrollo del cáncer [39]. El sobreesfuerzo del páncreas y la creciente insensibilidad a la acción de la insulina en los tejidos periféricos conllevan una pérdida de funcionalidad y número de células β pancreáticas (llegándose a describir la pérdida de entre el 40-60% de la masa total de células β). Como consecuencia se produce una reducción drástica de síntesis de insulina y un aumento de los niveles de glucosa en sangre. La causa de la reducción de células β se encuentra aún bajo estudio, aunque se atribuye a diferentes posibles eventos, como el aumento en la tasa apoptótica [40] o la desdiferenciación de células β a células α productoras de glucagón [41].

La obesidad, definida como una acumulación anormal de tejido adiposo en el que el sujeto supera o iguala su índice de masa corporal en 30 kg/m² y que puede dar lugar a diferentes problemas de salud [42], también ha sido relacionada con la resistencia a insulina en diversos estudios epidemiológicos [43–45]. Aún no se ha determinado la causa principal que hace que los sujetos con obesidad desarrollen resistencia a insulina, pero se han descrito diferentes eventos observados en estos sujetos y que podrían dar lugar a una disminución de la sensibilidad a insulina. En primer lugar, el aumento de grasa visceral está asociado con la acumulación de lípidos en el hígado, y por tanto con una función defectuosa de este. Se postula que el estrés oxidativo e inflamación promovidos por compuestos provenientes del metabolismo de los lípidos, como citoquinas proinflamatorias y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), activarían a las células estrelladas del hígado. Estas darían lugar a la deposición de proteínas fibrogénicas, impidiendo el correcto funcionamiento de este tejido y promoviendo así la resistencia a insulina [46].

Según la organización mundial de la salud (OMS), el número de pacientes con diabetes tipo 2 o con obesidad ha aumentado drásticamente

durante los últimos años y se prevé que siga en aumento, convirtiéndose en pandemias mundiales y en retos que afrontar en el siglo XXI [47]. En concreto, según la federación internacional de diabetes, 58 millones de europeos padecen diabetes tipo 2 y se prevé que esta cifra aumente un 16% para 2045 [48]. De acuerdo con la OMS, entre el 10-30% de los europeos padecen obesidad [42].

1.3 Resistencia a insulina y patologías hepáticas

La resistencia a insulina está relacionada con diferentes aspectos patológicos. En el hígado en concreto, ha sido relacionada con el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA), caracterizada por esteatosis hepática (acúmulo de triglicéridos en el hígado) no causada por la ingesta de alcohol [49]. A su vez, la acumulación de lípidos en el hígado promueve la activación de macrófagos, incrementando la inflamación hepática, activando las células estrelladas del hígado y promoviendo la deposición de colágeno y la consecuente acumulación de fibrosis, favoreciendo así el estado de resistencia a insulina y dando lugar a esteatohepatitis hepática no alcohólica (EHNA) [50]. El daño hepático crónico puede progresar desde la fibrosis hasta la formación de cirrosis, y en último término, a hepatocarcinoma (HCC), estimándose incluso que HGNA puede ser la causa más común de desarrollo de HCC en los países desarrollados [51].

La fibrosis consiste en la acumulación de proteínas fibróticas que forman la matriz extracelular y que participan en la respuesta de cicatrización ante daños hepáticos. Supone un mecanismo de respuesta al daño, que una vez cesado debe ser eliminado, dado que la continua acumulación de matriz extracelular destruye las estructuras hepáticas e imposibilita la correcta función del hígado [52]. Los estados más avanzados de fibrosis hepática en los que no sólo aparece una mayor deposición de matriz, sino que también se produce una disrupción tisular, alteración de la circulación sanguínea y riesgo de fallo hepático, se conocen como cirrosis [52] (Figura 4).

La resistencia a insulina ha sido relacionada con la progresión de fibrosis en enfermedades hepáticas como EHNA y VHC, pero los mecanismos que llevan a esta relación se desconocen [53]. Además, se ha observado que en pacientes con HGNA o EHNA los niveles hepáticos de IRS2 se encuentran reducidos [54, 55]. HGNA está asociada no sólo a la resistencia a insulina, sino también al estado de hiperinsulinemia. Los últimos estudios indican que entre un 70-80% de individuos con obesidad o con diabetes tipo 2 presentan HGNA convirtiéndose en una de las afecciones crónicas hepáticas más comunes [56].

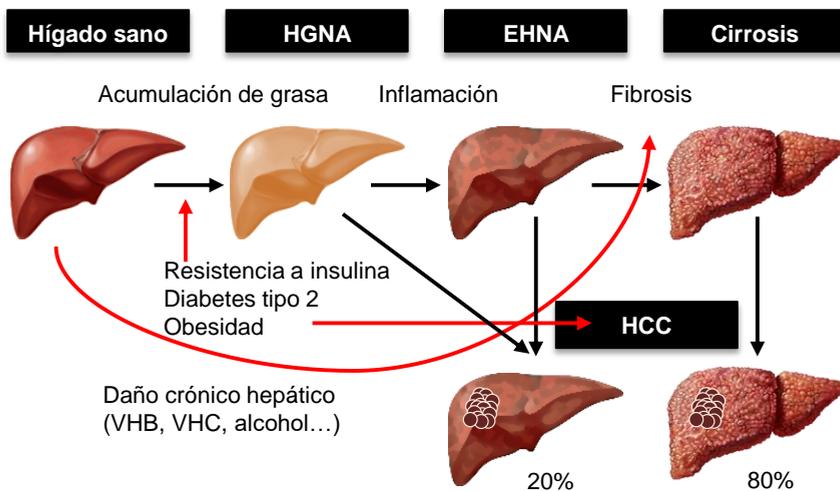


Figura 4. Esquema de la progresión del daño hepático. Factores como la diabetes tipo 2 y la obesidad, caracterizadas por el desarrollo de resistencia a insulina, promueven la acumulación de grasas en el hígado y el desarrollo de HGNA, que junto con la inflamación progresa hasta EHNA. El daño hepático crónico característico de esta enfermedad y otras patologías como infecciones de VHB, VHC o la ingesta continuada de alcohol, promueven las deposiciones fibróticas hepáticas y en último término el desarrollo de cirrosis. El HCC suele aparecer en un contexto de cirrosis hepática (alrededor del 80% de los casos de HCC), pero también en menor medida (20% aproximadamente) puede surgir en un ambiente no cirrótico. Además, la obesidad y diabetes tipo 2 son factores que incrementan el riesgo de padecer HCC. HGNA, enfermedad del hígado graso no alcohólico; EHNA, esteatohepatitis hepática no alcohólica; HCC, hepatocarcinoma; VHB, virus de la hepatitis B; VHC, virus de la hepatitis C.

El daño crónico en el hígado conlleva procesos de adaptación y de regeneración que tratan de reparar el deterioro. La resistencia a insulina también ha sido asociada con defectos en la regeneración hepática a partir de la proliferación de hepatocitos [16, 57], sin embargo, no está descrito el

papel que esta tendría en la regeneración hepática a partir de células progenitoras. A pesar de ello, la resistencia a insulina sí que ha sido relacionada con la progresión de EHNA y la aparición de las conocidas como “reacciones ductulares” donde las células progenitoras hepáticas se disponen creando estructuras con forma de ductos, rodeadas de estroma y células inflamatorias [58].

El daño crónico hepático está también vinculado con la aparición y desarrollo de hepatocarcinomas. La cirrosis supone el principal factor de riesgo de HCC, llegándose a observar en alrededor de un 80-90% de sujetos con HCC [59]. Existen a su vez otros factores de riesgo de HCC relacionados con el daño crónico hepático como infecciones crónicas víricas (VHB o VHC) [60], HGNA, diabetes tipo 2 u obesidad [61]. En concreto, el riesgo de padecer HCC aumenta en sujetos con obesidad (entre 1,5 a 4 veces más), con diabetes tipo 2 (entre 2 y 3 veces más) y con hiperinsulinemia (3 veces más) [51, 62]. Aparte de ser un factor de riesgo de HCC, la diabetes tipo 2 también ha sido relacionada con una mayor tasa de desarrollo de HCC en pacientes que ya padecen daño crónico hepático [63] o en pacientes con VHC [64]. Además, la resistencia a insulina también aumenta las probabilidades de desarrollar HCC en pacientes con VHC [65], habiéndose vinculado con la aparición de HCC en un modelo de EHNA en ratón [66].

Cabe destacar, que aunque comúnmente está extendida la creencia de que el HCC sólo aparece cuando el hígado posee tal nivel de daño que padece cirrosis, el HCC también se desarrolla en pacientes con HGNA sin cirrosis, con tasas de alrededor del 20% [67]. Esto sugiere que la resistencia a insulina y el ambiente proinflamatorio característico en estos pacientes pudieran promover la carcinogénesis sin necesidad de desarrollar fibrosis ni cirrosis. Además, tanto la obesidad como la diabetes tipo 2 y la hiperinsulinemia han sido relacionadas con un aumento en las probabilidades de padecer cáncer de hígado [68]. Las vías que promueven el desarrollo de HCC en estos pacientes no están completamente definidas, pero se atribuye a factores comunes en ambos sujetos, como son la

resistencia a insulina, la hiperinsulinemia, el incremento en los niveles de IGF, esteroides, péptidos de hormonas y marcadores de inflamación [68, 69].

1.4 Fisiología del hígado

1.4.1 Función

El hígado es un órgano del cuerpo humano que llega a abarcar un 2% aproximado del peso (1,5- 1,8 Kg), siendo el encargado de múltiples funciones como son el metabolismo de carbohidratos, el almacenamiento de glucógeno, vitaminas, hormonas y cofactores, sintetizar y secretar proteínas plasmáticas, filtrar toxinas y producir la bilis que promueve la digestión de las grasas. El hígado también detoxifica la sangre de alcohol y fármacos. En algunas ocasiones, los metabolitos provenientes de esta detoxificación son más tóxicos que el precursor, lo que causa daño hepático [70].

1.4.2 Anatomía del hígado

El hígado recibe abastecimiento sanguíneo de dos fuentes, por un lado, de la arteria hepática y por otro de la vena porta. La arteria hepática supe al hígado de sangre oxigenada, y supone alrededor del 25% del flujo sanguíneo que llega a este órgano. Sin embargo, el mayor suministro lo da la vena porta, un 75% aproximadamente del flujo sanguíneo [71]. Se trata de sangre venosa proveniente del sistema gastrointestinal (bazo, páncreas e intestino delgado) que transporta nutrientes y productos provenientes de la digestión al hígado, antes de pasar al corazón. Este flujo sanguíneo pasa a través de las venas mesentéricas superior e inferior que, junto con la vena esplénica, se unen y forman la vena porta. Esta a su vez se ramifica en el interior del hígado llegando la sangre a los sinusoides hepáticos donde es filtrada por las células de Kupffer para eliminar posibles patógenos que hayan escapado de las defensas del sistema gastrointestinal. El plasma llega a los hepatocitos, que gracias a la cantidad de enzimas que poseen, son capaces de romper y metabolizar los compuestos que este flujo lleva consigo. La sangre que pasa a través de los sinusoides llega finalmente hasta las venas

centrales, que se encargan de transportar el flujo sanguíneo a través de la vena inferior cava hasta el corazón [72].

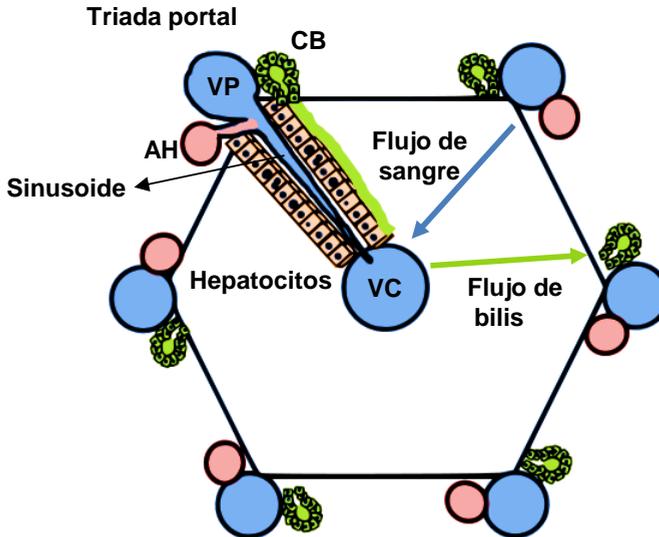


Figura 5. Representación del lobulillo hepático. Representación de la sección transversal con forma de hexágono en la que en cada vértice se observa la triada portal formada por una ramificación de la VP, otro de la AH y un CB. La sangre proveniente de la VP y AH fluye por los sinusoides hasta la VC, mientras que el flujo de bilis lo hace desde la VC hasta el CB. VP, vena portal; AH, arteria hepática; VC, vena central; CB, conducto biliar.

En el hígado también se produce un flujo de bilis, que es sintetizado por los hepatocitos y secretado a los canículos biliares que se disponen entre hepatocitos y que a través del Canal de Hering desembocan en los conductos biliares (red tubular formada por colangiocitos). Estos conductos biliares transportan la bilis hacia la vesícula biliar, donde se almacena y desde donde se envía al duodeno para participar en el metabolismo de las grasas. La bilis es una solución acuosa (95%) en la que están disueltas sales biliares, proteínas, fosfolípidos, colesterol, aminoácidos, vitaminas y metales pesados, así como toxinas y xenobióticos. La bilis tiene diversas funciones, siendo una de ellas la excreción de compuestos que debido a su alto peso molecular son difíciles de filtrar por los riñones. También participa en la emulsión de grasas para facilitar su absorción intestinal, eliminación de colesterol, excreción de inmunoglobulina A y citoquinas inflamatorias [73].

El hígado está estructurado en subunidades denominadas lobulillos, separadas entre sí por tejido conectivo. La sección transversal de estos tiene forma hexagonal en la que en el centro se dispone la vena central, y en cada vértice se encuentra la llamada triada portal, que consta de una rama de la AH, otra de la VP y un CB. Desde esta zona periporta se disponen los sinusoides por los que circula la sangre hacia la VC, pasando por los hepatocitos y favoreciendo la captación de los productos de la digestión por estos [72] (Figura 5).

1.4.3 Tipos celulares

Durante la etapa de desarrollo embrionario, el hígado se forma a partir tanto del endodermo como del mesodermo, de modo que contiene células epiteliales, como son los hepatocitos y los colangiocitos, y células mesenquimales, representadas por diversos tipos celulares como son las células estrelladas hepáticas, las células Kupffer, las endoteliales o los fibroblastos portales [74] (Figura 6).

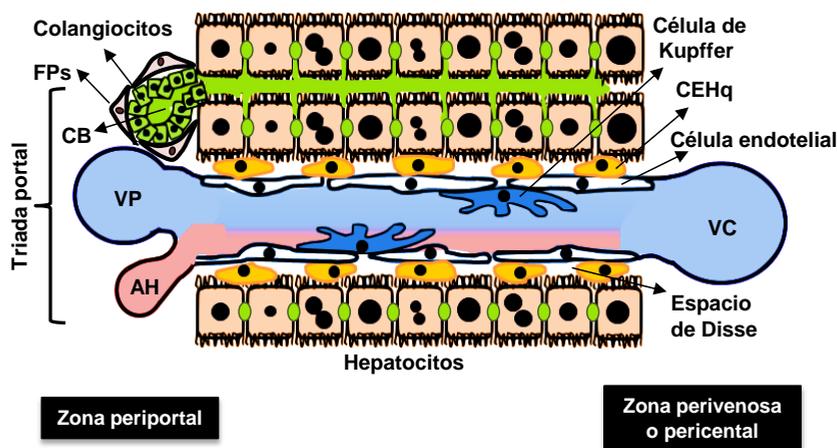


Figura 6. Esquema representativo de los tipos celulares residentes en el hígado. El flujo sanguíneo proveniente de la VP y la AH confluye en los sinusoides hepáticos por los que llega hasta la VC. Las células endoteliales forman una pared entre los sinusoides y el espacio de Disse, donde residen las CEHq, en contacto con los hepatocitos. Las células de Kupffer también se encuentran entre los sinusoides, llegando a alcanzar a los hepatocitos a través del espacio de Disse. Los hepatocitos se disponen por el tejido pudiendo poseer diferentes ploidías e incluso binuclearidad, y secretan, a través de canículos, bilis hacia los CBs, formados por colangiocitos y localizándose en la zona periporta. Estos a su vez se encuentran rodeados de FPs. El CB, la VP y la AH forman la conocida como triada portal.

VP, vena portal; AH, arteria hepática; VC, vena central; CB, conducto biliar; FPs, fibroblastos portales; CEHq, célula estrellada hepática quiescente.

Hepatocitos: Los hepatocitos son células epiteliales que constituyen la fracción principal celular del hígado, representando aproximadamente el 45-55% del número de células residentes hepáticas pero ocupando en torno al 70-80% del volumen [75, 76]. Esto se debe a que son células de gran tamaño, conteniendo una gran masa de retículo endoplasmático rugoso y ribosomas, que les confiere la capacidad de sintetizar abundantes cantidades de proteínas. Los hepatocitos provienen de precursores más indiferenciados productores de alfa-fetoproteína (AFP), denominados hepatoblastos. A medida que estos se van diferenciando se convierten en hepatocitos dejando de expresar este marcador fetal [77]. Se disponen formando filas desde la zona periportal hacia la zona perivenosa hepática separadas entre sí por canales vasculares por los que circula el flujo sanguíneo, conocidos como sinusoides. Son células polarizadas, que mantienen su membrana basal en dirección a las células endoteliales y su zona apical formando los canículos biliares [78]. La función de los hepatocitos radica no sólo en la síntesis de proteínas, sino también en su almacenamiento, transformación de carbohidratos, síntesis de colesterol, sales biliares y fosfolípidos, y en la detoxificación y modificación de un amplio espectro de sustancias [79]. El hígado presenta zonalidad, ejerciendo los hepatocitos residentes en las zonas periportales un mayor papel en la gluconeogénesis y en el metabolismo de las grasas, mientras que los residentes en las zonas perivenosas están más vinculados a la detoxificación [80].

La ploidización es una característica celular que se da en pocos tejidos de mamíferos, entre ellos el hígado, corazón o la médula ósea. Los hepatocitos tienen la característica de poder presentar diferentes ploidías, pudiendo variar según multitud de factores como la edad, el daño hepático, procesos de regeneración e incluso variaciones en la señalización de insulina [81]. Durante el desarrollo embrionario y primeras semanas de vida, los hepatocitos presentan un contenido de ADN diploide. A medida que se

produce el desarrollo postnatal y junto con el proceso de destete y comienzo de ingestión de alimentos sólidos, los hepatocitos comienzan a ganar ploidía debido a fallos en la citocinesis y a continuas rondas de síntesis de ADN [82]. En etapas adultas los humanos poseen en torno al 50% de hepatocitos poliploides, mientras que en ratones esta cifra ronda el 90% [83, 84]. La población más abundante es la tetraploide; estando en torno al 40% en humanos adultos y al 70% en ratones [81]. Además, también es frecuente la aparición de hepatocitos binucleares pudiéndose observar alrededor del 30% dependiendo de la edad y la cepa de ratón [83, 85]. El aumento de la ploidía está asociado a múltiples procesos como la diferenciación, alteraciones en la actividad metabólica [86], reducción de sensibilidad a insulina en hepatocitos [81] o la protección contra la pérdida de genes supresores de tumores [83]. La ploidía hepatocítica suele presentar variaciones en diferentes estados fisiopatológicos. Se han descrito cambios en el perfil de ploidía hepatocítica caracterizados por un incremento de hepatocitos con un contenido igual o mayor a $8c$ y pérdida de hepatocitos $2c$ durante enfermedades hepáticas como HGNA [87]. En VHB y VHC se ha observado una reducción en el porcentaje de hepatocitos mononucleares diploides, donde el incremento en ploidía se correlaciona con la severidad de la infección. Además, la proporción de hepatocitos binucleares es mayor en los casos de VHB que de VHC, mostrando por tanto patrones de ploidía diferenciales entre ambas infecciones [88]. Un estudio de poliploidía de hepatocarcinomas humanos ha demostrado que los HCC reducen su contenido de células binucleares, mientras que aumentan el contenido de células mononucleares poliploides. Este incremento se relaciona con una menor diferenciación tumoral y una mayor tasa de reaparición [89].

La función biológica de la poliploidía hepatocítica se desconoce, pero existen diferentes hipótesis en torno a este fenómeno. Una de ellas es la creencia de que un mayor número de copias de ADN puede aumentar la capacidad metabólica de la célula, y el hecho de evitar la citocinesis supondría un ahorro energético. Además, los hepatocitos son células expuestas a multitud de toxinas que podrían crear un daño genotóxico. La

poliploidía otorga la capacidad de tener varias copias genéticas que ante exposiciones nocivas se traduciría en un menor riesgo de pérdida de función de genes esenciales, suponiendo un papel protector en cáncer [90]. De hecho se ha demostrado que el aumento de hepatocitos 2c incrementa las posibilidades de sufrir hepatocarcinoma, debido a una mayor susceptibilidad de pérdida de función de genes supresores de tumores [83].

Colangiocitos: Junto con los hepatocitos forman parte de los dos tipos de células epiteliales hepáticas. No son muy abundantes, representando aproximadamente el 3-5% del número de células en el hígado. Los colangiocitos forman los conductos biliares que se extienden tanto intrahepáticamente como extrahepáticamente hasta el duodeno. Participan en la modificación de la composición de la bilis durante su recorrido por los conductos biliares. Su disfunción afecta a diferentes enfermedades hepáticas causando colestasis (disminución del flujo biliar) [91].

Células endoteliales sinusoidales: estas células de origen mesenquimal representan en torno al 30% de células hepáticas [75]. Forman los capilares o sinusoides por los que circula la sangre que proviene tanto de la vena porta como de la arteria hepática hasta la vena central. Se encuentran en contacto directo con el flujo sanguíneo, quedando este separado de los hepatocitos por estas células y por el espacio de Disse. Lo que las distingue de otras células endoteliales es su capacidad de formar poros celulares ante diferentes estímulos, que permiten el intercambio de compuestos entre el plasma sanguíneo y los hepatocitos (pasando previamente por el espacio de Disse), sin dejar de formar una barrera contra agentes patógenos [92, 93].

Células de Kupffer: estas células de origen mesenquimal representan en torno al 9% de células hepáticas [75]. Son los macrófagos residentes del hígado que se localizan en el lumen de los sinusoides, en contacto con las células endoteliales, pero también con los hepatocitos y células estrelladas hepáticas, gracias a prolongaciones citoplasmáticas que

atravesan el espacio de Disse. Se encuentran en contacto directo con posibles patógenos que puedan llegar al tejido hepático a través del flujo sanguíneo proveniente del tracto gastrointestinal, por lo que se observan en mayor abundancia alrededor de las zonas portales, por donde el flujo sanguíneo entra al hígado. Una vez activados al reconocer sustancias extrañas, liberan citoquinas, especies reactivas de oxígeno y otros compuestos que median la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Es por ello que las células de Kupffer participan en la respuesta primaria ante infecciones hepáticas, exposición a toxinas y procesos de inflamación entre otros [94].

Células estrelladas hepáticas (CEH): representan en torno al 11% de la fracción celular hepática [75]. Las CEH son células de origen mesenquimal que se encuentran de forma quiescente (CEHq) en el espacio perisinusoidal de Disse, entre los sinusoides y los hepatocitos. Se caracterizan por su alto contenido en vitamina A, almacenado en forma de retinil palmitato y por la expresión del marcador fibrilar glial ácido (GFAP) [95]. También es destacable su plasticidad, ya que pueden ser activadas (CEHa) por estrés oxidativo, citoquinas, señales proinflamatorias inducidas por las células de Kupffer y cuerpos apoptóticos provenientes de hepatocitos dañados [52]. Su activación consiste en la inducción de la proliferación y en la transdiferenciación a miofibroblastos productores de proteínas fibróticas como α -actina del músculo liso (α -SMA) o colágeno I, perdiendo también el almacenamiento de vitamina A [95]. De modo que, ante situaciones de daño hepático, las CEH migran al lugar del daño y sintetizan proteínas que forman parte de la matriz extracelular, cicatrizando así provisionalmente el tejido y participando por tanto en los procesos de fibrosis [96]. Además, las CEH también actúan como células señalizadoras liberando citoquinas y factores de crecimiento. El análisis de expresión genética a partir de CEH individuales ha demostrado que estas pueden presentar diferentes cambios transcripcionales durante los procesos regenerativos. Este estudio reciente define nuevos estados funcionales de las CEH que no habían sido descritos previamente, distinguiendo dos estados de activación, el profibrótico y el pro-

regenerativo, expresando α -SMA y colágenos o bien citoquinas y factores de crecimiento [97].

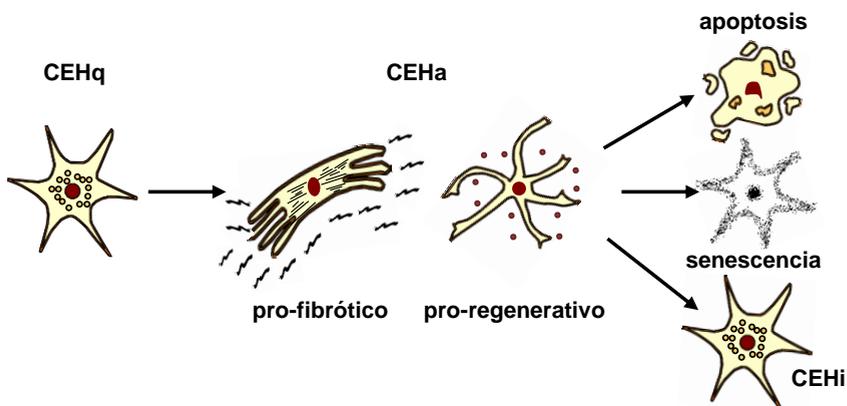


Figura 7. Transición fenotípica de las células estrelladas hepáticas. Normalmente se encuentran en estado quiescente (CEHq) en el que almacenan vitamina A. Tras el daño hepático se activan (CEHa) y pasan a un estado profibrótico en el que sintetizan componentes de la matriz extracelular. Además, también pueden presentarse en su estado pro-regenerativo productor de citoquinas y factores de crecimiento que inducen la reepitelización hepática. Una vez cesado el daño hepático, parte de estas se eliminan mediante apoptosis o senescencia y otras vuelven a un estado inactivado (CEHi) similar al quiescente. CEHq, célula estrellada hepática quiescente; CEHa, célula estrellada hepática activada; CEHi, célula estrellada hepática inactivada.

Una vez cesado el daño y repoblado el tejido con células epiteliales, los miofibroblastos llevan a cabo un proceso de resolución o reversión fibrótica. Durante este, los miofibroblastos entran en apoptosis [98], senescencia [99], o bien vuelven a un estado similar al quiescente, reduciendo la síntesis de proteínas fibróticas, pero con una habilidad de respuesta ante el daño más rápida. Este estado es conocido como inactivado (CEHi) [98] (Figura 7). Además, durante este estado de resolución se reduce la expresión de TIMP1, que ha sido relacionado con el bloqueo de enzimas degradadoras de matriz extracelular (como las proteínas metaloproteasas, MMPs) e inhibición de apoptosis de las CEH. De esta forma se promueve la degradación de las deposiciones extracelulares que han generado cicatrización del tejido, recobrando así la epitelización y correcta funcionalidad hepática. El daño crónico hepático, sin embargo, promueve

este estado de activación de CEH en el tiempo, provocando fibrosis y en último término fallo hepático [52].

Fibroblastos periportales (FP): Estas células, al igual que las CEHs, pertenecen a la fracción mesenquimal. Ante el daño hepático crónico se activan, proliferan y muestran un fenotipo miofibroblástico expresando marcadores de la matriz extracelular [100]. Su caracterización es aún controvertida, pero se sabe que se localizan alrededor de la vena porta y que son positivas para marcadores como THY1, Elastina, Fibulina y α -SMA entre otros [101]. Aunque las CEH son la mayor fuente de miofibroblastos hepáticos, la capacidad de producir proteínas fibróticas por los FPs también les hace formar parte de esta población [102].

1.5 Regeneración hepática a partir de células progenitoras

El hígado es uno de los órganos de mamíferos con mayor capacidad regenerativa. Han sido descritos dos mecanismos por los que el hígado puede dar lugar a regeneración, dependientes del tipo de daño. Cuando se produce un daño agudo como una hepatectomía parcial (HP) (escisión quirúrgica de una parte del tejido) la masa hepática es repoblada por la proliferación y/o crecimiento de los hepatocitos [103]. El proceso de regeneración hepática a partir de la proliferación de hepatocitos que se da tras una HP donde el resto del hígado mantiene un estado sano ha sido extensamente estudiado. Sin embargo, este escenario no está representado en la mayoría de patologías hepáticas, ya que el tejido suele presentar inflamación, senescencia de hepatocitos, aumento de deposiciones en la matriz extracelular debido al desarrollo de fibrosis y otra serie de complicaciones [104].

Cuando el hígado es dañado de forma crónica, los hepatocitos no son capaces de compensar la pérdida celular. Es en estos procesos de daño agudo (casados por fármacos o toxinas) y de daño crónico (patologías hepáticas como la cirrosis cuando las células progenitoras hepáticas (CPHs)

se activan en lo que se conoce como reacción ductular [105]. Las reacciones ductulares fueron descritas por primera vez en 1956 por Farber [106], y desde entonces son numerosos los estudios que tratan sobre ellas. Este tipo celular juega un papel fundamental durante la regeneración hepática debido a su capacidad de diferenciación tanto en hepatocitos como en colangiocitos, los dos tipos de células epiteliales presentes en el hígado [107]. Las CPHs se caracterizan por ser células pequeñas con un alto ratio núcleo/citoplasma [106]. Hasta la fecha no existe una combinación de marcadores específicos para su completa identificación debido a la heterogeneidad que las caracteriza [108]. Algunos de los marcadores más comúnmente utilizados para su seguimiento son SOX9, EPCAM, MIC1-1C3 o SPP1 entre otros [109–112]. Estas células pueden madurar hasta la formación de nuevos hepatocitos [112], promoviendo así la regeneración hepática. Son diferentes las patologías hepáticas en las que se describe la aparición de CPHs, como EHNA, VHB o VHC [113–115], entre otras.

A pesar de la multitud de estudios realizados con CPHs su procedencia es aún una cuestión por resolver, existiendo diferentes teorías al respecto. Debido a su capacidad de diferenciación a hepatocitos y a colangiocitos, se ha propuesto que las CPHs pudieran provenir de ambos tipos celulares. Por una parte, ha sido demostrado que los hepatocitos tanto de origen murino como de origen humano, pueden realizar un proceso de metaplasia en el que se transdiferenciarían a un estado progenitor. Este proceso sería reversible y por tanto promovería la regeneración hepática ante situaciones de daño crónico mediante la diferenciación de nuevo a hepatocitos [116, 117]. Aunque las CPHs no tienen la capacidad de diferenciarse a células no parenquimales, también hay otros estudios que defienden la hipótesis de que las células estrelladas del hígado no sólo participarían en la proliferación y diferenciación de CPHs, sino que ellas mismas podrían ser su origen [118, 119]. Mediante el seguimiento de células GFAP positivas se ha demostrado que las CEHs pueden desdiferenciarse a CPHs realizando una transición mesenquimal-epitelial (MET) [120].

En experimentación, la inducción de CPHs se puede realizar artificialmente mediante el uso de diferentes modelos experimentales. Uno de ellos es la dieta suplementada con 3-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC). Esta reproduce los principales eventos histopatológicos descritos durante la colestasis, caracterizada por una obstrucción del flujo biliar. La administración crónica de la dieta DDC genera tapones de porfirinas que obstruyen los conductos biliares y que producen como resultado un daño hepático. Esto genera una remodelación tisular en la que la acumulación biliar genera la expansión de estructuras ductulares formadas por células de carácter heterogéneo positivas para el marcador citoqueratina 19 (CK19), observándose desde colangiocitos que se encargan de la eliminación del acúmulo de bilis, hasta CPHs que pueden diferenciarse en colangiocitos y hepatocitos. Alrededor de estos ductos se acumulan células fibróticas observándose también infiltraciones de células inflamatorias [121].

1.5.1 El nicho progenitor

Las CPHs se disponen alrededor de la zona periportal formando estructuras ductulares rodeadas por un nicho progenitor compuesto por diferentes tipos celulares, matriz extracelular, factores de crecimiento y citoquinas que actúan en la activación, proliferación y diferenciación de CPHs [122]. La presencia de reacciones ductulares y de CPHs ha sido asociada con la de células inflamatorias y deposiciones fibróticas en patologías como EHNA [58], llegándose a relacionar la activación de CPHs con la progresión de fibrosis en EHNA, VHB y VHC [123–125]. Es por ello que se plantea la hipótesis de que las deposiciones de matriz extracelular sean necesarias para la activación de CPHs y para una correcta respuesta regenerativa, o si por el contrario, la presencia de CPHs promueve una excesiva acumulación de matriz favoreciendo la cirrosis [126]. Son múltiples los estudios que tratan de resolver esta cuestión analizando el papel que desempeñan las células inflamatorias y miofibroblastos sobre la población de CPHs. Por una parte, las células inflamatorias liberan citoquinas que han sido relacionadas con la estimulación e iniciación de la expansión de CPHs [122]. Mediante el seguimiento cronológico de células inflamatorias, citoquinas producidas por

ellas y CPHs, se ha descrito que la infiltración de linfocitos en el hígado precede a la liberación de citoquinas y expansión de CPHs [127]. Por otra parte, también ha sido descrito que la activación de miofibroblastos positivos para el marcador α -SMA y la deposición de matriz extracelular ocurren justo antes de la expansión de CPHs [128]. Estos estudios indican que tanto las células inflamatorias como fibróticas intervienen en la activación de CPHs. Además, factores paracrinos liberados por células de origen mesenquimal en el nicho fibrótico también han sido relacionados con la expansión de CPHs [129]. Por ejemplo el factor de crecimiento fibroblástico FGF7, cuya expresión promueve la expansión de CPHs y la supervivencia de animales tratados con dieta DDC [130].

1.6 Relación entre la reparación del daño crónico hepático y cáncer

La reparación del daño crónico implica una remodelación tisular dada la activación de diferentes poblaciones celulares (CEHs, CPHs, FPs...) que participan en la reparación epitelial. En estos procesos regenerativos y en cáncer se dan eventos comunes, como son la proliferación celular, inflamación, fibrogénesis, formación de nueva vasculatura, plasticidad celular a través de transiciones epitelial-mesenquimal (EMT) y MET, etc. La desregulación de estos eventos ha sido descrita por diversos estudios en HCC [131]. También participan en ambos procesos compuestos no celulares del microambiente, entre los que se incluye la matriz extracelular, factores de crecimiento, citoquinas proinflamatorias, etc, describiéndose multitud de mitógenos que estimulan tanto la reepitelización como el crecimiento de carcinomas [132].

La comunicación intercelular es importante durante los procesos de reepitelización, pero también durante la carcinogénesis donde las células cancerígenas son capaces de comunicarse con el microambiente tumoral promoviendo su crecimiento, metástasis y resistencia farmacológica de los tumores [133].

La inflamación es un evento que se da en las primeras etapas de la respuesta al daño. Multitud de observaciones clínicas muestran que la aparición de cáncer es frecuente en tejidos expuestos de forma crónica a inflamación [134]. La expansión de CPHs también se observa durante el daño crónico hepático, estando sujetas a procesos EMT y MET, debido a la desdiferenciación de hepatocitos a CPHs y diferenciación de CPHs a hepatocitos y colangiocitos [116]. Es frecuente que las células tumorales realicen procesos de EMT adquiriendo mayores capacidades migratorias e invasivas que propician la metástasis [135]. Además también se ha llegado a describir la presencia de marcadores de CPHs en HCCs [136]. El daño crónico también conlleva la activación de CEHs productoras de matriz extracelular. Una vez reparado el daño, se produce una resolución fibrótica donde estas son eliminadas [98]. Sin embargo, la permanente activación de estas da lugar a la acumulación de tejido fibrótico, donde el desarrollo de tumores es más frecuente [137]. Todas estas similitudes han hecho que algunos autores definan el cáncer como un proceso de cicatrización desmesurado y descontrolado [138]. Harold Dvorak propuso en 1986 que “los tumores son heridas que no cicatrizan”, siendo el cáncer un evento sin freno, resultando en una proliferación incontrolada, invasión y metástasis [139]. Por tanto, dadas las similitudes entre los eventos que dan lugar a la respuesta al daño crónico hepático y HCC, es posible que deficiencias en la coordinación de la reparación del hígado pudieran influir durante la formación o progresión de tumores hepáticos.

1.7 Hepatocarcinoma (HCC)

El hepatocarcinoma (HCC) es el tipo de cáncer de hígado más frecuente (entre el 70-85%), seguido del colangiocarcinoma (alrededor del 15%) [140]. Son varios los factores de riesgo de HCC, entre los que destacan las infecciones crónicas víricas como VHB o VHC, el síndrome metabólico asociado con EHNA, diabetes tipo 2, obesidad y otros factores como el consumo de alcohol, de tabaco y factores genéticos [61].

Según datos de OMS (año 2014), el cáncer de hígado fue el quinto tipo de cáncer con mayor prevalencia en hombres y el noveno en mujeres de entre el número de cánceres diagnosticados. Sin embargo, ocupa el segundo puesto en la lista de mortalidad por cáncer [141]. Cabe destacar que el índice de afección de HCC es variable según la región demográfica. Es más frecuente en países asiáticos y africanos, atribuido a que en estas regiones las infecciones víricas crónicas de VHB y VHC son más comunes. Aunque los índices de afección se están viendo reducidos en dichas áreas debido a la creciente vacunación contra el VHB y las terapias anti-víricas administradas. En contraposición, en Europa y América, los casos de HCC relacionados con EHNA, diabetes tipo 2 y obesidad son cada vez más frecuentes y puesto que estos desórdenes metabólicos se están convirtiendo en epidemias globales, se espera que la prevalencia de HCC aumente en dichas regiones [142].

1.8 Hepatoblastoma (HB)

El hepatoblastoma (HB) es el tipo de cáncer de hígado más común en niños, en concreto se suele dar desde el nacimiento hasta los cinco años de edad. Dado lo prematuro de su aparición durante el desarrollo, estos tumores se caracterizan por ser poco diferenciados histológicamente, presentando hepatoblastos (hepatocitos en proceso de diferenciación) y pudiendo ser tanto de carácter epitelial como mixto (mesenquimal-epitelial) [143].

Su desarrollo se ha relacionado con la afectación de varios síndromes. Uno de ellos es la poliposis adenomatosa familiar, que resulta en mutaciones que inactivan al gen supresor de tumores APC [144]. Otro es el Síndrome de Beckwith–Wiedemann, en el que los sujetos padecen trastornos del crecimiento caracterizado por gigantismo, presentando también hipoglicemia neonatal [145]. La trisomía del cromosoma 18 conocido como Síndrome de Edwards también ha sido relacionada con la aparición de HB [146]. El HB también puede aparecer en niños que no padecen estos síndromes, desconociéndose las causas de su desarrollo. Dado que su

aparición es frecuente al nacer, y teniendo en cuenta la necesidad de un periodo de desarrollo tumoral, hay estudios epidemiológicos que vinculan su aparición con posibles alteraciones durante el periodo gestacional, como son el bajo peso al nacer [147–149], la aparición de preeclampsia en la madre durante el embarazo [148] o el sobrepeso de esta [149, 150]. La etiología de estos desórdenes es multifactorial y resulta difícil vincularlos con un solo evento. Aun así, cabe destacar en todos ellos la presencia de desórdenes metabólicos, como la asociación de resistencia a insulina con pacientes con sobrepeso [151] o con preeclampsia [152], o una mayor incidencia en el desarrollo de resistencia a insulina durante la niñez de aquellos bebés que nacieron con bajo peso al nacer [153]. También han sido reportados menores niveles de IGF-1 en suero en madres de bebés que presentan bajo peso al nacer [154], al igual que las que padecen preeclampsia [155]. Estos factores sugieren una posible relación entre la afección de HB y la presencia de desórdenes metabólicos.

1.9 Heterogeneidad y clasificación de HCCs

El HCC se caracteriza por su gran heterogeneidad, no solo entre diferentes tumores, sino también intratumoral, lo que dificulta su tratamiento y estudio [156]. El origen de esta heterogeneidad se desconoce, pero se atribuye a diferentes factores como el origen de las células que sufren una transformación tumoral, las características que van adquiriendo las células a medida que avanza el tumor, las anormalidades cromosómicas que estas puedan desarrollar (observado en el 90% de los casos de HCC), las diferencias en la comunicación tumoral con su entorno, etc. [156, 157]. La clasificación molecular de los distintos tipos de HCC podría mejorar las perspectivas clínicas del HCC, facilitando un tratamiento personalizado según las características tumorales. Es por ello que numerosos estudios han tratado de clasificar los HCC según sus características histopatológicas y su comportamiento clínico, pero dado el gran número de alteraciones genéticas que estos presentan y su intraheterogeneidad, resulta un proceso complejo [158].

Un estudio de expresión genética ha clasificado en tres subgrupos moleculares los HCCs (S1-S3) mediante el uso de 8 cohortes de pacientes con un total de 603 pacientes. El subgrupo S1 se caracteriza por poseer un perfil genético de carácter progenitor, poco diferenciado y con baja supervivencia. El perfil S2 no posee cambios histológicos aparentes en comparación con el S1, pero sí son de mayor tamaño induciendo la activación de MYC y de AKT y presentando también bajo pronóstico de supervivencia. Finalmente, el perfil S3 se caracteriza por ser el más diferenciado y el de menor tamaño, teniendo estos pacientes mayores expectativas de supervivencia [159]. El entendimiento de los mecanismos que pueden llevar a los tumores a pertenecer a una de las diferentes subclases podría ayudar en el tratamiento y prevención del avance tumoral. Además, la elección de terapias personalizadas según el perfil molecular del tumor podría aumentar los índices de supervivencia de los pacientes con HCC [160].

1.10 EMT y cáncer

La EMT es un proceso por el que las células epiteliales realizan una transformación a un fenotipo mesenquimal, caracterizado por la pérdida de su polaridad, del contacto con otras células y por cambios morfológicos. El proceso de EMT se da durante el desarrollo embrionario, durante los procesos de reparación y regeneración tisular y durante la progresión tumoral, resultando crítico en la metástasis tumoral. En los procesos de metástasis, la EMT juega un papel crucial, siendo común la pérdida de expresión de proteínas de adhesión como E-Cadherina y la expresión de otras de origen mesenquimal como N-cadherina y vimentina. Este cambio de cadherinas da lugar a unas propiedades de adhesión diferentes, perdiendo la afinidad por células epiteliales adyacentes y ganando afinidad por células de origen mesenquimal, además de aumentar las capacidades migratorias e invasivas celulares [135]. Cabe destacar que aparte de cambios de expresión en cadherinas, durante la EMT también se producen cambios en el citoesqueleto de actina que favorecen la movilidad e invasión celular hacia

otros tejidos [161]. Además, la inducción de componentes sintetizados por células estromales favorecen los procesos de EMT y metástasis, como por ejemplo la expresión metaloproteinasas (MMPs) o TGF- β [162]. Es por estos motivos que el microambiente tumoral es crucial para la progresión del cáncer. La mayoría de HCCs se desarrollan en un ambiente profibrótico e inflamatorio, lo que se traduce en cambios estromales y en la matriz extracelular. El microambiente tumoral se compone tanto de células (CEH, fibroblastos asociados a cáncer, células inflamatorias...) como de citoquinas, factores de crecimiento y matriz extracelular sintetizadas por estas [133]. La comunicación entre el tumor y este microambiente modula el proceso de hepatocarcinogénesis pudiendo inducir EMT y las capacidades invasivas y metastásicas tumorales, siendo la progresión tumoral y metástasis la principal causa de muerte en sujetos con HCC [133].

1.11 Implicación de proteínas IRSs en cáncer

Las proteínas IRSs, previa estimulación de sus receptores, activan vías de señalización vinculadas con procesos oncogénicos como PI3K/AKT/mTOR y RAS/MAPK, por lo que han sido extensamente estudiadas como posibles proteínas promotoras del cáncer [163, 164]. Sin embargo, su actuación también es esencial para una correcta señalización de insulina/IGF-1 y el mantenimiento de la homeostasis corporal, habiendo sido la resistencia a insulina vinculada con la aparición de cáncer [68], indicando que una falta de señalización a través de las IRSs también podría resultar perjudicial.

Son varios los estudios que vinculan tanto IRS1 como IRS2 con tumorigénesis en diferentes tejidos. Por lo general, en cáncer de mama se ha vinculado la expresión de IRS1 con un mayor crecimiento tumoral [165–167] y la expresión de IRS2 con mayores capacidades migratorias [168, 169]. Pero existen matices y controversia al respecto. Un estudio mostró que la sobreexpresión *in vivo* de IRS1 e IRS2 de origen humano en glándulas mamarias de ratón, inducía hiperplasia, tumorigénesis y finalmente metástasis. Cabe destacar que la histología de los tumores formados se

caracterizaba por poseer expansión de células progenitoras así como un alto porcentaje de diferenciación, 60% de tumores diferenciados bajo la sobreexpresión de IRS1 y 80% bajo la sobreexpresión de IRS2 [165]. También se ha vinculado una reducción de IGF-1/IRS1 en muestras de cáncer de mama humanas con una mayor progresión tumoral [170]. El análisis de 38 muestras de cáncer de mama de tipo ductal invasivo también mostró una reducción en la expresión de IRS1 en aquellas muestras menos diferenciadas [171]. Sin embargo, otros estudios han relacionado la expresión de IRS1 con una baja diferenciación de tumores primarios de cáncer de mama [172], así como con una mayor recurrencia tumoral [173]. Adicionalmente, se ha demostrado que en el modelo murino *Irs1*^{-/-} los tumores primarios mamarios no muestran diferencias en el crecimiento, aunque sí un aumento en la diseminación metastásica, sugiriendo un papel supresor metastásico para IRS1 [174]. En consonancia con estos datos, también se ha demostrado que la falta de *Irs1* aumenta la metástasis hacia el pulmón, sin afectar sin embargo al crecimiento tumoral [174].

También se ha descrito un papel positivo de IRS1 en la diseminación hacia los nódulos linfáticos del cáncer de cuello y cabeza. El estudio de 108 muestras tumorales de cuello y cabeza mostró una reducción de IRS1 en tumores que presentaban metástasis. Además, los nódulos resultantes de tal diseminación también reducían los niveles de IRS1 en comparación con el tumor primario, sugiriendo que una menor expresión de IRS1 podría estar relacionada con la migración celular. Por otra parte, mediante el uso de líneas celulares humanas también se comprobó que el silenciamiento de IRS1 aumentaba las capacidades metastásicas, observándose a su vez una reducción en los niveles de expresión de E-cadherina [175].

En cuanto al papel de las proteínas IRSs en cáncer de pulmón, se ha demostrado que el proceso de EMT causado por el tratamiento con TGF- β 1 es reprimido por IRS1, mientras que su silenciamiento induce una EMT [176]. Otro estudio independiente reveló que la expresión de IRS1 disminuía las capacidades migratorias e invasivas causadas por la expresión de miR-23a [177]. Por otra parte, el estudio de 30 muestras de cáncer de pulmón

mostró una disminución de expresión de IRS1 en aquellas muestras menos diferenciadas y con menor expresión de E-cadherina, indicando un posible papel de IRS1 en la represión del proceso EMT tumoral [176]. Además, otro estudio con 105 muestras humanas de cáncer de pulmón no microcítico reveló que la expresión de IRS1 se correlacionaba con aquellos pacientes con mayor índice de supervivencia [177]. Consecuentemente, también se ha observado una menor tasa de supervivencia en pacientes con tumores de adenocarcinoma de pulmón con menor expresión de IRS1 y mutación en KRAS [178].

En cáncer gástrico se ha vinculado la pérdida de función de IRS2 a través de su metilación genética con un posible evento implicado en el desarrollo y progresión tumoral [179].

El papel que las proteínas IRSs en cáncer hepático también es controvertido. El estudio de lesiones pre-neoplásicas en tejido hepático formado en ratón bajo dos modelos diferentes de inducción de HCC (dietilnitrosamina (DEN) y virus de sarcoma aviar (ASV)) ha mostrado que la expresión de IRS2 se induce en etapas tempranas de HCC, antes incluso de sea apreciables a nivel histológico. Algunas de estas muestras también presentaban un aumento en la expresión de IRS1 [180]. Otro estudio independiente en el que se indujo HCC mediante administración de NNM (N-nitrosomorfolina) también ha vinculado una mayor expresión de IRS2 con lesiones preneoplásicas intrahepáticas [181]. También se ha demostrado que en el modelo *Pten*^{+/-} en el que se desarrollan tumores en múltiples tejidos, la delección de *Irs2* aunque no afectaba a la formación de tumores, sí que reducía su crecimiento, proliferación e invasión, sugiriendo un posible papel de IRS2 en el desarrollo tumoral [182]. Sin embargo, en contraposición, un estudio transcriptómico de muestras humanas de HCC (n=29) mostró una disminución de expresión de IRS2 [183].

Por otra parte, en lesiones preneoplásicas, se ha observado un incremento en la expresión de IRS1, vinculando su expresión con el proceso de tumorigénesis, aunque también se observó una reducción progresiva de

su expresión con el avance tumoral [184]. La sobreexpresión de IRS1 ha sido asociada con una mayor supervivencia de células de HCC bajo el tratamiento de TGF- β 1 [185]. Además, la delección específica de *Irs1* en el hígado de ratones ha mostrado una reducción en la formación de tumores intrahepáticos (mediante inducción con DEN), sin embargo, la delección de *Irs2* no mostró fenotipo en la tumorigénesis hepática, lo que atribuye a IRS1 pero no a IRS2, un papel en la generación de tumores intrahepáticos [186].

1.12 Señalización IGF en HCC

La unión de IGF-1 o IGF-2 al receptor IGF-1R activa rutas de señalización a través de las proteínas IRSs que inducen la proliferación y supervivencia celular, por lo que cambios en la vía IGF han sido relacionados con procesos tumorigénicos. La expresión de IGF-1 ha demostrado ser protumorigénica en distintos tipos de cáncer, asociándose mayores niveles de IGF-1 en plasma con un aumento en el riesgo de padecer cánceres como el de mama, próstata y colon [187]. Por el contrario, en el hígado se postula que IGF-1 pudiera ejercer un papel positivo, dado que son numerosos los estudios que han mostrado una reducción en los niveles de IGF-1 durante enfermedades crónicas hepáticas y durante HCC [188, 189]. El hígado es el mayor productor de esta hormona, por lo que no está claro si su reducción es una consecuencia del daño hepático y por tanto de una pérdida de funcionamiento tisular, o si se debe a una agravación de este deterioro. Sin embargo, en el modelo de tumorigénesis DEN en el que no se produce daño crónico hepático, también se observa una reducción de IGF-1 en los tumores formados, sugiriendo un posible papel de esta hormona en el proceso de tumorigénesis, independientemente del daño hepático [8]. Además, menores niveles de IGF-1 en HCC han sido asociados con una mayor capacidad invasiva y un peor pronóstico en los pacientes [190]. Estos hechos sugieren que la reducción de IGF-1 en el hígado podría ser un evento protumorigénico. Otros estudios que han demostrado un papel positivo de IGF-1 durante la cirrosis y HCC. La administración exógena de IGF-1 mejora la función hepática en pacientes con cirrosis avanzada [191], e incluso, la expresión de

IGF-1 mediante vectores virales en ratas ha demostrado revertir el fenotipo cirrótico [192]. También, un estudio realizado en ratones demuestra que la reducción en la expresión de IGF-1 durante la madurez induce la expresión de GH, hepatomegalia, daño hepático y la formación de tumores en el hígado [193]. Todos estos datos sugieren que la reducción de IGF-1 podría ser un evento perjudicial para el correcto funcionamiento hepático.

1.12.1 Terapias anti-IGF-1R. Paradigma actual

La señalización IGF-1 ha sido relacionada con la resistencia a terapias anti-tumorales [187]. Es por ello que numerosos ensayos clínicos han probado la eficacia de distintos compuestos diseñados para inhibir la señalización a través de IGF-1R. A pesar de que muchos de estos compuestos han llegado a ser testados hasta en fase III en ensayos clínicos, los resultados no han sido lo suficientemente exitosos, mostrando múltiples efectos secundarios [194]. Son varias las posibles causas atribuidas al fallo terapéutico de las terapias anti-IGF-1R. Una de ellas es la complejidad de esta ruta de señalización, por lo que su inhibición podría tener consecuencias en otras vías de señalización importantes para el mantenimiento de la homeostasis corporal. También se atribuyen fallos a la falta de selección de los pacientes en los ensayos clínicos según la biología de sus tumores, de modo que alteraciones genéticas aguas abajo de IGF-1R podrían resultar en la ineficacia de estos compuestos [195]. Finalmente, otra de las posibles causas que han sido relacionadas con falta de ineficacia de las terapias anti-IGF-1 es el propuesto papel positivo de la señalización a través de insulina/IGF-1 en cáncer [178].

1.13 Factores de crecimiento fibroblástico (FGFs)

En organismos multicelulares la comunicación celular es un proceso clave para el correcto funcionamiento del organismo, en el que factores de crecimiento y citoquinas pueden interaccionar tanto de forma local como sistemática con otros tipos celulares. Esta comunicación celular es objetivo terapéutico en muchos campos de la biología. Por ejemplo, en cáncer la comunicación celular suele estar alterada, siendo multitud los estudios y

ensayos clínicos que tratan de manipularla para volver a adquirir un estado de homeostasis. En el campo de la regeneración y reparación tisular también se aborda la opción de modificar la comunicación celular con el objetivo de promover vías proregenerativas [196].

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) han recibido especial atención durante los últimos años. Esta es una familia de proteínas cuya forma de difusión canónica puede ser autocrina y paracrina, actuando así en células cercanas como señalización localizada, aunque algunos FGFs menos comúnmente también pueden actuar de forma endocrina [197]. Tras la unión con sus receptores inician diferentes cascadas de señalización, entre las que destaca RAS-ERK1/2, además de otras vías como PI3K-AKT. Se han descrito un total de 22 tipos diferentes de FGFs hasta la fecha con implicaciones en multitud de organismos y tejidos relacionadas con la proliferación, migración, supervivencia, actividades metabólicas, diferenciación, cicatrización y regeneración, entre otras [198]. El estudio de estas proteínas ha resultado tan prometedor en diferentes patologías que son varios los ensayos clínicos que se están llevando a cabo o se han realizado con ellas [199]. También han sido descritos 4 receptores tirosina quinasa transmembrana (FGFR1-4) específicos de proteínas FGF. Tres de ellos (FGFR1-3) realizan un procesamiento alternativo del ARNm, generando las isoformas IIIb y IIIc [198] y aumentando hasta 7 los receptores de FGFs. Cada tipo de FGF de entre los 22 descritos interacciona específicamente con uno o varios receptores de esta familia (Tabla 1), resultando así la señalización de FGFs en una ruta compleja. Además, las isoformas de estos receptores no se expresan de forma ubicua por los tejidos, siendo la IIIb específica de células epiteliales y la IIIc de células mesenquimales y de tipo estromal [200]. Este hecho añade especificidad a la comunicación de FGFs, permitiendo actuar sobre un tipo celular dentro de un tejido.

Los FGFs también han sido vinculados con el metabolismo de la insulina. En concreto, la administración de FGF1, FGF19 o FGF21 en modelos murinos de resistencia a insulina ha resultado en una mejora de la sensibilidad a esta hormona [201–203].

Receptor FGF	Ligandos específicos
FGFR1-IIIb	FGF-1, 2, 3, 10 y 22
FGFR1-IIIc	FGF-1, 2, 4, 5, 6, 19, 20 y 21
FGFR2-IIIb	FGF-1, 3, 4, 6, 7, 10 y 22
FGFR2-IIIc	FGF-1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 17, 18, 19, 21 y 23
FGFR3-IIIb	FGF-1 y 9
FGFR3-IIIc	FGF-1, 2, 4, 8, 9, 17, 18, 19, 21 y 23
FGFR4	FGF-1, 2, 4, 6, 8, 9, 16, 17, 18 y 19

Tabla 1. Especificidad de ligando de receptores FGF [200]. FGF, factor de crecimiento fibroblástico; FGFR, receptor de factor de crecimiento fibroblástico.

1.13.1 FGFs y regeneración hepática

Las proteínas FGF ejercen importantes funciones durante los procesos de reparación del daño, habiendo sido especialmente estudiados durante la reparación epitelial, cicatrización e incluso habiéndose empleado en distintos ensayos clínicos relacionados con la mejora de estos procesos [196, 199]. Como ejemplo, en un ensayo clínico se ha demostrado que FGF2 mejora la cicatrización de úlceras en pacientes con pie diabético [204]. Por otra parte, la falta de FGF7 ha sido relacionada con una cicatrización ralentizada en sujetos con diabetes [205], y su administración exógena con una aceleración del proceso de cicatrización epitelial [206].

En el estudio de la regeneración hepática se ha demostrado que FGFR2, expresado por hepatocitos, es inducido durante este proceso [207]. En concreto la falta de la isoforma IIIb en ratones impide la regeneración después de un proceso de HP debido a la incapacidad de proliferación de hepatocitos [208]. FGF7, cuyo único ligando es FGFR2-IIIb, no induce su expresión tras una HP [207, 208], sin embargo, sí que ha sido observada su inducción en casos de fibrosis y cirrosis hepática, tanto en ratones como humanos [209]. Esto es debido a que FGF7 es expresado por CEHs en su estado activado y FPs [209], indicando que la expresión de FGF7 es dependiente de la respuesta estromal durante la reparación del daño hepático. El papel de FGF7 ha sido estudiado en mayor profundidad durante la regeneración hepática mediada por células progenitoras utilizando un modelo murino carente de este gen (*Fgf7^{-/-}*). De esta forma, se ha

demostrado que FGF7 promueve la proliferación de CPHs, que poseen una alta expresión de FGFR2-IIIb, el único receptor de FGF7, estimulando la regeneración hepática y jugando por tanto un papel fundamental en la respuesta regenerativa del hígado [130, 210].

1.13.2 FGFs y cáncer

Las FGFs tienen importantes funciones en regeneración, habiendo sido relacionadas con procesos de proliferación, migración y angiogénesis entre otros, comúnmente asociados al desarrollo tumoral. Es por ello que en la literatura se puede observar una relación de estas proteínas con cáncer. Pero a la vez, su expresión también ha sido vinculada con una función supresora tumoral a través de la promoción de la diferenciación o regulando otras rutas oncogénicas [200].

El papel del receptor de FGF7 ha sido también ampliamente estudiado en cáncer. Su falta de expresión se ha vinculado con cánceres de diferentes tipos, como próstata [211], adenocarcinomas salivares [212], melanomas [213, 214] y vejiga [215], entre otros. También se ha demostrado que un cambio en la expresión de la isoforma III-b a la III-c promueve un fenotipo mesenquimal y va acompañado de un aumento en la agresividad tumoral [216, 217], habiéndose observado esta transición en cáncer renal [218] y de próstata [219, 220]. En HCC en concreto una menor expresión de FGFR2-IIIb se ha relacionado con un crecimiento tumoral más agresivo. Esto se debe a que su expresión se encuentra reducida en tumores de pacientes, además de que su reexpresión en líneas celulares de HCC ha demostrado mitigar sus capacidades migratorias [221].

Hipótesis y objetivos

La resistencia a insulina, vinculada con patologías como la diabetes tipo 2 y obesidad, ha sido relacionada con enfermedades hepáticas y daño crónico, con mayor incidencia de HCC y con la aparición de estructuras ductulares donde las CPHs se localizan. Además, también ha sido relacionada con defectos en la epitelialización de otros tejidos como la piel. Sin embargo, a pesar de la gran capacidad regenerativa del hígado, se desconoce el papel que la resistencia a insulina pueda tener en este proceso en el que participan CPHs. Con el propósito de evaluarlo, se ha utilizado un modelo de ratón resistente a insulina (*Irs2*^{-/-}) bajo tratamiento con dieta DDC, que genera daño crónico hepático e induce la expansión de CPHs. Además, es destacable la relación entre los eventos que dan lugar a la regeneración hepática y HCC, habiéndose descrito una mayor expresión de IRS2 en muestras preneoplásicas y habiendo sido vinculado con la promoción tumoral. Por ello las hipótesis propuestas y los objetivos planteados para su comprobación son:

Hipótesis 1. La resistencia a insulina da lugar a fallos en la regeneración a partir de células progenitoras agravando el daño hepático.

- Caracterizar el impacto de la falta de *Irs2* en la población de CPHs inducida tras el tratamiento con DDC.
- Definir los efectos de la ausencia de *Irs2* en la población hepatocítica durante el daño generado por la dieta DDC.
- Determinar qué papel tiene IRS2 en el comportamiento de células estromales que rodean a las progenitoras como CEHs y FPs.

Hipótesis 2. La expresión de IRS2 promueve la progresión de hepatocarcinomas.

- Determinar si existen variaciones en la expresión de IRS2 durante diferentes fases y estados de diferenciación de HCCs de origen humano.
- Caracterizar cómo afecta la expresión de IRS2 en la proliferación, migración y epitelización de HCCs *in vitro* e *in vivo*.

Materiales y métodos

3.1 Experimentación animal

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

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

3.1.1 Modelos animales

En este proyecto se han utilizados dos modelos animales:

- Modelo *Irs2*^{-/-}

Este modelo generado en la cepa C57BL/6 carece del gen que codifica a *Irs2* en todo el organismo. Fue mantenido y caracterizado

genotípicamente por Arantxa Leal y Carlos Acosta mediante PCR bajo las indicaciones descritas previamente en la bibliografía [27].

- **Modelo SCID**

El modelo murino SCID fue generado en la cepa CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCr (Charles River). Posee una mutación autosómica recesiva designada como “Prkdc^{scid}” que le confiere una inmunodeficiencia severa de linfocitos B y T, es por ello que fue estabulado en un área de trabajo específica para ratones inmunodeprimidos. Esta inmunodeficiencia le impide producir anticuerpos para reaccionar contra antígenos comunes, por lo que también le impide rechazar injertos celulares exógenos [222]. Es por ello que este modelo fue utilizado para la experimentación que conllevó la generación de xenoinjertos con células humanas.

3.1.2 Inducción de daño hepático

Para los estudios de daño hepático se usó el modelo animal *Irs2^{-/-}* y los respectivos animales *WT* como controles. Hembras de entre 10 y 12 semanas fueron alimentadas con dieta enriquecida al 0,1% en DDC durante 7, 14 y 21 días. Tras el tratamiento, los animales fueron sacrificados administrando CO₂ y realizando dislocación cervical, extrayendo suero sanguíneo e hígado para su posterior análisis. Tanto la administración de la dieta como los sacrificios fueron realizados por Arantxa Leal y el Dr. Carlos Acosta.

3.1.3 Generación de xenoinjertos

En la generación de xenoinjertos se utilizaron hembras de la colonia SCID de entre 6 y 8 semanas de edad. Estas se mantuvieron anestesiadas por vía inhalatoria administrando isoflurano (Isovet, Braun Vetcare) al 5% en inducción y al 1,5-2% en mantenimiento durante el procedimiento quirúrgico.

Las células a inyectar se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo (detallado en el apartado 3.2) y se manejaron bajo esterilidad. Minutos previos a la inyección, estas células fueron tripsinizadas (Life technologies) y resuspendidas en 75 µL de matrigel (10 mg/mL) (BD Bioscience) disuelto

en 75 μL de PBS y mantenido en frío hasta su inyección. Se inyectaron un total de 5×10^5 células por dosis de forma subcutánea en la ingle del animal. El crecimiento tumoral fue monitorizado por mediciones de longitud cada 7 días mediante el uso de un calibre digital. Para el cálculo del volumen tumoral se utilizó la fórmula $[V = (A \times A \times L)/2]$ siendo “V” volumen, “A” anchura y “L” longitud, tal y como se describe en otros estudios [223]. Los animales fueron sacrificados tras 6 semanas desde la inyección celular administrando CO_2 seguido de dislocación cervical. Finalmente se procedió a la recolección de los tumores generados.

3.1.4 Ensayo de migración bazo-hígado

El ensayo de migración bazo-hígado permite analizar la capacidad de las células de invadir el tejido hepático desde un tumor primario intraesplénico, por medio de la migración a través de la vena esplénica y porta hepática (Figura 8). Para este ensayo se utilizaron hembras SCID de entre 6 y 8 semanas de edad. Las células a inyectar se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo (detallado en el apartado 3.2) manejándose bajo esterilidad. Minutos previos a la inyección, estas células fueron tripsinizadas y resuspendidas en PBS estéril. Cada dosis de inyección contenía 5×10^5 células de la línea Huh6 en 30 μL de PBS. Estas dosis se mantuvieron en frío hasta su administración.

A término de experimento, los animales fueron sacrificados administrando CO_2 y realizando dislocación cervical, procediéndose a su disección (4 semanas en el caso de los experimentos de silenciamiento de IRS2 y 6 semanas en los de sobreexpresión). Los tumores generados en el hígado fueron contados y medidos longitudinalmente con un calibre digital. Tanto algunos de estos tumores como el tejido hepático sano circundante a estos, fueron extraídos para posteriormente analizar su expresión proteica y genética. El resto del hígado con los tumores integrados en él y el bazo, también fueron procesados para realizar experimentos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia siguiendo los procedimientos descritos en los apartados 3.8 y 3.9.

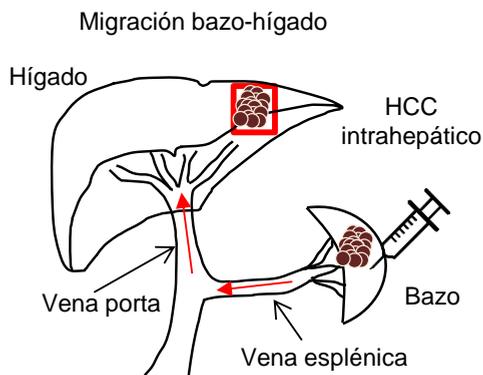


Figura 8. Trayectoria recorrida por las células durante el ensayo de migración bazo-hígado. Ilustración de inyección de células en el bazo y formación de un tumor primario, el cual diseminaría migrando a través de la vena esplénica y porta hasta el hígado donde se formaría un tumor secundario. HCC, hepatocarcinoma.

3.1.5 Recolección de muestras biológicas

Tras el sacrificio de los animales se procedió a la extracción de tejidos y muestras biológicas de interés experimental. Para estudios de expresión proteica y genética, pequeñas muestras de tejido fueron congeladas inmediatamente después de su recolección en nitrógeno líquido, siendo almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Los hígados destinados al análisis por inmunofluorescencia de los animales tratados con dieta DDC fueron incluidos en fresco en compuesto de temperatura óptima de corte (OCT) (Millipore, Sigma), congelados inmediatamente y almacenados a -80°C . Los tejidos destinados a ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica provenientes de los experimentos tumorales fueron fijados con PFA 4%-PBS en agitación suave y a 4°C durante 16 horas. Para inmunofluorescencia se lavaron con PBS y se incubaron durante 24 horas con diluciones crecientes de sacarosa (Sigma) 10, 20 y 30%-PBS con el fin de criopreservar los tejidos. Finalmente fueron incluidos en OCT y congelados a -80°C hasta su posterior uso. Sin embargo, para el análisis inmunohistoquímico, tras ser fijados, fueron lavados con dH_2O e introducidos en el procesador de tejidos (Spin Tissue Processor, Myr; STP120-2) que de forma automática sumerge agita y centrifuga los tejidos pasando por diluciones de EtOH 70%; 96%; 100%; Xilol

y Parafina. Finalmente fueron incluidos en parafina y almacenados a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

3.2 Cultivos celulares

Las diferentes líneas celulares utilizadas (Figura 9) y (Tabla 2) se cultivaron en condiciones de esterilidad manteniéndolas en un incubador (Thermo Fisher Scientific) en condiciones controladas de temperatura (37°C), humedad (95%) y CO₂ (5%). La descongelación celular se realizó mediante agitación rápida en un baño a 37°C. Las células fueron resuspendidas en medio fresco y centrifugadas antes de su siembra. Para el mantenimiento de cada línea se utilizó un medio de cultivo específico. Al llegar al 95% de confluencia en la placa, las células fueron lavadas con PBS estéril (libre de Mg⁺² Ca⁺²) pH 7,4, y tripsinizadas en el incubador. Posteriormente la tripsina fue inactivada gracias al suero contenido en el medio de cultivo, que se añadió a una dilución 2:1 (medio de cultivo:tripsina). Dependiendo de las especificaciones de la línea, en ciertos casos se procedió a la siembra directa de estas células tripsinizadas, y en otros casos se realizó un paso previo de centrifugación. El medio de cultivo fue remplazado con una frecuencia de 3 veces por semana.

Línea celular	Tipo de línea
HepaRG	Hepatoma
LX2	Estrellada hepática
hCEH	Primaria estrellada hepática de origen humano
Huh6	Hepatoblastoma
HepG2	Hepatoblastoma
Hep3B	Hepatocarcinoma

Tabla 2. Listado de líneas celulares de origen humano utilizadas en el estudio.

Línea celular **HepaRG** (cedida por las Dras. Anne Corlu y Cristiane Guillouzo, Universidad de Rennes), se caracteriza por ser una línea de células humanas de hepatoma con carácter progenitor, que fueron aisladas de un paciente con colangiocarcinoma [224]. Se cultivaron en medio Williams E Medium (Fisher Scientific) suplementado con 10% suero Fetal Clone III (GE Healthcare), 50 µM de hidrocortisona hemisuccinato (Sigma-Aldrich),

0,88 μM de insulina (Biotest Diagnosticos), 2 mM de L-glutamina (Fisher Scientific) y 1% penicilina-estreptomocina (Fisher Scientific). Para el proceso de descongelación se utilizó una centrifugación de 5 minutos a 1000 rpm. En experimentos donde se requerían condiciones sin insulina, el medio se cambió 24 horas después de su siembra, al mismo medio pero sin suplemento de insulina. Las células fueron tripsinizadas con tripsina 0,05% EDTA (Life Technologies) durante 5 minutos y pasadas a una densidad 1:5.

Línea celular **LX-2** (cedida por el Dr. Scott Friedman, Icahn School of Medicine en Mount Sinai), línea de células estrelladas hepáticas humanas que fue mantenida en medio DMEM con glucosa y piruvato (Gibco) en alta concentración, suplementado con 2% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Fisher Scientific) y 1% penicilina-estreptomocina (Fisher Scientific). Para el proceso de descongelación se utilizó una centrifugación de 3 minutos a 1000 rpm siendo las células resuspendidas y sembradas en medio suplementado con 10% de FBS inactivado por calor durante 24 horas. Antes de llegar a confluencia, las células fueron tripsinizadas con tripsina 0,25% EDTA (Life Technologies) durante 2 minutos, posteriormente la tripsina se inactivó con FBS inactivado por calor. La resuspensión celular resultante se centrifugó durante 3 minutos a 1000 rpm, finalizando con la siembra celular a una densidad 1:5. Las células utilizadas para experimentación y no para mantenimiento, se sembraron sobre placas pretratadas con gelatina (0,1%) (Sigma) disuelta en agua y se les cambió el medio tras 24 horas, al utilizado para el mantenimiento de la línea celular HepaRG.

Línea de células **estrelladas hepáticas primarias humanas (hCEH)** (Innoprot, Derio, España), línea comercial proviene de una donante caucásica sana de 15 años de edad. El medio de cultivo, proceso de tripsinización y descongelación de estas células fue el mismo que el utilizado con la línea LX-2, a diferencia de que la concentración de tripsina utilizada que fue del 0,05% EDTA y de que el paso de centrifugación postdescongelación fue omitido. La siembra de estas células para su mantenimiento se realizó sobre placas pretratadas durante 10 minutos con

polilisina (PLL) (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguido por 3 lavados con agua estéril (Braun) y secado a temperatura ambiente. Las células utilizadas para experimentación y no para mantenimiento, se sembraron sobre placas pretratadas con gelatina (0,1%) y se les cambió el medio tras 24 horas, al utilizado para el mantenimiento de la línea celular HepaRG.

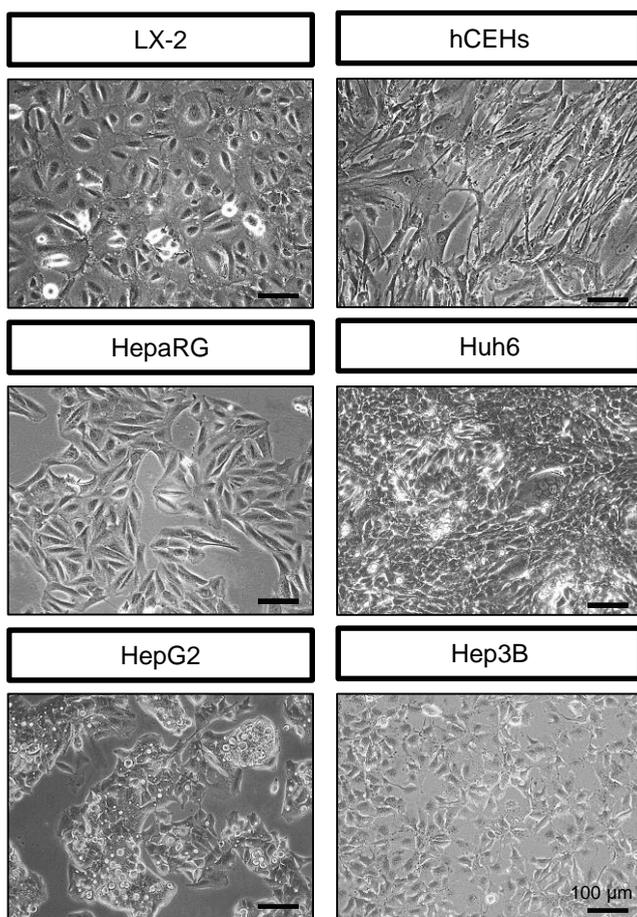


Figura 9. Líneas celulares utilizadas en el estudio. Imágenes de contraste de fases de las líneas celulares humanas utilizadas durante este proyecto. Barra de escala 100 μm .

Línea celular **Huh6** (cedida por la Dra. Marta Casado, IBV, CSIC, Valencia), procedente de un hepatoblastoma de un varón de 12 meses de edad con un fenotipo mixto (epitelial-mesenquimal) predominantemente

embrionario [225]. Fue cultivada en medio DMEM con alta glucosa y piruvato, suplementado con 10% FBS inactivado por calor y 1% penicilina-estreptomicina. Para el proceso de descongelación se utilizó una centrifugación de 5 minutos a 1000 rpm. Las células fueron tripsinizadas con tripsina 0,05% EDTA durante 5 minutos y sembradas a una densidad 1:10.

Línea celular **HepG2** (adquirida de ATCC), se caracteriza por ser una línea epitelial de hepatoblastoma, proveniente de un varón caucásico de 15 años de edad [226]. Fue mantenida en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) que contiene L-Glutamina suplementado con un 10% FBS inactivado por calor y un 1% penicilina-estreptomicina. Para el proceso de descongelación se utilizó una centrifugación de 5 minutos a 1000 rpm. Las células fueron tripsinizadas con tripsina 0,25% EDTA durante 5 minutos y sembradas a una densidad 1:5.

Línea celular **Hep3B** (cedida por la Dra. Marta Casado, IBV, CSIC, Valencia) caracterizada por ser una línea epitelial proveniente de un hepatocarcinoma de un de un varón no caucásico de 8 años de edad con mutación en el gen p53 y con el virus de la hepatitis B integrado en su genoma [227]. El medio utilizado para su cultivo, proceso de descongelación y tripsinización fueron los utilizados con la línea HepG2, a diferencia del uso de tripsina 0,05% EDTA y la siembra a una densidad 1:5.

3.3 Inactivación de células estrelladas con Mitomicina C (MitoC)

Una vez que las células estrelladas (LX-2 y hCEH) llegaron al 75% de confluencia, fueron tratadas durante 3 horas con MitoC (Millipore Sigma) diluida a una concentración final de 1 mg/mL en medio *advanced DMEM/F-12* (Gibco). Tras el tratamiento, se realizaron 5 lavados con PBS para eliminar cualquier resto del compuesto citotóxico, siguiendo las especificaciones de tratamiento de tales residuos. Finalmente, se procedió a seguir con el proceso de tripsinización y mantenimiento celular para experimentación previamente descrito en el apartado 3.2.

3.4 Infección lentiviral de líneas celulares

Se crearon diferentes líneas celulares estables mediante infección con vectores lentivirales (Tabla 3). Las líneas HepaRG y LX-2 fueron infectadas por el Dr. Luke Noon y Arantxa Leal respectivamente.

Virus	Vector Lentiviral	Casa comercial	MOI
shRNA-luc	SMARTvector 2.0 Luciferase control	Dharmacon	1
shRNA-scrambled	SMARTvector 2.0 non-targeting control	Dharmacon	1
shRNA-IRS2	SMARTvector 2.0 SH-003554-03-10	Dharmacon	1
GFP control	rLV-EF1-GFP	Vectalys	6
EF1-mIrs2	rLV-EF1-mIrs2	Vectalys	6
pIRS2-GFP	rLV-pIRS2-GFP	Vectalys	6

Tabla 3. Vectores lentivirales utilizados para generar líneas celulares estables.

Para llevar a cabo el proceso de infección, las células a infectar (utilizadas con el menor número de pases posibles) se sembraron en placas de 6 pocillos. Tras 24 horas y habiendo alcanzado una confluencia de en torno al 60-70%, se tripsinizó uno de los pocillos con el que se realizó un conteo celular. Sabiendo los valores de número de células, el factor de multiplicidad de infección (MOI) escogido y la titulación vírica (aportada por el proveedor), se calculó el volumen de virus a añadir en cada caso a partir de la siguiente fórmula.

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

Seguidamente, se procedió a cambiar el medio de cultivo por medio fresco que contenía la suspensión vírica y polibreno a una concentración final de 1µg/mL (Sigma Aldrich). Tras 24 horas desde la infección, se aspiró el medio que contenía los virus, se realizaron varios lavados con PBS y se añadió medio de mantenimiento fresco. Las líneas celulares infectadas con los lentivirus de silenciamiento, fueron tratadas con puromicina (3 µg/mL) (Sigma Aldrich). Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de

esterilidad, siguiendo medidas de seguridad biológica y utilizando una cabina de seguridad biológica clase II.

Líneas de silenciamiento: para silenciar la proteína IRS2, se utilizó un vector lentiviral que contenía un “short hairping RNA” (shRNA) complementario al transcrito humano de *IRS2* (shRNA-*IRS2*), capaz así de formar una doble hebra con este, dando lugar a su degradación. Como control de infección, se utilizó, bien un vector que contenía un shRNA complementario al gen de la luciferasa (shRNA-luc) no expresado por ninguna de las líneas infectadas, o bien vector shRNA-scrambled, sin complementariedad. Estos vectores lentivirales contenían además un casete de resistencia a puomicina y la secuencia del gen reportero GFP, permitiendo seleccionar químicamente y distinguir visualmente las células infectadas. La capacidad de selección de estos cultivos permitió realizar una infección con MOI bajo.

Líneas de sobreexpresión: con el objetivo de sobreexpresar la proteínas IRS1 e IRS2, se infectaron dos líneas; una control que contenía la secuencia del gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) (GFP control) y otra que contenía la secuencia de ratón del gen que codifica para *Irs1* o *Irs2* (EF1-*mIrs1* y EF1-*mIrs2*). Estos vectores no contenían ningún casete de selección, por lo que se utilizó un MOI de infección alto para asegurar la superación del proceso en un amplio número de células.

Líneas reporteras: con el objetivo de seguir el patrón de expresión de *IRS2*, se utilizó un vector lentiviral que contenía la secuencia del gen reportero de la proteína GFP controlada bajo el promotor humano de *IRS2* (p*IRS2*-GFP). De modo que estas líneas permiten visualizar por medio de la expresión de GFP variaciones en la expresión de *IRS2*. La intensidad de GFP es dependiente del número de insertos víricos integrados en el genoma de cada célula, por lo que para poder visualizar cambios en la expresión de *IRS2* y no cambios de insertos víricos, se crearon líneas clonales a partir de una sola célula. Al no poseer casete de selección se utilizó un MOI alto.

3.5 Estimulación con insulina/IGF-1

La estimulación con los factores insulina e IGF-1 se realizó con las células HepG2. Los cultivos se mantuvieron durante 3 días en condiciones estándar y una vez alcanzada una confluencia de en torno al 90% se procedió a realizar el protocolo de estimulación. En primer lugar, se llevaron las células a condiciones de ayunas mediante el lavado con PBS de los cultivos y la incubación durante 15 minutos de estos con medio libre de suero, realizándose 3 ciclos de incubación. De esta forma se eliminan completamente los posibles restos de suero. Seguidamente se mantuvieron los cultivos durante 3 horas en el incubador con medio fresco libre de suero. Tras el ayuno, se procedió a la estimulación con insulina 1nM (Biotest Diagnosticos, Roche) o con IGF-1 1nM (Sigma) durante 10 minutos en el incubador. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS frío sobre hielo y recogidas para su análisis proteico siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.11.

3.6 Separación celular por citometría de flujo “cell sorting”

La separación de poblaciones celulares fue llevada a cabo por el servicio de citometría del CIPF, utilizando un sistema de separación celular (*Cell Sorter*) (High Speed Cell Sorter MoFlo, Beckman-Coulter, CA, USA). Las líneas celulares fueron crecidas en condiciones de cultivo estándar, procediendo a su tripsinización al llegar al 90% de confluencia. Se diluyeron a una concentración de 2×10^5 células/mL de medio, añadiendo yoduro de propidio (1mg/mL). Con el uso del *Cell Sorter*, las suspensiones celulares se hicieron pasar a través de un canal en forma de flujo laminar, que fue excitado con un láser para la detección de GFP (488 nm de longitud de onda). Para establecer las condiciones de separación celular, se utilizó una línea carente de GFP, con la que se estableció un rango de detección negativo. Finalmente, se procedió a la separación de dos poblaciones de la línea reportera p/RS2-GFP clonal (descrita en el apartado 3.4), estableciendo dos rangos de intensidad para GFP, uno mayor denominado

“GFP+” y otro menor denominado “GFP-”, obteniendo tras el proceso dos suspensiones con un número conocido de células (Figura 10).

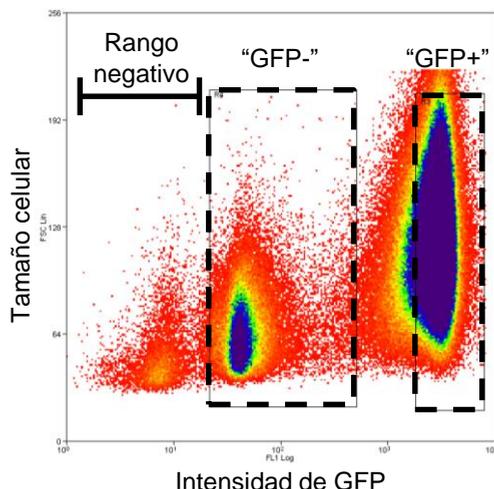


Figura 10. Representación de poblaciones celulares HepG2 pIRS2-GFP separadas mediante cell sorting. Imagen representativa de la distribución poblacional de GFP en la línea HepG2 pIRS2-GFP tras el proceso de *sorting* donde se ha separado una población con poca expresión de GFP “GFP-” y otra enriquecida “GFP+”, eliminando las células cuya expresión se correspondía a los controles negativos, denominado “rango negativo”. En el eje “Y” se representa el tamaño celular y en el eje “X” la intensidad de GFP registrada para cada célula. GFP, proteína verde fluorescente.

3.7 Análisis de enzimas de daño hepático en suero

Estos análisis fueron llevados a cabo por el Dr. Carlos Acosta. Para ello se llevaron a cabo ensayos de ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante, analizando las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alaninoaminotransferasa (ALT) en el suero sanguíneo extraído de los animales *WT* e *Irs2^{-/-}*, tanto controles como tratados con dieta DDC tras 7, 14 y 21 días.

3.8 Inmunohistoquímica

Los ensayos de inmunohistoquímica fueron llevados a cabo por el laboratorio del Instituto Valenciano de Patología, donde las muestras de hígado previamente incluidas en parafina, fueron cortadas en secciones de 4 μ m. Se realizaron tinciones con el anticuerpo CD3 (Tabla 4) así como de

hematoxilina y eosina (Sigma), mediante el uso del *Autostainer link 48* (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Las imágenes mostradas, representativas de varias muestras independientes, fueron adquiridas usando el software *Pannoramic Viewer* (3DHISTEC).

Anticuerpo	Huésped	Referencia	Dilución
Anti-CD3	Conejo	Agilent Dako (IR503)	1:1

Tabla 4. Anticuerpo primario utilizado para la detección proteica por inmunohistoquímica.

3.9 Tinción por inmunofluorescencia

Esta técnica se ha ejecutado de la misma manera indistintamente para tejidos como para células, exceptuando los pasos previos relativos a la preparación de las muestras.

3.9.1 Tejidos criopreservados

Los tejidos incluidos en bloques de OCT preservados a -80°C se laminaron en cortes de $6\mu\text{m}$ de espesor usando un criostato (Leica CM1850 UV) con el que se mantuvo una temperatura de -20°C en su interior. Cada corte de muestra fue pegado a un portaobjetos tratado con PLL. Aquellos tejidos que tras la disección animal fueron incluidos directamente en OCT, se fijaron posteriormente a su corte con PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se procedió a eliminar los restos de PFA y de OCT realizando 3 lavados de PBS. Los tejidos que fueron incluidos en OCT previamente fijados, se lavaron directamente con PBS tras su corte.

3.9.2 Cultivos celulares

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos pretratados con PLL (procedimiento descrito en el apartado 3.2). Una vez finalizado el tiempo de crecimiento se aspiró el medio de cultivo y se lavaron los restos celulares con PBS. Seguidamente, las células fueron fijadas con PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, realizándose 3 lavados con PBS.

Anticuerpo	Huésped	Referencia	Dilución
Anti-BrdU	Rata	Abcam (ab6326)	1:200
Anti-Caspasa3 activa (Asp175)	Conejo	Cell Signalling Technology (9664)	1:800
Anti-CD45	Rata	R&D Systems (MAB114-SP)	1:200
Anti-CK19	Ratón	Santa Cruz Biotechnology clone BA17 (sc-53258)	1:300
Anti-Elastina	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (sc58756)	1:100
Anti-EPCAM	Conejo	Abcam (ab32392)	1:200
Anti-FGF7	Ratón	R&D systems (MAB251-100)	1:200
Anti-FGFR2	Conejo	Sigma Aldrich (F0300)	1:300
Anti-FLAG	Ratón	Sigma Aldrich (F3165)	1:200
Anti-FOXO1 (C29H4)	Conejo	Cell Signalling Technology (2880S)	1:100
Anti-GFAP	Conejo	DAKO (Z0334)	1:250
Anti-HNF4 α	Cabra	Santa Cruz Biotechnology clone C-19 (sc-6556)	1:200
Anti-IRS2	Ratón	Santa Cruz Biotechnology B-5 (sc-390761)	1:500
Anti-Ki67	Conejo	Abcam (ab15580)	1:800
Anti-MIC1-1C3	Rata	Thermofisher Pierce antibodies (MA5-16136)	1:100
Anti-SOX9	Conejo	Millipore (AB5535)	1:100
Anti-SPP1	Cabra	R&D systems (AF808)	1:200
Anti-THY1	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (sc-53456)	1:100
Anti-Vimentina	Ratón	Santa Cruz Biotechnology clon E-5 (sc-373717)	1:200
Anti- α SMA	Conejo	Abcam (ab5694)	1:100
Faloidina (Alex. Fluor 647)	-----	Invitrogen (A22287)	1:50

Tabla 5. Listado de anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia.

Tras la fijación tanto de los cortes de tejidos como de las células en cubreobjetos, se permeabilizaron las estructuras lipídicas con una disolución en base de PBS 0,5% Tritón 100X durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras este paso se realizaron dos lavados de PBS y se procedió a

bloquear las muestras con solución PBS 1% BSA, 5% suero de caballo, 0,2% Tritón X100 (previamente filtrada), durante una hora a temperatura ambiente. Tras lo cual, se incubaron los anticuerpos primarios seleccionados en la misma disolución de bloqueo a la concentración indicada en la Tabla 5, durante 16 horas a 4°C y en condiciones húmedas. Tras la incubación del anticuerpo primario, se procedió a retirar el excedente realizando 6 lavados con PBS. Seguidamente, se incubó la muestra con el anticuerpo secundario correspondiente (Alexa Fluor, Life Technologies) (dilución 1:500) junto con *Hoechst* 33342 a una concentración final de 1 µg/mL en una disolución de PBS 1% BSA; 0,2% Tritón 100X durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se eliminaron los excesos de anticuerpo secundario realizando 4 lavados de PBS y dos lavados de H₂O destilada preservando la muestra con un portaobjetos y medio de montaje fluorescente (Dako), conservándola en oscuridad y a 4°C hasta su posterior uso.

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

3.10 Análisis cuantitativo de imagen

Los estudios cuantitativos de imagen se realizaron a partir de cortes de tejidos criopreservados y teñidos por inmunofluorescencia para diferentes marcadores según el protocolo descrito en el apartado 3.9. Se aplicaron métodos cuantitativos diferentes dependiendo de los requerimientos experimentales:

3.10.1 Análisis cuantitativo de intensidad de tinción

El análisis cuantitativo de intensidad de tinción se realizó a partir del análisis de imágenes adquiridas mediante microscopía confocal. Empleando el programa ImageJ (versión 1.47, Wayne Rasband, National Institutes of

Health, EEUU), se determinó la intensidad de tinción en diferentes campos aleatorios de varias muestras independientes estableciendo un límite de detección constante para todas las imágenes. Este tipo de análisis se realizó para determinar la expresión de los marcadores GFAP, α -SMA, Vimentina, Elastina, THY1 y FLAG.

3.10.2 Análisis cuantitativo celular

En este caso, las muestras teñidas de forma fluorescente fueron analizadas utilizando el software de adquisición y análisis IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare). Para ello, contando con la asistencia del servicio de citometría del CIPF, se establecieron protocolos de adquisición apropiados para cada experimento. Se seleccionó el objetivo, los filtros de emisión/excitación (Tabla 6) y las intensidades de exposición apropiadas según el marcaje analizado, para así adquirir en diferentes campos la totalidad de la muestra. La adquisición se realizó evitando la saturación de exposición y asegurando un correcto enfoque.

Canal de excitación	Longitud de onda de filtro de excitación	Longitud de onda de filtro de emisión
Hoechst	390/18 nm	432.5/48 nm
GFP	438/24 nm	475/24 nm
Cy5	632/22 nm	684/25 nm

Tabla 6. Longitud de onda de los filtros de excitación y emisión utilizados en los protocolos de adquisición de imagen con *IN Cell Analyzer*.

Tras la adquisición, se realizaron diferentes protocolos de análisis utilizando el sistema sistema IN Cell Analyzer. Para identificar y segmentar células individuales se utilizó el marcaje nuclear de *Hoechst* 33342. A partir de la previa identificación celular, se estableció un límite de detección de intensidad para cada marcador en estudio, que determinaba la positividad o negatividad de este en cada célula (Figura 11).

Tras la segmentación y aplicación del protocolo de análisis, se obtuvo el número de células positivas/negativas para cada marcador analizado, por campo adquirido. El número de células por unidad de área en cada muestra se halló multiplicando el número de campos analizados por el

área de adquisición de cada objetivo utilizado. Aquellos campos que no contenían muestra en su totalidad, fueron eliminados del análisis para evitar generar datos erróneos a la hora de calcular la densidad celular por unidad de área.

Con este método se calculó el número de núcleos HNF4 α positivos (hepatocitos) y negativos (células no parenquimales) en criocortes de hígados tratados con dieta DDC durante diferentes periodos de tiempo, habiendo procesado entre 4 y 6 muestras independientes para cada experimento, lo que generó un total de $1,23 \times 10^6$ núcleos analizados. Además, realizando un marcaje conjunto de Ki67 y estableciendo árboles de decisión en el proceso de análisis, se determinó el número de núcleos dobles positivos para diferentes marcadores. De este modo se calculó la proliferación de las poblaciones HNF4 α positiva, HNF4 α negativa y SPP1 positiva, analizando un total de $5,1 \times 10^5$; $7,2 \times 10^5$ y $6,5 \times 10^4$ núcleos positivos respectivamente, de entre un total de $1,23 \times 10^6$ (para HNF4 α) y $6,7 \times 10^5$ (para SPP1), de núcleos analizados.

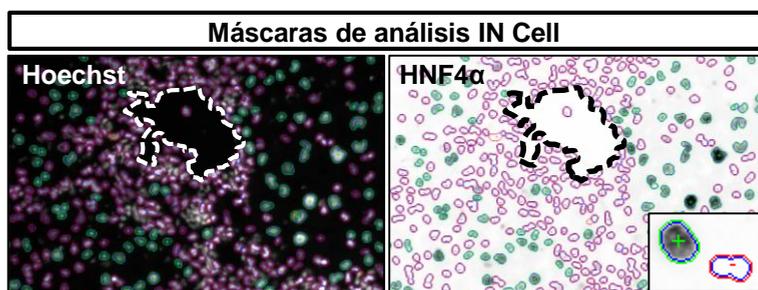


Figura 11. Máscaras celulares aplicadas en el análisis de imagen mediante IN Cell. (Izquierda) Segmentación de núcleos utilizando como señal la tinción de *Hoechst*. (Derecha) Clasificación de núcleos según la intensidad de señal del marcador HNF4 α como negativos (rojo -) o positivos (verde +) a partir de la segmentación nuclear de *Hoechst* previamente realizada. HNF4 α , factor nuclear 4 α de hepatocito.

3.10.3 Distribución hepática por área nuclear

Con el objetivo de analizar en mayor detalle la población hepática, se realizó una distribución del número de hepatocitos según su área nuclear. Este análisis de imagen se llevó a cabo con la plataforma multiparamétrica IN Cell, aplicando el mismo protocolo que en el apartado 3.10.2 y

seleccionando la opción de medida del tamaño nuclear en cada célula adquirida de forma individualizada, basado en la detección de la señal de tinción *Hoechst*. Debido a la gran cantidad de células analizadas y datos numéricos continuos obtenidos, se realizaron distribuciones frecuenciales utilizando el programa de Office, Microsoft Excel.

3.10.4 Estimación de ploidía hepatocítica

La estimación de ploidía hepatocítica se realizó mediante la implementación de un novedoso protocolo que se encuentra en proceso de revisión en la revista JoVE. Este protocolo permite realizar estimaciones de ploidía hepática a partir de secciones tisulares evitando el estandarizado uso de la citometría de flujo. Además, ofrece ventajas como la capacidad de obtener información espacial permitiendo localizar en el tejido cada grupo de hepatocitos. El principio fundamental de este protocolo se basa en que las células no parenquimales (HNF4 α -) poseen núcleos cuyo contenido de ADN es 2c, mientras que los hepatocitos pueden presentar diversas ploidías y además binuclearidad. A partir del cálculo del contenido de ADN de las células no parenquimales como control interno 2c, se interpolaron los distintos contenidos de ADN de las poblaciones hepáticas 2c, 4c, 8c y 16c (Figura 12).

Para llevar a cabo este análisis, se realizaron tinciones de criosecciones de hígados controles y tratados con dieta DDC con el marcador hepático nuclear HNF4 α y *Hoechst*. Las muestras fueron adquiridas y analizadas con la plataforma IN Cell siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.10.2. De nuevo, la capacidad de análisis multiparamétrica de este sistema, permitió obtener valores individuales para cada núcleo adquirido de circularidad/elongación (0-1, siendo 1 muy circular), área nuclear e intensidad media de tinción *Hoechst*.

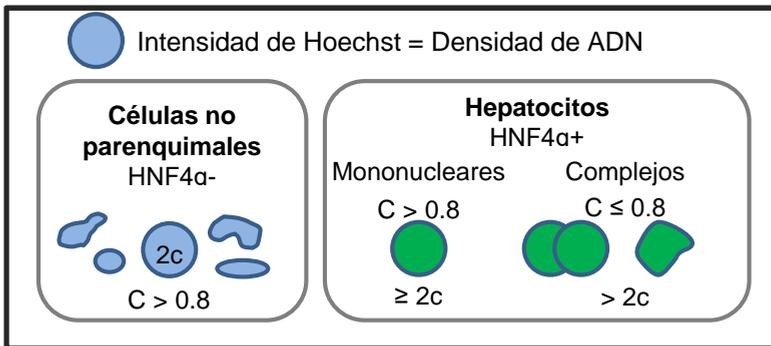
El cálculo del contenido de ADN de cada núcleo, se realizó a partir de los datos obtenidos del análisis en dos dimensiones (2D), por lo que la intensidad nuclear de *Hoechst* es proporcional a la densidad de ADN. El contenido de ADN se debe relativizar al cálculo en 3D, por tanto, fue

calculado multiplicando la densidad de ADN por el volumen de cada núcleo. Para realizar el cálculo del volumen a partir del área reportada por el sistema IN Cell, se aplicaron las fórmulas matemáticas siguientes:

$$\text{radio} = \sqrt{\frac{\text{área nuclear}}{\pi}}$$

$$\text{volumen} = \frac{4}{3} \times \pi \times \text{radio}^3$$

Datos en 2D



Interpolación a 3D

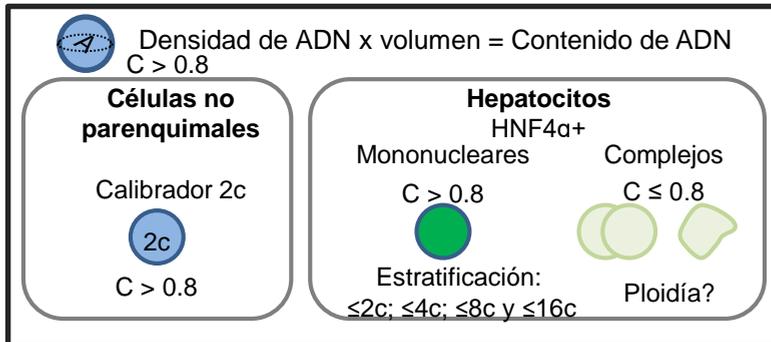


Figura 12. Modelo de estimación del contenido de ADN. Los datos obtenidos se corresponden al análisis de criosecciones hepáticas marcadas con HNF4α y *Hoechst* en dos dimensiones (2D). A partir de estos se obtienen los valores de densidad de ADN de núcleos con alta circularidad (C) ≥0,8, tanto de células no parenquimales (HNF4α-) como de hepatocitos (HNF4α+) mononucleares. Mediante la implementación de fórmulas matemáticas aplicables a círculos y esferas perfectas, se realiza una interpolación del contenido de ADN de estos núcleos altamente circulares. Los valores de contenido de ADN de células no parenquimales se utilizan como calibrador interno 2c. Los valores de contenido de ADN obtenidos en la población hepática son estratificados en diferentes ploidías a partir del calibrador. 2D, 2 dimensiones; 3D, 3 dimensiones; HNF4α, factor nuclear 4 α de hepatocito; C, circularidad; c, número de copias genéticas; A, área.

Estas fórmulas únicamente son aplicables a circunferencias perfectas, es decir, aquellos núcleos cuyos valores de circularidad son cercanos a 1. No todos los núcleos analizados presentarán alta circularidad debido a que los hepatocitos pueden ser binucleares y que las células no parenquimales suelen contener núcleos ovalados. De modo que para poder aplicar el protocolo, el contenido de ADN fue calculado multiplicando el volumen de cada célula cuya circularidad superaba el valor de 0,8 [87] por la intensidad nuclear de *Hoechst*. Aquellos núcleos con una circularidad $< 0,8$ y que contenían núcleos poco circulares o binucleares, fueron designados como complejos. De este modo se determinó el contenido de ADN de núcleos muy circulares tanto en la población HNF4 α positiva como negativa. Como control 2c interno se utilizó el valor medio de contenido de ADN de la población no parenquimal. Finalmente se relativizó el valor de contenido de ADN de cada núcleo a los controles, obteniéndose diferentes grupos de ploidía hepática (Figura 12).

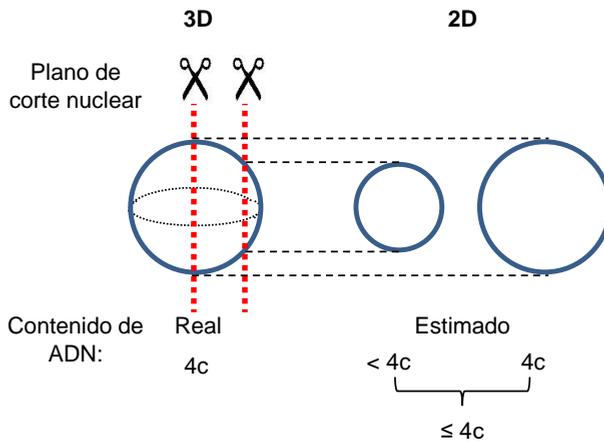


Figura 13. Ilustración de las posibles estimaciones de ploidía inferiores a las reales. Los núcleos de hepatocitos en 3 dimensiones (3D) que sean cortados para su análisis en 2D por su eje central, tendrán una ploidía estimada exacta a la real, pero variaciones en el eje de corte resultarían en un área nuclear menor y por tanto una estimación de ploidía inferior a la real. 2D, 2 dimensiones; 3D, 3 dimensiones; c, número de copias genéticas.

Otra de las limitaciones de esta técnica es la capacidad de medir únicamente la ploidía mínima nuclear. Esto se debe a que la segmentación de núcleos por su eje medio indicaría la ploidía exacta, ya que el área en 2D

sería la máxima. Sin embargo, aquellos núcleos que se encuentren cortados por un plano que no coincida con su eje central, poseerán un área inferior a su máximo valor. De esta forma, la estimación de su ploidía será inferior a la real. En cualquier caso, sería una limitación equivalente entre diferentes muestras (Figura 13).

3.10.5 Análisis de granularidad de Spp1

Mediante el uso de la herramienta multiparamétrica IN Cell Analyzer, se procedió al cálculo del número de gránulos de Spp1 observados por célula. A partir del marcaje por inmunofluorescencia de Spp1 en criocortes de hígados de ratón *WT* e *Irs2^{-/-}* tratados durante 14 días con dieta DDC, se llevó a cabo la adquisición y análisis por IN Cell previamente descrito en el apartado 3.10.2. Además de identificar las células Spp1 positivas, el análisis se complementó incluyendo la detección de acúmulos de píxeles positivos para este marcador, referenciados como gránulos. Para asegurar un análisis más certero, al tratarse de un parámetro de estudio muy dependiente del enfoque de la muestra, se eliminaron todos aquellos campos que no cumplieran con el criterio de nitidez requerido para este análisis. De esta forma se procesaron 6 muestras en cada grupo, analizando un total de $2,7 \times 10^4$ células Spp1 positivas, obteniendo así el número medio de gránulos en la población Spp1 en cada grupo de animales.

3.11 Inmunodetección de proteínas por *Western blot*

- Extracción de proteínas:

Las muestras provenientes de tejidos fueron introducidas en un tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM (Sigma-Aldrich, Panreac) pH8, NaCl 150 mM (Panreac), NP-40 1% (Sigma-Aldrich), deoxicolato de sodio 0,5% (Sigma- Aldrich) y SDS 0,1%. En el momento de su uso, se complementó con un mix de inhibidores de proteasas y fosfatasa consistente en Complete 1x (Roche), β -Glicerolfosfato 50 mM (Sigma-Aldrich), PMSF 20 mM (disuelto en etanol, Roche) y Ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) 200 μM (Sigma-Aldrich). Los tejidos fueron lisados con un

homogeneizador Polytron PT1600E (Kinematica, Suiza) aplicando tres ciclos de lisis de 10 segundos y 15 segundos de descanso en hielo.

Para la extracción proteica de muestras que provenían de cultivos celulares, se procedió a realizar tres lavados en frío con PBS de las placas que contenían los cultivos adherentes. Tras lo cual, las células fueron rascadas de la placa y recolectadas en un tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, Tween-20 1% (Sigma-Aldrich) y NP-40 0,2% al que se le añadió el mix de inhibidores de proteasas y fosfatasa previamente descrito. La lisis se llevó a cabo usando un sonicador Branson Sonifier 150 aplicando también tres ciclos de lisis de 10 segundos y 15 segundos de descanso en hielo.

Los homogeneizados resultantes fueron incubados durante 40 minutos en hielo y centrifugados a 4°C durante 30 minutos a 13200 rpm. El sobrenadante en el que se encontraban las proteínas purificadas fue pasado a un nuevo tubo eppendorf y almacenado a -80°C hasta su posterior uso.

- Cuantificación y preparación de proteínas:

La concentración proteica fue calculada usando el kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Se utilizó un lector de placas Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, Finland) para medir de forma colorimétrica a 562 nm la concentración proteica de las muestras, referenciándola a una curva patrón de BSA, según las instrucciones del fabricante. Se prepararon 20 µg de cada una de las muestras proteicas junto con tampón de carga compuesto por Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, Glicerol 10% (Sigma-Aldrich), SDS 1,6% (Sigma-Aldrich), β-Mercaptoetanol 5%(Sigma-Aldrich) y Azul de bromofenol 0,005% (Biorad). Estas muestras fueron desnaturalizadas aplicando un choque de calor a 97°C durante 5 minutos, seguido de una centrifugación de 5 segundos a 13000 rpm.

- Separación de proteínas por peso molecular y transferencia:

Las muestras proteicas se cargaron junto con un marcador de peso molecular (Biorad) en un gel de poliacrilamida, variando su porcentaje según el peso molecular de las proteínas a resolver (15% para proteínas muy

pequeñas y hasta 7% para las proteínas mayores). Los geles bifásicos que contenían una fracción inferior de resolución y una fracción superior de estancamiento proteico (Tabla 7) y (Tabla 8).

Fase de resolución (Vf=10mL)	6%	7%	8%	10%	12%	12,5%	15%
H ₂ O (mL)	3,39	3,14	2,89	2,39	1,89	1,765	1,14
Tampón de resolución (TrisHCl 1,5M, 0,4% SDS, pH 8,8) (mL)	3	3	3	3	3	3	3
Acilamida 40% (mL)	1,5	1,75	2	2,5	3	3,125	3,75
Glicerol (mL) (Biorad)	2	2	2	2	2	2	2
APS 10% (μL)	100	100	100	100	100	100	100
TEMED (μL)	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 7. Componentes de la fase de separación de geles de poliacrilamida. Los volúmenes a añadir de cada reactivo se detallan en función del porcentaje de acrilamida final del gel.

Fase de estancamiento (Vf=4mL)	4,5%
H ₂ O (mL)	2,46
Tampón de estancamiento (TrisHCl 0,5M; 0,4% SDS, pH 8,8) (mL)	1
Acilamida (mL) 40% (29:1)	0,5
APS 10% (uL)	40
TEMED (uL)	4

Tabla 8. Componentes de la fase de estancamiento de geles de poliacrilamida.

El gel se introdujo en una cubeta junto con tampón de separación (Tris 25 mM, Glicina 200 mM (Calbiochem), SDS 0,05%) usando el sistema Mini-Protean de Biorad. Se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) aplicando una corriente constante de 60 V durante 15 minutos, hasta que las muestras alcanzaron la fase inferior del gel, cuando se aplicó una corriente de 120 V hasta la completa resolución de la franja de peso molecular de las proteínas de interés.

Posteriormente, se procedió a la transferencia de las proteínas resueltas a una membrana PVDF (Biorad). La membrana fue previamente activada con metanol 100% (Merk) durante 5 minutos en agitación y manteniéndola en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 200 mM,

Capítulo 3. Materiales y métodos

metanol 10%). Se realizó una transferencia húmeda aplicando un voltaje de 100 V durante 90 minutos en agitación y a 4°C. Tras lo cual, se procedió a bloquear la membrana con tampón de bloqueo BSA 3% en TBST (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH7,5) en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario.

- Detección de proteínas:

Para la detección de la proteína de interés, la membrana fue incubada durante 16 horas en agitación a 4°C con el anticuerpo primario específico que reconoce a la proteína de estudio, diluido en tampón de bloqueo (Tabla 9).

Anticuerpo	Huésped	Referencia	Dilución
Anti-Caspasa3 activa (Asp175)	Conejo	Cell Signalling Technology (cs9664)	1:500
Anti-E-Cadherina	Ratón	BD Biosciences (610182)	1:500
Anti-FGF7	Ratón	R&D systems (MAB251-100)	1:500
Anti-GFAP	Conejo	DAKO (Z0334)	1:1000
Anti-IRS2 clon B-5	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (sc390761)	1:500
Anti-N-Cadherina clon 32 (RU)	Ratón	BD Biosciences (61092)	1:500
Anti-P53	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (sc71819)	1:500
Anti-p-AKT (Ser 473)	Ratón	Cell Signalling Technology (4051s)	1:1000
Anti-pERK	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (sc7383)	1:500
Anti-p-GSK3β (Ser 9)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology (sc11757)	1:500
Anti-SPP1	Cabra	Sigma Aldrich (O3389)	1:1000
Anti-Vimentina Clon E-5	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (sc373717)	1:500
Anti-α SMA	Conejo	Abcam (ab5694)	1:1000
Anti-β-actina	Ratón	Sigma Aldrich (A1978)	1:40000

Tabla 9. Listado de anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por *western blot*.

Tras la incubación del anticuerpo primario, se realizaron 6 lavados a la membrana con tampón TBST durante 5 minutos en agitación para eliminar exceso de anticuerpo y uniones inespecíficas. Seguidamente, se incubó el anticuerpo secundario específico para el reconocimiento del primario conjugado a la encima HRP (Cell Signaling Technology), diluido en tampón de bloqueo (1:5000), durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente (Tabla 9). Finalmente se realizaron 6 lavados a la membrana con tampón TBST durante 5 minutos en agitación para eliminar exceso de anticuerpo y uniones inespecíficas.

Para detectar la señal lumínica emitida por la encima HRP, la membrana fue incubada con una solución de sustrato ECL (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. La membrana se introdujo en un casete (Amersham) donde fue expuesta a películas CURIX RP2 Plus (AGFA) en condiciones de oscuridad. Finalmente, las películas fueron reveladas usando una reveladora AGFA Curix 60 y posteriormente escaneadas. La señal resultante fue cuantificada usando el software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) y normalizada usando la señal de un control de carga (β -Actina).

3.12 Análisis de expresión génica por RT-qPCR

Los ensayos de RT-qPCR para el análisis de expresión génica fueron llevados a cabo por la Dra. Amparo Galán.

- Extracción y purificación de ARN

Para la extracción de ARN de muestras provenientes de cultivos celulares, se utilizó el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) basado en un sistema de lisis, adhesión, lavado y elución por columnas con tratamiento de DNasa (Qiagen) para la eliminación de DNA genómico. La extracción de ARN de las muestras de tejido, se llevó a cabo homogeneizando entre 50-100 mg de estas en 1 mL de TRIzol (MilliporeSigma) con un homogeneizador Polytron PT1600E (Kinematica, Suiza) y posterior precipitación con alcoholes. El ARN obtenido se purificó posteriormente con el el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo de RNA Clean up y digestión en columna con DNasa

para obtener una pureza adecuada para su uso posterior en técnicas de análisis de PCR. La calidad y concentración del ARN fue medida usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (v3.7, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EEUU), conservándose a -80°C hasta su uso.

- Retrotranscripción:

Las muestras de ARNm (1-3 ug por muestra) fueron retrotranscritas a ADNc usando el kit EcoDry Premix (Takara) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las preparaciones de ADNc fueron diluidas a la solución de trabajo adecuada con agua libre de ADNasa y ARNasa.

- RT-qPCR:

La reacción se llevó a cabo en placas de 384 pocillos (Biotest Diagnosticos, Roche), que contenían una mezcla de reacción consistente en: 0,1 uL de la pareja de cebadores correspondiente (0,5 µL del cebador *forward* y 0,5 µL del cebador *reverse*) con una concentración inicial 50 mM, 5 uL de muestra de ADNc (100-200 ng) y 4,9 µL de SYBR PreMix ExTaq (Mi RNaseH Plus, Takara). Los cebadores utilizados para el estudio de cada gen (Tabla 10) se diseñaron libres de intrones para aplicar la técnica de RT-PCR. Seguidamente, las placas fueron cubiertas con un film termo-adhesivo (Roche) sometiéndola a una centrifugación corta para asegurar la mezcla de todos los componentes de reacción. Finalmente la placa se introdujo en un termociclador LightCycler 480 II (Roche) en el que se programó: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 45 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, anillamiento a 54°C durante 20 segundos, y extensión a 72°C 30 seg (con detección de fluorescencia) y 1 ciclo de fusión.

Todas las muestras se analizaron por triplicado, incluyendo controles negativos (muestras sin ADNc) y controles positivos utilizados como calibradores intraexperimentales. La expresión relativa de ARNm fue calculada utilizando como control de expresión para líneas celulares humanas la proteína ribosomal L19 (*RPL19*) y para tejido de ratón la gliceraldehido-3-fosfatasa deshidrogenasa (*Gapdh*). El cálculo de la

expresión relativa de los genes referidos al gen de referencia se realizó mediante la aplicación del método del $\Delta\Delta Ct$.

Gen	Especie	Cebador Forward	Cebador Reverse
E-Cadherina	Humano	5'-TGCCCCCAATAC CCCAGCGT-3'	5'-ACGGTGGCTGTG GAGGTGGT-3'
Epcam	Ratón	5'-AACACAAGACG ACGTGGACA-3'	5'-CCGTTCACTCT CAGGTCCAT-3'
FGF7	Humano	5'-TGCAATGAACAA GGAAGGAA-3'	5'-CCGTTGTGTGTC CATTAGC-3'
Fgf7	Ratón	5'-TTGACAAACGAG GCAAAGTG-3'	5'-CCCTTTGATTGCC ACAATTC-3'
FGFR2-IIIb	Humano	5'-TGCTGGCTCTG TTCAATGTG-3'	5'-GGCGATTAAGAA GACCCCTA-3'
Fgfr2-IIIb	Ratón	5'-AAGGTTTACA GCGATGCCCA-3'	5'-AGAGCCAGCA CTTCTGCATT-3'
Gapdh	Ratón	5'-TGCAAGAGACAG AGGAGTGG-3'	5'-GGCGATAGTCGT TAGCTTCG-3'
IRS2	Humano	5'-GTTTCCAGAAG CAGCCAGAG-3'	5'-TGAAATGGATG CATCGTACC-3'
P53	Humano	5'-CACATGACGGAG GTTGTGAG-3'	5'-ACACGCAAATTC CTCCAC-3'
RPL19	Humano	5'-CGAATGCCAGAG AAGGTCAC-3'	5'-CCATGAGAATCC GCTTGTTT-3'
Spp1	Ratón	5'-GCTTGGCTTA TGGACTGAGG-3'	5'-GACTCACCGCT CTTCATGTG-3'

Tabla 10. Lista de parejas de cebadores utilizados en el ensayo de RT-qPCR.

3.12.1 Meta-análisis de expresión de IRS2 en tejido hepático humano

El grupo del Dr. Yujin Hoshida del *UT Southwestern Medical Center* (Texas, EEUU) llevó a cabo un meta-análisis de expresión de ARNm de IRS2 recopilando la información desde bases de datos accesibles de forma pública. Un primer análisis fue realizado con datos de 10 muestras de hígados sanos, 10 con inflamación, 10 cirróticos y 26 con HCC, distinguiendo dos grupos tumorales, uno de estadio temprano (13 muestras) y otro de estadio avanzado (13 muestras) todos ellos recogidos en la base de datos "Gene Expression Omnibus" bajo el número de acceso "GSE54238".

Por otra parte también se analizaron diferencias en la expresión de IRS2 en un total de 374 muestras de HCC recopiladas en el *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Estas muestras a su vez fueron clasificadas en varios subgrupos moleculares (S1-S3) según su perfil de expresión génica. El subgrupo S1 (n=105) representa aquellos tumores caracterizados por poseer un perfil progenitor con baja tasa de diferenciación y supervivencia. El S2 (n=93) posee un tamaño mayor y en él se encuentran inducidos genes como MYC y AKT. Finalmente, el S3 (n=176) se caracteriza por poseer un perfil tumoral diferenciado y de menor tamaño [159].

3.13 Ensayo de viabilidad y crecimiento celular MTT

Para medir la viabilidad celular, las células bajo estudio se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad y durante un tiempo determinado por la línea de estudio (Tabla 11).

Línea celular	Número de células sembradas	Tiempo en cultivo
LX2 activadas	2000	48 horas
LX2 inactivadas	15000	5 días
Huh6	2000	48 horas
Hep3B	4000	48 horas

Tabla 11. Listado de condiciones de experimentación para el ensayo MTT según la línea celular usada.

Después de la incubación celular, se añadió 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) previamente disuelto en PBS (libre de Mg^{+2} Ca^{+2}) pH 7,4 a una concentración final 5 mg/mL y filtrado, en un ratio 1:5 al medio de cultivo en condiciones de oscuridad. Tras 4 horas en el incubador celular, el medio fue aspirado y los cristales de formazán resultantes tras la metabolización del compuesto por las células vivas, se disolvieron en 100 μ L de dymethylsulfoxide (Sigma-Aldrich), dando lugar a una reacción colorimétrica directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Se midió la densidad óptica resultante a 570 nm usando un lector de microplacas automático (Victor; PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

3.14 Ensayo de proliferación con 5-Bromo-2-Dexosiidina (BrdU)

Las células Huh6 se sembraron en una placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos, a una densidad de 20000 células por pocillo. Tras 24 horas en cultivo, se añadió una disolución filtrada de BrdU (Sigma) a concentración final de 10 μ M en medio de cultivo fresco. Tras 3 horas de incubación a 37°C y 0,5% CO₂, la disolución fue retirada y realizándose 2 lavados de 5 segundos y 3 lavados más de 2 minutos cada uno, con PBS. Tras la eliminación por completo del BrdU, se fijaron las células con PFA 4% disuelto en PBS durante 10 minutos. Se llevaron a cabo 3 lavados de PBS y se procedió a la permeabilización celular usando una disolución en base de PBS-0,5% Tritón 100X durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras lo cual, se realizaron dos lavados con PBS y se procedió a hidrolizar el ADN mediante la incubación de las células con ácido clorhídrico 1M durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se eliminaron los restos de ácido con PBS y se procedió siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.9.2 a realizar una incubación con el anticuerpo primario anti-BrdU.

3.15 Ensayo de herida (*wound healing*)

El ensayo de herida se llevó a cabo para evaluar la capacidad migratoria celular *in vitro*. Para ello se utilizaron placas de 12 pocillos, en los que se rotuló una línea horizontal en la base externa de la placa. En el caso de las células LX-2, las placas fueron pretratadas con gelatina (0,1%). Las células fueron sembradas siguiendo las condiciones de cultivo estándar de cada línea celular. Una vez llegado a su estado confluyente, se rascó una línea vertical en el centro de cada pocillo utilizando puntas p200, quedando una franja libre de células. Se procedió a aspirar el medio, a hacer un lavado con PBS para eliminar restos celulares y a añadir medio de cultivo fresco. Usando un microscopio de campo claro (Leica DM IL) y utilizando el contraste de fases, se realizó una foto a cada pocillo en el lugar de la herida, utilizando la marca rotulada como referencia de posición. Tras 24 horas

(células LX2) y 7 horas (células Huh6) de cultivo, se realizó otra fotografía exactamente en el mismo lugar donde se hizo en el tiempo inicial.

Utilizando el software ImageJ se midió el área de la herida inicial y final, con lo que se calculó la tasa de migración de cada línea celular, referenciando los controles a 1. Se realizaron 3 experimentos independientes, con al menos 3 réplicas cada uno, comparándose únicamente heridas con un área inicial similar.

3.16 Ensayo de migración e invasión por *transwell*

Para mediar las capacidades migratorias e invasivas *in vitro* se procedió a realizar un ensayo con pocillos *transwell* (EMD Millipore Millicell, Fisher Scientific) para placas de 24 pocillos con un diámetro de poro de 8 μm . Para el experimento de migración, los pocillos *transwell* fueron prehidratados con 100 μL de medio de cultivo completo con baja concentración de suero (1%). Mientras que para los experimentos de invasión, la prehidratación se realizó con matrigel 0,4 mg/mL disuelto en medio de cultivo completo con baja concentración de suero (1%), ambos durante 1 hora en el incubador. Las células utilizadas fueron disgregadas con tripsina siguiendo el procedimiento estándar descrito en el apartado 3.2. Fueron centrifugadas durante 5 minutos a una velocidad de 1000 rpm y resuspendidas en medio de cultivo completo 1% suero a una concentración de 4×10^5 células/mL. Seguidamente, se añadieron 750 μL de medio completo 10% suero a cada pocillo, introduciendo con unas pinzas un inserto *transwell* en cada uno. Sobre cada *transwell* se sembraron 200 μL de la suspensión celular previamente preparada y se dejó en el incubador celular durante 4 horas y 30 minutos. Tras la incubación, el medio contenido en el inserto fue aspirado con pipeta suavemente y se realizó un lavado con PBS. Las células pegadas al *transwell* fueron fijadas y teñidas con una disolución a partes iguales de metanol-PBS y cristal violeta (0,5%) (Sigma) durante 15 minutos en oscuridad y agitación ligera. Finalmente, el cristal violeta fue retirado por decantación y los insertos fueron lavados por inmersión en PBS. Las células contenidas en la parte superior del inserto fueron eliminadas con

el algodón de un bastoncillo, quedando únicamente fijadas y teñidas las células migradas en la parte inferior del *transwell*. El inserto fue cortado con un cúter y montado con medio de montaje acuoso (Tissue-Clear-Based Mounting Medium, Dako) sobre un portaobjetos para su posterior análisis de imagen.

El número de células migradas fue calculado mediante la adquisición y análisis de 4 campos aleatorios en cada pocillo usando la plataforma de imagen "IN Cell 1000" descrita en el apartado 3.10. Las imágenes mostradas, representativas de 3 experimentos independientes, fueron adquiridas usando el software Pannoramic Viewer (3DHISTEC).

3.17 Ensayo de clonogénesis

El ensayo de clonogenicidad se llevó a cabo sembrando una cantidad muy escasa de células por pocillo, para asegurar el aislamiento espacial de cada célula y medir así su capacidad para sobrevivir en este ambiente hostil en el que se carece de señalización intercelular, y de formar finalmente una colonia de al menos 50 células. Las líneas celulares se trataron de forma estándar, se disgregaron por tripsinización hasta conseguir células completamente separadas y se sembraron en placas de 6 pocillos en triplicados. La línea Huh6 y Hep3B fueron sembradas a una densidad de 200 células/pocillo, manteniéndose por 11 días en cultivo. El medio de cultivo fue reemplazado 2 veces por semana. Finalizado el tiempo de crecimiento celular, se aspiró el medio de cada pocillo y se realizó un lavado con PBS. Para teñir y fijar las colonias, se añadió 1 mL de una disolución 0,5% cristal violeta PBS:metanol 1:1 filtrada, manteniendo las placas en agitación suave durante 15 minutos. Seguidamente se realizaron varios lavados con agua destilada, dejándose secar las placas y escaneándose cada pocillo con un escáner de oficina (EPSON perfection V200 photo) a una resolución de 600dp y en escala de grises.

El análisis de cada pocillo se realizó utilizando el software ImageJ, con el que se transformó cada imagen a un formato binario y se analizó el área de cada colonia formada por pocillo. Con el programa Microsoft Excel

se realizaron distribuciones del número de colonias según su área, eligiendo una distribución logarítmica en base 2 y siendo representada en formato x-y con el programa GraphPad.

3.18 Análisis estadístico

La representación de datos y el análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, <http://www.graphpad.com>). El número de muestras independientes representado como “n” en el apartado de resultados, indica el número de animales utilizados en el caso de los experimentos *in vivo*, el número de tumores analizados en los experimentos de xenoinjertos y el número de experimentos independientes llevados a cabo en el caso de los experimentos *in vitro*. Los ensayos analíticos utilizados fueron: t-test, para comparar una variable entre dos muestras, *one-way* ANOVA para la comparación de varias muestras con una sola variable y *two-way* ANOVA para comparar varias muestras en las que intervienen diferentes variables. Los resultados fueron pareados cuando se aplicaron las mismas variables de experimentación.

Resultados

4.1 Bloque 1: El papel de IRS2 durante la reparación del daño hepático

La regeneración hepática puede estar liderada por hepatocitos que proliferan masivamente para repoblar el hígado, o por células progenitoras que emergen cuando este tejido sufre un daño crónico causado por la ingesta de alcohol, la dieta, infecciones hepáticas, etc. Este trabajo de investigación se ha centrado en el estudio de la respuesta progenitora durante el daño hepático crónico, por lo que el modelo utilizado ha sido el de la dieta DDC al 0,1% que induce la expansión de células de carácter progenitor. La dieta fue administrada durante diferentes intervalos de tiempo (día 0, 7, 14 y 21 días) a animales *WT* e *Irs2*^{-/-} (Figura 14, A). Como se ha descrito en la introducción, esta dieta induce una remodelación del tejido que genera una respuesta ductular en la que CPHs se disponen alrededor de las venas portales hepáticas, interaccionando con las células estromales para proliferar y madurar hacia hepatocitos y colangiocitos *de novo*, que ayudan a mantener la función parenquimal (Figura 14, B). Las células estromales participan en primer lugar induciendo una respuesta fibrogénica a causa de la pérdida masiva de células parenquimales. También participan en la comunicación estroma-epitelio generando factores paracrinos que permiten la proliferación y maduración de CPHs. Durante el daño, esta población fibrótica es capaz de remitir dando lugar a un proceso de resolución [130].

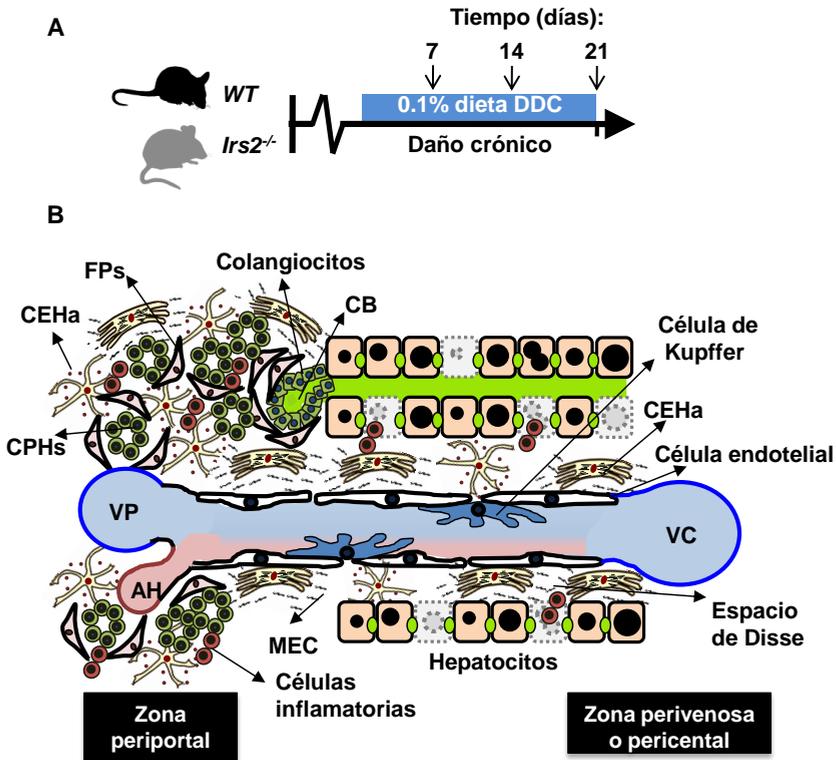


Figura 14. Modelo de experimentación de daño hepático crónico utilizado. (A) Diseño de protocolo de administración de dieta DDC. (B) Respuesta celular tras el daño hepatotóxico causado por la administración de la dieta DDC, en el que se produce una remodelación tisular a consecuencia de la expansión de CPHs alrededor de VPs y activación de CEHs y FPs, que forman parte del nicho progenitor y dan lugar a deposiciones en la MEC. *Irs2*, sustrato receptor de insulina 2; DDC, 3,5-dietoxicarbinol-1,4-dihidrocolina; VP, vena portal; AH, arteria hepática; VC, vena central; CB, conducto biliar; FPs, fibroblastos portales; CEHa, célula estrellada hepática activada; CPHs, células progenitoras hepáticas; MEC, matriz extracelular.

Los resultados mostrados a continuación se basan en el análisis de varias poblaciones celulares, tanto *in vivo* utilizando el modelo animal, como *in vitro* mediante la manipulación de líneas celulares humanas implicadas en la respuesta al daño hepatocítico.

4.1.1 Estudio de la respuesta al daño crónico hepático en animales *Irs2*^{-/-}

En primer lugar, se procedió a analizar cómo la resistencia a insulina causada por la falta de *Irs2* afecta al hígado durante el daño crónico hepático causado por la dieta DDC, inductora de células progenitoras. Para ello se estudiaron cambios en las poblaciones celulares de hepatocitos, CPHs, CEHs y FPs.

4.1.1.1 La ausencia de *Irs2* altera la capacidad de atenuación del daño hepático crónico

Con el objetivo de analizar si la ingesta de la dieta DDC estaba generando un daño hepático durante su administración a lo largo del tiempo, se procedió a la medida de enzimas de daño hepático en suero como la alaninoaminotransferasa (ALT) o la aspartato aminotransferasa (AST). Tras 7 días, los resultados mostraron una inducción similar en ambos grupos de animales, indicando inicialmente un daño comparable. Sin embargo, tras 14 y 21 días, los animales *Irs2*^{-/-} mostraron niveles mayores de ambas enzimas en sangre, indicativo de un mayor nivel de daño hepatocítico. De forma llamativa, los animales controles reducían los niveles de ALT y AST entre 7 y 14 días de dieta DDC, indicando una capacidad de respuesta al daño alterada en la ausencia de *Irs2* (Figura 15, A). Complementariamente, también se analizó la tasa apoptótica celular en ambos grupos de animales mediante un ensayo de inmunofluorescencia con caspasa-3 activa en estos hígados. Los resultados no mostraron diferencias entre ambos grupos de animales tras 14 días de dieta DDC. Sin embargo, tras 21 días de dieta, se observó una mayor tasa en el número de células en apoptosis en los animales *Irs2*^{-/-} (Figura 15, B), pudiendo indicar una menor capacidad de los hígados *Irs2*^{-/-} de contención del daño en comparación con los controles.

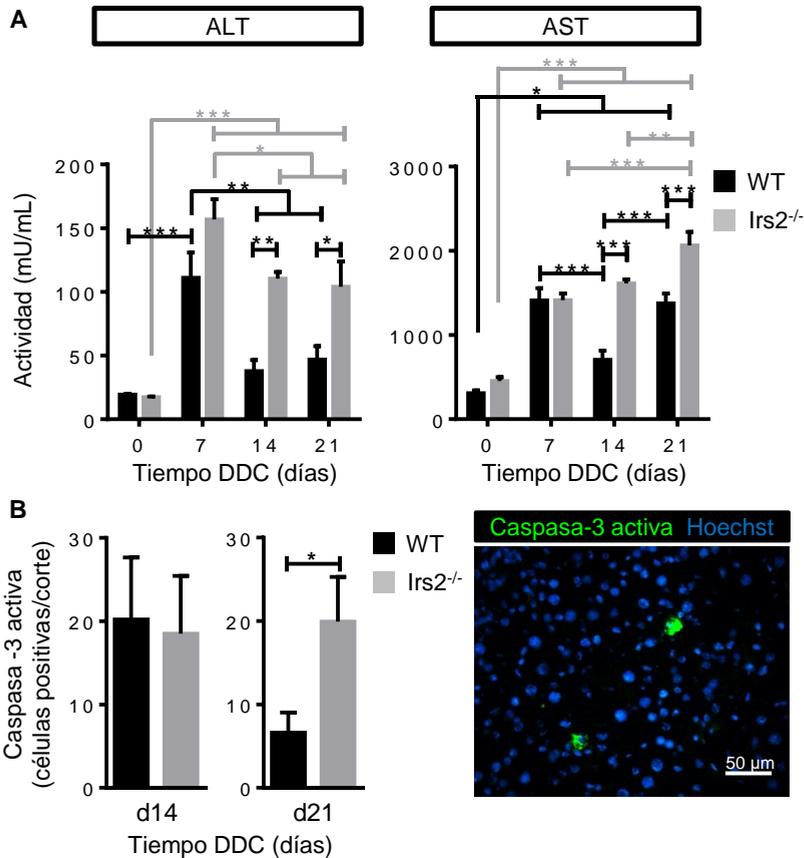


Figura 15. *Irs2* es necesario para reducir los niveles de daño hepático durante la dieta DDC. (A) Niveles de transaminasas hepáticas en suero de animales *WT* e *Irs2*^{-/-} durante el tratamiento con dieta DDC (n=4). Medias comparadas mediante un análisis *two-way* ANOVA aplicando un test de Bonferroni para comparaciones múltiples. (B) Análisis por inmunofluorescencia de caspasa-3 activa en criosecciones de hígados de animales *WT* e *Irs2*^{-/-} tratados durante 14 y 21 días con dieta DDC (derecha) que fueron cuantificados como células positivas por corte (izquierda). Barra de escala 50 μm. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test no pareado. Los datos representan la media + SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, y ***p < 0,001. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; DDC, 3,5-dietoxicarbinol-1,4-dihidrocolina; d14, día 14; d21, día 21.

4.1.1.2 La ausencia de *Irs2* acentúa la pérdida de hepatocitos pequeños durante el daño crónico hepático

Con el propósito de analizar más en detalle el efecto de la dieta DDC sobre la población de hepatocitos, que representan la unidad funcional del hígado, se realizaron tinciones de inmunofluorescencia de los hígados de

animales *WT* e *Irs2*^{-/-} tratados con dieta DDC 0,1% durante 0, 14 y 21 días. El marcaje del factor de transcripción nuclear de hepatocitos (HNF4 α) y de la totalidad de núcleos utilizando *Hoechst*, mostró una pérdida en la densidad de núcleos de hepatocitos a medida que avanzaba el tiempo de administración de la dieta. Tras 21 día se observaron diferencias entre ambos grupos de animales, no sólo en la densidad de núcleos marcados sino también en su tamaño (Figura 16, A).

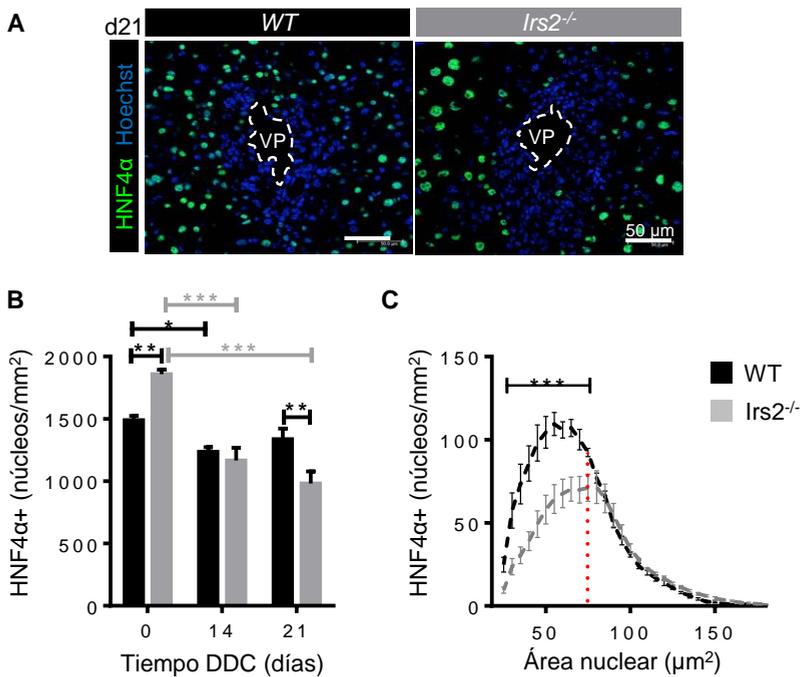


Figura 16. La falta de *Irs2* incrementa la reducción de células HNF4 α positivas durante el tratamiento con dieta DDC. (A) Imágenes representativas del análisis de inmunofluorescencia de HNF4 α y *Hoechst* en criocortes de hígados de ratones *WT* e *Irs2*^{-/-} tras 21 días de dieta DDC. Barra de escala 50 μ m. (B) Cuantificación del número de núcleos HNF4 α positivos por mm² en animales *WT* e *Irs2*^{-/-} (n = 4–6, total de 5,1 \times 10⁵ núcleos HNF4 α + analizados). (C) Distribución por tamaño del número de núcleos HNF4 α positivos por mm² en animales *WT* e *Irs2*^{-/-} tras 21 días de dieta DDC (n = 4, total de 1,2 \times 10⁵ núcleos HNF4 α + analizados). Los datos representan la media + SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, y ***p < 0,001. Medias comparadas mediante un análisis two-way ANOVA aplicando un test de Bonferroni para comparaciones múltiples. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; DDC, 3,5-dietoxicarbinol-1,4-dihidrocolina; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; HNF4 α , factor nuclear 4 α de hepatocito; VP, vena porta; d21, día 21.

Estas muestras fueron estudiadas en mayor detalle por medio de un análisis de imagen de alto contenido, utilizando el software *IN cell analyzer*. Con este se calculó el número de núcleos HNF4 α positivos por unidad de área durante el progreso del daño hepático. Como resultado se observó una reducción parenquimal entre los hígados controles (día 0 de dieta) y los tratados durante 14 días en ambos grupos de animales, consecuente con el daño hepatocítico causado por la dieta DDC. Sin embargo, se observó que entre día 14 y día 21 esta pérdida se mantenía en los animales *WT*, mientras que en los *Irs2*^{-/-} se veía aún más acentuada. Como consecuencia, tras 21 días de dieta DDC, se obtuvo una reducción significativa en el número de núcleos HNF4 α positivos por unidad de área en los animales *Irs2*^{-/-} en comparación con los *WT* (Figura 16, B).

Gracias a la capacidad de análisis multiparamétrico del software *IN cell analyzer*, se halló el área de cada núcleo adquirido, permitiendo así realizar una distribución de núcleos HNF4 α positivos en función de su tamaño en ambos grupos de animales tras 21 días de dieta DDC. En esta se observó que la reducción de núcleos de hepatocitos se produce principalmente en la población de menor área nuclear (<75 μm^2) (Figura 16, C).

4.1.1.3 La delección de *Irs2* aumenta el número de núcleos de hepatocitos Ki67 positivos durante el tratamiento DDC

Dada la observación de la reducción de hepatocitos, se procedió a analizar si esta pudiera deberse a cambios en la capacidad proliferativa hepatocítica. Para ello se realizó un análisis de imagen con *IN cell analyzer* a partir de muestras de hígados tratados con dieta DDC (día 0, 14 y 21) teñidos mediante inmunofluorescencia con HNF4 α y Ki67 como marcador de células en proliferación (tanto en fase G1, S, G2 y mitosis) (Figura 17, A). El cálculo del porcentaje de núcleos de hepatocitos Ki67 positivos no mostró diferencias entre 14 y 21 días de daño hepático en los animales *WT*. Cabe destacar que a pesar de que en los animales *Irs2*^{-/-} se observó una reducción del número de núcleos de hepatocitos tras 21 días de dieta DDC, estos

presentaban un mayor porcentaje de positividad para el marcador Ki67 (Figura 17, B). Este resultado es un indicador de que la mayor pérdida hepatocítica observada en estos animales no era debido a fallos proliferativos en esta población celular.

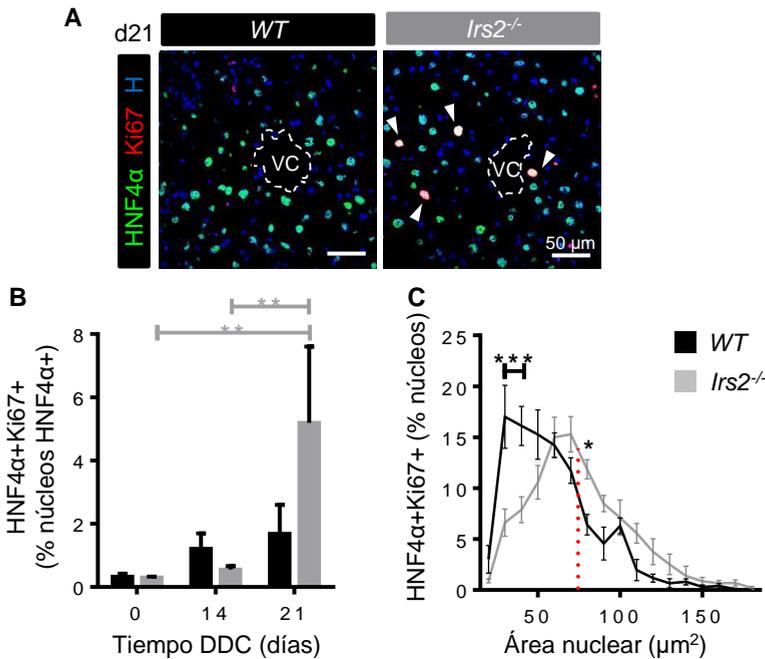


Figura 17. Inducción de núcleos Ki67 HNF4α doble positivos en animales *Irs2*^{-/-} tras 21 días de daño hepático. (A) Imágenes de inmunofluorescencia representativas de la población HNF4α Ki67 doble positiva (flechas) alrededor de venas centrales (línea punteada blanca, VC) criocortes de hígados de ratones *WT* e *Irs2*^{-/-} tras 21 días de dieta DDC. Barra de escala 50 µm. (B) Cuantificación del porcentaje de núcleos HNF4α+ Ki67+ doble positivos sobre el total de núcleos HNF4α+ durante 0, 14 y 21 días de dieta DDC (n = 4–6). (C) Distribución del porcentaje de núcleos HNF4α+ Ki67+ doble positivos según su área nuclear (µm²) después de 21 días de dieta DDC en animales *WT* e *Irs2*^{-/-} (n=4). Línea roja posicionada en el punto en el que se observa una reducción de células HNF4α+ <75 µm². Medias comparadas mediante análisis *two-way* ANOVA aplicando un test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, y ***p < 0,001. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; DDC, 3,5-dietoxicarbinol-1,4-dihidrocolina; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; HNF4α, factor nuclear 4 α de hepatocito; VC, vena central; d21, día 21.

Además, con el fin de estudiar más en profundidad estas variaciones, se realizó una distribución del porcentaje de núcleos HNF4α Ki67 doble positivos según su tamaño nuclear tras 21 días de dieta DDC. Los resultados mostraron una distribución diferencial en el tamaño de los núcleos

Ki67 positivos entre ambos grupos de animales. Mientras que en los animales *WT* los núcleos de hepatocitos que poseían un mayor índice de proliferación eran los de menor tamaño, en los animales *Irs2^{-/-}* se producía un desplazamiento de la curva hacia tamaños mayores (Figura 17, C). Los hepatocitos son capaces de llevar a cabo ciclos de endoreplicación, en los que el material genético se duplica pero no se lleva a cabo la citocinesis, aumentando así el tamaño celular. Los cambios observados en el área de los núcleos Ki67 positivos podrían resultar en diferencias en la ploidía hepatocítica, por lo que esta fue analizada.

4.1.1.4 La falta de *Irs2* reduce la capacidad de inducción de la población hepatocítica 2c durante el daño crónico hepático

Con el fin de analizar cambios en la ploidía hepatocítica se desarrolló un método de estimación del contenido de ADN nuclear mediante análisis de imagen con *IN cell analyzer*, teniendo en cuenta la morfología y la intensidad de *Hoechst* de cada núcleo. La estimación de ploidía se realizó usando como calibradores 2c internos células no parenquimales HNF4 α negativas.

De este modo se analizó el perfil de núcleos HNF4 α positivos con alta circularidad (“simples”), excluyendo del análisis aquellos núcleos que presentaban una circularidad pobre <0,8 (“complejos”) (Figura 18, A). Al aplicar el método de análisis, en una única muestra se pueden observar diferentes poblaciones de núcleos de hepatocitos distribuidos según su tamaño e intensidad nuclear de *Hoechst*. Aquellos grupos de mayores ploidías están representados por núcleos mayores y poblaciones cada vez más dispersas (Figura 18, B). El análisis numérico de esta distribución resultó en un enriquecimiento de la población 4c, seguido por la 8c, 2c y 16c, estando esta última representada por un número muy reducido de células (Figura 18, C).

Mediante la aplicación de este método, se analizaron de manera más detallada las poblaciones hepatocíticas 2c, 4c, 8c y 16c durante el daño

crónico a partir de criosecciones de hígados WT e *Irs2*^{-/-} teñidos con HNF4α y *Hoechst*. La estimación del contenido de ADN determinó que en ambos grupos de animales las poblaciones 2c y 4c se reducían tras 14 días de administración de dieta DDC. Sin embargo, la población 8c no sufría cambios significativos, y la 16c aumentaba en los controles pero no en los *Irs2*^{-/-}, cuyos niveles eran mayores en condiciones control sin dieta (Figura 19), indicando cambios intrínsecos debidos a la falta de *Irs2*.

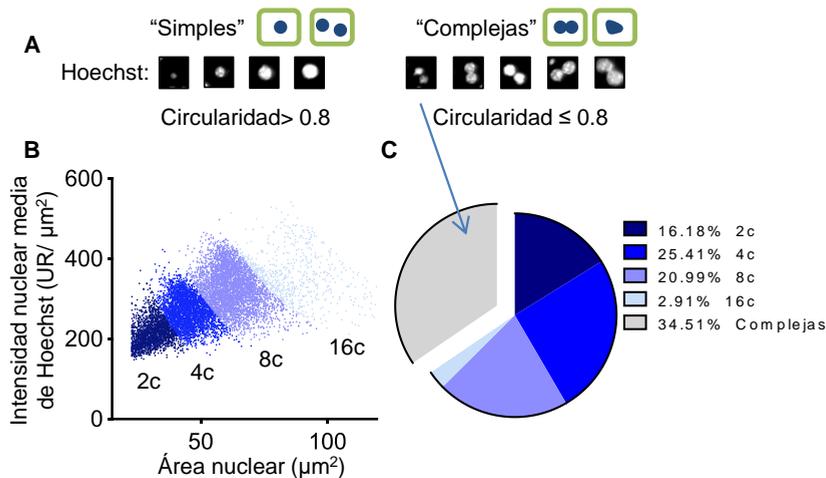


Figura 18. Análisis de ploidía hepática en animales control siguiendo el método desarrollado. (A) Imágenes representativas de los diferentes tipos de núcleos de hepatocitos marcados con *Hoechst* obtenidas mediante la plataforma *IN Cell*. Se distinguen células “simples” con núcleos cuya circularidad supera el valor 0,8 y “complejas” con una circularidad ≤0,8, con variaciones en la intensidad de tinción de *Hoechst*. (B) Distribución de núcleos de hepatocitos simples de una sola muestra control en el que cada punto representa un núcleo y se define en función de su intensidad media de *Hoechst* (unidades relativas/μm²), su área (μm²) y ploidía interpolada. (C) Representación del porcentaje medio de hepatocitos mononucleares 2c, 4c, 8c, 16c y complejos de animales WT control (n=4, análisis de un total de 6,7 x 10⁴ núcleos HNF4α positivos). UR, unidades relativas; c, número de copias genéticas.

La comparación entre ambos grupos de animales mostró una reducción en el número de núcleos HNF4α del 61%, 50,4% y 34,8% en las poblaciones 2c, 4c y 8c respectivamente (esta última no significativa) tras 21 días en los animales *Irs2*^{-/-} (Figura 19), consistente con la mayor pérdida de núcleos hepatocíticos de menor tamaño descrita anteriormente. El resultado más llamativo de este análisis recae sobre la población de núcleos 2c, que se vió incrementada en los animales WT entre 14 y 21 días de dieta DDC.

Se observó un aumento de un 64%, indicativo no sólo de una contención del daño hepatocítico sino también de un proceso de adaptación ausente en los animales *Irs2*^{-/-} (Figura 19).

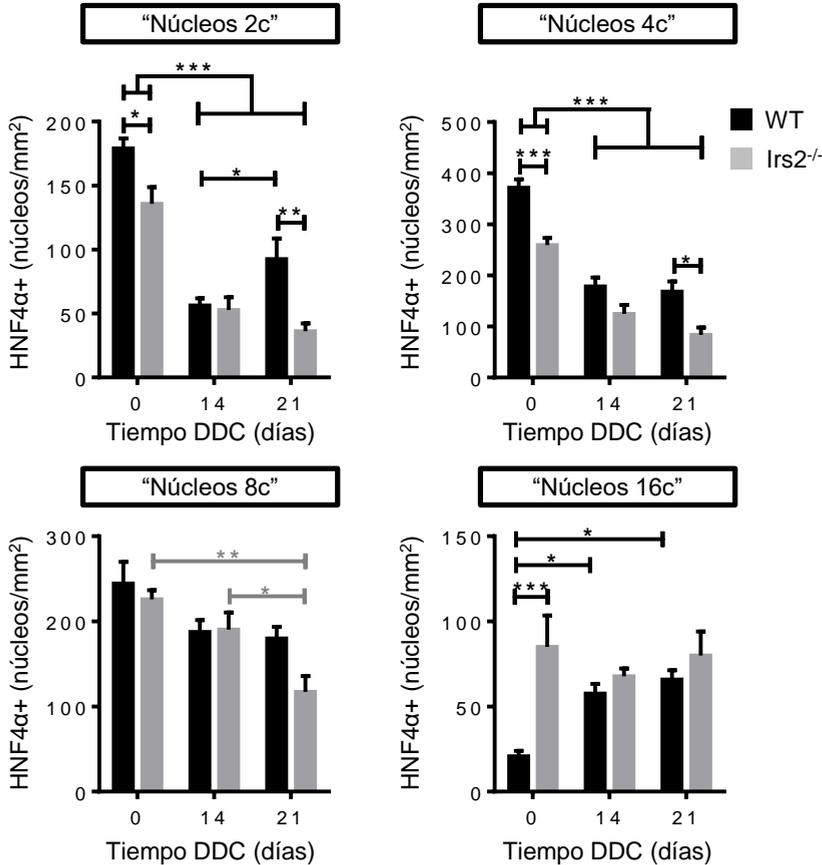


Figura 19. Incapacidad de repoblación de núcleos HNF4α 2c en animales *Irs2*^{-/-} durante el daño hepático. Cuantificación del número de núcleos HNF4α positivos por mm² en animales *WT* e *Irs2*^{-/-} durante 0, 14 y 21 días de dieta DDC, distribuidos en gráficas independientes según la estimación de su contenido de ADN (hepatocitos 2c, 4c, 8c y 16c). n = 4–6, con un total de 3,1 x 10⁴, 7,2 x 10⁴, 7,6 x 10⁴ y 2,6 x 10⁴ núcleos HNF4α+ analizados en las poblaciones 2c, 4c, 8c y 16c respectivamente. Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, y ***p < 0,001. Medias comparadas mediante un análisis two-way ANOVA aplicando un test de Bonferroni para comparaciones múltiples. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; DDC, 3,5-dietoxicarbinol-1.4-dihidrocolina; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; HNF4α, factor nuclear 4 α de hepatocito; c, número de copias genéticas.

4.1.1.5 La inducción de la fracción celular no parenquimal se ve retardada en animales *Irs2*^{-/-} durante el daño crónico hepático

Llevando a cabo el mismo procedimiento que el seguido para estudiar la densidad de núcleos hepáticos durante el daño crónico, se calculó la densidad de la población HNF4α negativa, es decir, la fracción de células no parenquimales (CNP). Los resultados mostraron un incremento en el número de CNPs tras 14 días de dieta DDC en ambos grupos de animales (Figura 20). Esta inducción es consistente con la descrita remodelación tisular que genera la dieta DDC, dando lugar a la formación de ductos para la eliminación de la acumulación de bilis, en los que se expanden las CNPs [121]. Sin embargo, el patrón de inducción de CNPs resultó menos pronunciado en los animales *Irs2*^{-/-} a lo largo del tiempo, observándose una reducción del 21% estadísticamente significativa tras 14 días de dieta DDC en comparación con los animales *WT* (Figura 20).

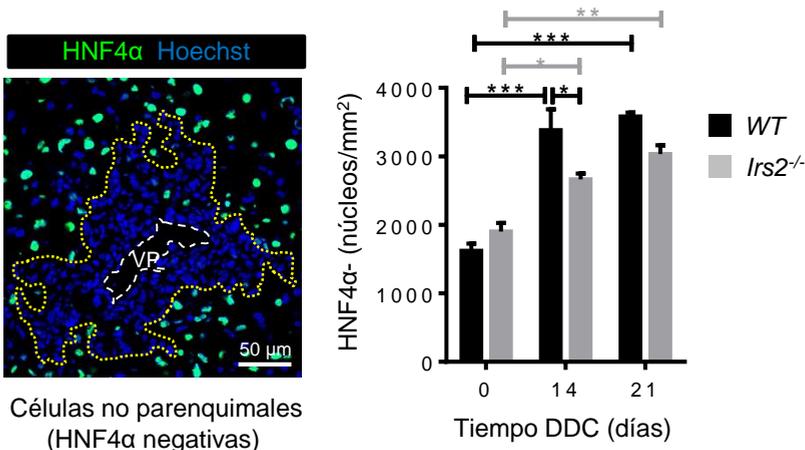


Figura 20. Reducción de CNPs en animales *Irs2*^{-/-} tras 14 días de daño hepático. (Izquierda) Imagen de inmunofluorescencia representativa de la población HNF4α negativa alrededor de venas portales (línea punteada blanca, VP) tras 14 días de dieta DDC. Acumulación de CNPs en zonas periportales, rodeados por línea amarilla. Barra de escala 50 μm. (Derecha) Cuantificación del número de núcleos HNF4α negativos por mm² en animales *WT* e *Irs2*^{-/-} durante 0, 14 y 21 días de dieta DDC. n = 4–6, con un total de 7,2 x 10⁵ núcleos HNF4α- analizados. Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, y ***p < 0,001. Medias comparadas mediante un análisis *two-way* ANOVA aplicando un test de Bonferroni para comparaciones múltiples. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; DDC, 3.5-dietoxicarbinol-1.4-dihidrocolina; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; HNF4α, factor nuclear 4 α de hepatocito; VP; vena porta.

Con el fin de comprobar si el fallo en la inducción no parenquimal era debido a diferencias en la proliferación de esta población, se realizó un estudio mediante análisis de imagen del número de células HNF4 α negativas y Ki67 positivas. Los resultados no mostraron cambios entre ambos grupos de animales. Aunque tras 14 días de dieta se produjo una inducción de CNPs en ambos grupos de animales, no se observó un aumento significativo de Ki67 en CNPs en este periodo. Sin embargo, sí que se observó un aumento tras 21 días de dieta DDC, tanto en los controles como en los animales *Irs2*^{-/-} (Figura 21). A pesar del aumento proliferativo de CNPs tras 21 días de tratamiento, no se observaron variaciones significativas en su número. Dada la heterogeneidad en la composición celular de CNPs, incluyendo CPHs, CEHs, FPs, etc, es posible que estos cambios se deban a diferencias en el comportamiento de cada una de estas poblaciones en particular.

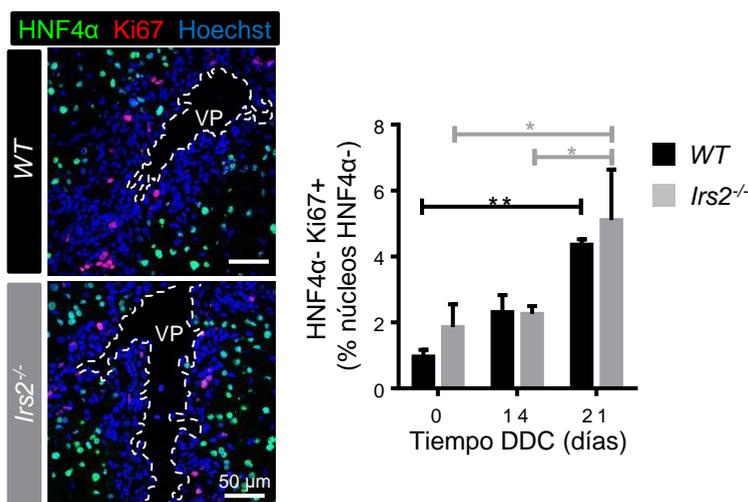


Figura 21. La falta de *Irs2* no afecta a la proliferación de CNPs que aumenta tras periodos largos de daño hepático. (Izquierda) Imágenes de inmunofluorescencia representativas de la población HNF4 α negativa/Ki67 positiva alrededor de venas portales donde estas células se acumulan (línea punteada blanca, VP) en criocortes de hígados de ratones *WT* e *Irs2*^{-/-} tras 21 días de dieta DDC. Barra de escala 50 μ m. (Derecha) Cuantificación del porcentaje de núcleos HNF4 α -Ki67+ por mm² en animales *WT* e *Irs2*^{-/-} durante 0, 14 y 21 días de dieta DDC (n = 4-6). Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05 y **p < 0,01. Medias comparadas mediante un análisis *two-way* ANOVA aplicando un test de Bonferroni para comparaciones múltiples. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; DDC, 3,5-dietoxicarbinol-1,4-dihidrocolina; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; HNF4 α , factor nuclear 4 α de hepatocito; VP; vena porta.

4.1.1.6 La deficiencia en *Irs2* reduce la expansión y proliferación de células progenitoras hepáticas

Con el propósito de testar si la falta de *Irs2* altera la composición de CNPs durante el daño crónico hepático, se analizó la población de CPHs, cuya inducción ha sido demostrada ser necesaria para la supervivencia de ratones durante la administración de la dieta DDC [130]. El daño generado por esta dieta induce una respuesta ductular, también descrita en patologías de daño crónico como la colestasis, hepatitis alcohólica, EHNA, HBV y HCV [123, 228–231]. La reacción ductular que se produce durante la administración de la dieta DDC consiste en la expansión de estructuras ductulares positivas para el marcador CK19, que contienen colangiocitos encargados de eliminar el flujo biliar, y CPHs que pueden dar lugar tanto a hepatocitos como a colangiocitos [121].

El análisis por inmunofluorescencia después de 14 días de tratamiento DDC, mostró que la falta de *Irs2* no impedía la expansión de células CK19 positivas, que originan los ductos periportales donde las CPHs se expanden. Sin embargo, el estudio de marcadores de CPHs como MIC1-1C3, SOX9, EPCAM y SPP1 mostró una reducción en los animales *Irs2*^{-/-}, coincidente con la reducción de CNPs observada tras este mismo periodo de tratamiento (Figura 22, A). De forma complementaria, también fueron analizados los niveles de expresión de ARNm de *Epcam* y *Spp1*, observándose una reducción en la inducción de ambos marcadores tras 14 días de dieta DDC (Figura 22, B).

En el análisis proliferativo de CNPs anteriormente descrito, no se observaron diferencias entre animales *WT* e *Irs2*^{-/-}, sin embargo, al tratarse de una población heterogénea, cabe la posibilidad de que haya diferencias proliferativas entre los distintos tipos celulares no parenquimales (CEHs, CPHs, colangiocitos, FPs...). Con el fin de comprobar si la falta de *Irs2* pudiera dar lugar a cambios en la capacidad proliferativa de CPHs, se analizó el porcentaje de células SPP1 Ki67 doble positivas tras 14 días de dieta DDC (Figura 23, A).

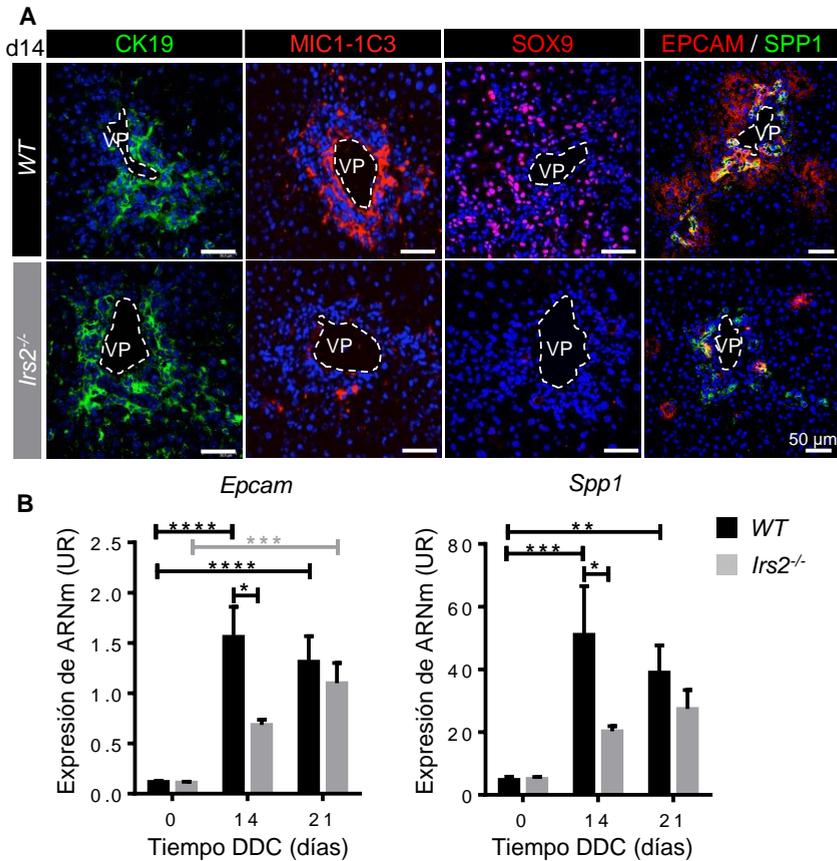


Figura 22. Los animales *Irs2*^{-/-} reducen el número de CPHs alrededor de venas portales. (A) Imágenes de inmunofluorescencia representativas de la población KRT19, MIC1-1C3, SOX9, EPCAM y SPP1 alrededor de venas portales, donde estas células se acumulan (línea punteada blanca, VP) en criocortes de hígados de ratones *WT* e *Irs2*^{-/-} tras 14 días de dieta DDC (n=4). Barra de escala 50 μ m. (B) Cuantificación de la expresión de ARNm de *Epcam* y *Spp1* representado como unidades relativas (UR) utilizando *Gapdh* como gen de referencia en muestras de hígados de animales *WT* e *Irs2*^{-/-} durante 0, 14 y 21 días de dieta DDC (n=6-8). Los datos representan el valor medio + SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$. Medias comparadas mediante un análisis *two-way* ANOVA aplicando un test de Bonferrini para comparaciones múltiples. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; DDC, 3,5-dietoxicarbinol-1,4-dihidrocolina; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; VP; vena porta; UR, unidades relativas; CK19, citoqueratina 19; MIC-1C3, citoquina inhibidora de macrófagos 1-1c3; EPCAM, molécula de adhesión celular epitelial, SPP1, osteopontina 1; d14, día 14.

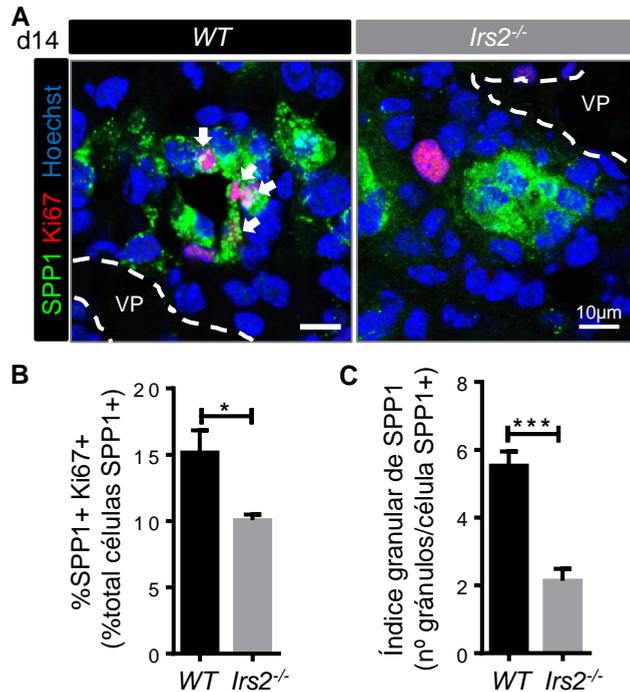


Figura 23. La falta de *Irs2* reduce la capacidad proliferativa y altera la distribución de *Spp1*. (A) Imágenes de inmunofluorescencia representativas de la población SPP1/Ki67 doble positiva (indicadas con flechas) alrededor de venas portales (línea punteada blanca, VP) en criocortes de hígados de ratones *WT* e *Irs2*^{-/-} tras 14 días de dieta DDC. Barra de escala 10 μ m. (B) Cuantificación del porcentaje de núcleos SPP1+ Ki67+ doble positivos sobre el total de células SPP1 positivas en animales *WT* e *Irs2*^{-/-} después de 14 días de dieta DDC (n = 6, total de $6,47 \times 10^6$ células SPP1 positivas analizadas). (C) Cuantificación del índice granular de células SPP1 positivas, como número de gránulos medio por célula (n = 6, total de $2,7 \times 10^4$ células SPP1 positivas analizadas). Los datos representan el valor medio + SEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test no pareado. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; VP; vena porta; SPP1, osteopontina 1; d14, día 14.

Los resultados mostraron que el porcentaje de células *Spp1* en proliferación sobre el total de esta población se encontraba reducido en un 33% en los animales *Irs2*^{-/-} (Figura 23, B). Además, se apreció cómo las células productoras de SPP1, dispuestas principalmente en forma de ductos alrededor de venas las portales, mostraban diferencias en el patrón de tinción entre ambos grupos de animales. SPP1 puede localizarse tanto de forma intracelular como extracelular, al tratarse de un factor soluble de secreción [232]. En los controles se observó una localización de SPP1 en forma de

cúmulos, mientras que en los *Irs2*^{-/-} se encontraba localizado de forma difusa predominantemente alrededor del citoplasma. Es por ello que mediante análisis de imagen con *IN cell analyzer* se determinó el índice de granularidad de SPP1, resultando disminuida un 61% en los animales *Irs2*^{-/-} (Figura 23, C), pudiendo así indicar cambios en la secreción de este factor.

Con el fin de estudiar más en profundidad si IRS2 pudiera tener un papel directo sobre la expresión de SPP1, se trabajó *in vitro* con la línea celular humana progenitora HepaRG. Para ello se utilizaron líneas de sobreexpresión (mIRS2) y silenciamiento de IRS2 (sh-IRS2), obtenidas por medio de infección lentiviral. Estas líneas celulares fueron cultivadas bajo condiciones estándar, en las que el medio de cultivo contenía aporte de insulina (0,88 μ M). Además, con el objetivo de testar si el aporte insulínico pudiera inducir cambios en SPP1, también se cultivaron eliminando este suplemento del medio. El análisis de SPP1 mostró que IRS2 era capaz de inducir y reprimir la expresión proteica de SPP1, independientemente del aporte extra de insulina al medio de estas células progenitoras (Figura 24).

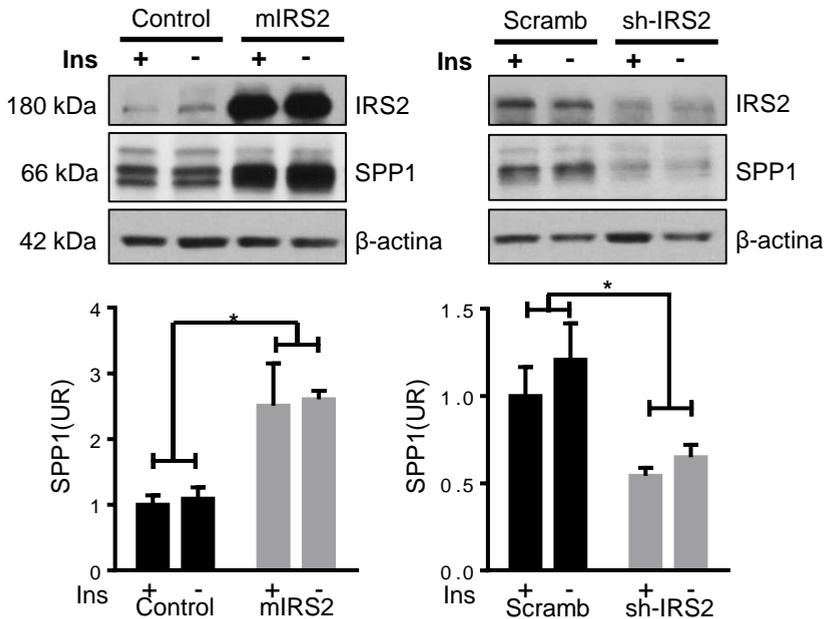


Figura 24. La expresión de SPP1 está vinculada a la expresión de IRS2 en células humanas progenitoras. Imágenes representativas del análisis proteico de IRS2, SPP1 y β -actina por *western blot* en células HepaRG cultivadas como progenitoras en condiciones control (control y *scramb*), de sobreexpresión (mIRS2) y de silenciamiento (sh-IRS2) de IRS2, con y sin aporte de insulina durante su cultivo (0,88 μ M). Cuantificación de la expresión de SPP1 representado como unidades relativas (UR) en tres experimentos independientes. Los datos representan el valor medio + SEM. * $p < 0,05$. Medias comparadas mediante un análisis *two-way* ANOVA aplicando un test de Holm Sidak para comparaciones múltiples. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; mIRS2, sobreexpresión de IRS2; *Scramb*, *scrambled* control; sh-IRS2, silenciamiento de IRS2; SPP1, osteopontina 1; Ins, insulina; UR, unidades relativas.

4.1.1.7 La inducción de *Fgf7* durante el daño hepático con DDC es dependiente de *Irs2*

La presencia de CPHs durante el daño hepático se asocia a la expansión de células fibróticas e inflamatorias que interactúan entre sí mediante señalización por factores de crecimiento y citoquinas formando parte del nicho progenitor. FGF7 forma parte de este microambiente, siendo necesaria su inducción para la expansión de CPHs y para la supervivencia de los ratones bajo tratamiento con dieta DDC [130]. Con el fin de comprobar si la reducida expansión de CPHs observada en el modelo *Irs2*^{-/-} pudiera estar asociada a cambios en el nicho progenitor, se analizó la expresión de FGF7 durante el daño crónico con DDC.

Mediante inmunofluorescencia de cortes procedentes de hígados tratados con DDC, se observó que FGF7 tenía una disposición predominantemente periportal, localizándose en estrecho contacto con CPHs marcadas con SPP1 y EPCAM, formando parte de estructuras ductulares (Figura 25, A). El tratamiento con dieta DDC entre 14 y 21 días, mostró un aumento de FGF7 en los animales control tanto a nivel de proteico detectado por inmunofluorescencia como de ARNm, no observable en los animales *Irs2*^{-/-} (Figura 25, B y Figura 26 A B). Además, cabe destacar la apreciación de una falta de arquitectura ductular en los animales *Irs2*^{-/-}, donde las CPHs se encuentran rodeadas por células estromales (Figura 25, A), pudiendo indicar fallos en el nicho progenitor.

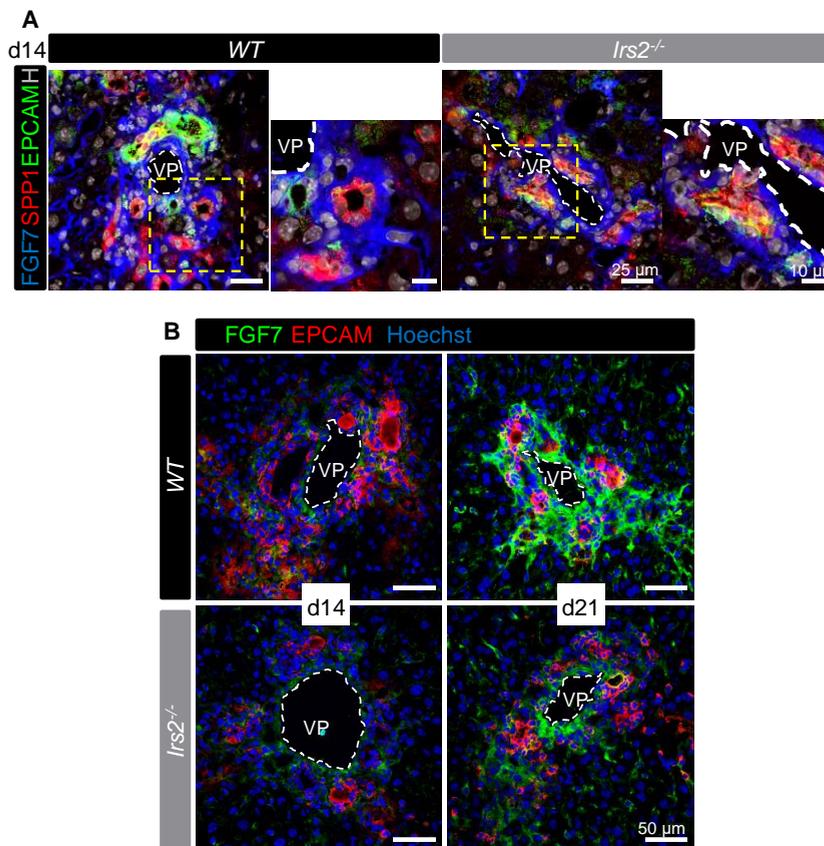


Figura 25. Los animales *Irs2^{-/-}* reducen la expresión de FGF7 alrededor de CPHs. (A) Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de FGF7, SPP1 y EPCAM alrededor de venas portales donde estas células se acumulan (línea punteada blanca, VP) en criosecciones de hígados *WT* e *Irs2^{-/-}* tratados con dieta DDC durante 14 días (n=4). Barra de escala 25 μ m. Ampliación de zonas ductulares (recuadro punteado amarillo) con barra de escala de 10 μ m. (B) Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de FGF7 y EPCAM alrededor de venas portales (línea punteada blanca, VP) en criosecciones de hígados *WT* e *Irs2^{-/-}* tratados con dieta DDC durante 14 y 21 días (n=4). Barra de escala 50 μ m. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2^{-/-}*, ratón deficiente del gen *Irs2*; VP; vena porta; FGF7, factor de crecimiento fibroblástico 7; SPP1, osteopontina 1; EPCAM, molécula de adhesión celular epitelial; d14, día 14; d21, día 21.

Con el objetivo de comprobar si la falta de *Irs2* altera la expresión de *Fgf7*, se estudió la expresión de su receptor, *Fgfr2-IIIb*. Este se localiza únicamente en células de carácter epitelial, en concreto se ha demostrado que las CPHs lo expresan en grandes cantidades [130]. Además también se

ha demostrado un aumento en su expresión durante el tratamiento con DDC [233].

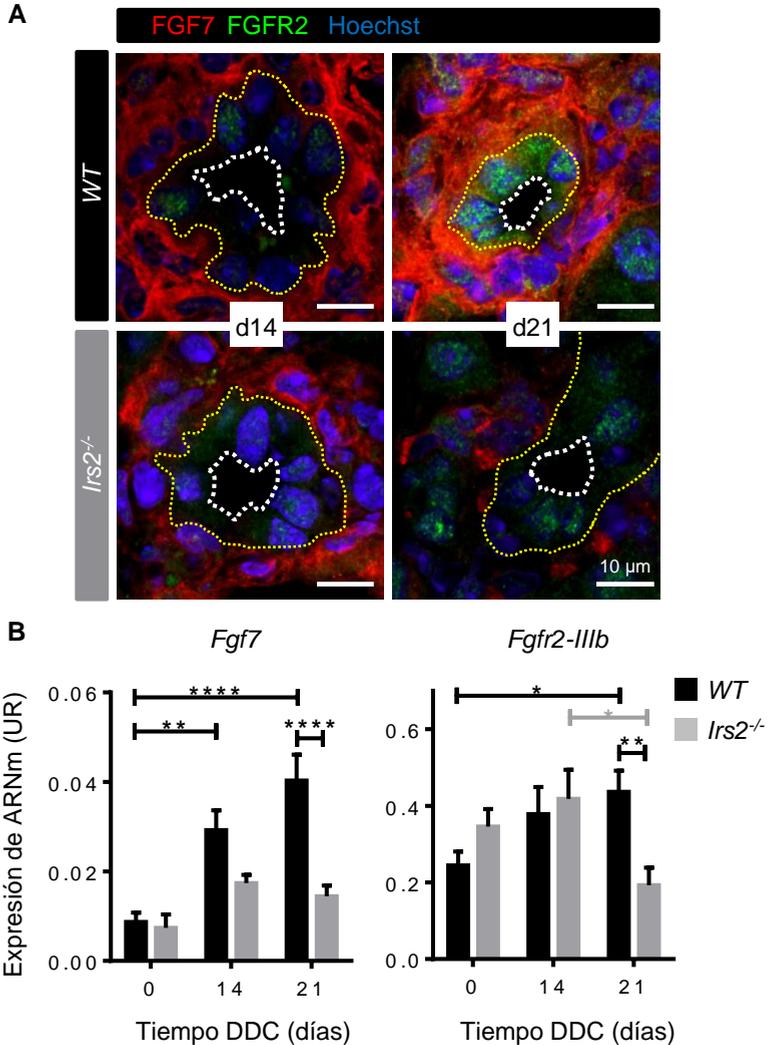


Figura 26. La expresión *Fgf7* y su receptor *Fgfr2-IIIb* se reduce en los ductos de los animales *Irs2*^{-/-}. (A) Imágenes representativas de la expresión de FGF7 y FGFR2 alrededor de ductos (línea blanca punteada) donde se disponen las CPHs rodeadas de células estromales (línea amarilla punteada) (n=4) tras 14 y 21 días de dieta DDC en criosecciones de hígados de animales WT e *Irs2*^{-/-}. Barra de escala 10 μ m. (B) Cuantificación de la expresión de ARNm de *Fgf7* y *Fgfr2-IIIb* representado como unidades relativas (UR) utilizando *Gapdh* como gen de referencia en muestras de hígados de animales WT e *Irs2*^{-/-} durante 0, 14 y 21 días de dieta DDC (n=6-8) representado como el valor medio + SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 y ****p < 0,0001. Medias comparadas mediante un análisis two-way ANOVA aplicando un test de Bonferroni para comparaciones múltiples. *Irs2*, substrato

receptor de insulina 2; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; FGF7, factor de crecimiento fibroblástico 7; FGFR2, receptor 2 de factor de crecimiento fibroblástico UR, unidades relativas; DDC, 3.5-dietoxicarbinol-1.4-dihidrocolina; d14, día 14; d21, día 21.

Mediante la realización de tinciones conjuntas de FGF7 y FGFR2 durante el daño hepático producido por la dieta DDC, se pudo observar *in situ* cómo las células residentes en los ductos que expresan FGFR2 se encuentran en contacto directo con células FGF7 positivas. Junto con la inducción de FGF7 durante el tratamiento DDC, se produjo un aumento en la expresión proteica de FGFR2 y de ARNm de *Fgfr2-IIIb* en los animales *WT*, consistente con los datos bibliográficos descritos. Sin embargo, en los animales *Irs2*^{-/-} se observó una falta de inducción de *Fgf7* así como una reducción en los niveles de expresión proteica de FGFR2 y de ARNm de *Fgfr2-IIIb*, resultando en una disminución significativa de expresión tras 21 días de dieta DDC (Figura 26, A y B). Estos resultados indican que la falta de *Irs2* genera un fallo en la comunicación estromal de *Fgf7* y epitelial de su receptor *Fgfr2-IIIb*.

4.1.1.8 La expresión de GFAP en el hígado se reduce en el modelo *Irs2*^{-/-} durante el tratamiento DDC

Irs2 resultó necesario para la inducción de *Fgf7* durante el daño crónico hepático inducido con la dieta DDC. Es por ello que se decidió estudiar el papel de *Irs2* sobre CEHs y FPs, que expresan FGF7 y que forman parte del progenitor [101, 209]. En primer lugar, se estudiaron las CEHs por medio de ensayos de inmunofluorescencia, utilizando como marcador la proteína GFAP. Las células GFAP positivas se observaron situadas dispersas por la zona parenquimal, coincidiendo con la descripción de su localización en el espacio de Disse [234]. También se observaron dispuestas en la zona periportal, y en concreto, formando parte de las estructuras ductulares que contenían células de origen progenitor SPP1 positivas (Figura 27).

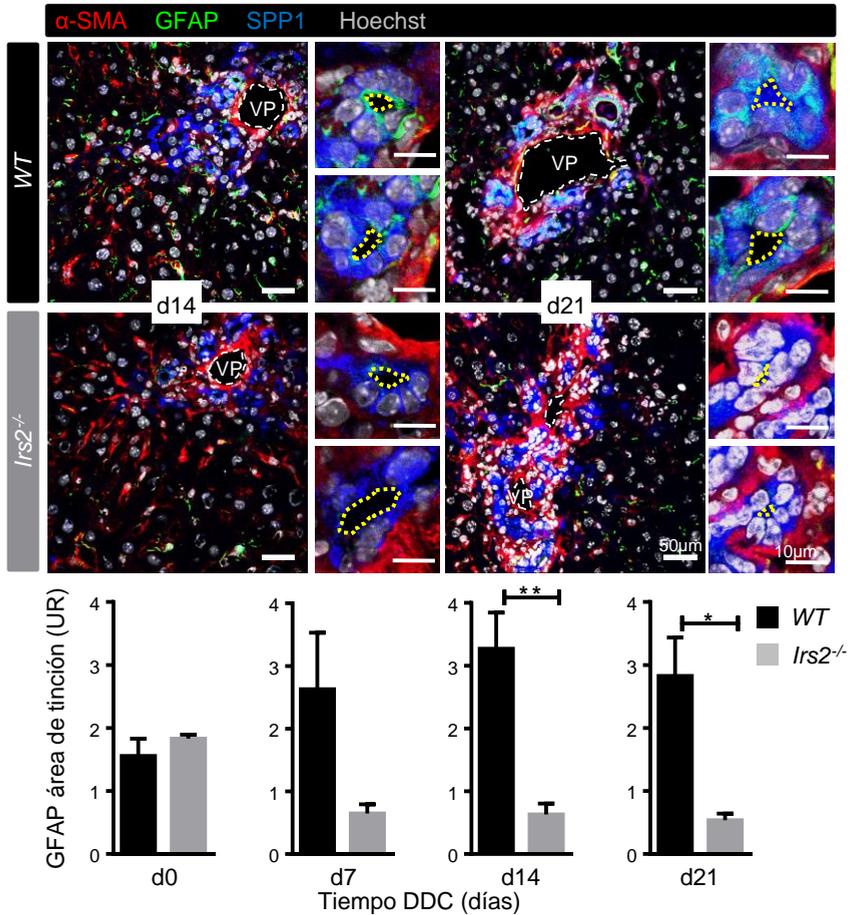


Figura 27. Pérdida parenquimal y periportal de células GFAP positivas durante el daño hepático en los animales *Irs2*^{-/-}. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de GFAP, α -SMA y SPP1 alrededor de venas portales (línea punteada blanca, VP) en criosecciones de hígados WT e *Irs2*^{-/-} tratados con dieta DDC durante 14 y 21 días. Barra de escala 50 μ m. Ampliaciones de ductos (línea punteada amarilla) donde se disponen las células SPP1 positivas y GFAP. Barra de escala 10 μ m. Cuantificación del área de tinción de GFAP (n= 3 y 4) en unidades relativas (UR) durante los distintos tiempos del tratamiento con DDC (0, 7, 14 y 21 días). Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05 y **p < 0,01. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test no pareado. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; WT, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; VP; vena porta; α -SMA, α -actina del músculo liso; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; SPP1, osteopontina 1; DDC, 3,5-dietoxicarbinol-1,4-dihidrocolina; d0, día 0 control; d7, d14, d21, día 7, 14 y 21 respectivamente; UR, unidades relativas.

La falta de *Irs2* llevó a la pérdida de este marcador desde etapas tempranas del daño hepático (día 7), siendo significativa la diferencia entre ambos grupos de animales tras 14 y 21 días de dieta DDC (Figura 27), indicativo de una reducción en la población de CEHs. Además, el daño hepático promueve la activación de CEHs hacia miofibroblastos, que comienzan a expresar el marcador α -SMA y que también generan matriz extracelular mediante la expresión de colágenos, promoviendo así la cicatrización [96]. A pesar de la reducción de marcadores de CEHs como GFAP y FGF7 en los animales *Irs2*^{-/-}, en estas mismas tinciones no se observó una menor expresión del también marcado de CEHs activadas, α -SMA.

4.1.1.9 Los animales *Irs2*^{-/-} poseen un microambiente fibrótico diferencial durante el daño crónico con DDC

Continuando con el estudio de células fibróticas localizadas en el nicho de CPHs, se procedió al análisis de proteínas implicadas en la activación tanto de CEHs como de FPs. Para ello se realizó un estudio de inmunofluorescencia tras 21 días de dieta DDC. La cuantificación de la expresión de proteínas como vimentina o α -SMA, características de miofibroblastos provenientes de CEHs y de FPs, no mostró alteraciones significativas entre ambos grupos de animales. Sin embargo, la expresión de marcadores más propios de FPs, como elastina y THY1 [101], se encontraban aumentados en los animales *Irs2*^{-/-}, indicando por tanto una mayor inducción de FPs durante el daño crónico ante la falta de *Irs2* (Figura 28).

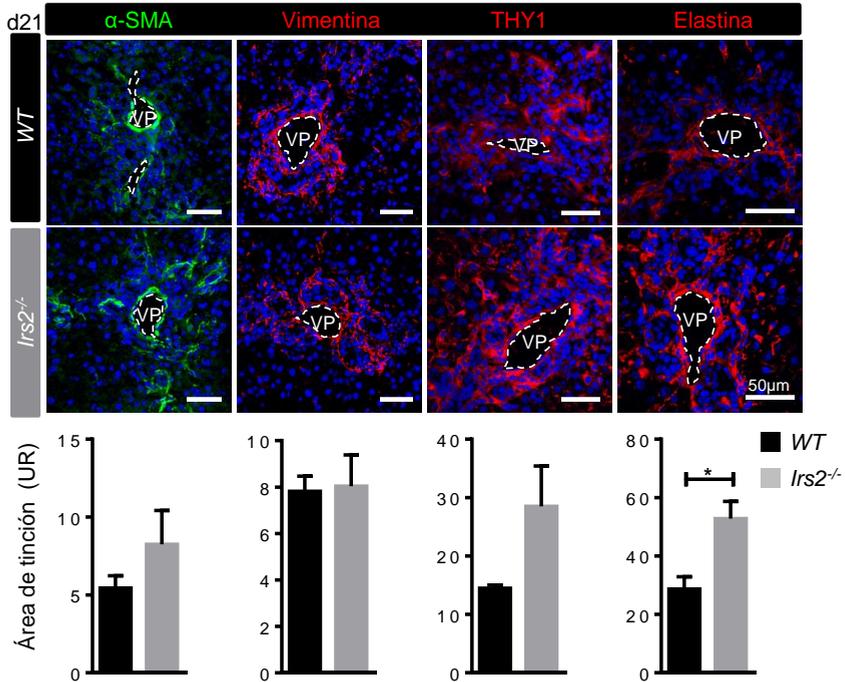


Figura 28. Marcadores de células mesenquimales se mantienen en niveles equivalentes mientras que los de células mesenquimales no estrelladas aumentan en los animales *Irs2*^{-/-}. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de α -SMA, vimentina, THY1 y elastina alrededor de venas portales (línea punteada blanca, VP) en criosecciones de hígados *WT* e *Irs2*^{-/-} tratados con dieta DDC durante 21 días. Barra de escala 50 μ m. Cuantificación del área de tinción de cada marcador en unidades relativas (UR) (n= 3 y 4). Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test no pareado. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; VP; vena porta; α -SMA, α -actina del músculo liso; THY1, antígeno celular del timo 1; d21, día 21; UR, unidades relativas.

La observación en mayor detalle de células THY1 positivas *in situ* tras 14 días de dieta DDC, mostró una localización diferencial entre los controles y los animales *Irs2*^{-/-}. Ante la falta de *Irs2*, las células THY1 positivas tendían a distribuirse alrededor de los ductos, en estrecho contacto con células *Epcam* y *Spp1* positivas. Mientras que en los controles, estas tendían a localizarse más hacia la periferia, adquiriendo también un fenotipo más alargado y laxo que las presentes en los animales *Irs2*^{-/-} (Figura 29).

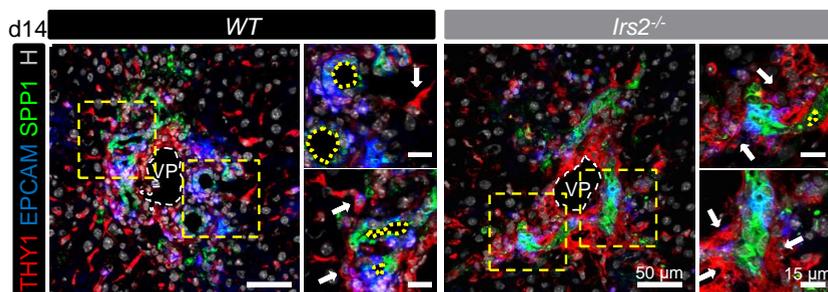


Figura 29. Diferencias en la disposición de células THY1 positivas entre hígados *WT* e *Irs2^{-/-}* tratados durante 14 días con dieta DDC. Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de THY1, Spp1 y Epcam alrededor de venas portaes (línea punteada blanca, VP) en criosecciones de hígados *WT* e *Irs2^{-/-}* tratados con dieta DDC durante 14 días (n=4). Barra de escala 50 μ m. Ampliación de zonas ductulares (recuadro punteado amarillo) con barra de escala de 15 μ m. Flechas indicativas de células THY1 positivas. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2^{-/-}*, ratón deficiente del gen *Irs2*; VP, vena porta; THY1, antígeno celular del timo 1; EPCAM, molécula de adhesión celular epitelial; SPP1, osteopontina 1; d14, día 14.

Los cambios morfológicos en las células THY1 positivas en el modelo *Irs2^{-/-}* durante el tratamiento DDC condujeron al estudio más en profundidad de esta población celular. En concreto, las células THY1 positivas pueden provenir tanto de FPs residentes en el hígado, como de fibrocitos, células de origen hematopoyético cuya migración hacia el hígado ha sido descrita en casos de daño hepático como la colestasis. Los fibrocitos, además de expresar el marcador hematopoyético CD45, también participan en la fibrosis hepática mediante la expresión de colágeno [235]. Para comprobar si los cambios morfológicos observados en la población THY1 del animal *Irs2^{-/-}* pudieran deberse a diferencias en el origen de esta población, se realizaron tinciones conjuntas de THY1 y CD45 en hígados tratados con dieta DDC durante 21 días.

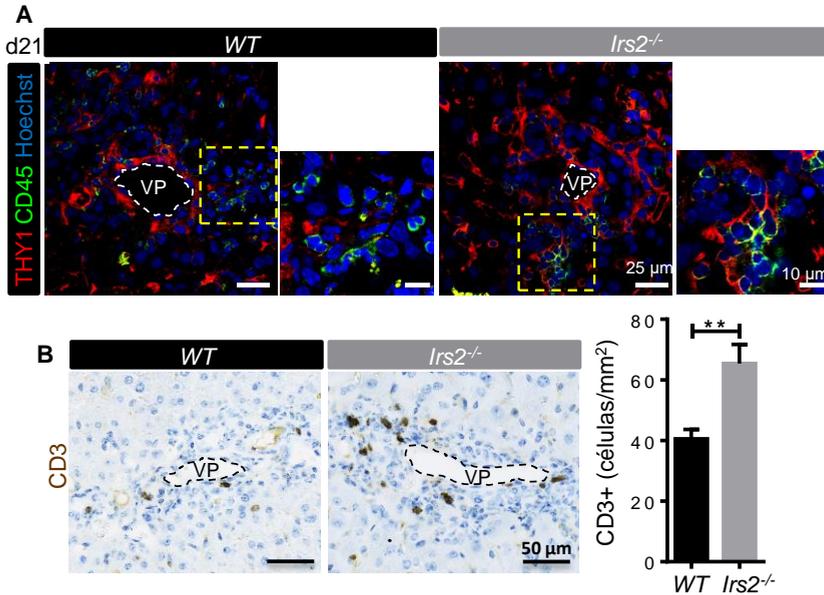


Figura 30. Aumento de células estromales derivadas de la médula ósea en los animales *Irs2*^{-/-}. (A) Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de THY1 y CD45 alrededor de venas portaes (línea punteada blanca, VP) en criosecciones de hígados *WT* e *Irs2*^{-/-} tratados con dieta DDC durante 21 días (n=4). Barra de escala 25 μ m. Ampliación de zonas de acumulación de células CD45 positivas (recuadro punteado amarillo) con barra de escala de 10 μ m. (B) Imágenes representativas del análisis por inmunohistoquímica de CD3 alrededor de venas portaes (línea punteada negra, VP) en secciones de parafina de hígados *WT* e *Irs2*^{-/-} tratados con dieta DDC durante 21 días. Barra de escala 50 μ m. Cuantificación del número de células CD3 positivas por unidad de área (n=6). Los datos representan el valor medio + SEM, **p < 0,01. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test no pareado. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; *WT*, fenotipo salvaje; *Irs2*^{-/-}, ratón deficiente del gen *Irs2*; VP, vena porta; THY1, antígeno celular del timo 1; CD45, grupo de diferenciación 45; CD3, grupo de diferenciación 45; d21, día 21.

Los resultados mostraron una mayor tendencia de colocalización en los animales *Irs2*^{-/-} (Figura 30, A). Además, también se analizó el marcador linfocítico CD3, cuya expresión ha sido descrita en células doble positivas THY1 CD45 durante el daño hepático [101]. El número de células CD3 positivas se encontraba aumentado un 61% en los animales *Irs2*^{-/-} comparado con los *WT* tras 21 días de dieta DDC (Figura 30, B). Por tanto, estos resultados muestran que ante la falta de *Irs2*, se producía un aumento de células hematopoyéticas en el estroma fibrótico alrededor de las CPHs, indicando una composición del nicho progenitor diferencial.

4.1.2 Estudio del papel de IRS2 en hCEHs.

Tras comprobar que el daño hepático genera una respuesta aberrante en la población estromal de los animales *Irs2*^{-/-}, se procedió a estudiar *in vitro* cómo afecta la falta de IRS2 a hCEHs.

4.1.2.1 La expresión de IRS2 no altera la proliferación, migración ni estado de activación de células estrelladas activadas

Durante el daño hepático las CEHq migran al lugar del daño y pasan a un estado activado, entrando en ciclo celular e induciendo así su proliferación, expresando también genes profibróticos, citoquinas y factores de crecimiento. De esta forma participan en la fibrogénesis provisional del tejido y en la reepitelización del hígado, siendo también responsables de la fibrosis hepática debido a una perpetuación de su activación [98]. Dado el fallo en la producción de FGF7 y la reducción de células GFAP positivas en el modelo *Irs2*^{-/-}, surge la cuestión de si la falta de IRS2 tiene un papel directo en la población de CEHs y cuáles serían los mecanismos en los que estaría implicado. Se realizó un silenciamiento de IRS2 mediante infección lentiviral con un sh-RNA complementario en la línea de CEHs de origen humano LX-2. Los resultados mostraron una reducción proteica del 90% en la denominada línea sh-IRS2 frente a la línea control de infección sh-luciferasa (sh-luc) (Figura 31, A).

Ha sido descrito que el cultivo *in vitro* de CEHs sobre una superficie de plástico induce una activación espontánea de las mismas, aumentando la síntesis de proteínas fibróticas [236]. Con el objetivo de analizar si la falta de IRS2 inducía diferencias fenotípicas durante el estado de activación de CEHs, se realizó un ensayo de MTT con el que se estudió la viabilidad celular de células LX-2 bajo el silenciamiento de IRS2. Los resultados no mostraron cambios significativos (Figura 31, B).

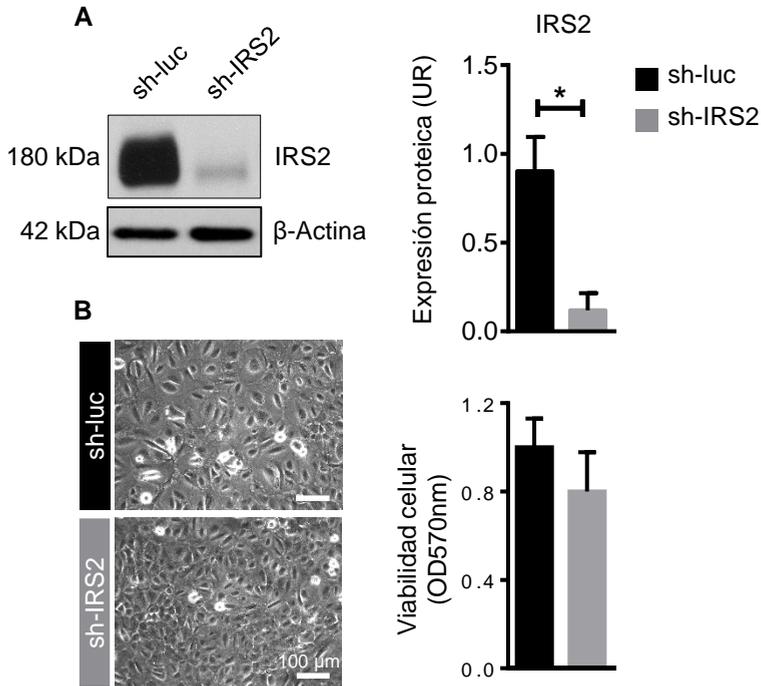


Figura 31. El silenciamiento de IRS2 no produce cambios en la viabilidad de células estrelladas humanas. (A) Imágenes representativas del análisis proteico de IRS2 y β -Actina por *western blot* en células LX2 sh-luc y sh-IRS2. Cuantificación de la expresión de IRS2 representado como unidades relativas (UR) en tres experimentos independientes. (B) Imágenes en contraste de fases de células LX2 sh-luc y sh-IRS2, con barra de escala de 100 μ m. Cuantificación de la viabilidad celular por medio del ensayo MTT. Se realizaron 3 experimentos independientes con triplicados. Los datos representan el valor medio + SEM. * $p < 0,05$. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test pareado. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta *luciferasa*; sh-IRS2, ARN de horquilla corta *IRS2*; UR, unidades relativas.

Con la finalidad de analizar posibles cambios en las capacidades migratorias bajo el silenciamiento de IRS2, se llevó a cabo un ensayo de herida. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la tasa migratoria tras 24 horas desde la realización de la “herida” en condiciones de cultivo estándar de células LX-2 en su estado activado (Figura 32).

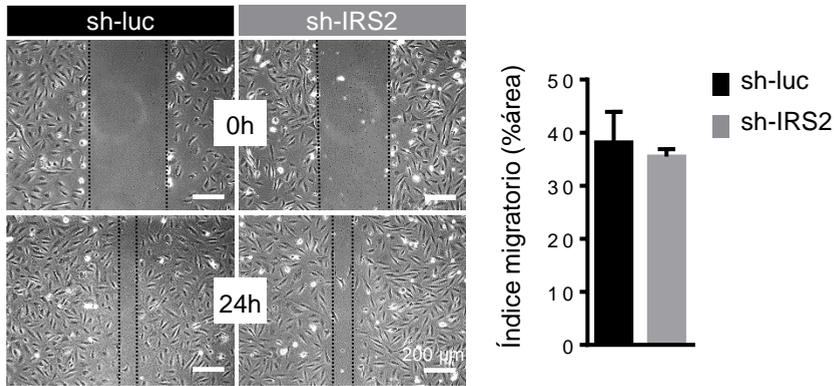


Figura 32. La capacidad de migración de células estrelladas no se ve afectada por el silenciamiento de IRS2. Imágenes representativas del ensayo de herida en contraste de fases de células LX2 sh-luc y sh-IRS2, a tiempo cero y tras 24 horas de realizar la herida. Barra de escala de 200 μ m. Cuantificación del índice de migración como el porcentaje del área de herida cerrada tras 24 horas. Los datos representan el valor medio + SEM. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test pareado. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta *luciferasa*; sh-IRS2, ARN de horquilla corta *IRS2*; h, horas.

Dado que la expresión proteica de α -SMA indica un estado activado de las células LX-2 [237], se procedió a analizar si el silenciamiento de IRS2 repercutía en cambios en este marcador. El análisis proteico tanto por *western blot* (Figura 33, A) como por inmunofluorescencia (Figura 33, B) no mostró variaciones significativas bajo estas condiciones de cultivo, aunque sí una ligera tendencia de aumento de expresión de α -SMA. De igual manera se analizó la expresión del marcador de células estrelladas GFAP, en el que tampoco se observaron cambios significativos (Figura 33, A). Por tanto, la falta de expresión de IRS2 en cultivos de células LX-2 en su estado activado, no afectó a su capacidad proliferativa, migratoria, ni a la expresión del marcador miofibroblástico α -SMA.

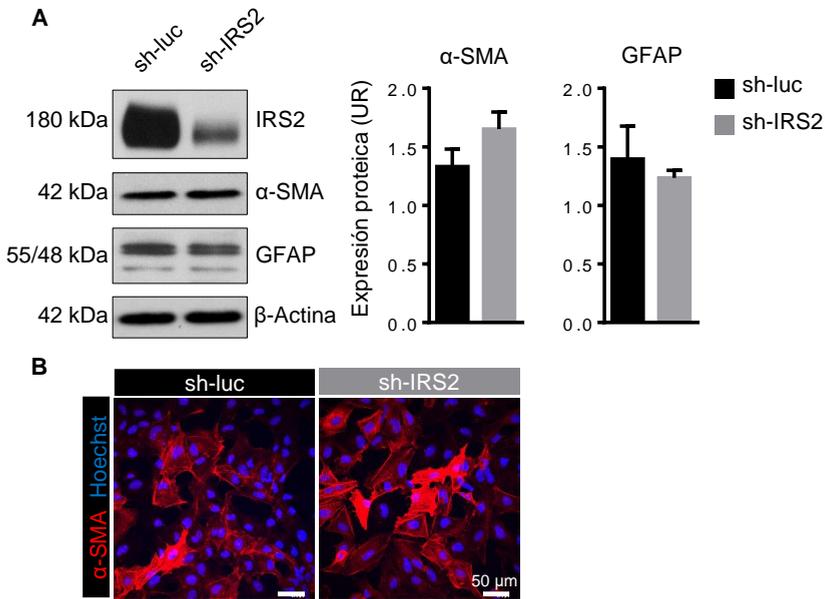


Figura 33. La expresión de α -SMA como marcador de miofibroblastos no se altera ante la falta de IRS2 en células estrelladas humanas. (A) Imágenes representativas del análisis proteico de IRS2, α -SMA, GFAP y β -Actina por *western blot* en células LX2 sh-luc y sh-IRS2. Cuantificación de la expresión de α -SMA (n=3) y GFAP (n=4) representado como unidades relativas (UR). (B) Imágenes de inmunofluorescencia representativas del nivel de α -SMA expresado en estos cultivos. Barra de escala de 50 μ m. Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test pareado. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta *luciferasa*; sh-IRS2, ARN de horquilla corta *IRS2*; UR, unidades relativas; α -SMA, α -actina del músculo liso; GFAP, proteína ácida fibrilar glial.

4.1.2.2 La inactivación mitótica de líneas de CEHs humanas induce la expresión de FGF7

La fibrosis hepática es un proceso reversible en el que los miofibroblastos entran en apoptosis, senescencia o también pueden dejar de expresar genes profibróticos, dando lugar a una transición a un estado inactivado similar al quiescente [98]. Dada la importancia de este proceso en la reparación del daño hepático, se estudió si IRS2 pudiera ejercer un papel durante esta transición. Con el fin de modelar la inactivación de CEHs *in vitro*, células LX-2 fueron tratadas con el compuesto citostático mitomicina C (MitoC) y cultivadas sobre gelatina, ya que su uso ha sido indicado para completar un estado de reversión en CEHs [238]. Como resultado, los cultivos experimentaron un arresto del ciclo celular junto con cambios

morfológicos, adquiriendo un aspecto estrellado (Figura 34, A). El tratamiento con MitoC también provocó una reducción en la expresión del marcador de miofibroblastos α -SMA, característico del estado de activación miofibroblástico [237] (Figura 34, A y B). Además, dado que las CEHs son productoras de FGF7 y tras observar una reducción de este marcador en el animal *Irs2*^{-/-} durante el daño hepático, se procedió a su análisis. Los resultados mostraron una inducción proteica tanto por inmunofluorescencia como por *western blot* tras el tratamiento con MitoC (Figura 34, A y B). Además, la inactivación mitótica mediante la exposición a MitoC junto con el cultivo sobre gelatina de una línea primaria de origen humano de CEHs (hCEH) también resultó en un aumento proteico de FGF7 (Figura 34, C).

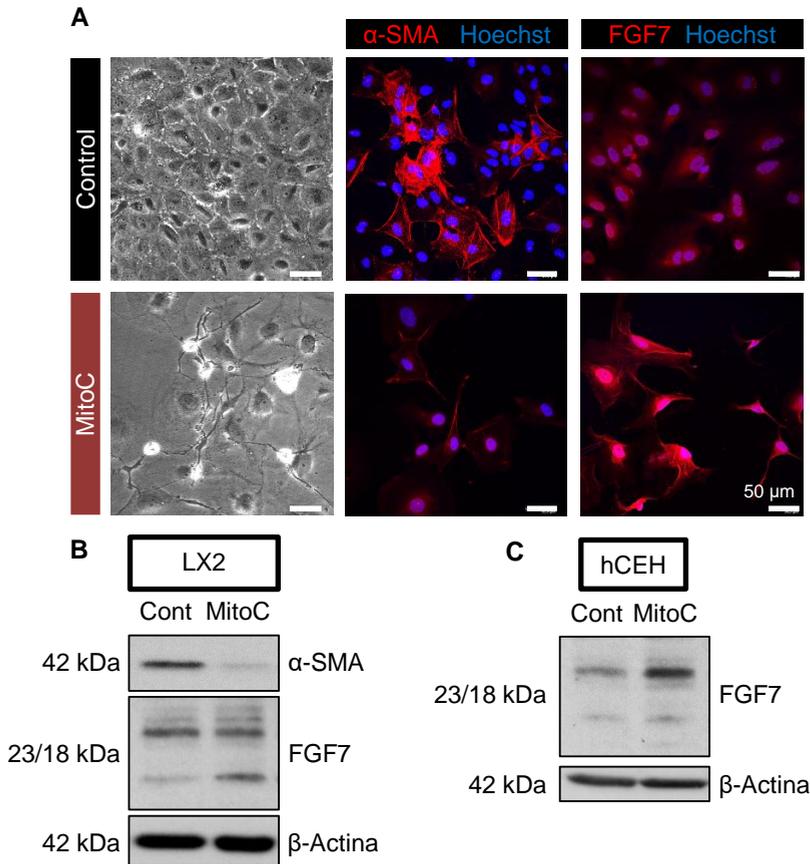


Figura 34. El uso de MitoC inactiva mitóticamente células estrelladas humanas e induce la expresión de FGF7. (A) Imágenes en contraste de fases de células LX2 en

condiciones control activadas, y bajo el tratamiento de MitoC para la inducción de la inactivación celular. Imágenes de inmunofluorescencia representativas del nivel de α -SMA y FGF7 expresado bajo ambas condiciones. Barra de escala de 50 μ m. (B y C) Imágenes representativas del análisis proteico de α -SMA, FGF7 y β -Actina por *western blot* en células LX2 (B) y hCEH (C) bajo condiciones de activación (cont) e inactivación (MitoC). α -SMA, α -actina del músculo liso; FGF7, factor de crecimiento fibroblástico 7; MitoC, mitomicina C; Cont, control; hCEH, células estrelladas hepáticas primarias humanas.

4.1.2.3 IRS2 promueve la supervivencia de células estrelladas inactivadas productoras de FGF7

Dada la importancia de la apoptosis de CEHs activadas durante la resolución fibrogénica [98], se testó si IRS2 pudiera ejercer un papel en este proceso. Para ello se evaluó la supervivencia de células LX2 a largo plazo (5 días) tras el tratamiento con MitoC.

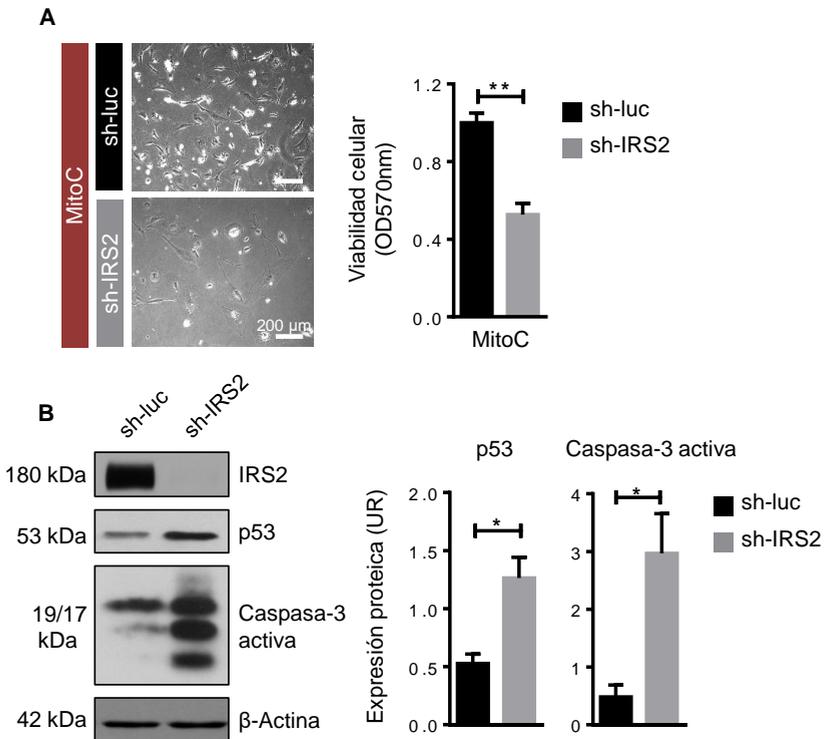


Figura 35. El silenciamiento de IRS2 aumenta la muerte celular de células estrelladas humanas inactivadas. (A) Imágenes en contraste de fases de células LX2 sh-luc y sh-IRS inactivadas con MitoC, con barra de escala de 200 μ m. Cuantificación de la viabilidad celular por medio del ensayo MTT. Se realizaron 3 experimentos independientes con triplicados. (B) Imagen representativa del nivel proteico de IRS2, P53, CASPASA-3 activa y β -Actina expresado por células LX2 sh-luc y sh-IRS2 tras ser inactivadas con MitoC. Cuantificación de la expresión de P53 y CASPASA-3 activa representado como unidades relativas (UR) (n= 3-5). Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05 y **p < 0,01.

Capítulo 4. Resultados

Para comparar medias se utilizó un análisis t-test pareado. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2; MitoC, mitomicina C; UR, unidades relativas.

Los resultados mostraron que el silenciamiento de IRS2 reducía en un 47% la capacidad de supervivencia de CEHs tras el tratamiento con MitoC y su cultivo sobre gelatina (Figura 35, A). El análisis complementario de los marcadores P53 y Caspasa-3 activa mostraron un aumento en las células silenciadas tras la inactivación (Figura 35, B). De modo que la falta de expresión de IRS2 se tradujo en una mayor tasa de muerte celular por medio de la inducción de apoptosis de CEHs inactivadas, estado en el que la expresión de FGF7 se encontraba inducida.

Complementariamente, la línea primaria hCEH fue tratada con NT-157, inhibidor alostérico de las proteínas IRS1/2 que conlleva su degradación proteosómica [239]. El estudio proteico de P53 y Caspasa-3 activa mostraron una inducción de la muerte celular tras el tratamiento de NT-157 durante 72 horas (Figura 36), indicativo de un papel protector de la apoptosis de las proteínas IRS1/2 en la línea primaria hCEH.

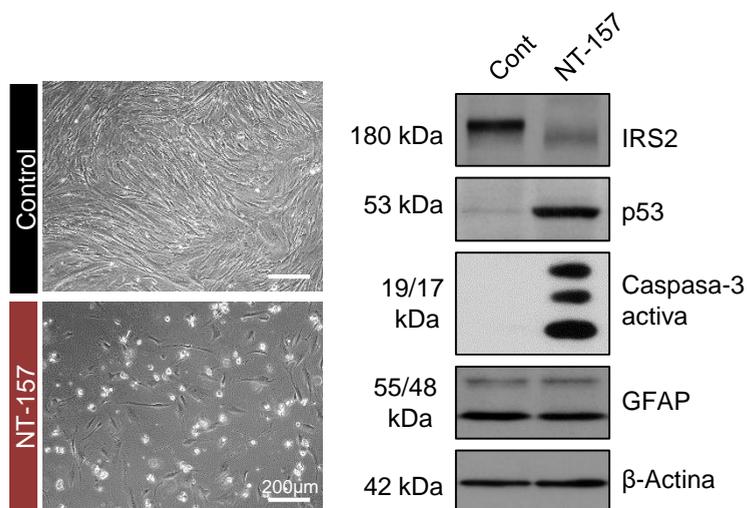


Figura 36. La inhibición de las proteínas IRSs en la línea primaria de hCEHs induce la muerte celular. Imágenes en contraste de fases de células hCEH en condiciones control (DMSO) y tratadas con NT-157 5 μ M durante 72 horas junto con análisis proteico mediante *western blot* de IRS2, P53, CASPASA-3 activa, GFAP y β -Actina (representativo de n=4). IRS2, substrato receptor de insulina2; cont, control; GFAP, proteína ácida fibrilar glial.

4.1.2.4 La falta de IRS2 disminuye la capacidad de reducción de α -SMA durante la inactivación de LX-2

Tras observar que IRS2 promovía la supervivencia de CEHS inactivadas, se estudió si su silenciamiento pudiera alterar la expresión del marcador fibrogénico α -SMA tras su inactivación con MitoC. Los resultados mostraron una reducción de α -SMA tanto en las células control como en las silenciadas. Sin embargo, el silenciamiento de IRS2 mostró una menor capacidad de reducción proteica del marcador α -SMA, a juzgar por su mayor expresión tras la inactivación mitótica (Figura 37). Estos resultados podrían ser indicativos de una reducción en la capacidad de inactivación, o también podrían indicar una supervivencia selectiva de células con carácter más fibrogénico.

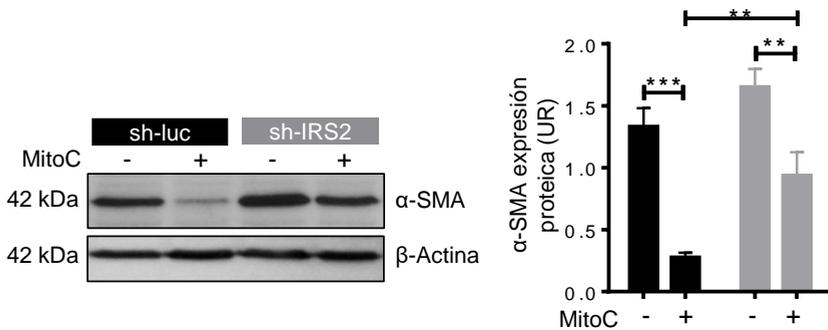


Figura 37. La falta de IRS2 reduce la capacidad de disminuir la expresión de α -SMA ante la inactivación de células estrelladas humanas. Imagen representativa del nivel proteico de α -SMA y β -ACTINA expresado por células LX2 sh-luc y sh-IRS2 en condiciones de activación e inactivación tras el tratamiento con MitoC. Cuantificación de la expresión de α -SMA representado como unidades relativas (UR) (n= 4-5). Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, y ***p < 0,001. Medias comparadas mediante análisis *two-way* ANOVA aplicando un test de Bonferrini para comparaciones múltiples. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2; MitoC, mitomicina C; UR, unidades relativas; α -SMA, α -actina del músculo liso.

4.2 Bloque 2: El papel de IRS2 durante el avance tumoral hepático

La expresión de IRS2 ha sido vinculada con lesiones preneoplásicas intrahepáticas [180]. Además, se le atribuye un papel protumoral a través de la acción de YAP [240], cuya expresión también ha sido relacionada con la dediferenciación de hepatocitos hacia células progenitoras [241]. Por otra parte, durante el estudio del papel de IRS2 en la respuesta al daño crónico hepático, se ha observado cómo su expresión es necesaria tanto para la reepitelización hepática como para la diferenciación hacia un estado epitelial, similar al de los hepatocitos, de la línea progenitora de hepatoma HepaRG [242]. Dadas las semejanzas entre los procesos de reparación del daño y el cáncer [138], el carácter poco diferenciado de los HBs y algunos HCCs similar a células progenitoras [157], y la importancia de los procesos de epitelización en cáncer, se procedió a estudiar el papel de IRS2 en hepatocarcinogénesis.

4.2.1 La expresión de IRS2 se reduce en estadios avanzados de HCC y en tumores menos diferenciados y con peor pronóstico

En primer lugar y con el objetivo de estudiar si cambios en la expresión de IRS2 son relevantes en HCC, se estableció una colaboración con el grupo del Dr. Yujin Hoshida del *UT Southwestern Medical Center* (Texas, EEUU). El planteamiento de estas hipótesis llevó al análisis de variaciones en la expresión de *IRS2* gracias al meta-análisis de bases de datos de origen público por este grupo. En concreto, se utilizó la base de datos "*Gene Expression Omnibus*" de la que, bajo el número de acceso "GSE54238" se obtuvieron datos de un total de 56 muestras de hígados sanos (n=10), con inflamación (n=10), cirróticos (n=10) y con HCC. En este último se distinguen dos grupos tumorales, uno de estadio temprano (n=13) y otro de estadio avanzado (n=13). Los datos muestran variaciones en la expresión de *IRS2* durante la progresión del daño hepático y cáncer. Destaca la reducción significativa de *IRS2* en aquellos tumores de carácter más

avanzado en comparación con HCCs tempranos, con muestras de hígados sanos y con hígados inflamados (Figura 38, A).

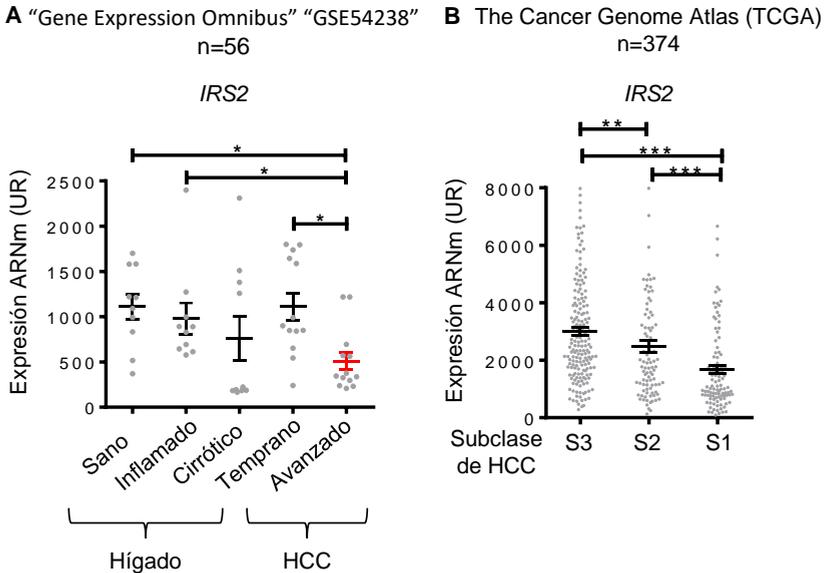


Figura 38. Muestras humanas de HCC de carácter avanzado y con un perfil de menor diferenciación y supervivencia reducen los niveles de *IRS2*. Cuantificación de la expresión de ARNm de *IRS2* representado como unidades relativas (UR) en (A) muestras humanas de hígados sanos (n=10), con inflamación crónica (n=10), cirróticos (n=10) o de HCC de carácter temprano (n=13) y avanzado (n=13), (B) y en muestras de HCC de diferentes subclases moleculares S1 (n=105), S2 (n=93) y S3 (n=176). En la representación se observa el valor de cada muestra como un punto junto con el valor medio \pm SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 y ***p < 0,001. Para comparar medias se utilizó un análisis *one-way* ANOVA aplicando un test de Wilcoxon. *IRS2*, sustrato receptor de insulina 2; UR, unidades relativas; HCC, hepatocarcinoma; n, número de muestras.

Además, también se analizó el perfil de expresión de *IRS2* en muestras de HCC clasificadas previamente en tres subgrupos según su perfil transcriptómico, S3-S1 [159]. Los datos de estas muestras provienen de un total de 8 cohortes de pacientes independientes recopiladas de forma internacional, obteniéndose datos de un total de 374 muestras recopiladas en el *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). El análisis de expresión de *IRS2* en cada uno de los tres subgrupos reveló que los mayores niveles se observaban en el subgrupo S3, caracterizado por poseer un perfil tumoral diferenciado y de menor tamaño. Seguido de este, el perfil S2, caracterizado por poseer un mayor tamaño junto con inducción de *MYC* y de *AKT*.

Finalmente, el perfil S1 fue el que menor expresión de IRS2 presentaba, siendo este grupo caracterizado por poseer un perfil de carácter progenitor con bajo grado de diferenciación, asociándose con un mayor índice de reaparición en los pacientes, así como con mayores capacidades invasivas [159] (Figura 38, B). Por lo que mediante el análisis de datos recogidos en bases de datos de distinto origen, la expresión de IRS2 muestra una disminución a medida que se produce un avance tumoral y una desdiferenciación.

4.2.2 El silenciamiento de IRS2 no altera la capacidad proliferativa de la línea Huh6

Con el objetivo de estudiar cómo afecta la reducción en la expresión de IRS2 en hepatocarcinogénesis se silenció IRS2 en diferentes líneas de HCC y HB de origen humano, analizando para ello cambios fenotípicos relevantes en tumorigénesis. En concreto, la línea de HB Huh6 proveniente de hepatoblastos (hepatocitos en proceso de diferenciación), ha sido descrita como capaz de formar tumores intrahepáticos por medio de la migración a través de la vena esplénica desde un tumor primario en el bazo [243]. Esta característica permite no sólo el estudio de sus capacidades migratorias e invasivas *in vivo*, sino también el análisis de su comportamiento en un microambiente intrahepático y por tanto más cercano a la realidad.

Por medio de infección lentiviral de la línea Huh6 se generó una línea control sh-luciferasa (sh-luc) y otra que contenía un shRNA para IRS2 (sh-IRS2). En primer lugar se evaluó el correcto silenciamiento de IRS2, observándose un descenso del 84% en la expresión proteica (Figura 39, A). Con el objetivo de analizar si este silenciamiento conllevaba cambios en la capacidad de proliferación, se midió la actividad metabólica celular relativa al número de células viables por medio del ensayo MTT, no resultando en cambios significativos al silenciar IRS2 (Figura 39, B). El estudio de la tasa de síntesis de ADN por medio de la incorporación de BrdU tampoco resultó en cambios significativos (Figura 39, C), indicando que el silenciamiento de

IRS2 en la línea Huh6 y bajo condiciones estándar de cultivo, no muestra cambios en la proliferación celular.

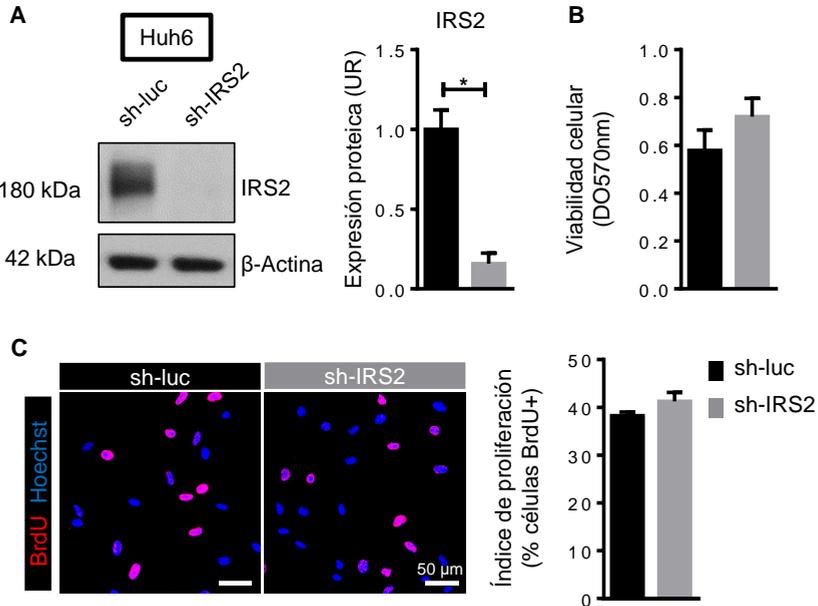


Figura 39. El silenciamiento de IRS2 en Huh6 no altera la proliferación celular. (A) Imagen representativa del análisis proteico de IRS2 por *western blot* en células Huh6 en condiciones control (sh-luc) y bajo el silenciamiento de IRS2 (sh-IRS2). Cuantificación de expresión representada como unidades relativas (UR) en tres experimentos independientes. (B) Cuantificación de la viabilidad celular por medio del ensayo MTT con triplicados en tres experimentos independientes (C) (Izquierda) Imágenes confocales de inmunofluorescencia representativas de la tinción anti-BrdU en cultivos Huh6 control (sh-luc) y bajo el silenciamiento de IRS2 (sh-IRS2). Barra de escala 50 μ m. (Derecha) Cuantificación del porcentaje de núcleos BrdU positivos en cultivos Huh6 control (sh-luc) y bajo el silenciamiento de IRS2 (sh-IRS2) en 3 experimentos independientes con un total de $2,7 \times 10^4$ células analizadas. Los datos representan el valor medio + SEM. * $p < 0,05$. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test pareado. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2; UR, unidades relativas.

4.2.3 La formación de colonias aisladas de mayor tamaño incrementa al reducir los niveles de IRS2

El ensayo de clonogénesis modela la capacidad de supervivencia y crecimiento de células aisladas. Con el objetivo de evaluar si la expresión de IRS2 afectaba a estas capacidades protumorigénicas, se llevó a cabo ensayo con la línea Huh6. Tras 12 días en cultivo, se observó la formación de

colonias de diferentes tamaños predominando unas colonias pequeñas con un fenotipo compacto y mayores en las que los límites se mostraban dispersos y en las que células individuales carentes de contacto entre sí y con una alta expresión de vimentina se extendían hacia la periferia (Figura 40, A). El silenciamiento de IRS2 no reflejó cambios significativos en el número total de colonias formadas, pero resultó en un enriquecimiento de colonias de mayor tamaño y carácter disperso, mientras que disminuía ligeramente el número de colonias de menor tamaño (Figura 40, B).

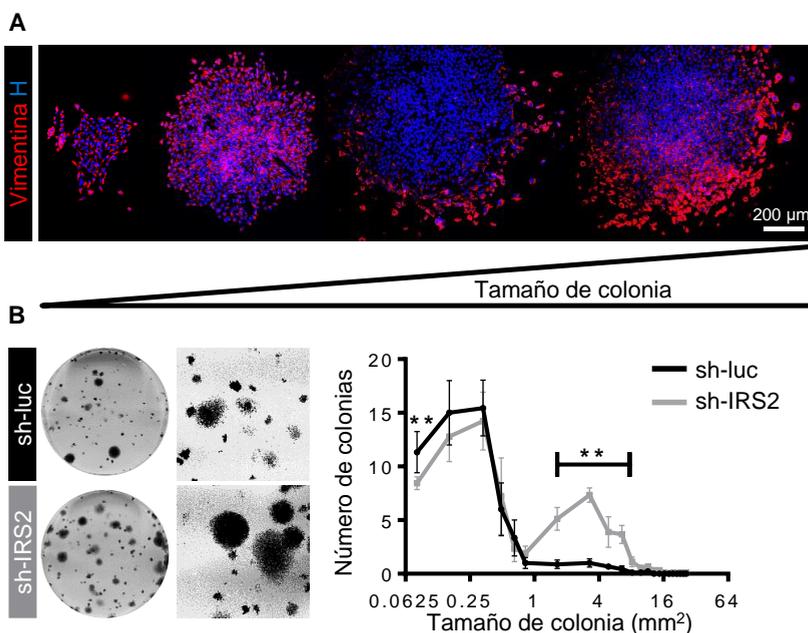


Figura 40. La falta de IRS2 en Huh6 promueve la formación de colonias de mayor tamaño y mayor dispersión. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de colonias sh-IRS2 teñidas con vimentina y *Hoechst* (H) distribuidas en función de su tamaño. Barra de escala 200 µm. (B) Imágenes representativas del análisis de clonogenicidad de la línea Huh6 en condiciones control (sh-luc) y bajo el silenciamiento de IRS2 (sh-IRS2). Representación del número de colonias en función de su tamaño (n=3, con triplicados). **p < 0,01. Medias comparadas mediante un análisis *two-way* ANOVA aplicando un test de Sidak para comparaciones múltiples. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2; H, *Hoechst*.

Con el objetivo de analizar si diferencias en la expresión de IRS2 endógeno pudiera generar cambios similares, se llevó a cabo este mismo ensayo con la línea reportera celular clonal Huh6 pIRS2-GFP, que expresa GFP bajo el control del promotor de IRS2 (Figura 41, A). Esta construcción genética ha sido previamente validada y caracterizada bajo el uso de la línea HepaRG [242]. Mediante separación celular por citometría de flujo se aislaron dos poblaciones celulares, una en la que la expresión de IRS2 se encontraba enriquecida y otra en la que se encontraba reducida. El ensayo de clonogénesis realizado con ambas poblaciones mostró que las células con menores niveles de expresión de IRS2 endógeno generaban más colonias de mayor tamaño (Figura 41, B). Estos resultados indican que la reducción en la expresión de IRS2, tanto a través de su silenciamiento como a través de una menor expresión endógena, resulta en la formación de colonias de mayor tamaño a partir de células aisladas.

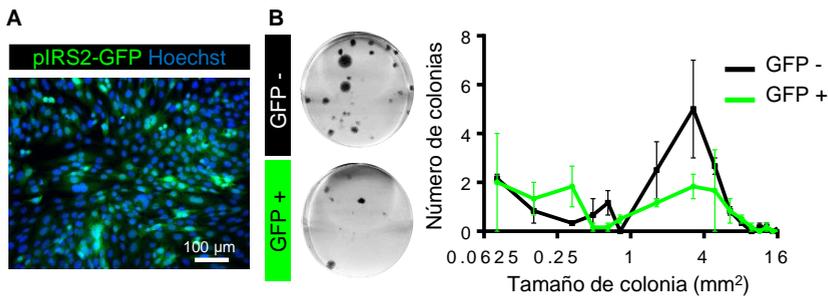


Figura 41. La reducción de expresión endógena de IRS2 en Huh6 promueve la formación de colonias de mayor tamaño. (A) Imagen de la línea celular reportera clonal Huh6 pIRS2-GFP teñida con *Hoechst*. Barra de escala 100 μm . (B) Imágenes representativas del análisis de clonogenicidad de la línea Huh6 pIRS2-GFP a partir de células enriquecidas en IRS2 (GFP+) y con bajos niveles de expresión de IRS2 (GFP-). Representación del número de colonias en función de su tamaño ($n=2$, con triplicados). GFP, proteína verde fluorescente.

4.2.4 El silenciamiento de IRS2 en Huh6 induce cambios en el citoesqueleto de actina

La observación de la morfología celular en contraste de fases de Huh6 bajo condiciones estándar de cultivo, mostró un cambio en el aspecto celular al silenciar IRS2. Para estudiar más en profundidad estas variaciones,

se realizó un marcaje del citoesqueleto de actina con faloidina (F-Actina). Los resultados revelaron que las células silenciadas perdían la organización de filamentos de actina, de forma que los filamentos dispuestos a lo largo del cuerpo celular pasaban a agruparse en la periferia formando protusiones de F-actina (Figura 42). Estas protusiones han sido descritas como filopodios y están vinculadas con la promoción de la motilidad celular [161].

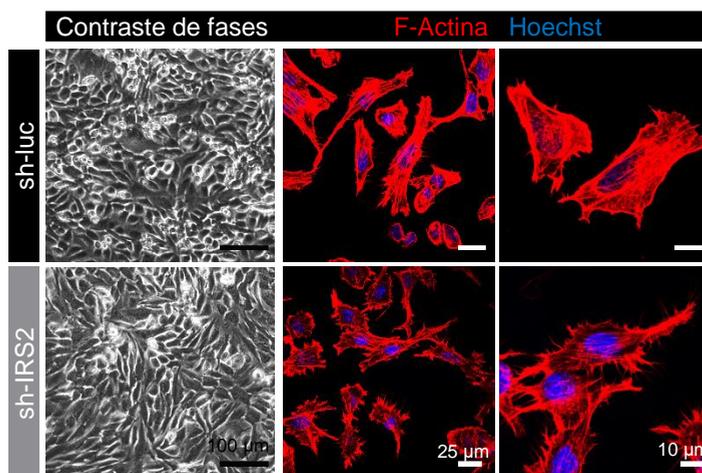


Figura 42. El silenciamiento de IRS2 en Huh6 altera la morfología del citoesqueleto celular. (Izquierda) Imágenes en contraste de fases (derecha) e imágenes confocales de inmunofluorescencia representativas de cultivos Huh6 control (sh-luc) y silenciando IRS2 (sh-IRS2), teñidas con F-Actina. Se pueden observar diferentes aumentos con barra de escala 100 μm , 25 μm y 10 μm (de izquierda a derecha). IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2.

4.2.5 La tasa migratoria e invasiva de Huh6 aumenta tras el silenciamiento de IRS2 *in vitro*

El estudio de cambios en las capacidades migratorias bajo el silenciamiento de IRS2 se realizó mediante un ensayo de herida, en él se estudió la capacidad de cierre de un área libre de células. Este ensayo mostró que tras 7 horas de migración, las células carentes de IRS2 migraban más rápido, llegando a cubrir un 20% más del área libre de células (Figura 43, A). El aumento en la tasa migratoria también fue corroborado mediante el ensayo de *transwell*, en el que el silenciamiento de IRS2 favorecía la migración a través de los poros de la cámara (Figura 43, B). Por medio de ambos ensayos se demostró que el silenciamiento de IRS2 promovía la

migración *in vitro* de Huh6. Además, también se evaluó la capacidad invasiva de estas células. Para ello se adicionó matrigel a las cámaras *transwell*, de modo que para poder traspasar el estrato formado, las células debían ser capaces de reducir la formación de adhesiones. Los resultados mostraron que el silenciamiento de IRS2 en Huh6 aumenta la capacidad invasiva (Figura 43, C).

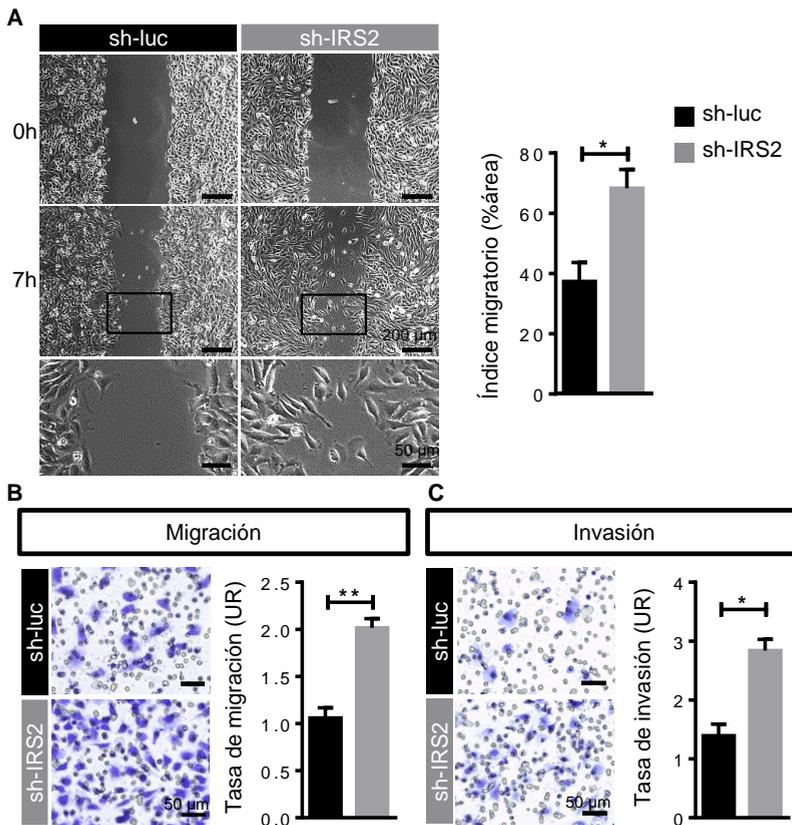


Figura 43. El silenciamiento de IRS2 en la línea Huh6 promueve la migración e invasión celular. (A) Imágenes de contraste de fases del experimento de herida en tiempo 0 (0h) y tras 7 horas (7h) en cultivo, en células Huh6 sh-luc y sh-IRS2. Barra de escala 200 μ m. Los recuadros negros muestran una zona magnificada con barra de escala de 50 μ m. Cuantificación del índice de migración mediante el cálculo del porcentaje de área cerrada tras 7 horas en tres experimentos independientes, con al menos 3 réplicas cada uno. (B y C) Experimento de migración e invasión por *transwell* en el que se muestran imágenes de células teñidas que han traspasado los poros, y la cuantificación de la tasa de migración e invasión representado como unidades relativas (UR). Los controles han sido normalizados a la unidad. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes. Barra de escala 50 μ m. Los datos representan el valor medio + SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Para comparar medias

se utilizó un análisis t-test pareado. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2; UR, unidades relativas.

4.2.6 El silenciamiento de IRS2 promueve las capacidades metastásicas de células Huh6

Tras observar un aumento en la capacidad migratoria de Huh6 debido al silenciamiento de IRS2 *in vitro*, se procedió al estudio del comportamiento migratorio *in vivo*. La inyección intraesplénica de las células Huh6 provocó la formación de un tumor primario en el bazo de los animales SCID. Esta línea celular tiene una alta capacidad de migración e invasión en comparación con otras líneas de HCC [243], lo que le permite migrar a través de la vena esplénica y vena porta hepática hasta alcanzar el hígado y metastatizar en este formando tumores intrahepáticos (Figura 44, A).

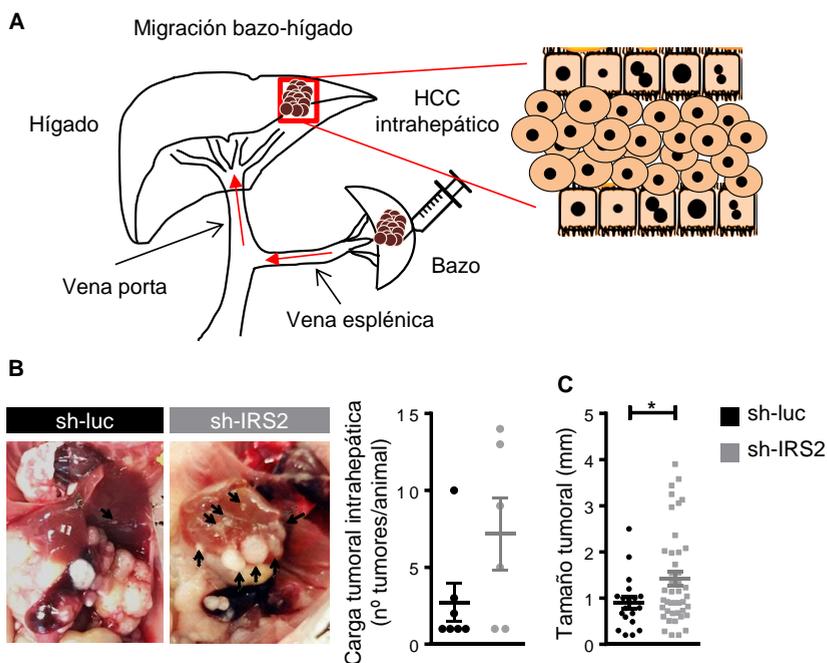


Figura 44. La falta de IRS2 en la línea celular Huh6 promueve la migración *in vivo*. (A) Esquema representativo del procedimiento de experimentación por el que las células Huh6 son inyectadas en el bazo de los animales, formando en este un tumor primario y migrando a través de la vena esplénica y porta hasta el hígado, donde forman tumores intrahepáticos. (B) Imágenes representativas del ensayo de migración bazo-hígado. Se observan tumores intrahepáticos (flechas negras) formados a partir de la migración de un tumor primario Huh6 intraesplénico sh-luc y sh-IRS2. Cuantificación de la carga tumoral intrahepática (representado como un punto por cada animal, junto con el valor medio \pm SEM) y (C) de su

tamaño longitudinal (n=6 y 7). *p< 0,05. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test no pareado. IRS2, sustrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2; HCC, hepatocarcinoma.

Tras cuatro semanas desde la inyección intraesplénica, se procedió al estudio de la formación de tumores intrahepáticos de forma macroscópica. El silenciamiento de IRS2 resultó en un aumento no significativo (p=0,054 aplicando un t-test) de la carga tumoral intrahepática de cada animal. El número medio de tumores intrahepáticos por animal fue de $2,714 \pm 1,248$ tumores en los controles en comparación con $7,167 \pm 2,344$ tumores (media \pm SEM) utilizando las células silenciadas (Figura 44, B). Cabe destacar que el número total de tumores macroscópicos formados en los animales controles fue de 19 (n=7 animales) en comparación con 43 bajo el silenciamiento de IRS2 (n=6 animales). Destacó el tamaño tumoral de los tumores sh-IRS2, resultando 2,6 veces mayor que en los controles (Figura 44, C). Los resultados obtenidos en este ensayo mimetizan los obtenidos en el ensayo de clonogénesis, ya que el silenciamiento de IRS2 genera tumores pequeños como los controles, pero también resulta en la formación de tumores de mayor tamaño ausentes en los controles, además de corroborar la mayor capacidad migratoria observada *in vitro*.

La examinación histológica de los tumores mediante la realización de tinciones de hematoxilina y eosina reveló diferencias a nivel morfológico (Figura 45, A). Los tumores que silenciaban la expresión de IRS2 mostraron una reducción del área tumoral necrótica (Figura 45, B). Además, dada la importancia de la expresión del gen supresor de tumores p53 en cáncer, y en concreto la relación de su menor expresión en HCCs con una menor diferenciación y mayor progresión tumoral [244], se analizó su expresión. Los resultados mostraron una reducción de p53 a nivel de ARNm en los tumores sh-IRS2 (Figura 45, C).

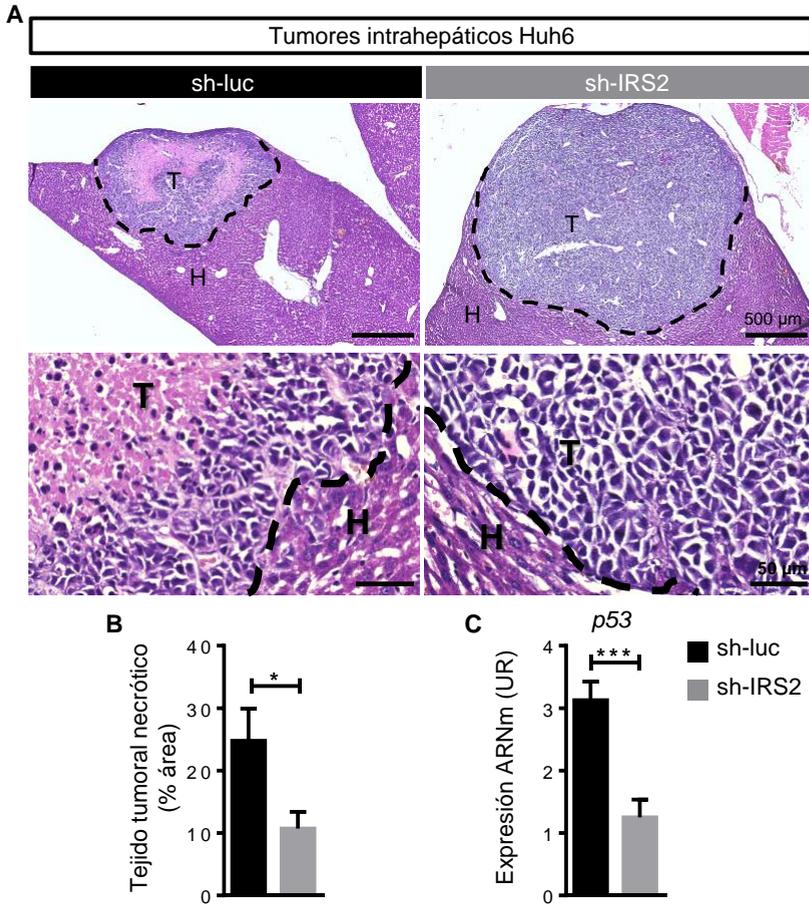


Figura 45. El silenciamiento de IRS2 en tumores intrahepáticos reduce la necrosis tumoral y la expresión de P53. (A) Imágenes en campo claro de tinción de hematoxilina y eosina de hígados con tumores intrahepáticos Huh6 sh-luc y sh-IRS2 (T), rodeados en el límite con el tejido hepático no tumoral (H). Barra de escala 500 y 50 μ m. (B) Cuantificación del área de tejido tumoral necrótico representado como porcentaje (n=2-8). (C) Cuantificación de la expresión de ARNm de *P53* representado como unidades relativas (UR), utilizando *RPL 19* como gen de referencia en tumores intrahepáticos sh-luc y sh-IRS2 (n=7). Los datos representan el valor medio + SEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test no pareado. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2; UR, unidades relativas.

4.2.7 La falta de IRS2 en la línea epitelial Hep3B promueve el crecimiento de xenoinjertos subcutáneos

De manera adicional, también se estudiaron las consecuencias de la pérdida de expresión de IRS2 en la línea epitelial de hepatocarcinoma Hep3B. Para ello se generó una línea control sh-luc y otra sh-IRS2. El correcto silenciamiento se verificó mediante análisis proteico y de ARNm, observándose un descenso de expresión transcripcional del 55% que dio lugar a su reducción proteica (Figura 46, A). La caracterización fenotípica de esta línea no resultó en cambios significativos en el crecimiento celular, a juzgar por los resultados obtenidos en el ensayo MTT (Figura 46, B), al igual que lo observado con la línea Huh6.

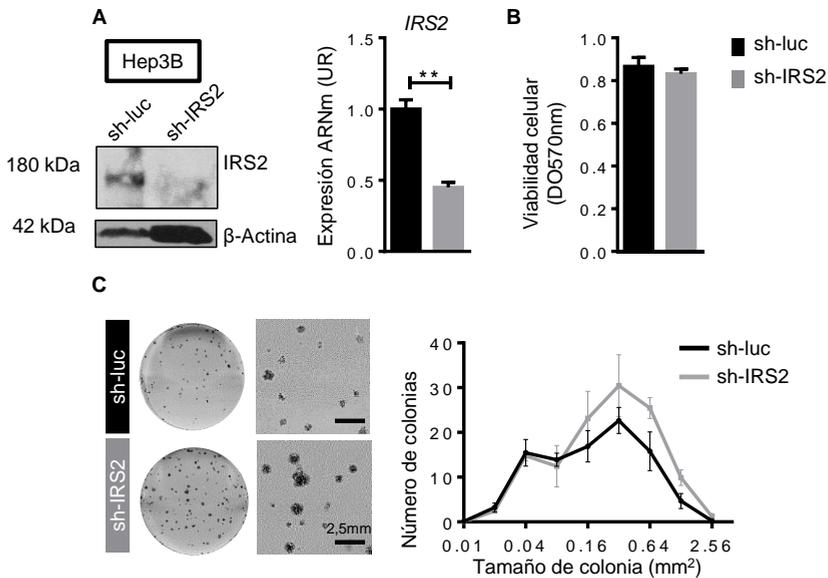


Figura 46. El silenciamiento de IRS2 en la línea Hep3B no afecta a la proliferación celular pero aumenta el número de colonias de mayor tamaño. (A) Imágenes representativas del análisis de expresión proteica de IRS2 de la línea Hep3B bajo condiciones sh-luc y sh-IRS2, junto con un análisis de expresión de ARNm (n=3). Para comparar medias se utilizó un análisis t-test pareado *p < 0,05 (B) Cuantificación de la viabilidad celular por medio del ensayo MTT, representado como valor medio + SEM (n=5, con triplicados). Para comparar medias se utilizó un análisis t-test pareado. (C) Imágenes representativas del análisis de clonogenicidad de la línea Hep3B sh-luc y sh-IRS2 y representación del número de colonias en función de su tamaño (n=3, con triplicados). Barra de escala 2,5 mm. Medias comparadas mediante un análisis two-way ANOVA aplicando un test de Sidak para comparaciones múltiples. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2; UR, unidades relativas.

Mediante el ensayo de clonogénesis se observó que el tamaño de las colonias obtenidas era generalmente pequeño, poseyendo estas una morfología compacta. El silenciamiento de IRS2 en Hep3B mostró una tendencia en el aumento de la capacidad de supervivencia de células aisladas y su desarrollo hasta la formación de colonias, en concreto, las de mayor tamaño (Figura 46, C).

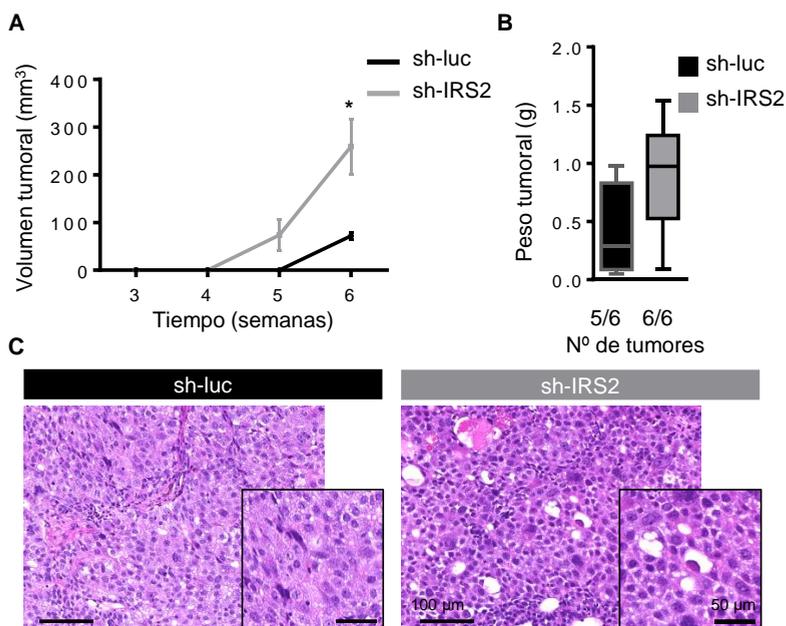


Figura 47. El silenciamiento de IRS2 en la línea Hep3B aumenta el peso y volumen tumoral. (A) Representación del volumen tumoral en función del tiempo como el valor medio \pm SEM (n=2-6). Medias comparadas mediante un análisis *two-way* ANOVA aplicando un test de Sidak para comparaciones múltiples. * $p < 0,05$. (B) Representación del peso de xenoinjertos subcutáneos formados a partir de células Hep3B sh-luc y sh-IRS2, representado como el valor máximo y mínimo y la mediana (n=5-6). Para comparar medias se utilizó un análisis t-test no pareado. (C) Imágenes en campo claro de tinción de hematoxilina y eosina de xenoinjertos subcutáneos Hep3B sh-luc y sh-IRS2. Barra de escala 100 y 50 μ m. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2.

Para estudiar la capacidad de formación de tumores a partir de estas células *in vivo*, se generaron xenoinjertos subcutáneos (debido a su incapacidad de formación de tumores en el ensayo de migración bazo-higado). Tras la inyección subcutánea de estas células se midió el volumen de los tumores formados con una frecuencia semanal. El silenciamiento de

IRS2 resultó en un aumento del volumen tumoral (Figura 47, A), pudiéndose palpar 2 tumores en los controles y 6 en los silenciados, de entre un total de 6 animales inyectados en cada grupo. La extracción de tumores al término del experimento permitió obtener el peso de los tumores menores, no palpables en el animal, lo que resultó en un ratio tumoral de 5/6 y 6/6 entre los tumores controles y silenciados respectivamente. La medida del peso tumoral mostró un aumento no significativo ($p=0,067$) desde $0,4 \pm 0,2$ g a $0,9 \pm 0,2$ g (media \pm SEM) al silenciar IRS2 (Figura 47, B).

El análisis histológico de los xenoinjertos subcutáneos generado a partir de células Hep3B también mostró diferencias bajo el silenciamiento de IRS2. Cabe destacar las agrupaciones celulares en forma de ductos de los tumores sh-IRS2, similares a las reacciones ductulares descritas en patologías hepáticas donde las células progenitoras se localizan (Figura 47, C).

4.2.8 El silenciamiento de IRS2 no es suficiente para promover una EMT *in vitro*

El avance tumoral generalmente está vinculado con mayores habilidades migratorias e invasivas, con cambios morfológicos debidos a la reorganización del citoesqueleto de actina y con cambios en proteínas de adhesión típicas de procesos EMT, entre otros eventos [245]. Tras observar que el silenciamiento de IRS2 aumenta el potencial metastásico de diferentes líneas de HCC y limita la capacidad de diferenciación de la línea progenitora HepaRG [242], se planteó la hipótesis de que el silenciamiento de IRS2 pudiera promover una EMT *in vitro*. De entre las líneas celulares utilizadas, HepG2 no mostró niveles detectables de *IRS2*, por lo que su silenciamiento no fue analizado en esta línea. El estudio de marcadores epiteliales como *E-cadherina* y *FGFR2-IIIb* indicaban que Hep3B era la línea con mayor índice epitelial *in vitro*, mientras que Huh6 era la línea que poseía un mayor índice mesenquimal debido a su alta expresión de *vimentina* (Figura 48), muestra de la heterogeneidad de las líneas celulares usadas en este proyecto.

Se analizaron cambios en la expresión de proteínas de adhesión relevantes en una EMT, como son la pérdida de E-cadherina y el aumento en la expresión N-cadherina y vimentina [135]. Los resultados en la línea HepaRG mostraron un descenso en la expresión de E-cadherina del $96,7\% \pm 9,0$ UR (media \pm SEM) tras silenciar IRS2 y en condiciones de cultivo estándar. En estas condiciones también se observó un ligero aumento de N-cadherina y ausencia de cambios en vimentina (Figura 49, A), aunque cabe destacar los reducidos niveles de expresión basal de vimentina que posee esta línea (Figura 48).

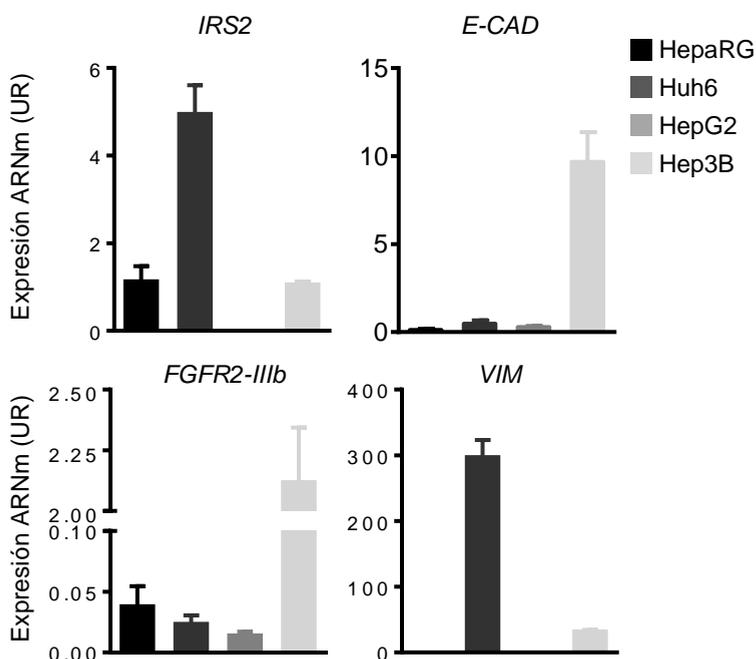


Figura 48. Análisis de expresión de ARNm de IRS2 y marcadores epiteliales y mesenquimales de las diferentes líneas utilizadas en el estudio. Expresión de ARNm de IRS2, E-cadherina, FGFR2-IIIb y Vimentina representado como unidades relativas (UR), utilizando *RPL19* como gen de referencia en las líneas HepaRG, Huh6, HepG2 y Hep3B (n=3). Los datos representan el valor medio + SEM. IRS2, substrato receptor de insulina 2; E-CAD, E-cadherina; FGFR2-IIIb, receptor 2-IIIb del factor de crecimiento fibroblástico; VIM, vimentina; UR, unidades relativas.

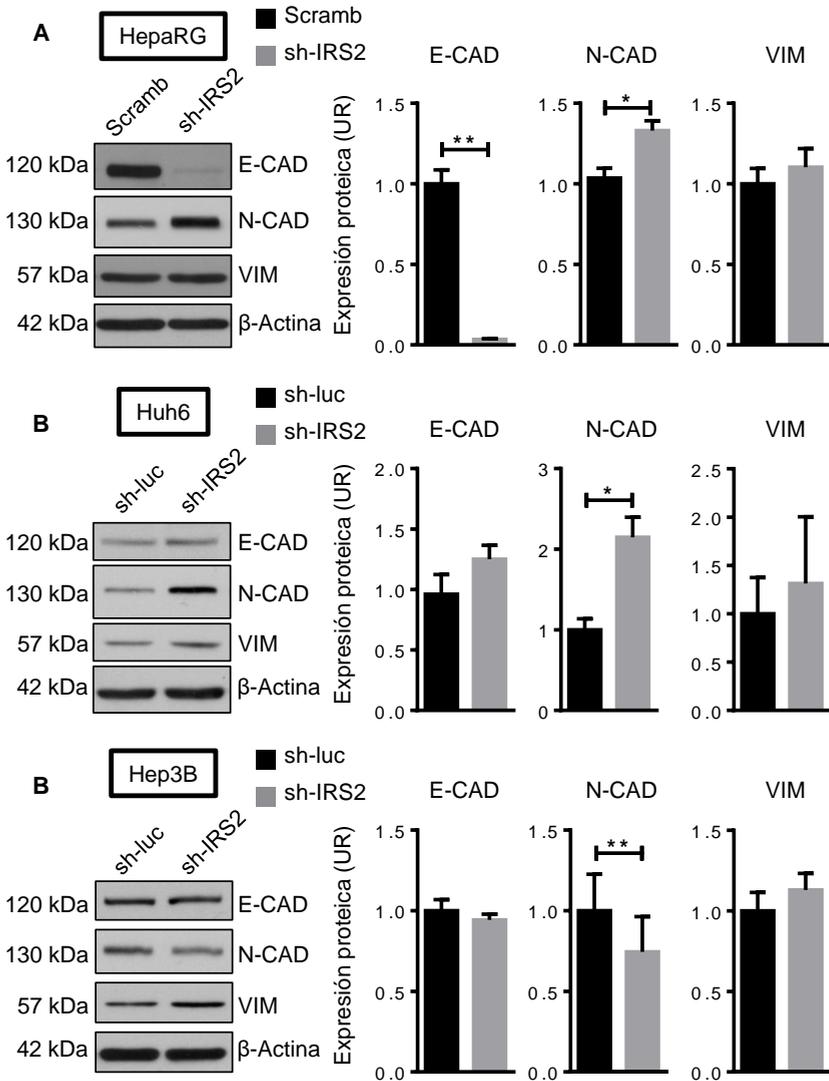


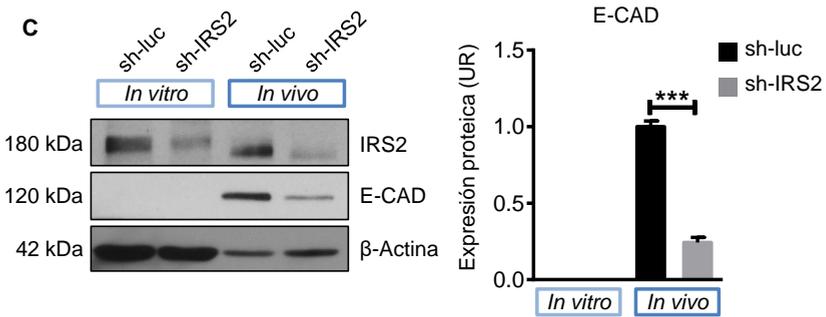
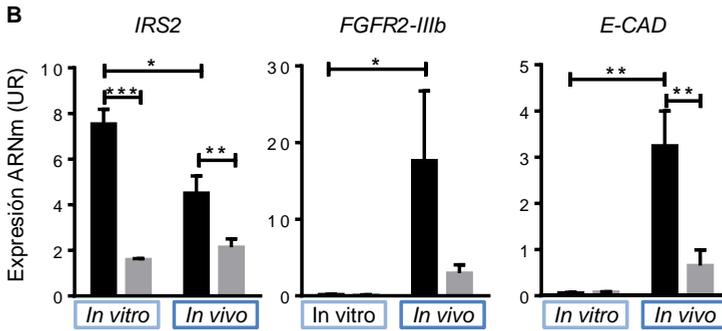
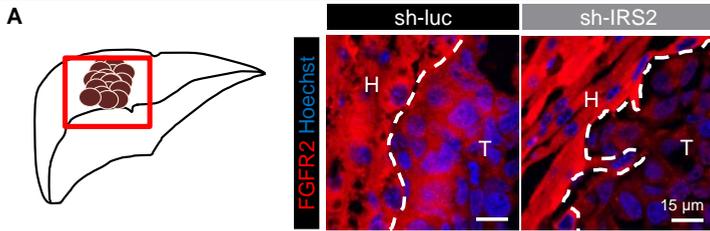
Figura 49. El silenciamiento de IRS2 promueve cambios en la expresión de marcadores característicos de una EMT en las líneas HepaRG (A) y Huh6 (B). Imágenes representativas del análisis proteico de IRS2, E-cadherina y N-cadherina por *western blot* en células Huh6 y HepaRG en condiciones control (sh-luc y scramb) y sh-IRS2. Cuantificación de expresión representado como unidades relativas (UR) en tres (Huh6) y cuatro (HepaRG) experimentos independientes. Los datos representan el valor medio + SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test pareado. IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2; E-CAD, E-cadherina; N-CAD, N-cadherina; VIM, vimentina UR, unidades relativas.

Por otra parte, el silenciamiento de IRS2 en la línea Huh6 no varió la expresión de E-cadherina, cuyos niveles basales eran también muy reducidos (Figura 48). Sin embargo, la expresión de N-cadherina aumentó al doble, indicando un fenotipo mesenquimal alterado, aunque no se observaron grandes diferencias en la expresión de vimentina (Figura 49, B). Finalmente, el análisis de expresión de estas proteínas en la línea epitelial Hep3B no resultó en cambios típicos de una EMT. Los niveles de E-cadherina y vimentina no se vieron alterados, mientras que los de N-cadherina disminuyeron ligeramente al silenciar IRS2 (Figura 49, C). Estos resultados indican que el silenciamiento de IRS2 aunque puede influir en la expresión de proteínas de adhesión implicadas en una EMT, no es suficiente para inducir este proceso.

4.2.9 La expresión de IRS2 es necesaria para la epitelización de Huh6 tras la metástasis *in vivo*

El análisis de los tumores intrahepáticos generados a partir de la migración de células Huh6 desde el bazo hacia el hígado se centró tanto en el estudio de E-cadherina, cuya reducción está vinculada a un proceso EMT y ha sido asociada con la promoción del HCC [246], como de FGFR2-IIIb, cuya expresión hemos observado que es dependiente de *Irs2* durante la reparación del daño hepático crónico [242] y además su reducción ha sido vinculada con un perfil de HCC más agresivo [221]. El análisis mediante inmunofluorescencia mostró una menor expresión proteica de FGFR2 en las células que componían los tumores intrahepáticos sh-IRS2 (T), limítrofes con el tejido hepático (H) (Figura 50, A). El estudio de expresión de ARNm del tejido tumoral corroboró el correcto silenciamiento de IRS2. Llamativamente, se observó una reducción en la expresión de *IRS2* entre las células control cultivadas *in vitro* y los tumores intrahepáticos formados con estas mismas células (Figura 50, B), pudiendo sugerir posibles cambios en IRS2 durante el proceso de migración y metástasis.

Tumores intrahepáticos Huh6



Xenoinjertos subcutáneos Hep3B

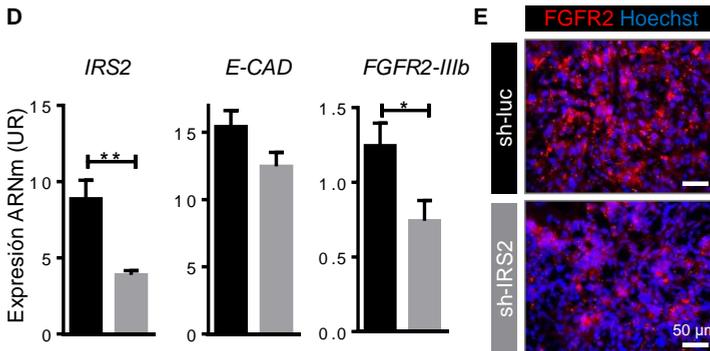


Figura 50. El silenciamiento de IRS2 en tumores intrahepáticos y xenoinjertos subcutáneos reduce su epitelización. (A) Imágenes confocales de inmunofluorescencia representativas de la tinción anti-FGFR2 en tumores intrahepáticos Huh6 sh-luc y sh-IRS2 (T) en el límite con el tejido hepático no tumoral (H). Barra de escala 15 μm . (B) Cuantificación de la expresión de ARNm de *IRS2*, *FGFR2-IIIb* y *E-cadherina* representado como unidades relativas (UR) utilizando como gen de referencia *RPL19* en muestras de células Huh6 cultivadas *in vitro* (n=3), y en tumores intrahepáticos formados por estas mismas (*in vivo*) (n=3-8), sh-luc y sh-IRS2. Medias comparadas mediante un análisis *two-way* ANOVA aplicando un test Bonferroni de comparaciones múltiples. (C) Imagen representativa del proteico de IRS2, E-cadherina y β -actina expresado por células Huh6 *in vitro* e *in vivo* en tumores intrahepáticos sh-luc y sh-IRS2. Cuantificación de la expresión de E-cadherina en estas muestras representado como unidades relativas (UR) (n= 2-3). (D) Cuantificación de la expresión de ARNm de *IRS2*, *E-cadherina* y *FGFR2-IIIb* representado como unidades relativas (UR) utilizando como gen de referencia *RPL19* en xenoinjertos sh-luc y sh-IRS2 (n= 4-5). Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05 y **p < 0,01, ***p < 0,001. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test no pareado. (E) Imágenes de inmunofluorescencia representativas de la tinción anti-FGFR2 en xenoinjertos Hep3B control (sh-luc) y silenciando IRS2 (sh-IRS2). Barra de escala 50 μm . IRS2, substrato receptor de insulina 2; sh-luc, ARN de horquilla corta luciferasa; sh-IRS2, ARN de horquilla corta IRS2; E-CAD, E-cadherina; FGFR2-IIIb, receptor 2-IIIb del factor de crecimiento fibroblástico; UR, unidades relativas.

Por otra parte, el estudio de los marcadores epiteliales *FGFR2-IIIb* y *E-cadherina* (Figura 50, B), y la expresión proteica de E-cadherina (Figura 50, C), tanto en células cultivadas *in vitro* como en los tumores intrahepáticos, mostró una MET entre las células control cultivadas *in vitro* y los tumores intrahepáticos formados por estas. Sin embargo, el silenciamiento de IRS2 impidió el proceso MET, resultando en la generación de tumores intrahepáticos con menor grado de epitelización, a juzgar por la reducción en *FGFR2-IIIb* y en *E-cadherina*, tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico.

Complementariamente, el análisis de expresión de ARNm de xenoinjertos Hep3B subcutáneos también verificó el silenciamiento de IRS2, junto con un ligero descenso no significativo (P=0,0522) de la expresión de *E-cadherina* y una reducción en la expresión del receptor epitelial *FGFR2-IIIb* del 60% en comparación con los controles (Figura 50, D). Además, en consonancia con el estudio de expresión de ARNm, la tinción por inmunofluorescencia de los tumores también mostró un descenso a nivel proteico de FGFR2 (Figura 50, E) indicando una reducción del fenotipo epitelial tumoral ante el silenciamiento de IRS2.

4.2.10 La sobreexpresión de IRS2 promueve MET *in vitro*

Tras observar que el silenciamiento de IRS2 impide el proceso MET entre células Huh6 cultivadas *in vitro* y los tumores intrahepáticos formados a partir de ellas (Figura 50), se trató de analizar si la expresión de IRS2 pudiera ser suficiente para inducir un proceso MET. Para ello se sobreexpresó IRS2 en diferentes líneas de HB y hepatoma mediante infección lentivírica del inserto IRS2 de origen murino. Al tratarse de la expresión de un gen de ratón en células de origen humano, en primer lugar se examinó si la proteína sobreexpresada era capaz de promover la señalización de insulina/IGF-1. Para ello, se estudiaron posibles cambios en la localización celular del factor de transcripción FOXO1, que bajo la señalización activa de insulina/IGF-1 sufre una traslocación desde el núcleo al citoplasma [247]. Como resultado, la sobreexpresión de IRS2 en la línea HepG2 promovió la traslocación de FOXO1 hacia el citoplasma (Figura 51, A), indicando una señalización activa de insulina/IGF-1.

Además, estas mismas células fueron estimuladas con insulina (1nM) y con IGF-1 (1nM) seguido del análisis proteico de la fosforilación de proteínas implicadas en la ruta de señalización de ambos factores. La diferencia más llamativa tras la estimulación con insulina fue el incremento de los niveles de p-AKT en la línea mIRS2, indicativo de la activación de la ruta PI3K. Por otra parte, la estimulación con IGF-1 inducía estas proteínas de forma similar en ambas líneas celulares (Figura 51, B).

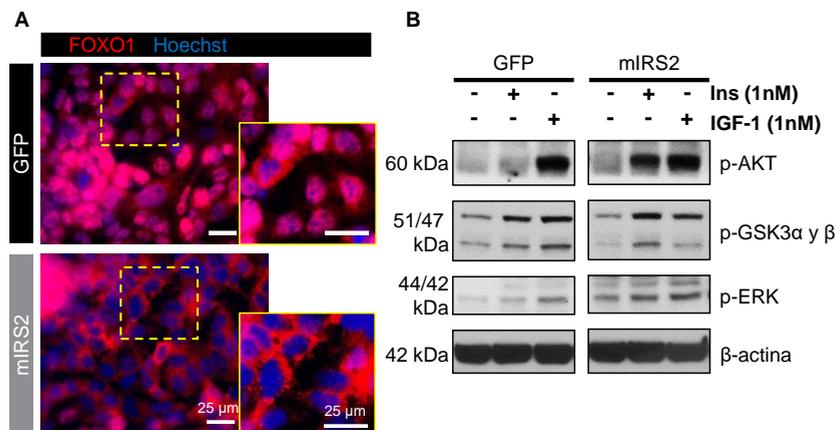


Figura 51. La sobreexpresión de IRS2 de origen murino en HepG2 promueve la señalización de insulina/IGF-1. (A) Imágenes de inmunofluorescencia representativas de la tinción anti-FOXO-01 en células HepG2 control (GFP) y sobreexpresando IRS2 (mIRS2). Barra de escala 25 μ m. (B) Imágenes del análisis de expresión proteica por *western blot* de p-AKT, p-GSK3 β y p-ERK en muestras de células HepG2 control (GFP) y sobreexpresando IRS2 (mIRS2) bajo condiciones de ayunas y estimulación de insulina (1nM) e IGF-1 (1nM). IRS2, substrato receptor de insulina 2; mIRS2, IRS2 de ratón; GFP, proteína verde fluorescente; p-AKT; proteína quinasa B fosforilada; p-GSK3 α y β , glucógeno sintasa quinasa 3 alfa y beta fosforilada; p-ERK, quinasa regulada por señal extracelular fosforilada; FOXO1, *forkhead box protein O1*.

Tras observar que la sobreexpresión de IRS2 de origen murino en la línea humana HepG2 inducía la señalización de insulina, se estudió el perfil de expresión de proteínas de adhesión en las líneas HepaRG, Huh6 y HepG2. La sobreexpresión de IRS2 resultó en un gran aumento en la expresión de E-cadherina en todas las líneas examinadas. Además, la reducción de vimentina en un 32% (Figura 52, A) y un 52% (Figura 52, B) en las líneas HepaRG y Huh6 respectivamente, junto con la reducción de N-cadherina de un 52% en HepG2 (Figura 52, C), indicaban que la expresión de IRS2 inducía el proceso MET *in vitro*. La expresión de vimentina no pudo ser caracterizada en HepG2 debido a los niveles tan reducidos que presentaba.

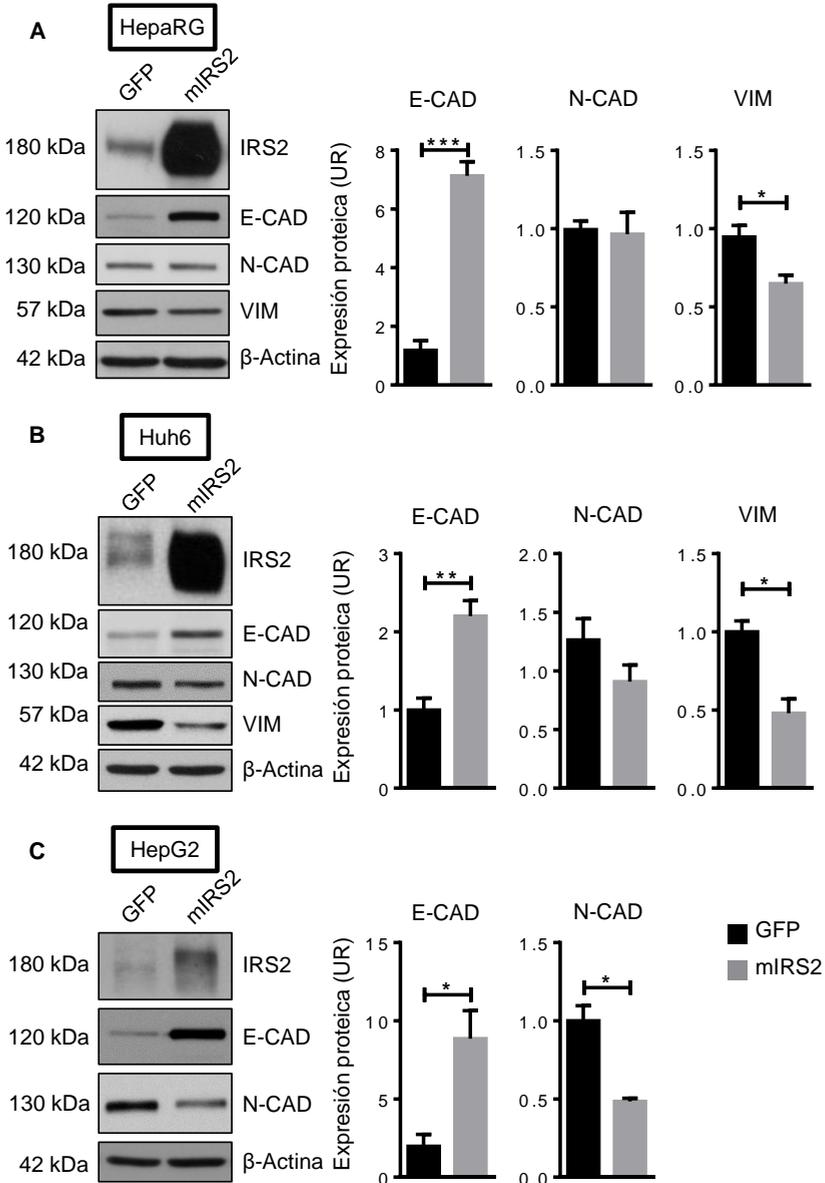


Figura 52. La sobreexpresión de IRS2 promueve cambios en la expresión de distintos marcadores característicos de una MET en las líneas HepaRG (A), Huh6 (B) y HepG2 (C). Imágenes representativas del análisis proteico de IRS2, E-Cadherina, N-Cadherina y Vimentina por *western blot* en células HepaRG, Huh6 y HepG2 en condiciones control (GFP) y sobreexpresando IRS2 (miRS2). Cuantificación de expresión representado como unidades relativas (UR) (n= 3 - 4). Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05, **p < 0,01 y ***p < 0,001. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test pareado. IRS2,

substrato receptor de insulina 2; mIRS2, IRS2 de ratón; GFP, proteína verde fluorescente; E-CAD, E-cadherina; N-CAD, N-cadherina; VIM, vimentina UR, unidades relativas.

4.2.11 La expresión de FGFR2-IIIb aumenta al sobreexpresar IRS2 en las líneas Huh6 y HepG2 *in vitro*

La falta de *Irs2* en el modelo animal reducía los niveles de FGFR2-IIIb durante el daño hepático crónico (Figura 26). Además, su reducción está vinculada con una mayor agresividad de hepatocarcinomas [221]. Tras observar que el silenciamiento de IRS2 reducía la expresión de este receptor epitelial, se evaluó si la sobreexpresión de IRS2 era capaz de inducir cambios en FGFR2-IIIb. El análisis en la línea Huh6 en condiciones de cultivo estándar, resultó en una inducción en la expresión de ARNm de este receptor epitelial de hasta 5,8 veces sobreexpresando IRS2. Adicionalmente, también se observó un aumento en la expresión proteica de FGFR2 por inmunofluorescencia (Figura 53, A). Al tratarse Huh6 de una línea mixta epitelial-mesenquimal, se examinó si la expresión de IRS2 podría también inducir cambios en el ligando de origen mesenquimal de este receptor, *FGF7*. Los resultados mostraron un aumento de 2,8 veces en su expresión (Figura 53, A), resultando la sobreexpresión de IRS2 en un aumento de esta ruta de señalización. También se analizó la expresión de ARNm de *FGFR2-IIIb* de cultivos HepG2, donde la sobreexpresión de IRS2 condujo a un incremento de más del doble de su expresión, junto con el aumento proteico de FGFR2, observado mediante tinciones de inmunofluorescencia en dichos cultivos (Figura 53, B).

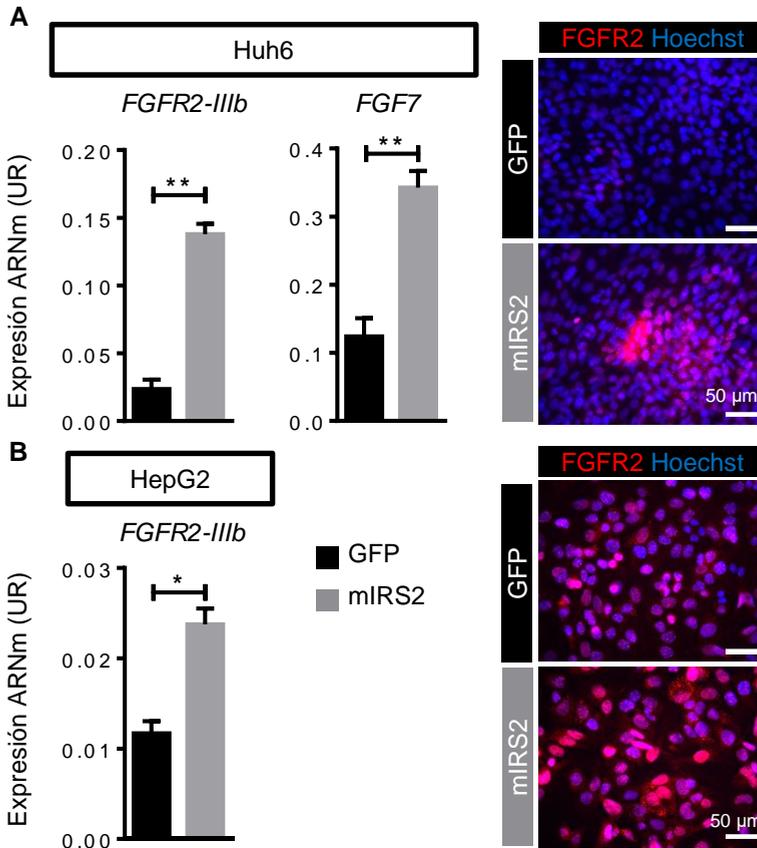


Figura 53. Inducción de la expresión de *FGFR2-IIIb* sobreexpresando IRS2. Cuantificación de la expresión de ARNm de *FGFR2-IIIb* en las líneas Huh6 (A) y HepG2 (B) y de *FGF7* en la línea Huh6, en condiciones control (GFP) y sobreexpresando IRS2 (mIRS2), representados como unidades relativas (UR) (n=3). Imágenes de fluorescencia representativas de la tinción anti-FGFR2 en estas células. Barra de escala 50 µm. Los datos representan el valor medio + SEM. *p < 0,05, **p < 0,01. Para comparar medias se utilizó un análisis t-test pareado. IRS2, substrato receptor de insulina 2; mIRS2, IRS2 de ratón; GFP, proteína verde fluorescente; FGF7, factor de crecimiento fibroblástico 7; FGFR2-IIIb, receptor 2-IIIb del factor de crecimiento fibroblástico ;UR, unidades relativas.

4.2.12 La sobreexpresión de IRS2 reduce la capacidad de migración *in vivo* y formación de tumores intrahepáticos de células Huh6

Finalmente, se procedió a estudiar si la sobreexpresión de IRS2 en la línea Huh6 era capaz de revertir el fenotipo promigratorio observado bajo el silenciamiento de IRS2. Para ello se realizó un ensayo de migración bazo-hígado en el que se generaron tumores intraesplénicos primarios mediante inyección de células Huh6 control (GFP) y sobreexpresando IRS2 (mIRS2) (Figura 54, A). Tras 6 semanas se analizaron de forma macroscópica los tumores intrahepáticos generados, resultando la sobreexpresión de IRS2 en una reducción del 63% de la carga tumoral intrahepática (Figura 54, B) indicativa de una menor capacidad migratoria *in vivo*.

De forma llamativa, se observó una pérdida de sobreexpresión de IRS2 en los tumores intrahepáticos formados. Mientras que las células cultivadas *in vitro* mantenían esta sobreexpresión en un $183,7\% \pm 21\%$ (media \pm SEM), los tumores intrahepáticos formados a partir de estas mismas células perdían la significancia de las diferencias estadísticas, aumentando la expresión de IRS2 en tan solo un $56,0\% \pm 43,9\%$ (media \pm SEM), tres veces menos que *in vitro* (Figura 54, C).

Con el objetivo de analizar si la sobreexpresión de IRS2 se perdía durante la migración bazo-hígado, se analizaron estos tumores en mayor detalle. La inserción lentiviral que contenía el inserto de IRS2 también expresaba el epítipo FLAG. De modo que se analizaron diferencias en la expresión de FLAG entre los tumores primarios intraesplénicos y los tumores intrahepáticos formados a partir de la diseminación y migración de estas células. Como control negativo de tinción se utilizaron muestras de tumores intraesplénicos controles, donde no se observó tinción de FLAG. La cuantificación de la intensidad de tinción del tumor del bazo con respecto al del hígado en cada animal, mostró una reducción del $47,6\% \pm 8,5\%$ (media \pm SEM) de expresión de FLAG (Figura 54, B). Estos resultados sugieren que la migración de Huh6 desde tumores primarios intraesplénicos reduce la sobreexpresión de IRS2-FLAG durante la migración e invasión de Huh6 en el hígado.

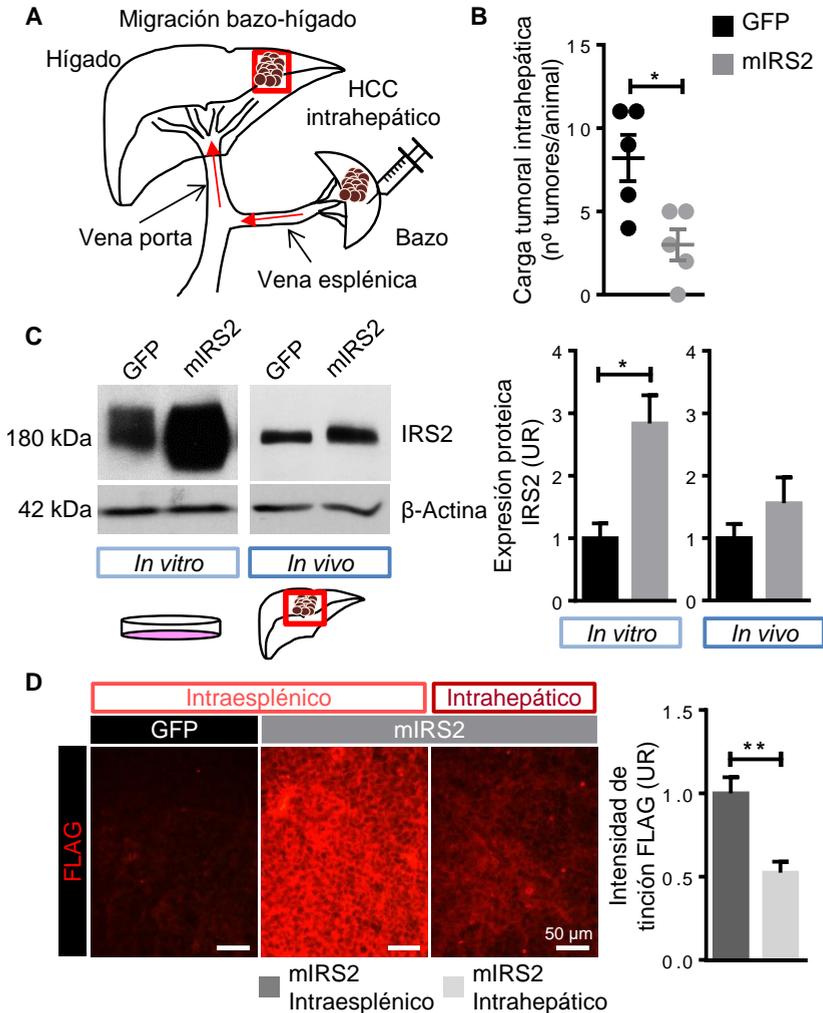


Figura 54. La sobreexpresión de IRS2 en la línea celular Huh6 reduce la migración *in vivo* y su expresión tras la formación de tumores intrahepáticos. (A) Esquema representativo de migración celular *in vivo* desde un tumor esplénico primario hacia el hígado. (B) Cuantificación de la carga tumoral intrahepática formada por células Huh6 GFP y mIRS2 analizada macroscópicamente representado como el valor de cada animal y el valor medio total \pm SEM (n=5). Comparación de medias mediante análisis t-test no pareado. (C) Cuantificación e imágenes representativas del análisis proteico de IRS2 por *western blot* en células Huh6 cultivadas *in vitro* y en tumores intrahepáticos (*in vivo*). Comparación de medias mediante análisis t-test pareado. (C) Imágenes de fluorescencia representativas de la expresión de Flag en tumores GFP y mIRS2 intraesplénicos y mIRS2 intrahepáticos. Barra de escala 50 μ m. Cuantificación de intensidad de expresión de FLAG en tumores mIRS2 intraesplénicos e intrahepáticos representado como valor medio + SEM en unidades relativas (UR) (n= 4). *p < 0,05 y **p < 0,01. Comparación de medias mediante análisis t-test pareado. IRS2, substrato receptor de insulina 2; mIRS2, IRS2 de ratón; GFP, proteína verde fluorescente; UR, unidades relativas; HCC hepatocarcinoma.

Discusión

5.1 El papel de IRS2 durante la reparación del daño hepático.

La resistencia a insulina está estrechamente relacionada con el desarrollo y progresión de enfermedades hepáticas en las que se produce exposición a un daño crónico como HGNA o EHNA [248, 249], también relacionándose con la progresión de fibrosis en EHNA y VHC [53]. La resistencia a insulina también ha sido relacionada con la aparición de estructuras ductulares hepáticas, donde las células progenitoras se disponen en un nicho fibrótico e inflamatorio, tanto en EHNA como en VHC [58, 250]. Sin embargo, se desconoce si la resistencia a insulina podría afectar a la respuesta progenitora en el hígado, y cuáles serían los efectos de esta sobre la comunicación estromal-epitelial que conduce a la reepitelización hepática [4].

Para abordar la cuestión de cómo afecta la resistencia a insulina al daño crónico hepático, se ha trabajado con la proteína IRS2, que actúa propagando la señalización desde los receptores de insulina e IGF-1 promoviendo la activación intracelular de diferentes vías, siendo esencial para la señalización de insulina en hepatocitos [251]. Además, IRS2 de entre las proteínas IRSs, es la que ejerce un papel principal en la señalización de insulina en hepatocitos [31]. Su falta de expresión hepática ha sido asociada con un fenotipo de resistencia a insulina [252]. También ha sido descrita una reducción en la expresión de IRS2, pero no de IRS1, durante el desarrollo de enfermedades metabólicas hepáticas que dan lugar al daño crónico, como

HGNA o EHNA [54, 55]. El modelo murino *Irs2*^{-/-} con el que se ha trabajado en este estudio presenta resistencia a insulina [27]. En él se ha inducido daño hepático crónico mediante el uso del modelo de dieta DDC en la que se forman tapones de porfirinas que obstruyen los conductos biliares, resultando en un daño hepático y en una remodelación tisular. Esta dieta reproduce los principales eventos histopatológicos descritos durante la colestasis. La obstrucción del flujo biliar da lugar a la expansión de estructuras ductulares en la que aparecen tanto colangiocitos (encargados de formar conductos para eliminar el acúmulo de bilis) como CPHs (que pueden diferenciarse en colangiocitos y hepatocitos), rodeadas de células fibróticas e inflamatorias, formando parte del nicho progenitor [121].

Los resultados de este proyecto muestran que la falta de señalización de insulina/IGF-1 a través de IRS2 afecta de forma negativa a la respuesta al daño crónico hepático, alterando la comunicación entre CPHs y estromales y dando lugar a cambios en la composición fibrótica hepática, con menores signos de recuperación hepatocítica.

El análisis de marcadores séricos de daño hepático (AST/ALT) durante el tratamiento con dieta DDC 0,1%, muestra una exacerbación del daño ante la falta de *Irs2*. Además, también sugiere una incapacidad de recuperación en los animales *Irs2*^{-/-} que sí ocurriría en los controles, dada la reducción de estas enzimas tras 14 días de administración de dieta DDC que no se produce ante la falta de *Irs2*. Así mismo, el análisis de células apoptóticas con caspasa-3 activa muestra un mayor índice de daño en los animales *Irs2*^{-/-} tras 21 días de dieta DDC. La muerte celular en el hígado ocurre principalmente mediante apoptosis o necrosis, habiéndose descrito esta última en modelos de colestasis y estando estrechamente relacionada con procesos inflamatorios, que se ven incrementados en el modelo DDC [253]. El hecho de observar una alta pérdida hepatocítica e inducción de AST/ALT, pero sin embargo bajos niveles de apoptosis, podría radicar en que la muerte celular con el modelo DDC se dé principalmente por necrosis, o que ocurra en etapas más tempranas de las analizadas. En cualquier caso,

los resultados indican que *Irs2* es necesario para que se produzca una respuesta y recuperación ante el daño crónico causado por DDC.

Junto con la elevación de enzimas de daño, se produce también una pérdida de núcleos de hepatocitos de menor tamaño, incrementada en los animales *Irs2*^{-/-}, reflejo del daño más acentuado en estos animales indicando un posible papel protector de IRS2. Otros estudios también han relacionado la expresión de IRS2 con una menor susceptibilidad apoptótica de hepatocitos de origen murino neonatal bajo condiciones de restricción sérica [254]. La posibilidad de que esta pérdida más acentuada se deba a una incapacidad de proliferación hepatocítica parece poco probable tras el análisis de Ki67 en esta población. De hecho, este análisis refleja un mayor índice de hepatocitos Ki67 positivos, manifestando que la falta de *Irs2* no impide que los hepatocitos pasen a través del ciclo celular. Una mayor pérdida hepática junto con un aumento de Ki67 parece contradictorio, sin embargo hay que tener en cuenta que los hepatocitos son capaces de realizar ciclos de endorreplicación, en los que aumentan su ploidía sin necesidad de dar lugar a dos células independientes por citocinesis [255]. Mediante la tinción de Ki67 no es posible distinguir entre ambos procesos, sin embargo sí que se observó un aumento en el área de los núcleos que se encontraban pasando por el ciclo celular en comparación con los animales *WT*. Este hecho junto con el análisis de poliploidía complementario en el que se observó una menor pérdida de hepatocitos de mayor ploidía, son indicativos de que los animales *Irs2*^{-/-} podría estar aumentando el proceso de endorreplicación en etapas tardías del daño hepático, y por ende aumentando la poliploidía hepatocítica. Cabe destacar, que un aumento de la ploidía y en la replicación de hepatocitos podrían aumentar también fallos y aneuploidías que desencadenen en HCC [256], siendo posible que la falta de *Irs2* en hígados expuestos a daño crónico hepático, que implicaría continuos ciclos de respuesta al daño, sean más susceptibles al desarrollo de cáncer de hígado.

La ploidía de los hepatocitos por tanto, puede ser variable observándose cambios en diferentes estados fisiopatológicos. Han sido

descritos perfiles de cambio en la ploidía durante la progresión de HGNA [12,19] y en infecciones virales [88]. Describiéndose también perfiles de poliploidía diferentes según las características histopatológicas y moleculares de HCCs [89]. Por estos motivos, la metodología desarrollada durante este proyecto para la cuantificación de cambios en la ploidía podría ser importante para la aplicación en el estudio de enfermedades hepáticas. No obstante, esta técnica tiene sus limitaciones. Su aplicación únicamente es válida en núcleos cuya morfología sea circular, dada la necesidad de inferir a partir del área el volumen mediante fórmulas matemáticas aplicables a circunferencias exactas. Es por ello que únicamente es posible analizar la ploidía a nivel nuclear y no a nivel celular, ya que los hepatocitos binucleares serían eliminados del análisis en el caso de no poder ser segmentados como núcleos individuales.

La función de la poliploidía hepática no está clara, pero una de las hipótesis radica en que esta podría ejercer un papel protector ante eventos tóxicos al aumentar el número de copias genéticas y disminuir así las posibilidades de mutaciones que puedan alterar la funcionalidad hepatocítica [90]. En consonancia con esta hipótesis, los resultados de la estimación de ploidía hepatocítica muestran una pérdida más acrecentada en las poblaciones con menor número de copias genéticas. En los animales *WT* la reducción hepatocítica se estabiliza en la población 8c e incluso aumenta el número de núcleos 16c, en concordancia con el hecho de que la ploidía hepatocítica aumenta con el daño hepático. El aumento de esta junto con la pérdida de hepatocitos 2c también ha sido descrito en afecciones hepáticas como EHNA [87], hepatitis B (VHB) o C (VHC) [88]. Además, el daño hepático y la regeneración también han sido asociados con un aumento del tamaño celular y nuclear [103], indicativo de una mayor ploidía en hepatocitos [258]. La falta de *Irs2* incrementa la pérdida de hepatocitos de menores ploidías, resultando en un aumento de la poliploidía más elevado que en los controles, pudiendo ser indicativo de un daño más exacerbado en esta población.

El estudio de la población 2c ha demostrado que los animales *WT* son capaces de recuperar parte de la población hepática 2c. Esta recuperación es una indicación de la capacidad de adaptación y respuesta al daño durante la continua ingesta de dieta DDC, que se produce a la vez que una reducción en los niveles de enzimas de daño hepático (AST/ALT). Presumiblemente, estos hepatocitos podrían provenir de CPHs con capacidad de diferenciación a hepatocitos pequeños [116], aunque serían necesarias más evidencias para llegar a esta afirmación. De cualquier modo, la falta de recuperación de esta población en los animales *Irs2*^{-/-} indica un fallo en la capacidad de adaptación y respuesta al daño crónico hepático causado por la dieta DDC.

Cabe destacar que la falta de *Irs2* induce una mayor poliploidía en los hígados de los animales sin tratamiento. En la literatura también se pueden encontrar estudios donde patologías íntimamente ligadas con la resistencia a insulina como es la HGNA, también aumentan el contenido 16c hepatocítico [87]. Este aumento podría deberse a que IRS2 ejerza un papel durante los procesos que dan lugar a la poliploidización hepática que ocurre durante el desarrollo, o también a que estos animales estén expuestos a un daño hepatocítico subyacente debido a la falta de *Irs2*.

El proceso regenerativo en el que intervienen CPHs conlleva una remodelación tisular y la participación de multitud de tipos celulares no parenquimales [95]. El estudio de la población de CNPs muestra la inducción de estas poblaciones celulares con el tratamiento DDC. La falta de *Irs2* reduce la aparición de este tipo celular tras 14 días de daño hepático, consecuente con la observada disminución de diferentes marcadores asociados a CPHs y a CEHs en este modelo animal. Por lo que la falta de generación de hepatocitos 2c en los animales *Irs2*^{-/-} podría deberse a una menor inducción de CPHs y/o a la pérdida de CEHs. Las causas de la reducción de CPHs en los animales *Irs2*^{-/-} podrían ser diversas. Una de ellas sería la incapacidad de formación de estructuras ductulares donde las CPHs residen, proliferan y se expanden como resultado de una respuesta adaptativa al daño [112]. El daño generado por esta dieta induce una

remodelación hepática y una respuesta ductular, también descrita en patologías de daño crónico como la colestasis, hepatitis alcohólica, EHNA, HBV y HCV [123, 228–231]. La reacción ductular que se produce durante la administración de la dieta DDC consiste en la expansión de estructuras ductulares positivas para el marcador CK19, que contienen colangiocitos encargados de eliminar el flujo biliar, y CPHs que pueden dar lugar tanto a hepatocitos como a colangiocitos [121]. Esta hipótesis no parece la más acertada debido a la observación de estructuras CK19 positivas alrededor de las zonas portales en ambos grupos de animales, indicativo de que los animales *Irs2*^{-/-} pueden promover la formación de ductos donde las CPHs se localizan.

Otra hipótesis sería la de que *Irs2* fuese necesaria para la inducción de esta población. Aunque existe controversia sobre el origen de CPHs, ha sido demostrado que estas pueden provenir de hepatocitos maduros que sufren un proceso de metaplasia, pudiendo así desdiferenciarse a un estado más progenitor y volver a diferenciarse tanto en hepatocitos como en colangiocitos [116, 259]. El hecho de no observarse una inducción en la proliferación no parenquimal, pero sí un aumento de CNPs tras 14 días de tratamiento DDC, podría indicar que estas poblaciones provienen de otras células en lugar de provenir de la proliferación de células residentes hepáticas. Aunque también cabe la posibilidad de que la proliferación sea inducida en etapas más tempranas de las estudiadas. Sin embargo, tras 21 días de tratamiento DDC la proliferación de CNPs se induce, sugiriendo que esta población podría ser no inducida por la proliferación, pero si mantenida en etapas tardías de daño crónico.

Algunos autores defienden que la plasticidad fenotípica de los hepatocitos al desdiferenciarse en CPHs podría ser un mecanismo de evasión del daño ante eventos hepatotóxicos [116]. Por tanto, cabe la posibilidad de que la menor inducción de CPHs observada en los animales *Irs2*^{-/-} pueda deberse a una menor capacidad de metaplasia hepática. Además, también es posible que las diferencias en la poliploidía hepática descritas en el estado basal ante la falta de *Irs2*, pudieran afectar al proceso

de metaplasia. Sin embargo, mediante el uso de un modelo murino que posee predominantemente hepatocitos diploides ($E2f7^{-/-} E2f8^{-/-}$), ha sido descrito que el enriquecimiento de hepatocitos 2c no genera cambios histológicos aparentes ni muestra diferencias en la medida de enzimas de daño hepático en suero durante la administración de la dieta DDC [260]. Por lo que al menos parece poco probable que el aumento observado en las enzimas de daño hepático en los animales $Irs2^{-/-}$ se deba a cambios en la ploidía hepática intrínseca. En cualquier caso, esta hipótesis no ha sido testada, siendo una posible cuestión por resolver si la falta de $Irs2$ pudiera afectar a la metaplasia hepática.

Mediante la manipulación *in vitro* de la línea progenitora de origen humano, HepaRG, se ha demostrado que IRS2 es capaz de regular la expresión de SPP1, sin que el aporte de insulina al medio suponga cambios significativos. Esto podría deberse a que la inducción de SPP1 responda ante la señalización de IGF-1 o a que el suero que contiene el medio sin aporte extra de insulina, sea suficiente para inducir la señalización de esta. SPP1 ha sido relacionada con la promoción de la respuesta progenitora hepática, generando su neutralización una disminución del número de células progenitoras y fibróticas y una reducción en la reepitelización hepática [261]. La menor expresión de $Spp1$ en los animales $Irs2^{-/-}$, junto con la observada menor proliferación de esta población, podría ser una de las causas de la reducción de marcadores de CPHs ante la falta de señalización a través de IRS2. Por tanto, IRS2 parece tener un papel inductor en la expansión y proliferación de CPHs, eventos que han sido demostrados determinantes para la supervivencia de ratones durante la administración de la dieta DDC [130].

La comunicación entre el estroma y CPHs es clave para la resolución del daño hepático, en el que factores pro-regenerativos como citoquinas y factores de crecimiento son liberados por las células estromales generando un microambiente promotor de la reparación y epitelización hepática [95]. La expansión de células progenitoras ha sido asociada en diferentes estudios con un aumento de la respuesta fibrótica [108],

probablemente debido a que estas se disponen alrededor de un nicho fibrótico y de células inflamatorias [58]. Incluso se ha llegado a demostrar que la activación de células productoras de matriz extracelular, como son las CEHs, es un evento que precede a la proliferación de CPHs, generando un nicho que favorecería su expansión [128]. La señalización de IGF-1 a través de IRS2 ha sido recientemente vinculada con la promoción de la activación fibrótica, donde mediante el uso del modelo *Irs2*^{-/-} y bajo la inducción de colestasis mediante ligación de ductos biliares, se ha demostrado un retraso en la activación fibrótica [262]. Por lo que el retraso en la inducción de CPHs observada en el modelo *Irs2*^{-/-} tratado con DDC podría estar relacionada con una incapacidad de una correcta formación del nicho progenitor fibrótico. En concreto, los factores de crecimiento fibroblásticos han sido relacionados con la promoción de la respuesta regenerativa hepática [210]. Específicamente, el modelo murino carente de *Fgf7* (*Fgf7*^{-/-}) muestra una falta de inducción de CPHs, afectando negativamente a la respuesta al daño durante la dieta DDC y reduciendo la supervivencia de los animales, demostrándose también una reducción en los niveles de daño hepático bajo el tratamiento exógeno de FGF7 [130], demostrando así un papel positivo de FGF7 en la respuesta al daño crónico hepático.

En consonancia con la localización de FGF7 descrita en torno a CPHs [130], los ensayos de inmunofluorescencia realizados en este proyecto muestran a FGF7 alrededor de ductos y en contacto directo con células que expresan marcadores como EPCAM y SPP1. Esta disposición es indicativa de una señalización paracrina intercelular entre ambos tipos de células, formando así FGF7 parte del nicho regenerativo. El receptor de FGF7, FGFR2-IIIb, se encuentra altamente expresado en CPHs [130] y es inducido durante el tratamiento con DDC [233] así como al sobreexpresar FGF7 [130]. En el modelo *Irs2*^{-/-} se produce un fallo en la inducción de *Fgf7* y en la capacidad de mantener la expresión de *Fgfr2-IIIb* durante el daño hepático crónico, produciéndose una reducción en la expresión de este receptor en células próximas a las que expresan FGF7 en el nicho progenitor. Además, cabe mencionar que FGF10, también ligando de FGFR2-IIIb, ha sido

relacionado con la expansión de CPHs [263] y su inducción se encuentra alterada durante el daño crónico hepático en los animales *Irs2*^{-/-} y en cocultivos de células LX2/HepaRG al silenciar *IRS2* [242]. Estos datos indican un fallo en la comunicación estroma-epitelio entre CPHs y fibroblastos, indicando que la señalización a través de *IRS2* no afecta exclusivamente a *FGF7-FGFR2-IIIb*, sino que además puede afectar a otros ligandos de este receptor.

Ha sido demostrado que la falta de *FGFR2-IIIb* impide la repoblación de hepatocitos durante la regeneración hepática [208]. Esto sugiere que la falta de señalización a través de *FGF7-FGFR2-IIIb* durante el daño hepático crónico podría repercutir en la mayor pérdida de hepatocitos observada en el modelo *Irs2*^{-/-} y la ausencia de inducción de la población 2c. Esta no es la primera evidencia que relaciona la resistencia a insulina con una incapacidad de reepitelización, ya que previamente ha sido vinculada con una deficiencia en la reepitelización de heridas cutáneas [264]. Además, el modelo de ratón diabético deficiente en *leptina (db/db)* reduce la inducción de *Fgf7* durante la reepitelización de la piel [265], cuyo silenciamiento ha sido demostrado que retrasa la reepitelización en este mismo modelo [205]. Teniendo en cuenta todas estas evidencias, es probable que la inducción terapéutica de *FGF7* junto con una promoción de la sensibilidad a insulina hepática pueda mejorar la reparación epitelial en sujetos con resistencia a insulina.

La falta de inducción de *Fgf7* en el modelo *Irs2*^{-/-} podría ser debida a una falta de activación o pérdida de alguna de las poblaciones celulares productoras de este factor paracrino. Ha sido descrito que *Fgf7* es expresado por CEHs en su estado activado [209] y por FPs [101]. Las CEHs expresan tanto proteínas profibróticas como citoquinas pro-regenerativas en su estado activado. Sin embargo, un estudio reciente en el que se realizó un análisis de expresión génica a partir de CEH individuales, ha demostrado que durante los procesos regenerativos, estas pueden presentar cambios transcripcionales que las posicionan en dos estados de activación diferentes, el profibrótico y el pro-regenerativo, expresando α -SMA y colágenos o bien citoquinas y factores de crecimiento respectivamente [97]. Según los

ensayos *in vitro* realizados con líneas de CEH humanas, la inactivación mitótica mediante el tratamiento con MitoC promueve la expresión de FGF7 y reduce la de α -SMA, junto con el arresto del ciclo celular. En consonancia con esto, la expresión de *Fgf7* también ha sido descrita en fibroblastos de la piel con un fenotipo senescente [266], por lo que es probable que la expresión de este marcador sea inducida durante la reversión fibrótica donde CEHs entran en senescencia, apoptosis o inactivación. Esta inactivación mitótica ha demostrado que la expresión de IRS2 es necesaria para la supervivencia de CEHs, en un estado en el que la expresión de FGF7 se encuentra aumentado. Otro hecho que apoya el papel de IRS2 en la supervivencia de CEHs es el tratamiento con NT-157, inhibidor alostérico de las proteínas IRS1/2 [239], que induce la apoptosis de la línea primaria de origen humano de CEHs. La pérdida de CEHs también se observa en el modelo animal *Irs2*^{-/-}, donde se produce un descenso del marcador de CEHs GFAP. Otros estudios han confirmado que la señalización a través de IGF-1 es importante para la supervivencia de la población de CEHs activadas [267]. De modo que estos resultados muestran una regulación de la supervivencia de esta población bajo la expresión de IRS2.

En el modelo *Irs2*^{-/-} durante el daño crónico DDC, la reducción de CEHs no sólo se observa por el espacio parenquimal, sino también en las estructuras ductulares, donde ya ha sido descrita su localización y su contacto directo con CPHs [268]. Es posible que estas interacciones sean importantes para el mantenimiento de la arquitectura ductular, pudiendo ser la causa de la observada alteración de la morfología ductular en los animales *Irs2*^{-/-}. Además, hay autores que afirman la posibilidad de que la localización ductular de las CEHs se deba a una promoción directa del proceso de diferenciación [118]. Por tanto, la pérdida de contacto entre CEHs y CPHs ante la falta de *Irs2* podría afectar negativamente a la proliferación y diferenciación de CPHs durante el daño crónico hepático.

Así pues, la falta de inducción de *Fgf7* en el modelo *Irs2*^{-/-} podría deberse a una reducción de las poblaciones celulares productoras de este factor, siendo una de ellas las CEHs. Sin embargo, las células THY1

positivas también han sido descritas como productoras de *Fgf7*, localizándose alrededor de los ductos en proximidad con las CPHs [101]. En este estudio se ha observado un mayor índice de células THY1 positivas en los animales *Irs2*^{-/-}, encontrándose en estrecho contacto con las células SPP1 y EPCAM positivas. Esta observación y su inducción podrían deberse a un mecanismo compensatorio ante la falta de CEHs productoras de FGF7 en este modelo. Sin embargo, la inducción de células THY1 positivas no es capaz de compensar los niveles de *Fgf7* observados en los animales control. Esto podría deberse a que la expresión de *Fgf7* en células THY1 positivas es diferencial dependiendo de su origen. Las células THY1 positivas pueden provenir de células residentes hepáticas o de fibrocitos de origen hematopoyético, cuya expresión de *Fgf7* es menor [101]. La observada mayor colocalización de THY1 y CD45 (marcador hematopoyético) junto con el aumento de células positivas para el marcador linfocítico CD3, indican una mayor infiltración de células provenientes de la médula en el nicho estromal de los animales *Irs2*^{-/-} durante el daño crónico con dieta DDC. Es posible que esta mayor infiltración se deba a un mecanismo compensatorio ante la falta de inducción de *Fgf7* por las células residentes hepáticas. Previamente ya ha sido descrito como los fibrocitos de los pacientes con diabetes tipo 2 poseen capacidades migratorias, metabólicas y funcionales alteradas, lo que podría contribuir a mostrar alteraciones en la expresión de diferentes marcadores importantes para la reepitelización hepática [269].

A pesar de que la población THY1 positiva se encuentra aumentada en el modelo *Irs2*^{-/-}, la inducción de *Fgf7* no se produce en igual medida que en los controles. Además, la delección de *Spp1* ha sido previamente relacionada con la movilización hasta el hígado de células hematopoyéticas favoreciendo un microambiente proinflamatorio [270]. Por lo que la reducción de *Spp1* descrita en el modelo *Irs2*^{-/-} podría ser también un desencadenante de la mayor representación de células linfocíticas en el hígado de estos animales. Además, cabe destacar que SPP1 puede encontrarse secretada actuando como factor paracrino y de forma intracelular en modelos murinos [271]. Se ha demostrado que la SPP1 intracelular es la encargada de reducir

los niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF α o IL6, atribuyendo a esta un papel reductor de la inflamación [272]. Los ensayos de inmunofluorescencia de este estudio muestran diferencias en el patrón de dispersión de SPP1, siendo más granular en los controles y difusa ante la falta de *Irs2*. Esta diferencia podría deberse a un cambio en la secreción de esta proteína, pudiendo repercutir en la comunicación paracrina con otras células y en la promoción de la movilización de células derivadas de la médula ósea, pudiendo favorecer así un microambiente proinflamatorio. Además, un estudio demuestra que la falta de *Spp1* promueve la proliferación de hepatocitos de carácter maligno, ejerciendo un papel protumorigénico en el hígado [272]. Estos datos muestran que la falta de *Irs2* puede ser un desencadenante de la movilización de células de la médula hasta el hígado, pudiendo relacionarse con la reducción en la expresión de *Spp1* o con cambios en su secreción.

Finalmente, las CEHs activadas tienen la capacidad de llevar a cabo un proceso de resolución o reversión fibrótica tras el daño hepático, en el que mueren mediante apoptosis o senescencia, o pasan a un estado de inactivación en el que reducen la expresión de genes fibrogénicos [98]. La inactivación mitótica mediante el uso de MitoC en cultivos LX-2 reduce la expresión de α -SMA, indicando un menor estado de activación. Sin embargo, el silenciamiento de *IRS2* en estos cultivos muestra una menor capacidad de reducir la expresión de esta proteína, pudiendo sugerir una menor capacidad de reversión ante la falta de *IRS2* y pudiendo contribuir por tanto a la fibrosis hepática.

En conjunto estos resultados demuestran un papel de *IRS2* durante el daño crónico hepático, afectando tanto a células progenitoras como estromales que forman parte del nicho progenitor, siendo necesaria para la adaptación y respuesta durante el daño crónico hepático. Los datos generados durante este estudio apoyan la hipótesis de que la resistencia a insulina/IGF-1 reduce la capacidad de respuesta al daño pudiendo promover la progresión de afecciones crónicas hepáticas.

5.2 El papel de IRS2 durante el avance tumoral hepático.

La resistencia a insulina está relacionada no sólo con el daño crónico que da lugar a la cirrosis, sino que también está vinculada a una mayor incidencia de HCC [61, 62], sugiriendo un papel de la señalización de insulina en ambos procesos. Sin embargo se desconocen las consecuencias que la resistencia a insulina podría ejercer durante el avance tumoral.

Es en estos contextos de daño crónico donde se observa una mayor incidencia de cáncer hepático, documentándose alrededor del 80% de HCC desarrollados en hígados cirróticos y un 20% en hígados expuestos a daño crónico con HGNA sin haber desarrollado cirrosis [67]. También existe una estrecha relación entre la remodelación tisular que se produce durante el daño hepático crónico y las características del ambiente tumoral, llegando a definirse el cáncer como un proceso de reepitelización (*wound healing*) desmesurado y descontrolado [138]. En este contexto las funciones que ejerce IRS2 durante la respuesta al daño crónico hepático podrían también ser relevantes en la progresión del HCC.

Los resultados alcanzados durante el desarrollo de este estudio muestran como la pérdida de IRS2 durante el avance tumoral estaría asociada al desarrollo de un tipo de tumor con un carácter más progenitor, con menor grado de diferenciación y más migratorio e invasivo. Mientras que la sobreexpresión de esta proteína reduciría la capacidad migratoria tumoral y promovería la epitelización de diferentes líneas de hepatoma y HB promoviendo un proceso MET.

En primer lugar, el análisis de expresión de *IRS2* en muestras hepáticas de origen humano ha revelado un comportamiento muy heterogéneo incluso entre muestras del mismo grupo de estudio. Este resultado es una evidencia más del dinamismo de *IRS2* en el hígado, pues su expresión es reducida a nivel transcripcional por la insulina [273], mientras que se induce en el periodo de ayunas [252]. De modo que estas variaciones podrían deberse a diferentes situaciones metabólicas en el momento de

recogida de las muestras. A pesar de que en la literatura se pueden encontrar estudios en los que se relaciona una mayor expresión de *IRS2* con muestras preneoplásicas en etapas tempranas de HCC [180, 181], este análisis no muestra un incremento de *IRS2* en muestras de HCC en comparación con hígados sanos. Esto podría deberse a diversos factores, como que la mayor expresión de *IRS2* se dé lugar en estados más tempranos que los representados por estas muestras, o que el número de muestras analizadas es reducido y no es suficiente para poder llegar a una conclusión certera. Además, las muestras de HCC temprano muestran una gran variabilidad de expresión de *IRS2*, quizá debido a la asociada heterogeneidad intra y extra-tumoral con la que el HCC se caracteriza [274].

En cualquier caso, y a pesar de la heterogeneidad en la expresión de *IRS2*, es evidente la pérdida de expresión en muestras de HCC en estado avanzado, sugiriendo un posible papel protector de *IRS2* ante el avance tumoral. Generalmente las proteínas IRSs han sido relacionadas con un papel promotor de HCC [180, 184–186, 240] y del cáncer en general [165–169, 172–174, 182, 275], debido a que participan en la activación de diferentes vías de señalización vinculadas con procesos oncogénicos como PI3K/AKT/mTOR y RAS/MAPK [163, 164]. Por otra parte, también promueven la señalización de insulina, cuya resistencia ha sido vinculada al cáncer [68]. Además existen otros estudios que relacionan las IRSs con menores capacidades tumorales [170, 176–179], vinculando en muchos de ellos su expresión con un buen grado de diferenciación tumoral [165, 171, 175, 176]. Por lo que el papel de las proteínas IRSs en cáncer es difícil de concretar y algunos autores sugieren que esta controversia podría deberse a que su implicación en cáncer puede ser dependiente de tejido, del origen oncogénico o de factores ambientales [276]. A pesar de ello, en la literatura también se pueden encontrar otros estudios en los que a través del análisis transcriptómico de muestras humanas de HCC, se observa una reducción de *IRS2* [183], apoyando los resultados obtenidos en este proyecto. El avance tumoral generalmente está vinculado con mayores habilidades migratorias e invasivas, con cambios morfológicos debidos a la reorganización del

citoesqueleto de actina y con cambios en proteínas de adhesión típicos de una EMT entre otros eventos [245], por lo que la pérdida de *IRS2* podría tener implicaciones en ellos.

Apoyando esta hipótesis, el estudio de la línea celular de HB Huh6 mostró una relación entre la expresión de *IRS2* y un menor índice migratorio. En primer lugar, el silenciamiento de *IRS2* resultó en una promoción tanto de la migración como de la invasión celular *in vitro*. Además, la observación de colonias de mayor tamaño mediante el ensayo de clonogénesis, no solo ante la falta de *IRS2* mediante su silenciamiento, sino también a través de una menor expresión endógena de este, sugiere que *IRS2* pueda ejercer un papel en el control de la dispersión y supervivencia celular. Aunque no se han observado diferencias en la capacidad proliferativa bajo condiciones estándar de estos cultivos, cabe la posibilidad de que bajo las circunstancias de este ensayo sí que se promueva la proliferación y por tanto el mayor tamaño de colonias observado se deba a ello. Sin embargo, una promoción de la migración celular también podría incrementar la dispersión de células y la formación de colonias de mayor tamaño. De hecho, en estas colonias mayores se observaban células en la periferia con una alta expresión de la proteína vimentina, proteína vinculada con la migración celular [277]. Estos resultados indican que el silenciamiento de *IRS2* en la línea de HB Huh6 podría estar implicado en la promoción de las habilidades migratorias e invasivas.

Por otra parte, la experimentación *in vivo* mediante el ensayo de migración bazo-hígado resultó en un aumento no significativo del número de tumores intrahepáticos generados bajo el silenciamiento de *IRS2* en Huh6. De forma complementaria, la sobreexpresión de *IRS2* en Huh6 resultó en un menor número de estos, indicando una reducción en la capacidad migratoria celular. Además, se observó una pérdida de expresión de *IRS2* entre las células cultivadas *in vitro* y los tumores intrahepáticos formados a partir de estas, tanto en los experimentos realizados con el modelo de sobreexpresión como en el de silenciamiento, sugiriendo una reducción de expresión de *IRS2* en el proceso migratorio. Aunque no se puede descartar que la

variación de la expresión se deba a cambios a consecuencia del microambiente en el que se encuentran las células. Todos estos resultados indican que la expresión de IRS2 podría frenar la migración de células de HB.

Los cambios en la morfología de las células Huh6 bajo el silenciamiento de IRS2 apoyan este fenotipo promigratorio. La observación de estructuras filopódicas indican cambios en la reorganización del citoesqueleto de actina y han sido vinculadas con la promoción de las capacidades migratorias e invasivas celulares [161].

Por otra parte, el proceso EMT en el que células con fenotipo polarizado y epitelial pasan a un estado más propiamente mesenquimal, con mayores capacidades móviles e invasivas, es característico del avance tumoral [245]. Durante este proceso se produce un cambio de cadherinas en el que se reducen aquellas de fenotipo epitelial, como E-cadherina, responsable de las uniones entre células epiteliales y de estas con la membrana basal. También suele aumentar la expresión de marcadores mesenquimales asociados a la migración e invasión celular como la proteína de adhesión N-cadherina o el filamento intermedio vimentina [278]. El estudio de proteínas de adhesión bajo el silenciamiento de IRS2 *in vitro* refleja cambios característicos de una EMT en la línea HepaRG, disminuyendo E-cadherina y aumentando N-cadherina. Sin embargo, en la línea Huh6 no se observa este cambio de cadherinas, pero sí un aumento en la expresión de N-cadherina. Mientras que en la línea epitelial Hep3B no se aprecian cambios inductores de un proceso EMT. Estos resultados indican que el silenciamiento de IRS2 puede generar cambios promotores de un fenotipo mesenquimal pero no es suficiente para inducir una EMT. Sin embargo, el silenciamiento de IRS2 reduce drásticamente la capacidad de epitelización de tumores intrahepáticos, disminuyendo la capacidad de expresión de *E-cadherina* y de *FGFR2-IIIb*. Además, la sobreexpresión de IRS2 sí que genera este cambio de cadherinas en las diferentes líneas celulares estudiadas *in vitro*. Estos resultados sugieren que la expresión de IRS2 es capaz de promover un proceso MET, por lo que su pérdida durante el avance

tumoral podría impedir la epitelización celular. Estos datos son consistentes con la observación de que los tumores clasificados en la categoría S1, con carácter más progenitor y menos diferenciado, sean los que tengan una menor expresión de IRS2. En la literatura también se pueden encontrar otros estudios que apoyan estos hallazgos, como por ejemplo en células epiteliales del útero se ha relacionado una menor señalización a través de las vías PI3K/AKT y MAP/ERK con el incremento de la expresión de vimentina [279]. También ha sido documentado que el silenciamiento de IRS2 conlleva la pérdida de E-cadherina e incremento en la expresión de vimentina en muestras de cáncer de colon de pacientes con diabetes tipo 2 [280]. Estos cambios proteicos han sido asociados a un carácter de HCC más agresivo [281], en los que incluso la delección de E-cadherina específica de hígado ha demostrado ser promotora del crecimiento de HCCs inducidos por DEN [246], asociándose la pérdida de E-cadherina con un peor pronóstico en muestras humanas de HCC [246, 282].

Los xenoinjertos generados a partir del silenciamiento de IRS2 en la línea Hep3B, no sólo reducen la expresión de *FGFR2-IIIb*, sino que también muestran un cambio en la organización celular. Se observa la formación de estructuras “ductulares”, vinculadas con la presencia de células de carácter progenitor [58] y a su vez, con la resistencia a insulina [58, 250], sugiriendo un fenotipo menos diferenciado y más propio de la categoría S1 (de perfil progenitor), provocado por el silenciamiento de IRS2.

Por otra parte, la expresión del receptor epitelial *FGFR2-IIIb* es un indicador de epitelización temprana, y su reducción ha sido directamente relacionada con un aumento de la proliferación e invasión de HCCs, dando lugar a un fenotipo más agresivo. De forma complementaria, su re-expresión en líneas celulares de HCC mitiga sus capacidades migratorias [221]. También ha sido relacionada su falta de expresión con la promoción tumoral en diferentes tipos de cáncer como próstata [211], adenocarcinomas salivares [212], melanomas [213, 214] y vejiga [215] entre otros. Durante el estudio del daño hepático, se ha observado que la falta de *Irs2* altera la señalización entre el factor mesenquimal pro-regenerativo *Fgf7* y su receptor

epitelial *Fgfr2-IIIb*, dando lugar a una menor expresión de este último durante el daño hepático crónico [242]. El silenciamiento de IRS2 en células Huh6 también ha mostrado una incapacidad de expresión de *FGFR2-IIIb* en tumores intrahepáticos, observándose también su reducción en xenoinjertos Hep3B bajo el silenciamiento de IRS2. Por otra parte, la sobreexpresión de IRS2 ha demostrado ser promotora de la expresión de este receptor en líneas de HB *in vitro*. Además, la línea Huh6 al ser de carácter mixto epitelial-mesenquimal [225], es capaz de expresar *FGF7* restringido a células de fenotipo mesenquimal, así como su receptor epitelial. La sobreexpresión de IRS2 dio lugar a un aumento no sólo del receptor, sino también del ligando, indicando un papel promotor de IRS2 en la ruta de señalización FGF7-FGFR2-IIIb. Este bucle de inducción también ha sido descrito en la línea HepaRG en el estudio llevado a cabo por nuestro grupo en el papel de IRS2 durante el daño hepático crónico [242]. Todos estos resultados indican que la expresión de IRS2 promueve la del receptor epitelial FGFR2-IIIb, mostrando un incremento en la epitelización a través de la señalización IRS2-FGFR2-IIIb. Además, su vinculación con unas menores capacidades migratorias y la observación de la relación IRS2 y menor migración, indican que la señalización a través de IRS2-FGFR2-IIIb podría ser una posible vía implicada en la contención y reducción de la migración celular. Estos hallazgos sugieren que esta vía podría ser una buena candidata para su activación terapéutica en casos de HCC, pudiendo dar lugar a la restricción del avance tumoral, aunque serían necesarios más experimentos para poder llegar a concluirlo.

El estudio de la implicación del silenciamiento de IRS2 en la proliferación celular *in vitro* no mostró cambios notables, sugiriendo la posibilidad de que la pérdida de IRS2 durante el avance tumoral no afecte directamente a la proliferación. En la literatura también se puede encontrar otro estudio que apoya estos resultados, habiéndose demostrado que la delección de IRS2 específica de hígado de ratón no generaba cambios en el crecimiento de HCCs inducidos con el compuesto DEN [186]. Sin embargo, el tamaño de los tumores intrahepáticos formados a partir de la migración

esplénica de células Huh6 silenciando IRS2 resultó mayor. Además, el silenciamiento de IRS2 en la línea Hep3B, a pesar de no promover la proliferación *in vitro*, dio lugar a xenoinjertos mayores. Es posible que estos cambios de comportamiento *in vitro-in vivo* puedan deberse a una promoción de la proliferación y/o crecimiento celular por medio de la interacción con otros tipos celulares *in vivo*. Otra posibilidad tendría que ver con una mayor supervivencia celular. Los menores niveles de expresión del gen supresor de tumores *p53* y del área tumoral necrótica observada en los tumores intrahepáticos Huh6 bajo el silenciamiento de IRS2, podrían indicar una mayor capacidad de supervivencia celular. Además, en consonancia con el papel de IRS2 descrito en este proyecto, la menor expresión de *p53* en HCC ha sido relacionada con un menor grado de diferenciación y mayor progresión tumoral [244]. Aunque cabe destacar que estas diferencias también podrían estar relacionadas con otros eventos, como una mayor irrigación sanguínea en los tumores silenciados. Según estos resultados, es posible que la reducción en la expresión de IRS2 *in vivo* influya en el tamaño tumoral. En cualquier caso, para poder determinar si el silenciamiento de IRS2 promueve el crecimiento tumoral por medio de la proliferación y/o supervivencia celular serían necesarios experimentos complementarios.

Hay que destacar que estos resultados no descartan la posibilidad de que las proteínas IRSs induzcan la formación de HCCs. Sin embargo, a pesar del papel controvertido que muestran las IRSs en cáncer, los resultados expuestos muestran que la pérdida de expresión de IRS2 durante el avance de la hepatocarcinogénesis puede ser un evento protumoral. La reducida expresión de IRS2 podría dar lugar a cambios celulares inductores de una mayor migración y una reducción en la epitelización celular, promoviendo así el carácter maligno tumoral y su progresión. Estos resultados apoyan el paradigma actual de las terapias anti-IGF-1R, en las cuales a pesar de haber invertido grandes esfuerzos y haber llegado a realizarse numerosos ensayos clínicos testados hasta en fase III, no se han obtenido resultados lo suficientemente exitosos [194]. El fallo de estas terapias junto con los resultados expuestos en este proyecto, podrían indicar

un papel positivo en la señalización de IRS2 a través de IGF-1R, resultando su inhibición en un evento promotor del avance tumoral. Otros autores también han planteado esta posibilidad, indicando un posible papel positivo de las proteínas IRSs en cáncer y atribuyendo la falta de ineficacia de las terapias anti-IGF-1R a este hecho [178].

Asimismo, el fármaco metformina, cuya capacidad de mejorar el metabolismo de la glucosa e inhibir la gluconeogénesis hepática hace que sea apropiado para tratar a pacientes diabéticos tipo 2 [283], ha sido asociado con un menor riesgo de desarrollo de cáncer, y en concreto de HCC en pacientes con diabetes tipo 2 [284]. Esta es procesada en su mayoría por el hígado, donde a través del tratamiento de un modelo murino de resistencia a insulina con EHNA y cirrosis con metformina, ha sido descrito que promueve la expresión de IRS2 hepática [285]. Además, el tratamiento de líneas celulares de HCC con este compuesto ha resultado en una reducción de la migración celular, invasión y el proceso EMT, eventos que además se veían potenciados bajo la restricción de glucosa [286]. Esta relación entre el uso de la metformina, la promoción de la expresión hepática de *IRS2* y la reducción de la capacidad migratoria celular, son un indicativo más del posible papel protector de IRS2 inductor de MET durante el avance tumoral hepático.

5.3 IRS2 como factor clave en procesos de reparación y cáncer hepático

En resumen, este proyecto describe cómo una falta de señalización a través de IRS2 tendría consecuencias negativas durante la adaptación y reparación del daño crónico hepático (Figura 55) y el avance tumoral (Figura 56), resultantes en una menor capacidad de epitelización hepática.

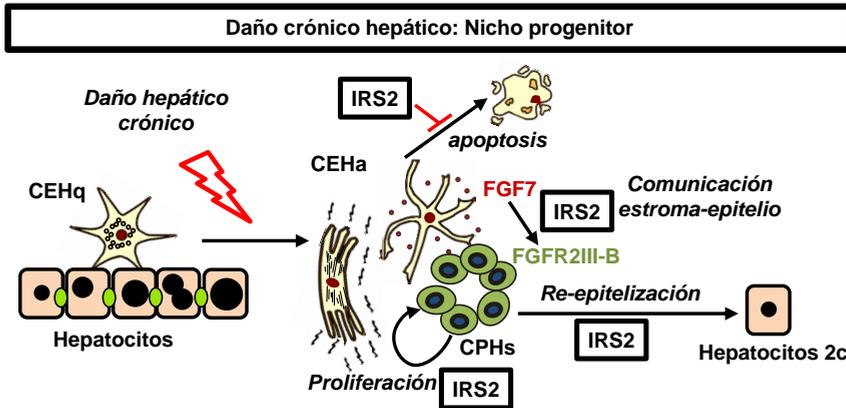


Figura 55. Modelo esquemático representativo del papel de *Irs2* en el nicho progenitor durante el daño hepático crónico. Representación del papel positivo de *Irs2* en la promoción de la proliferación de CPHs, en la comunicación estromal-epitelial entre CEHs productoras de FGF7 y CPHs que expresarían su receptor FGFR-2IIIb, en la promoción de la re-epitelización de hepatocitos 2c provenientes de CPHs y en la represión de la apoptosis de CEHs productoras de Fgf7. *Irs2*, substrato receptor de insulina 2; CEHq, célula estrellada hepática quiescente; CEHa, célula estrellada hepática activada; CPH, célula progenitora hepática; FGF7, factor de crecimiento fibroblástico 7; FGFR2-IIIb, receptor 2-IIIb del factor de crecimiento fibroblástico; 2c, 2 copias genéticas.

Los resultados expuestos prueban que defectos en la señalización de insulina pueden dar lugar a una disfunción de la comunicación entre células estromales y progenitoras a nivel local en el nicho progenitor mediante la regulación de la señalización FGF7-FGFR2-IIIb a través de *Irs2*. *Irs2* promueve la supervivencia de CEHs productoras de FGF7, promotor de la expansión de CPHs en el nicho progenitor [130]. Mientras que en CPHs y en HCC, *Irs2* promueve procesos MET y la adquisición de sensibilidad a FGF7, a través de una mayor expresión de *FGFR2-IIIb*. En consecuencia, la falta de *Irs2* durante el daño crónico afecta a la habilidad de producir nuevas células epiteliales (hepatocitos 2c), disminuyendo la capacidad de reepitelización hepática (Figura 55). Esto sugiere que la resistencia a insulina, que posee cada vez una mayor tasa de incidencia en los países en desarrollo [48] y que está íntimamente asociada con las enfermedades hepáticas [38, 53], impediría una correcta reparación del daño hepático crónico. La expresión de *Irs2* además de promover MET, reduce las capacidades metastásicas relacionándose con HCCs más diferenciados y de carácter menos avanzado (perfil molecular S3). Estos resultados

sugieren que una mayor señalización a través de IRS2 durante la hepatocarcinogénesis podría limitar procesos metastásicos promoviendo el estado de diferenciación epitelial tumoral (Figura 56).

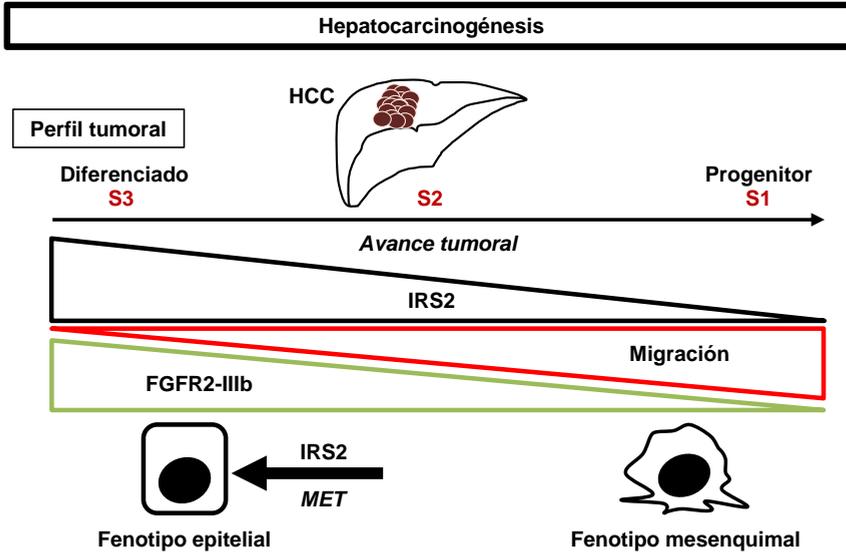


Figura 56. Modelo esquemático representativo del papel de IRS2 en hepatocarcinogénesis. Representación de la pérdida de expresión de IRS2 asociada con un perfil tumoral más avanzado y de carácter progenitor (S1), con una mayor migración celular y con una menor expresión del marcador epitelial FGFR2-IIIb dando lugar a un fenotipo mesenquimal. Complementariamente, se ilustra cómo la sobreexpresión de IRS2 promovería una menor migración celular, mayor expresión de FGFR2-IIIb y se asociaría con un perfil tumoral de carácter diferenciado (S3). IRS2, substrato receptor de insulina 2; FGFR2-IIIb, receptor 2-IIIb del factor de crecimiento fibroblástico; HCC, hepatocarcinoma; MET, transición epitelio-mesenquimal.

La señalización FGF y el emergente campo de las terapias FGF muestran especial relevancia en el campo de la diabetes y las enfermedades metabólicas hepáticas [287] así como en HCC [288]. Los resultados expuestos suponen un precedente para el estudio de cómo la señalización sistémica de insulina, actúa localmente a través de IRS2 coordinando las señales pro-regenerativas entre el nicho y CPHs durante el daño hepático crónico promoviendo la reepitelización hepática (Figura 55) así como en HCC promoviendo la epitelización (Figura 56). Un estudio más en profundidad de esta señalización localizada podría ayudar a proponer terapias que ayuden a la reparación del daño hepático crónico en casos de resistencia a insulina, así como en el campo oncológico frenando el avance tumoral.

Conclusiones

1. La delección de *Irs2* reduce la capacidad de paliación del daño hepatocítico, resultando en una mayor pérdida de hepatocitos pequeños y en una menor capacidad de repoblación de hepatocitos 2c en etapas tardías del daño crónico con DDC.
2. La falta de *Irs2* genera un fallo en la comunicación estroma-epitelio impidiendo la inducción de *Fgf7* y produciéndose una reducción en la expresión de su receptor *Fgfr2-IIIb* en células progenitoras durante el daño crónico hepático inducido con DDC. Por tanto, indicando una relación entre la señalización global de insulina/IGF-1 y la señalización local de FGF7 en el nicho progenitor.
3. IRS2 promueve la supervivencia *in vitro* de CEHs tras una inactivación mitótica, estado en el que la expresión de FGF7 se ve aumentada.
4. La falta de *Irs2* retarda la expansión de células progenitoras durante el daño crónico inducido con dieta DDC, reduciendo la capacidad de proliferación de células SPP1 positivas y alterando su patrón de distribución intracelular, sugiriendo cambios en su secreción. Además, *IRS2* actúa aguas arriba de *SPP1* promoviendo su expresión en la línea celular de carácter progenitor HepaRG.
5. La composición del estroma fibrótico que rodea a las CPHs durante el daño crónico hepático se ve alterado en el modelo murino *Irs2*^{-/-}. Este presenta una reducción de células GFAP positivas, pudiendo deberse a una menor supervivencia de CEHs, así como un aumento de células THY1, con un mayor índice de movilización desde la médula.

6. La expresión de *IRS2* se reduce en muestras humanas de HCC de carácter avanzado y en el proceso de migración e invasión intrahepático murino. Su silenciamiento genera un fenotipo más migratorio e invasivo mientras que su sobreexpresión reduce la migración e invasión intrahepática *in vivo*, indicando que la reducción en la expresión de *IRS2* durante el avance tumoral de HCCs podría resultar en un evento prometastásico.
7. *IRS2* promueve procesos MET en modelos humanos de hepatocarcinogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además la expresión de *IRS2* varía entre perfiles moleculares S3-S2-S1 de HCCs humanos, reduciéndose a medida que los tumores pasan desde un fenotipo diferenciado a un fenotipo con un perfil progenitor.
8. La expresión del receptor epitelial *FGFR2-IIIb*, vinculada con un perfil tumoral menos agresivo, es promovida por la expresión de *IRS2*. Además, la sobreexpresión de *IRS2* en la línea mixta epitelio-mesenquimal Huh6, también aumenta la expresión de su ligando *FGF7*, promoviendo un bucle de inducción en la señalización *FGF7-FGFR2-IIIb*.

Capítulo 7

Bibliografía

1. T.D. Farmer, E.C. Jenkins, T.P. O'Brien, G.A. McCoy, A.E. Havlik, E.R. Nass, W.E. Nicholson, R.L. Printz, and M. Shiota: "Comparison of the physiological relevance of systemic vs. portal insulin delivery to evaluate whole body glucose flux during an insulin clamp." *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* vol. 308, no. 3, pp. E206-22, 2015.
2. W.C. Duckworth, R.G. Bennett, and F.G. Hamel: "Insulin Degradation: Progress and Potential." *Endocr. Rev.* vol. 19, no. 5, pp. 608–624, 1998.
3. W.C. Duckworth and A.E. Kitabchi: "Insulin metabolism and degradation." *Endocr. Rev.* vol. 2, no. 2, pp. 210–233, 1981.
4. I.A. Leclercq, A. Da, S. Morais, B. Schroyen, N. Van Hul, A. Geerts, A. Da Silva Morais, B. Schroyen, N. Van Hul, and A. Geerts: "Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences." *J. Hepatol.* vol. 47, no. 1, pp. 142–156, 2007.
5. W.H. DAUGHADAY and P. ROTWEIN: "Insulin-Like Growth Factors I and II. Peptide, Messenger Ribonucleic Acid and Gene Structures, Serum, and Tissue Concentrations*." *Endocr. Rev.* vol. 10, no. 1, pp. 68–91, 1989.
6. L. Liu, S. Greenberg, S.M. Russell, and C.S. Nicoll: "Effects of insulin-like growth factors i and ii on growth and differentiation of transplanted rat embryos and fetal tissues." *Endocrinology.* vol. 124, no. 6, pp. 3077–3082, 1989.
7. M.L. Adamo, S. Neuenschwander, D. LeRoith, and C.T. Roberts: "Structure, Expression, and Regulation of the IGF-I Gene." Presented at the (1994).
8. M. Enguita-Germán and P. Fortes: "Targeting the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma," <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25349643>, (2014).
9. A. Adamek and A. Kasprzak: "Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases." *Int. J. Mol. Sci.* vol. 19, no. 5, 2018.
10. H. Werner, D. Weinstein, and I. Bentov: "Similarities and differences between insulin and IGF-I: Structures, receptors, and signalling pathways." *Arch. Physiol. Biochem.* vol. 114, no. 1, pp. 17–22, 2008.
11. A. KASPRZAK and A. ADAMEK: "The insulin-like growth factor (IGF)

- signaling axis and hepatitis C virus-associated carcinogenesis (Review)." *Int. J. Oncol.* vol. 41, no. 6, pp. 1919–1931, 2012.
12. F. Hakuno and S.-I. Takahashi: "40 YEARS OF IGF1: IGF1 receptor signaling pathways." *J. Mol. Endocrinol.* vol. 61, no. 1, pp. T69–T86, 2018.
 13. A. Belfiore, F. Frasca, G. Pandini, L. Sciacca, and R. Vigneri: "Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease." *Endocr. Rev.* vol. 30, no. 6, pp. 586–623, 2009.
 14. C.P. Moxham, V. Duronio, and S. Jacobs: "Insulin-like growth factor I receptor beta-subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor I and insulin receptor heterodimers." *J. Biol. Chem.* vol. 264, no. 22, pp. 13238–44, 1989.
 15. D. Accili, J. Drago, E.J. Lee, M.D. Johnson, M.H. Cool, P. Salvatore, L.D. Asico, P.A. José, S.I. Taylor, and H. Westphal: "Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene." *Nat. Genet.* vol. 12, no. 1, pp. 106–109, 1996.
 16. M.D.D. Michael, R.N. Kulkarni, C. Postic, S.F. Previs, G.I. Shulman, M.A. Magnuson, and C.R.R. Kahn: "Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction." *Mol. Cell.* vol. 6, no. 1, pp. 87–97, 2000.
 17. S. Yakar and M.L. Adamo: "Insulin-like growth factor 1 physiology: lessons from mouse models." *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* vol. 41, no. 2, pp. 231–47, v, 2012.
 18. K. Mardilovich, S.L. Pankratz, and L.M. Shaw: "Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer." *Cell Commun. Signal.* vol. 7, no. 1, pp. 14, 2009.
 19. M.G. Myers, T.C. Grammer, J. Brooks, E.M. Glasheen, L.M. Wang, X.J. Sun, J. Blenis, J.H. Pierce, and M.F. White: "The pleckstrin homology domain in insulin receptor substrate-1 sensitizes insulin signaling." *J. Biol. Chem.* vol. 270, no. 20, pp. 11715–8, 1995.
 20. D.J. Burks, S. Pons, H. Towery, J. Smith-Hall, M.G. Myers, L. Yenush, and M.F. White: "Heterologous pleckstrin homology domains do not couple IRS-1 to the insulin receptor." *J. Biol. Chem.* vol. 272, no. 44, pp. 27716–21, 1997.
 21. D. Sawka-Verhelle, S. Tartare-Deckert, M.F. White, and E. Van Obberghen: "Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786." *J. Biol. Chem.* vol. 271, no. 11, pp. 5980–5983, 1996.
 22. X.J. Sun, D.L. Crimmins, M.G. Myers, M. Miralpeix, and M.F. White: "Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1." *Mol. Cell. Biol.* vol. 13, no. 12, pp. 7418–7428, 1993.
 23. X.J. Sun, L.M. Wang, Y. Zhang, L. Yenush, M.G. Myers, E. Glasheen, W.S. Lane, J.H. Pierce, and M.F. White: "Role of IRS-2 in insulin and

- cytokine signalling." *Nature*. vol. 377, no. 6545, pp. 173–177, 1995.
24. J.R.Z. M. Björnholm, A. R. He, A. Attersand, S. Lake, S. C. H. Liu, G. E. Lienhard, S. Taylor, P. Arner: "Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans." *Diabetologia*. vol. 45, no. 12, pp. 1697–1702, 2002.
 25. E. Araki, M.A. Lipes, M.-E. Patti, J.C. Brüning, B. Haag III, R.S. Johnson, and C.R. Kahn: "Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene." *Nature*. vol. 372, no. 6502, pp. 186–190, 1994.
 26. K. Ueki, T. Yamauchi, H. Tamemoto, K. Tobe, R. Yamamoto-Honda, Y. Kaburagi, Y. Akanuma, Y. Yazaki, S. Aizawa, R. Nagai, and T. Kadowaki: "Restored insulin-sensitivity in IRS-1-deficient mice treated by adenovirus-mediated gene therapy." *J. Clin. Invest.* vol. 105, no. 10, pp. 1437–1445, 2000.
 27. D.J. Withers, J.S. Gutierrez, H. Towery, D.J. Burks, J.-M. Ren, S. Previs, Y. Zhang, D. Bernal, S. Pons, G.I. Shulman, S. Bonner-Weir, and M.F. White: "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice." *Nature*. vol. 391, no. 6670, pp. 900–904, 1998.
 28. L. Khamzina, P.A. Gruppuso, and J.R. Wands: "Insulin signaling through insulin receptor substrate 1 and 2 in normal liver development." *Gastroenterology*. vol. 125, no. 2, pp. 572–585, 2003.
 29. Y. Kido, D.J. Burks, D. Withers, J.C. Brüning, C.R. Kahn, M.F. White, and D. Accili: "Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2." *J. Clin. Invest.* vol. 105, no. 2, pp. 199–205, 2000.
 30. S.F. Previs, D.J. Withers, J.M. Ren, M.F. White, and G.I. Shulman: "Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo." *J. Biol. Chem.* vol. 275, no. 50, pp. 38990–4, 2000.
 31. K.I. Rother, Y. Imai, M. Caruso, F. Beguinot, P. Formisano, and D. Accili: "Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes." *J. Biol. Chem.* vol. 273, no. 28, pp. 17491–7, 1998.
 32. B. M., H. A., A. A., L. S., L. S., L. G., T. S., A. P., and Z. J.: "Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans." *Diabetologia*. vol. 45, no. 12, pp. 1697–1702, 2002.
 33. S.C. Liu, Q. Wang, G.E. Lienhard, and S.R. Keller: "Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis." *J. Biol. Chem.* vol. 274, no. 25, pp. 18093–9, 1999.
 34. V.R. Fantin, Q. Wang, G.E. Lienhard, and S.R. Keller: "Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis." *Am. J. Physiol. Metab.* vol. 278, no. 1, pp. E127–E133, 2000.
 35. M.C. Mendoza, E.E. Er, and J. Blenis: "The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation." *Trends Biochem. Sci.* vol. 36, no. 6, pp. 320–8, 2011.

36. J. Boucher, A. Kleinridders, and C.R. Kahn: "Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states." *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* vol. 6, no. 1, 2014.
37. D. Leroith, E.J. Scheinman, and K. Bitton-Worms: "The Role of Insulin and Insulin-like Growth Factors in the Increased Risk of Cancer in Diabetes." *Rambam Maimonides Med. J.* vol. 2, no. 2, pp. e0043, 2011.
38. L. Li and J.L. Messina: "Acute insulin resistance following injury." *Trends Endocrinol. Metab.* vol. 20, no. 9, pp. 429–35, 2009.
39. T. Tsujimoto, H. Kajio, and T. Sugiyama: "Association between hyperinsulinemia and increased risk of cancer death in nonobese and obese people: A population-based observational study." *Int. J. Cancer.* vol. 141, no. 1, pp. 102–111, 2017.
40. H.S. Spijker, H. Song, J.H. Ellenbroek, M.M. Roefs, M.A. Engelse, E. Bos, A.J. Koster, T.J. Rabelink, B.C. Hansen, A. Clark, F. Carlotti, and E.J.P. De Koning: "Loss of b-Cell Identity Occurs in Type 2 Diabetes and Is Associated With Islet Amyloid Deposits ISLET STUDIES." *Diabetes.* vol. 64, pp. 2698, 2015.
41. F. Cinti, R. Bouchi, J.Y. Kim-Muller, Y. Ohmura, P.R. Sandoval, M. Masini, L. Marselli, M. Suleiman, L.E. Ratner, P. Marchetti, and D. Accili: "Evidence of β -Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* vol. 101, no. 3, pp. 1044–1054, 2016.
42. Anonymous: "World Health Organization. Obesity and overweight," <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
43. G.A. Colditz, W.C. Willett, M.J. Stampfer, J.E. Manson, C.H. Hennekens, R.A. Arky, and F.E. Speizer: "Weight as a risk factor for clinical diabetes in women." *Am. J. Epidemiol.* vol. 132, no. 3, pp. 501–513, 1990.
44. R.B. Singh, M.A. Niaz, P. Agarwal, R. Beegum, S.S. Rastogi, and N.K. Singh: "Epidemiologic study of central obesity, insulin resistance and associated disturbances in the urban population of North India." *Acta Cardiol.* vol. 50, no. 3, pp. 215–25, 1995.
45. R.M. Viner, T.Y. Segal, E. Lichtarowicz-Krynska, and P. Hindmarsh: "Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity." *Arch. Dis. Child.* vol. 90, no. 1, pp. 10–14, 2005.
46. A.S. Williams, L. Kang, and D.H. Wasserman: "The extracellular matrix and insulin resistance." *Trends Endocrinol. Metab.* vol. 26, no. 7, pp. 357–366, 2015.
47. World Health Organisation: "Global report on diabetes." *Glob. Rep. Diabetes.* vol. 978, pp. 88, 2018.
48. International Diabetes Federation: "IDF Diabetes Atlas." *IDF Diabetes Atlas - 8th Ed.* vol. 8th, pp. 140, 2017.
49. A. Duseja, S.P. Singh, V.A. Saraswat, S.K. Acharya, Y.K. Chawla, S. Chowdhury, R.K. Dhiman, R. V Jayakumar, K. Madan, S.P. Misra, H. Mishra, S.K. Modi, A. Muruganathan, B. Saboo, R. Sahay, and R. Upadhyay: "Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome-

- Position Paper of the Indian National Association for the Study of the Liver, Endocrine Society of India, Indian College of Cardiology and Indian Society of Gastroenterology." *J. Clin. Exp. Hepatol.* vol. 5, no. 1, pp. 51–68, 2015.
50. K. McGlynn and W. London: "The Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma, Present and Future." *Clin Liver Dis.* vol. 15, no. 2, pp. 223–43, 2011.
 51. M. Noureddin and M.E. Rinella: "Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Diabetes, Obesity, and Hepatocellular Carcinoma." *Clin. Liver Dis.* vol. 19, no. 2, pp. 361–379, 2015.
 52. Y.K. Jung and H.J. Yim: "Reversal of liver cirrhosis: current evidence and expectations." *Korean J. Intern. Med.* vol. 32, no. 2, pp. 213–228, 2017.
 53. G. Svegliati-Baroni, E. Bugianesi, T. Bouserhal, F. Marini, F. Ridolfi, F. Tarsetti, F. Ancarani, E. Petrelli, E. Peruzzi, M. Lo Cascio, M. Rizzetto, G. Marchesini, and A. Benedetti: "Post-load insulin resistance is an independent predictor of hepatic fibrosis in virus C chronic hepatitis and in non-alcoholic fatty liver disease." *Gut.* vol. 56, no. 9, pp. 1296–1301, 2007.
 54. N. Kubota, T. Kubota, E. Kajiwara, T. Iwamura, H. Kumagai, T. Watanabe, M. Inoue, I. Takamoto, T. Sasako, K. Kumagai, M. Kohjima, M. Nakamuta, M. Moroi, K. Sugi, T. Noda, Y. Terauchi, K. Ueki, and T. Kadowaki: "Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity." *Nat. Commun.* vol. 7, pp. 12977, 2016.
 55. M. Honma, S. Sawada, Y. Ueno, K. Murakami, T. Yamada, J. Gao, S. Kodama, T. Izumi, K. Takahashi, S. Tsukita, K. Uno, J. Imai, E. Kakazu, Y. Kondo, K. Mizuno, N. Kawagishi, T. Shimosegawa, and H. Katagiri: "Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers." *Int. J. Obes.* vol. 42, no. 9, pp. 1544–1555, 2018.
 56. R. Karagozian, Z. Derdák, and G. Baffy: "Obesity-associated mechanisms of hepatocarcinogenesis." *Metabolism.* vol. 63, no. 5, pp. 607–617, 2014.
 57. J.H. Tseng, C.H. Ouyang, K.J. Lin, and T. Sen Yeh: "Significance of insulin signaling in liver regeneration triggered by portal vein ligation." *J. Surg. Res.* vol. 166, no. 1, pp. 77–86, 2011.
 58. M.M. Richardson, J.R. Jonsson, E.E. Powell, E.M. Brunt, B.A. Neuschwander-Tetri, P.S. Bhathal, J.B. Dixon, M.D. Weltman, H. Tilg, A.R. Moschen, D.M. Purdie, A.J. Demetris, and A.D. Clouston: "Progressive Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: Association With Altered Regeneration and a Ductular Reaction." *Gastroenterology.* vol. 133, no. 1, pp. 80–90, 2007.
 59. G. Fattovich, T. Stroffolini, I. Zagni, and F. Donato: "Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors." *Gastroenterology.* pp. S35–S50. *W.B. Saunders* (2004).
 60. J. Amin, M.G. Law, M. Bartlett, J.M. Kaldor, and G.J. Dore: "Causes of

- death after diagnosis of hepatitis B or hepatitis C infection: a large community-based linkage study." *Lancet*. vol. 368, no. 9539, pp. 938–945, 2006.
61. A. Tang, O. Hallouch, V. Chernyak, A. Kamaya, and C.B. Sirlin: "Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis," <http://link.springer.com/10.1007/s00261-017-1209-1>, (2018).
 62. C. Chen, H. Yang, W. Yang, C. Liu, P. Chen, S. You, L. Wang, C. Sun, S. Lu, D. Chen, and C. Chen: "Metabolic Factors and Risk of Hepatocellular Carcinoma by Chronic Hepatitis B/C Infection: A Follow-up Study in Taiwan." *Gastroenterology*. vol. 135, no. 1, pp. 111–121, 2008.
 63. J. Chen, Y. Han, C. Xu, T. Xiao, and B. Wang: "Effect of type 2 diabetes mellitus on the risk for hepatocellular carcinoma in chronic liver diseases: A meta-analysis of cohort studies." *Eur. J. Cancer Prev.* vol. 24, no. 2, pp. 89–99, 2015.
 64. B.J. Veldt, W. Chen, E.J. Heathcote, H. Wedemeyer, J. Reichen, W.P. Hofmann, R.J. de Knegt, S. Zeuzem, M.P. Manns, B.E. Hansen, S.W. Schalm, and H.L.A. Janssen: "Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus." *Hepatology*. vol. 47, no. 6, pp. 1856–1862, 2008.
 65. C.-H. Hung, J.-H. Wang, T.-H. Hu, C.-H. Chen, K.-C. Chang, Y.-H. Yen, Y.-H. Kuo, M.-C. Tsai, S.-N. Lu, and C.-M. Lee: "Insulin resistance is associated with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C infection." *World J. Gastroenterol.* vol. 16, no. 18, pp. 2265–71, 2010.
 66. S. De Minicis, L. Agostinelli, C. Rychlicki, G.P. Sorice, S. Saccomanno, C. Candelaresi, A. Giaccari, L. Trozzi, I. Pierantonelli, E. Mingarelli, M. Marzioni, G. Muscogiuri, M. Gaggini, A. Benedetti, A. Gastaldelli, M. Guido, and G. Svegliati-Baroni: "HCC development is associated to peripheral insulin resistance in a mouse model of NASH." *PLoS One*. vol. 9, no. 5, pp. e97136, 2014.
 67. F. Kanwal, J.R. Kramer, S. Mapakshi, Y. Natarajan, M. Chayanupatkul, P.A. Richardson, L. Li, R. Desiderio, A.P. Thrift, S.M. Asch, J. Chu, and H.B. El-Serag: "Risk of Hepatocellular Cancer in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology*. vol. 155, no. 6, pp. 1828-1837.e2, 2018.
 68. D.H. Cohen and D. LeRoith: "Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection." *Endocr. Relat. Cancer*. vol. 19, no. 5, pp. F27-45, 2012.
 69. K.G. Tolman, V. Fonseca, A. Dalpiaz, and M.H. Tan: "Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease." *Diabetes Care*. vol. 30, no. 3, pp. 734–743, 2007.
 70. Y. Nakanuma, Y. Zen, and B.C. Portmann: "MacSween's Pathology of the Liver.", 2012.
 71. K. Jungermann and T. Keitzmann: "Zonation of Parenchymal and Nonparenchymal Metabolism in Liver." *Annu. Rev. Nutr.* vol. 16, no. 1,

- pp. 179–203, 2003.
72. A. Kalra and F. Tuma: “Physiology, Liver.” *StatPearls Publishing* , 2018.
 73. J.L. Boyer: “Bile formation and secretion.” *Compr. Physiol.* vol. 3, no. 3, pp. 1035–78, 2013.
 74. N. Shiojiri, J.M. Lemire, and N. Fausto: “Cell Lineages and Oval Cell Progenitors in Rat Liver Development1.” , 1991.
 75. H. Morales-Navarrete, F. Segovia-Miranda, P. Klukowski, K. Meyer, H. Nonaka, G. Marsico, M. Chernykh, A. Kalaidzidis, M. Zerial, and Y. Kalaidzidis: “A versatile pipeline for the multi-scale digital reconstruction and quantitative analysis of 3D tissue architecture.” *Elife.* vol. 4, 2015.
 76. J.L. Baratta, A. Ngo, B. Lopez, N. Kasabwalla, K.J. Longmuir, and R.T. Robertson: “Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis.” *Histochem. Cell Biol.* vol. 131, no. 6, pp. 713–726, 2009.
 77. G.J. Mizejewski: “Alpha-fetoprotein Structure and Function: Relevance to Isoforms, Epitopes, and Conformational Variants.” *Exp. Biol. Med.* vol. 226, no. 5, pp. 377–408, 2017.
 78. A. Treyer and A. Müsch: “Hepatocyte polarity.” *Compr. Physiol.* vol. 3, no. 1, pp. 243–287, 2013.
 79. J.F. Dufour and P.A. Clavien: “Signaling pathways in liver diseases.” *Springer Berlin Heidelberg*, Berlin, Heidelberg , 2010.
 80. N.R. Katz: “Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus.” *J. Nutr.* vol. 122, no. 3 Suppl, pp. 843–9, 1992.
 81. S. Celton-Morizur, G. Merlen, D. Couton, G. Margall-Ducos, and C. Desdouets: “The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents.” *J. Clin. Invest.* 2009.
 82. G. Margall-Ducos, S. Celton-Morizur, D. Couton, O. Brégerie, and C. Desdouets: “Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis.” *J. Cell Sci.* vol. 120, no. Pt 20, pp. 3633–9, 2007.
 83. S. Zhang, K. Zhou, X. Luo, L. Li, H.-C.C. Tu, A. Sehgal, L.H. Nguyen, Y. Zhang, P. Gopal, B.D. Tarlow, D.J. Siegwart, and H. Zhu: “The Polyploid State Plays a Tumor-Suppressive Role in the Liver.” *Dev. Cell.* vol. 44, no. 4, pp. 447-459.e5, 2018.
 84. A.W. Duncan, M.H. Taylor, R.D. Hickey, A.E. Hanlon Newell, M.L. Lenzi, S.B. Olson, M.J. Finegold, and M. Grompe: “The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation.” *Nature.* vol. 467, no. 7316, pp. 707–710, 2010.
 85. J.-E.E. Guidotti, O. Brégerie, A. Robert, P. Debey, C. Brechot, and C. Desdouets: “Liver cell polyploidization: A pivotal role for binuclear hepatocytes.” *J. Biol. Chem.* vol. 278, no. 21, pp. 19095–19101, 2003.
 86. C. Kreutz, S. MacNelly, M. Follo, A. Wäldin, P. Binnering-Lacour, J. Timmer, and M.M. Bartolomé-Rodríguez: “Hepatocyte Ploidy Is a Diversity Factor for Liver Homeostasis.” *Front. Physiol.* vol. 8, pp. 862,

- 2017.
87. G. Gentric, V. Maillat, V. Paradis, D. Couton, A. L'Hermitte, G. Panasyuk, B. Fromenty, S. Celton-Morizur, and C. Desdouets: "Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease." *J. Clin. Invest.* vol. 125, no. 3, pp. 981–992, 2015.
 88. H. Toyoda, O. Bregerie, A. Vallet, B. Nalpas, G. Pivert, C. Brechot, and C. Desdouets: "Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis." *Gut.* vol. 54, no. 2, pp. 297–302, 2005.
 89. M. Bou-Nader, S. Caruso, R. Donne, S. Celton-Morizur, J. Calderaro, G. Gentric, M. Cadoux, A. L'Hermitte, C. Klein, T. Guilbert, M. Albuquerque, G. Couchy, V. Paradis, J.-P.P. Couty, J. Zucman-Rossi, and C. Desdouets: "Polyploidy spectrum: a new marker in HCC classification." *Gut.* vol. 0, pp. gutjnl-2018-318021, 2019.
 90. M.-J. Wang, F. Chen, J.T.Y. Lau, and Y.-P. Hu: "Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes." *Cell Death Dis.* vol. 8, no. 5, pp. e2805, 2017.
 91. J.M. Banales, R.C. Huebert, T. Karlsen, M. Strazzabosco, N.F. LaRusso, and G.J. Gores: "Cholangiocyte pathobiology." *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019.
 92. A. Margreet De Leeuw, A. Brouwer, and D.L. Knook: "Sinusoidal endothelial cells of the liver: Fine structure and function in relation to age." *J. Electron Microsc. Tech.* vol. 14, no. 3, pp. 218–236, 1990.
 93. J. Poisson, S. Lemoine, C. Boulanger, F. Durand, R. Moreau, D. Valla, and P.-E. Rautou: "Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases." *J. Hepatol.* vol. 66, no. 1, pp. 212–227, 2017.
 94. G. Kolios, V. Valatas, and E. Kouroumalis: "Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease." *World J. Gastroenterol.* vol. 12, no. 46, pp. 7413–20, 2006.
 95. S. Götze, E.C. Schumacher, C. Kordes, and D. Häussinger: "Epigenetic changes during hepatic stellate cell activation." *PLoS One.* vol. 10, no. 6, pp. 1–18, 2015.
 96. U.E. Lee and S.L. Friedman: "Mechanisms of hepatic fibrogenesis." *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* vol. 25, no. 2, pp. 195–206, 2011.
 97. D. Cook, S. Achanta, J.B. Hoek, B.A. Ogunnaike, and R. Vadigepalli: "Cellular network modeling and single cell gene expression analysis reveals novel hepatic stellate cell phenotypes controlling liver regeneration dynamics." *BMC Syst. Biol.* vol. 12, no. 1, pp. 86, 2018.
 98. T. Kisseleva, M. Cong, Y. Paik, D. Scholten, C. Jiang, C. Benner, K. Iwaisako, T. Moore-Morris, B. Scott, H. Tsukamoto, S.M. Evans, W. Dillmann, C.K. Glass, and D.A. Brenner: "Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis." *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 109, no. 24, pp. 9448–9453, 2012.
 99. V. Krizhanovsky, M. Yon, R.A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender, and S.W. Lowe: "Senescence of activated stellate cells

- limits liver fibrosis." *Cell*. vol. 134, no. 4, pp. 657–67, 2008.
100. B. Tuchweber, A. Desmouliere, M.-L. Bochaton-Piallat, L. Rubbia-Brandt, and G. Gabbiani: "Proliferation and Phenotypic Modulation of Portal Fibroblasts in the Early Stages of Cholestatic Fibrosis in the Rat." *Lab. Investig.* vol. 74, no. 1, pp. 265, 1996.
 101. L.W. Katsumata, A. Miyajima, and T. Itoh: "Portal Fibroblasts Marked by the Surface Antigen Thy1 Contribute to Fibrosis in Mouse Models of Cholestatic Liver Injury." 2017.
 102. I. Lua, Y. Li, J.A. Zagory, K.S. Wang, S.W. French, J. Sévigny, and K. Asahina: "Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers."
 103. Y. Miyaoka, K. Ebato, H. Kato, S. Arakawa, S. Shimizu, A. Miyajima, K. Ebato, A. Miyajima, H. Kato, S. Shimizu, and Y. Miyaoka: "Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration." *Curr. Biol.* vol. 22, no. 13, pp. 1166–75, 2012.
 104. H. Gilgenkrantz and A. Collin de l'Hortet: "Understanding Liver Regeneration." *Am. J. Pathol.* vol. 188, no. 6, pp. 1316–1327, 2018.
 105. T.A. Roskams, N.D. Theise, C. Balabaud, G. Bhagat, P.S. Bhathal, P. Bioulac-Sage, E.M. Brunt, J.M. Crawford, H.A. Crosby, V. Desmet, M.J. Finegold, S.A. Geller, A.S.H. Gouw, P. Hytioglou, A.S. Knisely, M. Kojiro, J.H. Lefkowitz, Y. Nakanuma, J.K. Olynyk, Y. Nyun Park, B. Portmann, R. Saxena, P.J. Scheuer, A.J. Strain, S.N. Thung, I.R. Wanless, and A.B. West: "Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: Canals, ductules, and ductular reactions in human livers." *Hepatology*. vol. 39, no. 6, pp. 1739–1745, 2004.
 106. E. Farber: "Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylamino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene." *Cancer Res.* vol. 16, no. 2, pp. 142–8, 1956.
 107. W.-Y. Lu, T.G. Bird, L. Boulter, A. Tsuchiya, A.M. Cole, T. Hay, R. V. Guest, D. Wojtacha, T.Y. Man, A. Mackinnon, R.A. Ridgway, T. Kendall, M.J. Williams, T. Jamieson, A. Raven, D.C. Hay, J.P. Iredale, A.R. Clarke, O.J. Sansom, and S.J. Forbes: "Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity." *Nat. Cell Biol.* vol. 17, no. 8, pp. 971–983, 2015.
 108. V. Lukacs-Kornek and F. Lammert: "The progenitor cell dilemma: Cellular and functional heterogeneity in assistance or escalation of liver injury," [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(16\)30644-4/pdf](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(16)30644-4/pdf), (2017).
 109. B.D. Tarlow, M.J. Finegold, and M. Grompe: "Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury." *Hepatology*. vol. 60, no. 1, pp. 278–289, 2014.
 110. M. Okabe, Y. Tsukahara, M. Tanaka, K. Suzuki, S. Saito, Y. Kamiya, T. Tsujimura, K. Nakamura, and A. Miyajima: "Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver." *Development*. vol. 136, no. 11, pp. 1951–1960, 2009.

111. C. Dorrell, L. Erker, K.M. Lanxon-Cookson, S.L. Abraham, T. Victoroff, S. Ro, P.S. Canaday, P.R. Streeter, and M. Grompe: "Surface markers for the murine oval cell response." *Hepatology*. vol. 48, no. 4, pp. 1282–91, 2008.
112. R. Español–Suñer, R. Carpentier, N. Van Hul, V. Legry, Y. Achouri, S. Cordi, P. Jacquemin, F. Lemaigre, I.A. Leclercq, R. Español–Suñer, R. Carpentier, N. Van Hul, V. Legry, Y. Achouri, S. Cordi, P. Jacquemin, F. Lemaigre, and I.A. Leclercq: "Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice." *Gastroenterology*. vol. 143, no. 6, pp. 1564–1575.e7, 2012.
113. T. Roskams, S.Q. Yang, A. Koteish, A. Durnez, R. DeVos, X. Huang, R. Achten, C. Verslype, and A.M. Diehl: "Oxidative Stress and Oval Cell Accumulation in Mice and Humans with Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Am. J. Pathol.* vol. 163, no. 4, pp. 1301–1311, 2003.
114. C.C. Hsia, R.P. Everts, H. Nakatsukasa, E.R. Marsden, and S.S. Thorgeirsson: "Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis." *Hepatology*. vol. 16, no. 6, pp. 1327–33, 1992.
115. L. Libbrecht, V. Desmet, B. Van Damme, and T. Roskams: "Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate?" *J. Pathol.* vol. 192, no. 3, pp. 373–8, 2000.
116. B.D. Tarlow, C. Pelz, W.E. Naugler, L. Wakefield, E.M. Wilson, M.J. Finegold, and M. Grompe: "Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes." *Cell Stem Cell*. vol. 15, no. 5, pp. 605–618, 2014.
117. S. Sekiya and A. Suzuki: "Hepatocytes, Rather than Cholangiocytes, Can Be the Major Source of Primitive Ductules in the Chronically Injured Mouse Liver." *Am. J. Pathol.* vol. 184, no. 5, pp. 1468–1478, 2014.
118. C. Kordes, I. Sawitza, S. Götze, D. Herebian, and D. Häussinger: "Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration." *J. Clin. Invest.* vol. 124, no. 12, pp. 5503–5515, 2014.
119. C. Kordes, I. Sawitza, A. Müller-Marbach, N. Ale-Agha, V. Keitel, H. Klonowski-Stumppe, and D. Häussinger: "CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* vol. 352, no. 2, pp. 410–417, 2007.
120. L. Yang, Y. Jung, A. Omenetti, R.P. Witek, S. Choi, H.M. Vandongen, J. Huang, G.D. Alpini, and A.M. Diehl: "Fate-Mapping Evidence That Hepatic Stellate Cells Are Epithelial Progenitors in Adult Mouse Livers." *Stem Cells*. vol. 26, no. 8, pp. 2104–2113, 2008.
121. E. Pose, P. Sancho-Bru, and M. Coll: "3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine diet: A rodent model in cholestasis research." *Methods in Molecular Biology*. pp. 249–257 (2019).
122. A. Katoonizadeh and H. Poustchi: "Adult Hepatic Progenitor Cell Niche: How it affects the Progenitor Cell Fate." *Middle East J. Dig. Dis.* vol. 6, no. 2, pp. 57–64, 2014.

123. V.L. Gadd, R. Skoien, E.E. Powell, K.J. Fagan, C. Winterford, L. Horsfall, K. Irvine, and A.D. Clouston: "The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology*. vol. 59, no. 4, pp. 1393–1405, 2014.
124. Y.K. Chen, X.X. Zhao, J.G. Li, S. Lang, and Y.M. Wang: "Ductular proliferation in liver tissues with severe chronic hepatitis B: An immunohistochemical study." *World J. Gastroenterol.* vol. 12, no. 9, pp. 1443–1446, 2006.
125. A.D. Clouston, E.E. Powell, M.J. Walsh, M.M. Richardson, A.J. Demetris, and J.R. Jonsson: "Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: Roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis." *Hepatology*. vol. 41, no. 4, pp. 809–818, 2005.
126. M.J. Williams, A.D. Clouston, and S.J. Forbes: "Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion." *Gastroenterology*. vol. 146, no. 2, pp. 349–356, 2014.
127. B. Knight, V.B. Matthews, B. Akhurst, E.J. Croager, E. Klincken, L.J. Abraham, J.K. Olynyk, and G. Yeoh: "Liver inflammation and cytokine production, but not acute phase protein synthesis, accompany the adult liver progenitor (oval) cell response to chronic liver injury." *Immunol. Cell Biol.* vol. 83, no. 4, pp. 364–374, 2005.
128. N.K.M. Van Hul, J. Abarca-Quinones, C. Sempoux, Y. Horsmans, and I.A. Leclercq: "Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury." *Hepatology*. vol. 49, no. 5, pp. 1625–1635, 2009.
129. L. Erker and M. Grompe: "Signaling networks in hepatic oval cell activation," (2008).
130. H.M. Takase, T. Itoh, S. Ino, T. Wang, T. Koji, S. Akira, Y. Takikawa, and A. Miyajima: "FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration." *Genes Dev.* vol. 27, no. 2, pp. 169–181, 2013.
131. H. Li and L. Zhang: "Liver regeneration microenvironment of hepatocellular carcinoma for prevention and therapy." *Oncotarget*. vol. 8, no. 1, pp. 1805–1813, 2017.
132. M.T. Birgani and V. Carloni: "Tumor microenvironment, a paradigm in hepatocellular carcinoma progression and therapy." *Int. J. Mol. Sci.* vol. 18, no. 2, 2017.
133. J.D. Yang, I. Nakamura, L.R. Roberts, and L.R.R. Ju Dong Yang, Ikuo Nakamura: "The Tumor Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma: Current Status and Therapeutic Targets." *Semin. Cancer Biol.* vol. 21, no. 1, pp. 35–43, 2012.
134. L.M. Coussens and Z. Werb: "Inflammation and cancer." *Nature*. vol. 420, no. 6917, pp. 860–867, 2002.
135. M. Yilmaz and G. Christofori: "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion." *Cancer Metastasis Rev.* vol. 28, no. 1–2, pp. 15–33, 2009.
136. T. Yamashita, J. Ji, A. Budhu, M. Forgues, W. Yang, H.Y. Wang, H. Jia,

- Q. Ye, L.X. Qin, E. Wauthier, L.M. Reid, H. Minato, M. Honda, S. Kaneko, Z.Y. Tang, and X.W. Wang: "EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features." *Gastroenterology*. vol. 136, no. 3, pp. 1012-1024.e4, 2009.
137. D.C. Radisky, P.A. Kenny, and M.J. Bissell: "Fibrosis and cancer: Do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT?," <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17211838>, (2007).
138. M. Schäfer and S. Werner: "Cancer as an overhealing wound: An old hypothesis revisited," <http://www.nature.com/articles/nrm2455>, (2008).
139. J.S. Flier, L.H. Underhill, and H.F. Dvorak: "Tumors: Wounds That Do Not Heal," <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3537791>, (1986).
140. K.A. McGlynn, J.L. Petrick, and W.T. London: "Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability." *Clin. Liver Dis.* vol. 19, no. 2, pp. 223–38, 2015.
141. B.W. Stewart, C. Wild, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer., and World Health Organization.: "World cancer report 2014." *International Agency for Research on Cancer*, 2014.
142. A. Baecker, X. Liu, C. La Vecchia, and Z.-F. Zhang: "Worldwide incidence of hepatocellular carcinoma cases attributable to major risk factors." *Eur. J. Cancer Prev.* vol. 27, no. 3, pp. 205–212, 2018.
143. C.E. Herzog: "Childhood Cancers: Hepatoblastoma." *Oncologist*. vol. 5, no. 6, pp. 445–453, 2000.
144. L.J. Hughes and V. V. Michels: "Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis." *Am. J. Med. Genet.* vol. 43, no. 6, pp. 1023–1025, 1992.
145. E.Y. Weng, G.R. Mortier, and J.M. Graham: "Beckwith-Wiedemann Syndrome: An Update and Review for the Primary Pediatrician." *Clin. Pediatr. (Phila)*. vol. 34, no. 6, pp. 317–326, 1995.
146. K. Maruyama, H. Ikeda, and T. Koizumi: "Hepatoblastoma associated with trisomy 18 syndrome: a case report and a review of the literature." *Pediatr. Int.* vol. 43, no. 3, pp. 302–5, 2001.
147. M. Tanimura, I. Matsui, J. Abe, H. Ikeda, N. Kobayashi, M. Ohira, M. Yokoyama, and M. Kaneko: "Increased risk of hepatoblastoma among immature children with a lower birth weight." *Cancer Res.* vol. 58, no. 14, pp. 3032–5, 1998.
148. J.E. Heck, T.J. Meyers, C. Lombardi, A.S. Park, M. Cockburn, P. Reynolds, and B. Ritz: "Case-control study of birth characteristics and the risk of hepatoblastoma." *Cancer Epidemiol.* vol. 37, no. 4, pp. 390–395, 2013.
149. C. Pu, C. Guo, X. Jin, C. Deng, M. Zhang, Y. Li, and Q. Kang: "[Retrospective analysis of maternal and infant birth features of hepatoblastoma patients]." *Chinese J. Hepatol.* vol. 17, no. 6, pp. 459–61, 2009.

150. C.C. McLaughlin, M.S. Baptiste, M.J. Schymura, P.C. Nasca, and M.S. Zdeb: "Maternal and Infant Birth Characteristics and Hepatoblastoma." *Am. J. Epidemiol.* vol. 163, no. 9, pp. 818–828, 2006.
151. B.B. Kahn and J.S. Flier: "Obesity and insulin resistance." *J. Clin. Invest.* vol. 106, no. 4, pp. 473–81, 2000.
152. J.C. Hauth, R.G. Clifton, J.M. Roberts, L. Myatt, C.Y. Spong, K.J. Leveno, M.W. Varner, R.J. Wapner, J.M. Thorp, B.M. Mercer, A.M. Peaceman, S.M. Ramin, M.W. Carpenter, P. Samuels, A. Sciscione, J.E. Tolosa, G. Saade, Y. Sorokin, G.D. Anderson, and G.D. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network: "Maternal insulin resistance and preeclampsia." *Am. J. Obstet. Gynecol.* vol. 204, no. 4, pp. 327.e1–6, 2011.
153. M. Gupta, R. Gupta, A. Pareek, R. Bhatia, and V. Kaul: "Low birth weight and insulin resistance in mid and late childhood." *Indian Pediatr.* vol. 44, no. 3, pp. 177–84, 2007.
154. A.O.M. Elzein, A.A. Ali, H.Z. Hamdan, E.M. Elhassan, N.E.M.A. Shrif, and I. Adam: "Materno-foetal leptin and insulin-like growth factor in low birth weight neonates." *J. Obstet. Gynaecol. (Lahore).* vol. 36, no. 1, pp. 31–33, 2016.
155. M. Incec, H.G. Gursoy, L. Yildiz, Y. Kumtepe, and S. Kadanali: "Serum levels of insulin, IGF-1, and IGFBP-1 in pre-eclampsia and eclampsia." *Int. J. Gynecol. Obstet.* vol. 84, no. 3, pp. 214–219, 2004.
156. K. Rombouts and V. Carloni: "The fibrotic microenvironment as a heterogeneity facet of hepatocellular carcinoma." *Fibrogenesis Tissue Repair.* vol. 6, no. 1, pp. 17, 2013.
157. J.S. Lee, J. Heo, L. Libbrecht, I.S. Chu, P. Kaposi-Novak, D.F. Calvisi, A. Mikaelyan, L.R. Roberts, A.J. Demetris, Z. Sun, F. Nevens, T. Roskams, and S.S. Thorgeirsson: "A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells." *Nat. Med.* vol. 12, no. 4, pp. 410–416, 2006.
158. R. Désert, N. Nieto, and O. Musso: "Dimensions of hepatocellular carcinoma phenotypic diversity." *World J Gastroenterol.* vol. 24, no. 40, pp. 4536–4547, 2018.
159. Y. Hoshida, S. Nijman, and M. Kobayashi: "Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma." *Cancer Res.* vol. 69, no. 18, pp. 7385–7392, 2009.
160. R.A. Burkhart, S.M. Ronnekleiv-Kelly, and T.M. Pawlik: "Personalized therapy in hepatocellular carcinoma: Molecular markers of prognosis and therapeutic response," <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28577719>, (2017).
161. F. Xue, D.M. Janzen, and D.A. Knecht: "Contribution of Filopodia to Cell Migration: A Mechanical Link between Protrusion and Contraction." *Int. J. Cell Biol.* vol. 2010, pp. 507821, 2010.
162. D. Nantajit, D. Lin, and J.J. Li: "The network of epithelial–mesenchymal

- transition: potential new targets for tumor resistance." *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* vol. 141, no. 10, pp. 1697–1713, 2015.
163. C. Porta, C. Paglino, and A. Mosca: "Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer." *Front. Oncol.* vol. 4, pp. 64, 2014.
164. L. Santarpia, S.M. Lippman, and A.K. El-Naggar: "Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy." *Expert Opin. Ther. Targets.* vol. 16, no. 1, pp. 103–119, 2012.
165. R.K. Dearth, X. Cui, H.-J. Kim, I. Kuitatse, N.A. Lawrence, X. Zhang, J. Divisova, O.L. Britton, S. Mohsin, D.C. Allred, D.L. Hadsell, and A. V Lee: "Mammary tumorigenesis and metastasis caused by overexpression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) or IRS-2." *Mol. Cell. Biol.* vol. 26, no. 24, pp. 9302–14, 2006.
166. M.K. Nolan, L. Jankowska, M. Prisco, S. Xu, M.A. Guvakova, and E. Surmacz: "Differential roles of IRS-1 and SHC signaling pathways in breast cancer cells." *Int. J. cancer.* vol. 72, no. 5, pp. 828–34, 1997.
167. E. Surmacz and J.-L. Burgaud: "Overexpression of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-i) in the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 Induces Loss of Estrogen Requirements for Growth and Transformation'." , 1995.
168. J.A. Nagle, Z. Ma, M.A. Byrne, M.F. White, and L.M. Shaw: "Involvement of Insulin Receptor Substrate 2 in Mammary Tumor Metastasis." *Mol. Cell. Biol.* vol. 24, no. 22, pp. 9726–9735, 2004.
169. S.L. Gibson, Z. Ma, and L.M. Shaw: "Divergent roles for IRS-1 and IRS-2 in breast cancer metastasis." *Cell Cycle.* vol. 6, no. 6, pp. 631–637, 2007.
170. B. Schnarr, K. Strunz, J. Ohsam, A. Benner, J. Wacker, and D. Mayer: "Down-regulation of insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor substrate-1 expression in advanced human breast cancer." *Int. J. Cancer.* vol. 89, no. 6, pp. 506–513, 2000.
171. D. Sisci, C. Morelli, C. Garofalo, F. Romeo, L. Morabito, F. Casaburi, E. Middea, S. Cascio, E. Brunelli, S. Andò, and E. Surmacz: "Expression of nuclear insulin receptor substrate 1 in breast cancer." *J. Clin. Pathol.* vol. 60, no. 6, pp. 633–641, 2007.
172. M. Koda, M. Sulkowska, L. Kanczuga-Koda, and S. Sulkowski: "Expression of insulin receptor substrate 1 in primary breast cancer and lymph node metastases." *J. Clin. Pathol.* vol. 58, no. 6, pp. 645–649, 2005.
173. R.L. Rocha, S.G. Hilsenbeck, J.G. Jackson, C.L. VanDenBerg, C. n Weng, A. V Lee, and D. Yee: "Insulin-like growth factor binding protein-3 and insulin receptor substrate-1 in breast cancer: correlation with clinical parameters and disease-free survival." *Clin. Cancer Res.* vol. 3, no. 1, pp. 103–9, 1997.
174. Z. Ma, S.L. Gibson, M.A. Byrne, J. Zhang, M.F. White, and L.M. Shaw: "Suppression of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) Promotes Mammary Tumor Metastasis." *Mol. Cell. Biol.* vol. 26, no. 24, pp. 9338–9351, 2006.

175. X. Luo, S. Fan, W. Huang, S. Zhai, Z. Ma, P. Li, S.Y. Sun, and X. Wang: "Downregulation of IRS-1 promotes metastasis of head and neck squamous cell carcinoma." *Oncol. Rep.* vol. 28, no. 2, pp. 659–667, 2012.
176. J. Shi, D.-M. Wang, C.-M. Wang, Y. Hu, A.-H. Liu, Y.-L. Zhang, B. Sun, and J.-G. Song: "Insulin Receptor Substrate-1 Suppresses Transforming Growth Factor- 1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition." *Cancer Res.* vol. 69, no. 18, pp. 7180–7187, 2009.
177. M. Cao, Y. Li, H. Lu, Q. Meng, L. Wang, L. Cai, and X. Dong: "MiR-23a-mediated migration/invasion is rescued by its target, IRS-1, in non-small cell lung cancer cells." *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* vol. 140, no. 10, pp. 1661–1670, 2014.
178. H.E. Metz, J. Kargl, S.E. Busch, K.-H. Kim, B.F. Kurland, S.R. Abberbock, J. Randolph-Habecker, S.E. Knoblaugh, J.K. Kolls, M.F. White, and A.M. Houghton: "Insulin receptor substrate-1 deficiency drives a proinflammatory phenotype in KRAS mutant lung adenocarcinoma." *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 113, no. 31, pp. 8795–8800, 2016.
179. S. Yamashita, Y. Tsujino, K. Moriguchi, M. Tatematsu, and T. Ushijima: "Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray." *Cancer Sci.* vol. 97, no. 1, pp. 64–71, 2006.
180. M. Boissan, E. Beurel, D. Wendum, C. Rey, Y. Lécluse, C. Housset, M.-L. Lacombe, and C. Desbois-Mouthon: "Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma." *Am. J. Pathol.* vol. 167, no. 3, pp. 869–77, 2005.
181. E. Aleem, D. Nehrbass, F. Klimek, D. Mayer, and P. Bannasch: "Upregulation of the insulin receptor and type i insulin-like growth factor receptor are early events in hepatocarcinogenesis." *Toxicol. Pathol.* vol. 39, no. 3, pp. 524–543, 2011.
182. M. Szabolcs, M. Keniry, L. Simpson, L.J. Reid, S. Koujak, S.C. Schiff, G. Davidian, S. Licata, S. Gruvberger-Saal, V.V.V.S.V.S. Murty, S. Nandula, A. Efstratiadis, J.A. Kushner, M.F. White, and R. Parsons: "Irs2 inactivation suppresses tumor progression in Pten+/- mice." *Am. J. Pathol.* vol. 174, no. 1, pp. 276–86, 2009.
183. X.-R. Xu, J. Huang, Z.-G. Xu, B.-Z. Qian, Z.-D. Zhu, Q. Yan, T. Cai, X. Zhang, H.-S. Xiao, J. Qu, F. Liu, Q.-H. Huang, Z.-H. Cheng, N.-G. Li, J.-J. Du, W. Hu, K.-T. Shen, G. Lu, G. Fu, M. Zhong, S.-H. Xu, W.-Y. Gu, W. Huang, X.-T. Zhao, G.-X. Hu, J.-R. Gu, Z. Chen, and Z.-G. Han: "Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver." *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 98, no. 26, pp. 15089–15094, 2002.
184. D. Nehrbass, F. Klimek, and P. Bannasch: "Overexpression of insulin receptor substrate-1 emerges early in hepatocarcinogenesis and elicits preneoplastic hepatic glycogenesis." *Am J Pathol.* vol. 152, no. 2, pp. 341–345, 1998.
185. S. Tanaka and J.R. Wands2: "Insulin Receptor Substrate 1

- Overexpression in Human Hepatocellular Carcinoma Cells Prevents Transforming Growth Factor β -induced Apoptosis'." , 1996.
186. Y. Sakurai, N. Kubota, I. Takamoto, A. Obata, M. Iwamoto, T. Hayashi, M. Aihara, T. Kubota, H. Nishihara, and T. Kadowaki: "Role of insulin receptor substrates in the progression of hepatocellular carcinoma." *Sci. Rep.* vol. 7, no. 1, pp. 5387, 2017.
 187. M. Pollak: "Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia," <http://www.nature.com/articles/nrc2536>, (2008).
 188. W.W. Su, K.T. Lee, Y.T. Yeh, M.S. Soon, C.L. Wang, M.L. Yu, and S.N. Wang: "Association of circulating insulin-like growth factor 1 with hepatocellular carcinoma: One cross-sectional correlation study." *J. Clin. Lab. Anal.* vol. 24, no. 3, pp. 195–200, 2010.
 189. Y.S. Chun, M. Huang, L. Rink, and M. Von Mehren: "Expression levels of insulin-like growth factors and receptors in hepatocellular carcinoma: a retrospective study." *World J. Surg. Oncol.* vol. 12, pp. 231, 2014.
 190. A.O. Kaseb, J.S. Morris, M.M. Hassan, A.M. Siddiqui, E. Lin, L. Xiao, E.K. Abdalla, J.N. Vauthey, T.A. Aloia, S. Krishnan, and J.L. Abbruzzese: "Clinical and prognostic implications of plasma insulin-like growth factor-1 and vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma." *J. Clin. Oncol.* vol. 29, no. 29, pp. 3892–3899, 2011.
 191. M. Conchillo, R.J. De Knecht, M. Payeras, J. Quiroga, B. Sangro, J.I. Herrero, I. Castilla-Cortazar, J. Frystyk, A. Flyvbjerg, C. Yoshizawa, P.L.M. Jansen, B. Schar Schmidt, and J. Prieto: "Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: Results of a pilot randomized controlled clinical trial." *J. Hepatol.* vol. 43, no. 4, pp. 630–636, 2005.
 192. M. Vera, L. Sobrevals, M. Zaratiegui, L. Martinez, B. Palencia, C.M. Rodríguez, J. Prieto, and P. Fortes: "Liver transduction with a simian virus 40 vector encoding insulin-like growth factor I reduces hepatic damage and the development of liver cirrhosis." *Gene Ther.* vol. 14, no. 3, pp. 203–210, 2007.
 193. Z. Gong, O. Kennedy, H. Sun, Y. Wu, G.A. Williams, L. Klein, L. Cardoso, R.W. Matheny, G.B. Hubbard, Y. Ikeno, R.P. Farrar, M.B. Schaffler, M.L. Adamo, R.H. Muzumdar, and S. Yakar: "Reductions in serum IGF-1 during aging impair health span." *Aging Cell.* vol. 13, no. 3, pp. 408–418, 2014.
 194. C. Crudden, A. Girnita, and L. Girnita: "Targeting the IGF-1R: The Tale of the Tortoise and the Hare." *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. vol. 6, pp. 64, 2015.
 195. H.X. Chen and E. Sharon: "IGF-1R as an anti-cancer target--trials and tribulations." *Chin. J. Cancer.* vol. 32, no. 5, pp. 242–252, 2013.
 196. Q.M. Nunes, Y. Li, C. Sun, T.K. Kinnunen, and D.G. Fernig: "Fibroblast growth factors as tissue repair and regeneration therapeutics." *PeerJ.* vol. 4, pp. e1535, 2016.
 197. D.M. Ornitz and N. Itoh: "The Fibroblast Growth Factor signaling

- pathway." *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* vol. 4, no. 3, pp. 215–266, 2015.
198. L. Maddaluno, C. Urwyler, and S. Werner: "Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair." *Development.* vol. 144, no. 22, pp. 4047–4060, 2017.
 199. J. Zhang and Y. Li: "Therapeutic uses of FGFs." *Semin. Cell Dev. Biol.* vol. 53, pp. 144–154, 2016.
 200. N. Turner and R. Grose: "Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer," <http://www.nature.com/articles/nrc2780>, (2010).
 201. J.M. Suh, J.W. Jonker, M. Ahmadian, R. Goetz, D. Lackey, O. Osborn, Z. Huang, W. Liu, E. Yoshihara, T.H. van Dijk, R. Havinga, W. Fan, Y.-Q. Yin, R.T. Yu, C. Liddle, A.R. Atkins, J.M. Olefsky, M. Mohammadi, M. Downes, and R.M. Evans: "Endocrinization of FGF1 produces a neomorphic and potent insulin sensitizer." *Nature.* vol. 513, no. 7518, pp. 436–439, 2014.
 202. L. Fu, L.M. John, S.H. Adams, X.X. Yu, E. Tomlinson, M. Renz, P.M. Williams, R. Soriano, R. Corpuz, B. Moffat, R. Vandlen, L. Simmons, J. Foster, J.-P. Stephan, S.P. Tsai, and T.A. Stewart: "Fibroblast Growth Factor 19 Increases Metabolic Rate and Reverses Dietary and Leptin-Deficient Diabetes." *Endocrinology.* vol. 145, no. 6, pp. 2594–2603, 2004.
 203. J. Xu, D.J. Lloyd, C. Hale, S. Stanislaus, M. Chen, G. Sivits, S. Vonderfecht, R. Hecht, Y.S. Li, R.A. Lindberg, J.L. Chen, D.Y. Jung, Z. Zhang, H.J. Ko, J.K. Kim, and M.M. Véniant: "Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice." *Diabetes.* vol. 58, no. 1, pp. 250–259, 2009.
 204. H. UCHI, A. IGARASHI, K. URABE, T. KOGA, J. NAKAYAMA, R. KAWAMORI, K. TAMAKI, H. HIRAKATA, T. OHURA, and M. FURUE: "Clinical efficacy of basic fibroblast growth factor (bFGF) for diabetic ulcer." *Eur. J. Dermatol.* vol. 19, no. 5, pp. 461–8,.
 205. C. Peng, B. Chen, H.K. Kao, G. Murphy, D.P. Orgill, and L. Guo: "Lack of FGF-7 further delays cutaneous wound healing in diabetic mice." *Plast. Reconstr. Surg.* vol. 128, no. 6, pp. 673e-684e, 2011.
 206. S. Werner: "Keratinocyte Growth Factor: A Unique Player in Epithelial Repair Processes." *Cytokine Growth Factor Rev.* vol. 9, no. 2, pp. 153–165, 1998.
 207. Z. Hu, R.P. Everts, K. Fujio, E.R. Marsden, and S.S. Thorgeirsson: "Expression of fibroblast growth factor receptors flg and bek during hepatic ontogenesis and regeneration in the rat," <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.864.8229&rep=rep1&type=pdf>, (1995).
 208. H. Steiling, T. Wüstefeld, P. Bugnon, M. Brauchle, R. Fässler, D. Teupser, J. Thiery, J.I. Gordon, C. Trautwein, and S. Werner: "Fibroblast growth factor receptor signalling is crucial for liver homeostasis and regeneration." *Oncogene.* vol. 22, no. 28, pp. 4380–8, 2003.

209. H. Steiling, M. Mühlbauer, F. Bataille, J. Schölmerich, S. Werner, C. Hellerbrand, M. Muhlbauer, H. Steiling, J. Schölmerich, S. Werner, and C. Hellerbrand: "Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease." *Am. J. Pathol.* vol. 165, no. 4, pp. 1233–41, 2004.
210. J.D. Schumacher and G.L. Guo: "Regulation of Hepatic Stellate Cells and Fibrogenesis by Fibroblast Growth Factors." *Biomed Res. Int.* vol. 2016, pp. 8323747, 2016.
211. D. Giri, F. Ropiquet, and M. Ittmann: "Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer." *Clin. Cancer Res.* vol. 5, no. 5, pp. 1063–1071, 1999.
212. Y. Zhang, H. Wang, S. Toratani, J.D. Sato, M. Kan, W.L. McKeehan, and T. Okamoto: "Growth inhibition by keratinocyte growth factor receptor of human salivary adenocarcinoma cells through induction of differentiation and apoptosis." *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 98, no. 20, pp. 11336–11340, 2001.
213. M.G. Gartside, H. Chen, O.A. Ibrahim, S.A. Byron, A. V. Curtis, C.L. Wellens, A. Bengston, L.M. Yudt, A. V. Eliseenkova, J. Ma, J.A. Curtin, P. Hyder, U.L. Harper, E. Riedesel, G.J. Mann, J.M. Trent, B.C. Bastian, P.S. Meltzer, M. Mohammadi, and P.M. Pollock: "Loss-of-Function Fibroblast Growth Factor Receptor-2 Mutations in Melanoma." *Mol. Cancer Res.* vol. 7, no. 1, pp. 41–54, 2009.
214. R. Grose, V. Fantl, S. Werner, A.M. Chioni, M. Jarosz, R. Rudling, B. Cross, I.R. Hart, and C. Dickson: "The role of fibroblast growth factor receptor 2b in skin homeostasis and cancer development." *EMBO J.* vol. 26, no. 5, pp. 1268–1278, 2007.
215. D. Ricol, D. Cappellen, A. El Marjou, S. Gil-Diez-de-Medina, J.-M. Girault, T. Yoshida, G. Ferry, G. Tucker, M.-F. Poupon, D. Chopin, J.P. Thiery, and F. Radvanyi: "Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer." *Oncogene.* vol. 18, no. 51, pp. 7234–7243, 1999.
216. D. Ranieri, B. Rosato, M. Nanni, A. Magenta, F. Belleudi, and M.R. Torrisi: "Expression of the FGFR2 mesenchymal splicing variant in epithelial cells drives epithelial-mesenchymal transition." *Oncotarget.* vol. 7, no. 5, pp. 5440–60, 2016.
217. C.L. Chaffer, J.P. Brennan, J.L. Slavin, T. Blick, E.W. Thompson, and E.D. Williams: "Mesenchymal-to-Epithelial Transition Facilitates Bladder Cancer Metastasis: Role of Fibroblast Growth Factor Receptor-2." *Cancer Res.* vol. 66, no. 23, pp. 11271–11278, 2006.
218. Q. Zhao, O.L. Caballero, I.D. Davis, E. Jonasch, P. Tamboli, W.K.A. Yung, J.N. Weinstein, K. Shaw, R.L. Strausberg, and J. Yao: "Tumor-specific isoform switch of the fibroblast growth factor receptor 2 underlies the mesenchymal and malignant phenotypes of clear cell renal cell carcinomas." *Clin. Cancer Res.* vol. 19, no. 9, pp. 2460–2472, 2013.
219. G. Yan, Y. Fukabori, G. McBride, S. Nikolaropolous, and W.L. McKeehan: "Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth

- factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy." *Mol. Cell. Biol.* vol. 13, no. 8, pp. 4513–22, 1993.
220. R.P. Carstens, J. V Eaton, H.R. Krigman, P.J. Walther, and M.A. Garcia-Blanco: "Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in human prostate cancer." *Oncogene.* vol. 15, no. 25, pp. 3059–3065, 1997.
221. T. Amann, F. Bataille, T. Spruss, K. Dettmer, P. Wild, C. Liedtke, M. Mühlbauer, P. Kiefer, P.J. Oefner, C. Trautwein, A.-K. Bosserhoff, C. Hellerbrand, M. Mü, P. Kiefer, P.J. Oefner, C. Trautwein, A.-K. Bosserhoff, C. Hellerbrand, M. Mühlbauer, P. Kiefer, P.J. Oefner, C. Trautwein, A.-K. Bosserhoff, and C. Hellerbrand: "Reduced Expression of Fibroblast Growth Factor Receptor 2IIIb in Hepatocellular Carcinoma Induces a More Aggressive Growth." *Am. J. Pathol.* vol. 176, no. 3, pp. 1433–1442, 2010.
222. "The CB17/Icr-Prkdc scid /IcrIcoCrl Mouse: A Fox Chase SCID® (Severe Combined Immunodeficiency) Model." , 2009.
223. A. Faustino-Rocha, P.A. Oliveira, J. Pinho-Oliveira, C. Teixeira-Guedes, R. Soares-Maia, R.G. da Costa, B. Colaço, M.J. Pires, J. Colaço, R. Ferreira, and M. Ginja: "Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements." *Lab Anim. (NY).* vol. 42, no. 6, pp. 217–224, 2013.
224. V. Cerec, D. Glaise, D. Garnier, S. Morosan, B. Turlin, B. Drenou, P. Gripon, D. Kremendorf, C. Guguen-Guillouzo, and A. Corlu: "Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma hepaRG cell line through bipotent progenitor." *Hepatology.* vol. 45, no. 4, pp. 957–967, 2007.
225. R.R. Rikhi, K.K. Spady, R.I. Hoffman, M.S. Bateman, M. Bateman, and L.E. Howard: "Hepatoblastoma: A need for cell lines and tissue banks to develop targeted drug therapies." *Front. Pediatr.* vol. 4, no. MAR, pp. 22, 2016.
226. D. López-Terrada, S.W. Cheung, M.J. Finegold, and B.B. Knowles: "Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line." *Hum. Pathol.* vol. 40, no. 10, pp. 1512–1515, 2009.
227. B.B. Knowles, C.C. Howe, and D.P. Aden: "Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen." *Science (80-.).* vol. 209, no. 4455, pp. 497–499, 1980.
228. Y. Kinugasa, Y. Nakashima, S. Matsuo, K. Shono, S. Suita, and K. Sueishi: "Bile ductular proliferation as a prognostic factor in biliary atresia: An immunohistochemical assessment." *J. Pediatr. Surg.* vol. 34, no. 11, pp. 1715–1720, 1999.
229. H.A. Crosby, S. Hubscher, L. Fabris, R. Joplin, S. Sell, D. Kelly, and A.J. Strain: "Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6." *Am. J. Pathol.* vol. 152, no. 3, pp. 771–9, 1998.

230. P. Sancho-Bru, J. Altamirano, D. Rodrigo-Torres, M. Coll, C. Millán, J. José Lozano, R. Miquel, V. Arroyo, J. Caballería, P. Ginès, and R. Bataller: "Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis." *Hepatology*. vol. 55, no. 6, pp. 1931–1941, 2012.
231. C. Sun, X.-L. Jin, and J.-C. Xiao: "Oval cells in hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis: histological and ultrastructural study." *Histopathology*. vol. 48, no. 5, pp. 546–555, 2006.
232. T. Uede: "Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases." *Pathol. Int.* vol. 61, no. 5, pp. 265–280, 2011.
233. S. Utleý, D. James, N. Mavila, M. V Nguyen, C. Vendryes, S.M. Salisbury, J. Phan, and K.S. Wang: "Fibroblast growth factor signaling regulates the expansion of A6-expressing hepatocytes in association with AKT-dependent β -catenin activation." *J. Hepatol.* vol. 60, no. 5, pp. 1002–1009, 2014.
234. K. Wake: "Liver perivascular cells revealed by gold- and silver-impregnation methods and electron microscopy." *Biopathology of the Liver*. pp. 23–36. *Springer Netherlands*, Dordrecht (1988).
235. T. Kisseleva, H. Uchinami, N. Feirt, O. Quintana-Bustamante, J.C. Segovia, R.F. Schwabe, and D.A. Brenner: "Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis." *J. Hepatol.* vol. 45, no. 3, pp. 429–438, 2006.
236. S.L. Friedman: "Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver." *Physiol. Rev.* vol. 88, no. 1, pp. 125–172, 2008.
237. R. Weiskirchen, J. Weimer, S.K. Meurer, A. Kron, B. Seipel, I. Vater, N. Arnold, R. Siebert, L. Xu, S.L. Friedman, and C. Bergmann: "Genetic Characteristics of the Human Hepatic Stellate Cell Line LX-2." *PLoS One*. vol. 8, no. 10, 2013.
238. M.D.A. Gaça, X. Zhou, R. Issa, K. Kiriella, J.P. Iredale, and R.C. Benyon: "Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: Evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells." *Matrix Biol.* vol. 22, no. 3, pp. 229–239, 2003.
239. H. Reuveni, E. Flashner-Abramson, L. Steiner, K. Makedonski, R. Song, A. Shir, M. Herlyn, M. Bar-Eli, and A. Levitzki: "Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment." *Cancer Res.* vol. 73, no. 14, pp. 4383–4394, 2013.
240. S.-H. Jeong, H.H.-B. Kim, M.-C. Kim, J.H.J. Lee, J.H.J. Lee, J.-W.J.-M.J.-H.J.B. Kim, J.-W.J.-M.J.-H.J.B. Kim, W.-Y. Park, S.-Y. Kim, J.-W.J.-M.J.-H.J.B. Kim, H.H.-B. Kim, J.-W.J.-M.J.-H.J.B. Kim, H.-S. Choi, and D.-S. Lim: "Hippo-mediated suppression of IRS2/AKT signaling prevents hepatic steatosis and liver cancer." *J. Clin. Invest.* vol. 128, no. 3, pp. 1010–1025, 2018.
241. D. Yimlamai, C. Christodoulou, G.G. Galli, K. Yanger, B. Pepe-Mooney, B. Gurung, K. Shrestha, P. Cahan, B.Z. Stanger, and F.D. Camargo:

- “Hippo Pathway Activity Influences Liver Cell Fate.” *Cell*. vol. 157, no. 6, pp. 1324–1338, 2014.
242. F. Manzano-Núñez, M.J. Arámbul-Anthony, A. Galán Albiñana, A. Leal Tassias, C. Acosta Umanzor, I. Borreda Gascó, A. Herrera, J. Forteza Vila, D.J. Burks, and L.A. Noon: “Insulin resistance disrupts epithelial repair and niche-progenitor Fgf signaling during chronic liver injury.” *PLOS Biol*. vol. 17, no. 1, pp. e2006972, 2019.
243. J.M. Schnater, E. Bruder, S. Bertschin, T. Woodtli, C. de Theije, T. Pietsch, D.C. Aronson, D. von Schweinitz, W.H. Lamers, and E.S. Köhler: “Subcutaneous and intrahepatic growth of human hepatoblastoma in immunodeficient mice.” *J. Hepatol*. vol. 45, no. 3, pp. 377–386, 2006.
244. T. Oda, H. Tsuda, A. Scarpa, M. Sakamoto, and S. Hirohashi: “p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma.” *Cancer Res*. vol. 52, no. 22, pp. 6358–64, 1992.
245. D. Hanahan and R.A. Weinberg: “Hallmarks of cancer: The next generation,” <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>, (2011).
246. M.R. Schneider, F. Hiltwein, J. Grill, H. Blum, S. Krebs, A. Klanner, S. Bauersachs, C. Bruns, T. Longerich, D. Horst, L. Brandl, E. de Toni, A. Herbst, and F.T. Kolligs: “Evidence for a role of E-cadherin in suppressing liver carcinogenesis in mice and men.” *Carcinogenesis*. vol. 35, no. 8, pp. 1855–1862, 2014.
247. A. Brunet, A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis, and M.E. Greenberg: “Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.” *Cell*. vol. 96, no. 6, pp. 857–68, 1999.
248. G. Marchesini, M. Brizi, A.M. Morselli-Labate, G. Bianchi, E. Bugianesi, A.J. McCullough, G. Forlani, and N. Melchionda: “Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance.” *Am. J. Med*. vol. 107, no. 5, pp. 450–5, 1999.
249. T. Ota, T. Takamura, S. Kurita, N. Matsuzawa, Y. Kita, M. Uno, H. Akahori, H. Misu, M. Sakurai, Y. Zen, Y. Nakanuma, and S. Kaneko: “Insulin Resistance Accelerates a Dietary Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis.” *Gastroenterology*. vol. 132, no. 1, pp. 282–293, 2007.
250. G. Svegliati-Baroni, G. Faraci, L. Fabris, S. Saccomanno, M. Cadamuro, I. Pierantonelli, L. Trozzi, E. Bugianesi, M. Guido, M. Strazzabosco, A. Benedetti, and G. Marchesini: “Insulin resistance and necroinflammation drives ductular reaction and epithelial-mesenchymal transition in chronic hepatitis C.” *Gut*. vol. 60, no. 1, pp. 108–15, 2011.
251. A.M. Valverde, D.J. Burks, I. Fabregat, T.L. Fisher, J. Carretero, M.F. White, and M. Benito: “Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes.” *Diabetes*. vol. 52, no. 9, pp. 2239–2248, 2003.
252. N. Kubota, T. Kubota, S. Itoh, H. Kumagai, H. Kozono, I. Takamoto, T. Mineyama, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Ohsugi, T. Sasako, M. Moroi, K. Sugi, S. Kakuta, Y. Iwakura, T. Noda, S. Ohnishi, R. Nagai, K. Tobe, Y. Terauchi, K. Ueki, and T. Kadowaki: “Dynamic Functional Relay between

- Insulin Receptor Substrate 1 and 2 in Hepatic Insulin Signaling during Fasting and Feeding." *Cell Metab.* vol. 8, no. 1, pp. 49–64, 2008.
253. M.E. Guicciardi, H. Malhi, J.L. Mott, and G.J. Gores: "Apoptosis and necrosis in the liver." *Compr. Physiol.* vol. 3, no. 2, pp. 977–1010, 2013.
254. A.M. Valverde, I. Fabregat, D.J. Burks, M.F. White, and M. Benito: "IRS-2 mediates the antiapoptotic effect of insulin in neonatal hepatocytes." *Hepatology.* vol. 40, no. 6, pp. 1285–1294, 2004.
255. Z. Shu, S. Row, and W.-M. Deng: "Endoreplication: The Good, the Bad, and the Ugly." *Trends Cell Biol.* vol. 28, no. 6, pp. 465–474, 2018.
256. G. Gentric, C. Desdouets, and S. Celton-Morizur: "Hepatocytes Polyploidization and Cell Cycle Control in Liver Physiopathology." *Int. J. Hepatol.* vol. 2012, pp. 1–8, 2012.
257. G. Gentric and C. Desdouets: "Liver polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hide?" *Oncotarget.* vol. 6, no. 11, pp. 8430–1, 2015.
258. H. Danielsen, T. Lindmo, and A. Reith: "A method for determining ploidy distributions in liver tissue by stereological analysis of nuclear size calibrated by flow cytometric DNA analysis." *Cytometry.* vol. 7, no. 5, pp. 475–480, 1986.
259. T. Katsuda, M. Kawamata, K. Hagiwara, R. u. Takahashi, Y. Yamamoto, F.D. Camargo, and T. Ochiya: "Conversion of Terminally Committed Hepatocytes to Culturable Bipotent Progenitor Cells with Regenerative Capacity." *Cell Stem Cell.* vol. 20, no. 1, pp. 41–55, 2017.
260. S.K. Pandit, B. Westendorp, S. Nantasanti, E. van Liere, P.C.J. Tooten, P.W.A. Cornelissen, M.J.M. Toussaint, W.H. Lamers, and A. de Bruin: "E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells." *Nat. Cell Biol.* vol. 14, no. 11, pp. 1181–1191, 2012.
261. J.D. Coombes, M. Swiderska-Syn, L. Dollé, D. Reid, B. Eksteen, L. Claridge, M.A. Briones-Orta, S. Shetty, Y.H. Oo, A. Riva, S. Chokshi, S. Papa, Z. Mi, P.C. Kuo, R. Williams, A. Canbay, D.H. Adams, A.M. Diehl, L.A. Van Grunsven, S.S. Choi, and W.K. Syn: "Osteopontin neutralisation abrogates the liver progenitor cell response and fibrogenesis in mice." *Gut.* vol. 64, no. 7, pp. 1120–1131, 2015.
262. A. Villar-Lorenzo, P. Rada, E. Rey, P. Marañón, A.I. Arroba, B. Santamaría, J. Sáiz, F.J. Rupérez, C. Barbas, C. García-Monzón, Á.M. Valverde, and Á. González-Rodríguez: "Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficiency delays liver fibrosis associated to cholestatic injury." *Dis. Model. Mech.* vol. 12, no. 7, pp. dmm.038810, 2019.
263. T. Berg, C.B. Rountree, L. Lee, J. Estrada, F.G. Sala, A. Choe, J.M. Veltmaat, S. De Langhe, R. Lee, H. Tsukamoto, G.M. Crooks, S. Bellusci, and K.S. Wang: "Fibroblast growth factor 10 is critical for liver growth during embryogenesis and controls hepatoblast survival via β -catenin activation." *Hepatology.* vol. 46, no. 4, pp. 1187–1197, 2007.
264. M. Otranto, A.P. do Nascimento, and A. Monte-Alto-Costa: "Insulin resistance impairs cutaneous wound healing in mice." *Wound Repair Regen.* vol. 21, no. 3, pp. 464–472, 2013.

265. S. Werner, M. Breeden, G. Hübner, D.G. Greenhalgh, and M.T. Longaker: "Induction of Keratinocyte Growth Factor Expression Is reduced and Delayed During Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse." *J. Invest. Dermatol.* vol. 103, no. 4, pp. 469–473, 1994.
266. P. Hiebert, M.S. Wietecha, M. Cangkrama, E. Haertel, E. Mavrogonatou, M. Stumpe, H. Steenbock, S. Grossi, H.-D.D. Beer, P. Angel, J. Brinckmann, D. Kletsas, J. Dengjel, and S. Werner: "Nrf2-Mediated Fibroblast Reprogramming Drives Cellular Senescence by Targeting the Matrisome." *Dev. Cell.* vol. 46, no. 2, pp. 145-161.e10, 2018.
267. R. Issa, E. Williams, N. Trim, T. Kendall, M.J.P. Arthur, J. Reichen, R.C. Benyon, and J.P. Iredale: "Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors." no. 2, pp. 548–557, 2001.
268. S. Paku, J. Schnur, P. Nagy, and S.S. Thorgeirsson: "Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver." *Am. J. Pathol.* vol. 158, no. 4, pp. 1313–1323, 2001.
269. A. Walker, E. Nissen, and A. Geiger: "Migratory, metabolic and functional alterations of fibrocytes in type 2 diabetes." *IUBMB Life.* vol. 70, no. 11, pp. 1122–1132, 2018.
270. F. Magdaleno, X. Ge, H. Fey, Y. Lu, H. Gaskell, C.C. Blajszczak, C. Aloman, M.I. Fiel, and N. Nieto: "Osteopontin deletion drives hematopoietic stem cell mobilization to the liver and increases hepatic iron contributing to alcoholic liver disease." *Hepatol. Commun.* vol. 2, no. 1, pp. 84–98, 2018.
271. M. Inoue and M.L. Shinohara: "Intracellular osteopontin (iOPN) and immunity." *Immunol. Res.* vol. 49, no. 1–3, pp. 160–172, 2011.
272. X. Fan, C. He, W. Jing, X. Zhou, R. Chen, L. Cao, M. Zhu, R. Jia, H. Wang, Y. Guo, and J. Zhao: "Intracellular Osteopontin Inhibits Toll-like Receptor Signaling and Impedes Liver Carcinogenesis." *Cancer Res.* vol. 75, no. 1, pp. 86–97, 2015.
273. Y. Hirashima, K. Tsuruzoe, S. Kodama, M. Igata, T. Toyonaga, K. Ueki, C.R. Kahn, and E. Araki: "Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." *J. Endocrinol.* vol. 179, no. 2, pp. 253–66, 2003.
274. K.-S. Jeng, C.-F. Chang, W.-J. Jeng, I.-S. Sheen, and C.-J. Jeng: "Heterogeneity of hepatocellular carcinoma contributes to cancer progression." *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* vol. 94, no. 3, pp. 337–347, 2015.
275. J.G. Jackson, X. Zhang, T. Yoneda, and D. Yee: "Regulation of breast cancer cell motility by insulin receptor substrate-2 (IRS-2) in metastatic variants of human breast cancer cell lines." *Oncogene.* vol. 20, no. 50, pp. 7318–7325, 2001.
276. F. Hakuno, T. Fukushima, Y. Yoneyama, H. Kamei, A. Ozoe, H. Yoshihara, D. Yamanaka, T. Shibano, M. Sone-Yonezawa, B.-C. Yu, K. Chida, and S.-I. Takahashi: "The Novel Functions of High-Molecular-Mass Complexes Containing Insulin Receptor Substrates in Mediation

- and Modulation of Insulin-Like Activities: Emerging Concept of Diverse Functions by IRS-Associated Proteins." *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. vol. 6, 2015.
277. M.G. Mendez, S.-I. Kojima, and R.D. Goldman: "Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition." *FASEB J.* vol. 24, no. 6, pp. 1838–1851, 2010.
278. J. Haynes, J. Srivastava, N. Madson, T. Wittmann, and D.L. Barber: "Dynamic actin remodeling during epithelial–mesenchymal transition depends on increased moesin expression." *Mol. Biol. Cell.* vol. 22, no. 24, pp. 4750–4764, 2011.
279. Y. Zhang, X. Sun, X. Sun, F. Meng, M. Hu, X. Li, W. Li, X.K. Wu, M. Brännström, R. Shao, and H. Billig: "Molecular characterization of insulin resistance and glycolytic metabolism in the rat uterus." *Sci. Rep.* vol. 6, no. 1, pp. 30679, 2016.
280. J. Wu, J. Chen, Y. Xi, F. Wang, H. Sha, L. Luo, Y. Zhu, X. Hong, and S. Bu: "High glucose induces epithelial-mesenchymal transition and results in the migration and invasion of colorectal cancer cells." *Exp. Ther. Med.* vol. 16, no. 1, pp. 222–230, 2018.
281. G. Giannelli, P. Koudelkova, F. Dituri, and W. Mikulits: "Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma," <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27212245>, (2016).
282. J. Chen, J. Zhao, R. Ma, H. Lin, X. Liang, and X. Cai: "Prognostic significance of E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis." *PLoS One.* vol. 9, no. 8, pp. e103952, 2014.
283. K. Fujita, H. Iwama, H. Miyoshi, J. Tani, K. Oura, T. Tadokoro, T. Sakamoto, T. Nomura, A. Morishita, H. Yoneyama, and T. Masaki: "Diabetes mellitus and metformin in hepatocellular carcinoma." *World J. Gastroenterol.* vol. 22, no. 27, pp. 6100, 2016.
284. C.-H. Tseng: "Metformin and risk of hepatocellular carcinoma in patients with type 2 diabetes." *Liver Int.* vol. 38, no. 11, pp. 2018–2027, 2018.
285. H. Xu, Y. Zhou, Y. Liu, J. Ping, Q. Shou, F. Chen, and R. Ruo: "Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin-resistant rats of NASH and cirrhosis." *J. Endocrinol.* vol. 229, no. 2, pp. 133–144, 2016.
286. A.C. Ferretti, F. Hidalgo, F.M. Tonucci, E. Almada, A. Pariani, M.C. Larocca, and C. Favre: "Metformin and glucose starvation decrease the migratory ability of hepatocellular carcinoma cells: targeting AMPK activation to control migration." *Sci. Rep.* vol. 9, no. 1, pp. 2815, 2019.
287. V.J.M. Nies, G. Sancar, W. Liu, T. van Zutphen, D. Struik, R.T. Yu, A.R. Atkins, R.M. Evans, J.W. Jonker, and M.R. Downes: "Fibroblast Growth Factor Signaling in Metabolic Regulation." *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. vol. 6, no. January, 2016.
288. N. Zheng, W. Wei, and Z. Wang: "Emerging roles of FGF signaling in hepatocellular carcinoma." *Transl. Cancer Res.* vol. 5, no. 1, pp. 1–6, 2016.

Capítulo 8

Anexos

RESEARCH ARTICLE

Insulin resistance disrupts epithelial repair and niche-progenitor Fgf signaling during chronic liver injury

Fátima Manzano-Núñez^{1,2}✉, María José Arámbul-Anthony^{1,2}✉, Amparo Galán Albiñana²✉, Aranzazu Leal Tassias², Carlos Acosta Umanzor^{1,2}, Irene Borreda Gascó³, Antonio Herrera², Jerónimo Forteza Vila^{2,3}, Deborah J. Burks^{1,2}, Luke A. Noon^{1,2}* 

1 CIBERDEM (Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas), Madrid, Spain, **2** Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain, **3** Instituto Valenciano de Patología, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Valencia, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

* lnoon@cipf.es



 OPEN ACCESS

Citation: Manzano-Núñez F, Arámbul-Anthony MJ, Galán Albiñana A, Leal Tassias A, Acosta Umanzor C, Borreda Gascó I, et al. (2019) Insulin resistance disrupts epithelial repair and niche-progenitor Fgf signaling during chronic liver injury. *PLoS Biol* 17 (1): e2006972. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972>

Academic Editor: Paul Titchenell, University of Pennsylvania, United States of America

Received: July 30, 2018

Accepted: January 8, 2019

Published: January 29, 2019

Copyright: © 2019 Manzano-Núñez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Underlying data from the main figures can be found in [S1 Data](#). For supporting figures, underlying data are available in [S2 Data](#).

Funding: Generalitat Valenciana <http://www.ceice.gva.es/ca/web/ciencia> (grant number ACIF/2016/020). Received by FMN. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Insulin provides important information to tissues about feeding behavior and energy status. Defective insulin signaling is associated with ageing, tissue dysfunction, and impaired wound healing. In the liver, insulin resistance leads to chronic damage and fibrosis, but it is unclear how tissue-repair mechanisms integrate insulin signals to coordinate an appropriate injury response or how they are affected by insulin resistance. In this study, we demonstrate that insulin resistance impairs local cellular crosstalk between the fibrotic stroma and bipotent adult liver progenitor cells (LPCs), whose paracrine interactions promote epithelial repair and tissue remodeling. Using insulin-resistant mice deficient for insulin receptor substrate 2 (*Irs2*), we highlight dramatic impairment of proregenerative fibroblast growth factor 7 (Fgf7) signaling between stromal niche cells and LPCs during chronic injury. We provide a detailed account of the role played by *IRS2* in promoting Fgf7 ligand and receptor (Fgfr2-IIIb) expression by the two cell compartments, and we describe an insulin/*IRS2*-dependent feed-forward loop capable of sustaining hepatic re-epithelialization by driving *FGFR2-IIIb* expression. Finally, we shed light on the regulation of *IRS2* and *FGF7* within the fibrotic stroma and show—using a human coculture system—that *IRS2* silencing shifts the equilibrium away from paracrine epithelial repair in favor of fibrogenesis. Hence, we offer a compelling insight into the contribution of insulin resistance to the pathogenesis of chronic liver disease and propose *IRS2* as a positive regulator of communication between cell types and the transition between phases of stromal to epithelial repair.

Author summary

“Insulin resistance” is a chronic state of reduced sensitivity to the effects of circulating insulin. It is one of the hallmarks of metabolic disease and a consequence of ageing, but insulin resistance is also observed in otherwise healthy individuals after severe trauma/

Generalitat Valenciana <http://www.ceice.gva.es/ca/web/ciencia> (grant number ACIF/2018/287). Received by MJAA. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Centro de Investigación Príncipe Felipe <http://www.cipf.es> (grant number P.I.04/2017). Received by MJAA. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. MINECO <http://www.mineco.gob.es> (grant number BFU2014-58686-P). Received by LAN. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. MINECO <http://www.mineco.gob.es> (grant number RYC-2012-11700). Received by LAN. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. MINECO <http://www.mineco.gob.es> (grant number SAF2011-28331). Received by DJB and LAN. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. European Commission https://ec.europa.eu/eurostat/cros/content/research-projects-under-framework-programmes-0_en (grant number FP7 HEALTH-F5-2008-223317). Received by DJB. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: AKT, Protein kinase B; ALT, alanine transaminase; APOA2, apolipoprotein A2; AST, aspartate transaminase; AU, arbitrary unit; c-CASP3, cleaved caspase 3; CEEA, Comité Ético de Experimentación Animal; cMyc, MYC proto-oncogene; COL1A1, Collagen 1A1; COL3A1, type III collagen; Ctgf, Connective tissue growth factor; CYP3A4, cytochrome P450 3A4; db/db, diabetic leptin-deficient mice; DDC, 3,5-diethoxycarboxynf-1,4-dihydrocollidine; DR, ductular reaction; E-cad, E-cadherin; EF1, Human elongation factor-1 alpha promoter; EpcAM, epithelial cell adhesion molecule; ERK, extracellular signal-regulated kinase; Fc, Fragment crystallizable region; Fgfr2-IIIb, Fibroblast growth factor receptor 2 isoform IIIb; Fgf7, fibroblast growth factor 7; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; Gtsp, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescent protein; hHSC, human HSC; HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4- α ; HSC, hepatic stellate cell; HSPA1B, heat shock 70 kDa protein 1B; IGF-1, Insulin-like growth factor 1; i.p., intraperitoneal; Kit, Proto-oncogene c-kit; Irs2, insulin receptor substrate 2; Lenti-mlrs2, murine

hemorrhage/sepsis, suggesting that it plays a physiological role in modulating the response to injury. Defective insulin signals are linked to impaired wound healing, yet it remains unclear how systemic changes affect locally the cells that coordinate tissue repair. In this study, we used the liver to assess how insulin resistance impacts the injury response in mice. We provide proof of concept that insulin signals are locally integrated by the fibrotic microenvironment surrounding the adult liver stem cells during chronic injury, resulting in the increased expression of epithelial repair signals. Insulin also simultaneously primes stem cells to respond to these stromal growth factors, leading to an increased participation in epithelial repair. Insulin resistance disrupts this local paracrine circuit, resulting in a blunted epithelial response to chronic injury that exacerbates tissue damage. Our model highlights a potential role for insulin in switching the hepatic injury response from a stromal repair process to an epithelial repair process. To our knowledge, our data provide a new perspective from which to reassess how insulin resistance influences fibrosis, wound healing, and tissue remodeling during injury.

Introduction

Successful wound healing requires coordination between stromal and epithelial cell compartments. Stromal activation lays the groundwork for epithelial repair, producing the appropriate microenvironment and growth factors to facilitate proliferation and remodeling of epithelia [1]. Metabolic disease is associated with a spectrum of chronic comorbidities, including cardiovascular disease and liver disease, as well as defects in wound healing [2,3]. However, it remains unclear whether insulin resistance affects injury-repair mechanisms in target organs such as the liver, which are otherwise at the forefront of insulin's metabolic actions. The liver parenchyma is highly regenerative and can undergo dramatic tissue remodeling to maintain parenchymal function in the face of chronic injury. Such remodeling is shaped in part by the activation of perisinusoidal cells, such as hepatic stellate cells (HSCs), and periportal mesenchymal cells, such as portal fibroblasts (PFs) [4], that expand to produce a fibrotic milieu capable of directing epithelial repair but that also contribute to long-term risk of scarring/fibrosis and hepatic dysfunction. To date, the impact of insulin resistance on the fibrotic stroma, including how it affects the ability of mesenchymal cells to communicate repair signals to the hepatic epithelia, remains unknown [5].

In this study, we investigate how insulin resistance affects stromal-epithelial repair mechanisms in the liver during chronic injury by knockout of insulin receptor substrate 2 (*Irs2*), a key adaptor protein that couples the insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors to intracellular signaling pathways. *Irs2*^{-/-} mice have normal liver development but severe peripheral insulin resistance that leads to late-onset type II diabetes [6]. IRS2 is the principle regulator of insulin sensitivity in hepatocytes [7], cooperating closely with IRS1 to mediate the metabolic response to feeding [8]. Aberrant IRS2 expression has been associated with hepatic insulin resistance [9] and progression of chronic liver diseases, including nonalcoholic steatohepatitis (NASH) [10], hepatitis C [11], and hepatocellular carcinoma [12], in which increased IRS2 expression is associated with proliferation, increased cell survival, and disruption of cell-fate signals controlling hepatocyte metaplasia and the expansion of bipotent liver progenitor cells (LPCs) [13,14]. Nevertheless, it remains to be established whether IRS2 plays any role in hepatic wound healing.

Fibroblast growth factor 7 (FGF7) is an important paracrine regulator of tissue morphogenesis during development [15,16] and during re-epithelialization of cutaneous lesions [17]. In

Irs2 transgene not targeted by human-gene-silencing construct; LPC, liver progenitor cell; MitoC, mitomycin C; Mmp9, Matrix metalloproteinase 9; mRNA, messenger RNA; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Myc, MYCO proto-oncogene; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; NPC, nonparenchymal cell; NT-157, allosteric inhibitor of IRS proteins 1 and 2; OD, optical density; pAPOA2, *APOA2* promoter; P-Erk, phosphorylated Erk (Tyrosine 204); PF, portal fibroblast; pHSC, primary human HSC; pIRS2, *Irs2* promoter; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; Ptpcr, protein tyrosine phosphatase, receptor type C gene encoding CD45 cell surface antigen; rhFGFR2-IIIb/rhIIIb-Fc, recombinant human Fgfr2; rFgf7, recombinant Fgf7; rhFGF7, recombinant human Fgf7; RPL19, Ribosomal Protein L19; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; RU, relative unit; shIRS2, shRNA-targeting IRS2; sh-Luc, control luciferase; shRNA, short hairpin RNA; SPF, specific-pathogen-free; Spp1, secreted phosphoprotein 1; TAZ, Tafazzin; TBIL, total bilirubin; Tgfb, transforming growth factor beta; Thy1, Thy-1 cell surface antigen; Timp1, tissue inhibitor of metalloproteinase 1; WT, wild type; YAP, Yes-associated protein; α Sma/Acta2, alpha-smooth muscle actin.

the liver, FGF7 is expressed by HSCs [18] and Thy1 T-cell surface antigen (Thy1)-expressing PFs [4,19] that produce stromal niche signals to drive epithelial remodeling in response to chronic injury. Fgf7-knockout mice have reduced survival due to liver failure when fed a hepatotoxic diet containing 0.1% 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) because they are unable to support the expansion of adult liver stem cells/LPCs required for the adaptive response to injury [19,20]. LPCs are bipotent epithelial precursors capable of differentiating into cholangiocytes or parenchymal hepatocytes [21]. During DDC liver injury, they proliferate to form duct-like structures within periportal tracts, surrounded by fibrotic stromal cells expressing Fgf7. LPCs express Fgfr2-IIIb [19], the receptor for Fgf7, which is exclusively expressed in epithelia. Amplification of Fgfr2-IIIb occurs in LPCs within the expanding nonparenchymal cell (NPC) fraction during DDC injury [22], and potentiation of Fgfr2-IIIb signaling by overexpression of Fgf7 [19] or Fgf10 [22] drives the dramatic expansion of LPCs and immature hepatocytes within the liver. Fgf7/Fgfr2-IIIb interactions therefore communicate proregenerative signals between stroma and epithelia, with a range that is strictly limited to local paracrine effects because of the high affinity of Fgf7 for heparin-sulphate proteoglycans in the extracellular matrix and neighboring cells [23].

Usually, insulin signals are systemic, but in model organisms such as *Drosophila*, they also coordinate short-range communication between niche cells and stem cells [24]. This allows for tissue-specific responses to changing environmental conditions [25]. In this study, we show that integration of insulin/IRS2 signals by HSCs and LPCs promotes paracrine crosstalk between the fibrotic stroma and LPCs via Fgf7. We demonstrate that loss of *Irs2* has a negative impact on hepatic wound healing, reducing the capacity of HSCs and LPCs to produce and respond to Fgf7 respectively.

Results

The response to DDC liver injury is blunted in *Irs2*^{-/-} mice

We examined how *Irs2* deletion affected the chronic liver-injury response in adult mice during 0.1% DDC feeding, in which paracrine Fgf7 signaling plays a central role in coordinating the LPC response and epithelial repair (Fig 1A). Transient induction of *Irs2* occurred in wild-type (WT) livers on day 7 of the DDC diet (Fig 1B), correlating with a peak in liver injury as judged by serum aspartate/alanine transaminase (AST/ALT) activity (Fig 1C). No differences in serum bilirubin or liver tissue bile acid levels were observed between the two groups (Fig 1D), and initial induction of AST/ALT was comparable on day 7, suggesting the cholestatic effects of the DDC diet were equivalent in WT and *Irs2*^{-/-} mice. However, past day 7, serum transaminases were reduced in controls (days 14–21), whereas in the *Irs2*^{-/-} mice, they remained significantly elevated (Fig 1C), suggesting a role for *Irs2* in the attenuation of liver damage.

Fgf7 expression and LPC expansion are impaired in *Irs2*^{-/-} mice

We observed robust Fgf7 activation in WT livers (days 14–21), which coincided with the significant reductions in AST/ALT recorded at these time points (Figs 2A and 1B), consistent with the proregenerative role played by Fgf7 in the response to DDC injury. Fgf7-expressing stromal cells surrounded duct-like structures in periportal tracts that stained positive for LPC markers including epithelial cell adhesion molecule (EpcAM) and osteopontin (secreted phosphoprotein 1, Spp1) (Fig 2B). In *Irs2*^{-/-} mice, we observed a striking failure to induce Fgf7 during DDC feeding (Fig 2A). We also observed modest but significant down-regulation of *Fgf10* but no change in *Fgf22* (S1 Fig), suggesting other stromal Fgfr2-IIIb ligands were also affected. Failure to induce Fgf7 expression in *Irs2*^{-/-} livers occurred in parallel with a delay in the overall increase in hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4 α)-NPCs (S2A and S2B Fig), as well as a

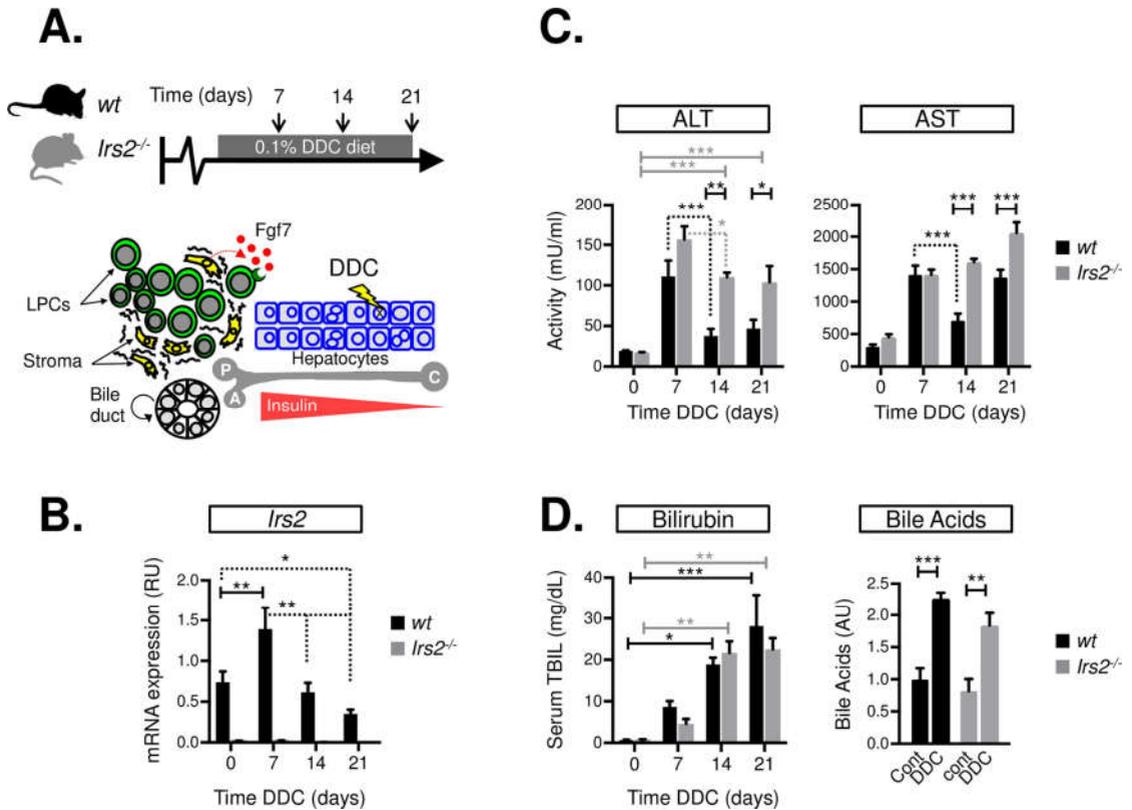


Fig 1. *Irs2* is required for the amelioration of liver injury during DDC feeding. (A) Schematic showing DDC feeding protocol (upper panel) and the cellular impact of chronic DDC feeding on the liver (lower panel): Hepatocellular damage is accompanied by expansion of bipotent LPCs and fibrotic stroma in periportal tracts, where cells are exposed to high concentrations of insulin. Portal vein (P), Hepatic artery (A), and Central vein (C). (B) Whole-liver mRNA levels of *Irs2* in WT and *Irs2*^{-/-} mice during a time course of DDC feeding based on RT-qPCR analysis (n = 3–8). Expression data are presented in RUs normalized to ribosomal protein L19 (*Rpl19*). (C) Liver injury measured by serum transaminase levels AST/ALT during a time course of DDC feeding in WT and *Irs2*^{-/-} mice (n = 4). (D) Equivalent levels of cholestasis in WT and *Irs2*^{-/-} mice during DDC injury. Left—serum levels of TBIL during a time course of DDC feeding (n = 3). Right—Whole-liver tissue bile acid levels prior to (Cont) and after 21 days of DDC feeding (DDC) (n = 4). Data information: underlying data are available in [S1 Data](#). Values plotted as mean ± SEM; Two-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using Bonferroni test *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001. Dotted lines indicate statistically significant decrease with time. ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; Cont, control; DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; Fgf7, fibroblast growth factor 7; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; LPC, liver progenitor cell; mRNA, messenger RNA; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; RU, relative unit; TBIL, total bilirubin; WT, wild type.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972.g001>

specific delay in the induction of LPC genes *EpCAM* and *osteopontin/Spp1* (Fig 2A) and decreased ductular immunostaining in periportal areas (Fig 2B). Proliferative expansion of cells expressing osteopontin/Spp1 was also diminished (day 14), as judged by Ki67 immunostaining (Fig 2C), and ducts containing LPCs appeared disorganized (Fig 2B).

Parenchymal cell depletion was exacerbated in *Irs2*^{-/-} mice during DDC feeding, based on quantification of HNF4α+ hepatocyte nuclei (S2A and S2C Fig). This was characterized by failure to sustain numbers of so-called "small" hepatocytes (nuclear area < 75 μm²), parenchymal cells attributed with the greatest regenerative potential (S2D Fig) [26,27]. Using an original methodology to estimate ploidy (described in Materials and methods), we analyzed changes in

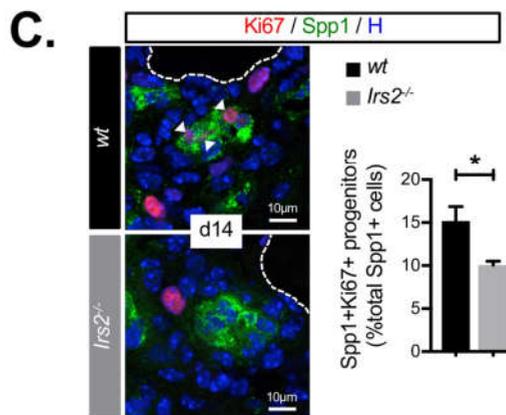
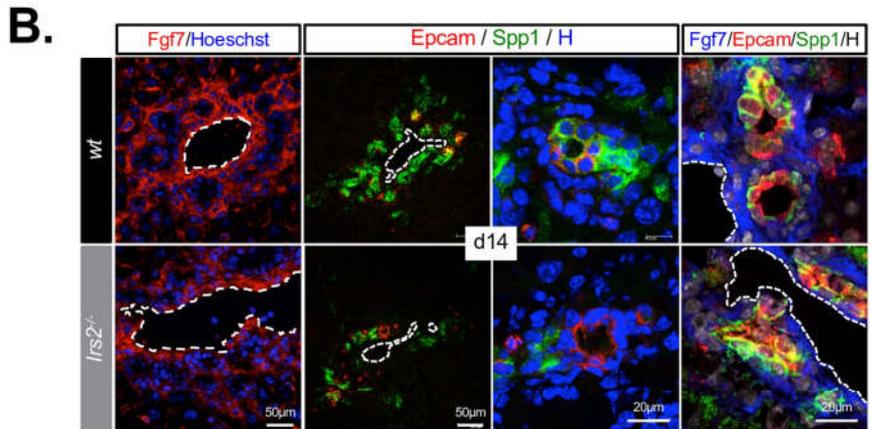
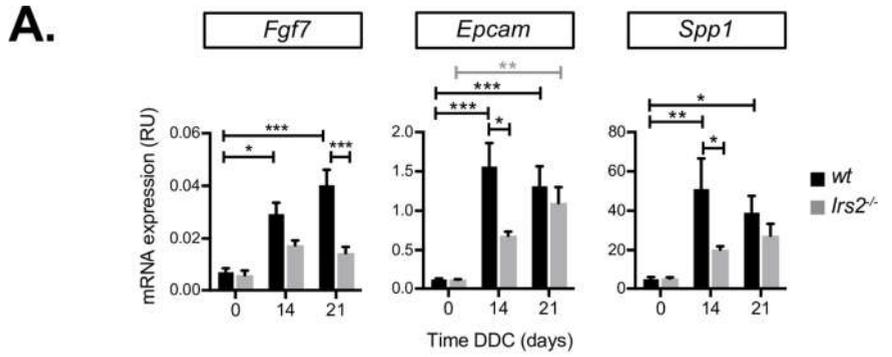


Fig 2. Fgf7 induction and the LPC response are impaired in *Irs2*^{-/-} mice during DDC injury. (A) RT-qPCR analysis of indicated genes in whole-liver mRNA from WT and *Irs2*^{-/-} mice during a time course of DDC feeding (*n* = 6–8). (B) Immunofluorescence staining for Fgf7-expressing stroma and EpCAM-Osteopontin/Spp1-expressing LPC ducts in livers of WT and *Irs2*^{-/-} mice after 14 days of DDC feeding. Dotted lines indicate portal vein (H = Hoechst). (C) Quantification of LPC proliferation in livers of WT and *Irs2*^{-/-} mice on DDC day 14. (left) Spp1/Ki67 immunofluorescence staining highlighting proliferation of cells within ducts (arrow heads). Dotted lines indicate portal vein. (Right) Quantification by INcell analysis of Spp1 cell proliferation (*n* = 6, total of 6.47×10^4 Spp+ cells analyzed). Data information: underlying data are available in [S1 Data](#). Values plotted as mean + SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001. (A) Two-way ANOVA was used to compare means. Significance *P* values were calculated using Tukey's multiple comparison test. (C) Unpaired Student *t* test. DDC, 3,5-dithiobis(2-nitrophenyl)-1,4-dihydrocollidine; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; Fgf7, fibroblast growth factor 7; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; LPC, liver progenitor cell; mRNA, messenger RNA; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; RU, relative unit; Spp1, secreted phosphoprotein 1; WT, wild type.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972.g002>

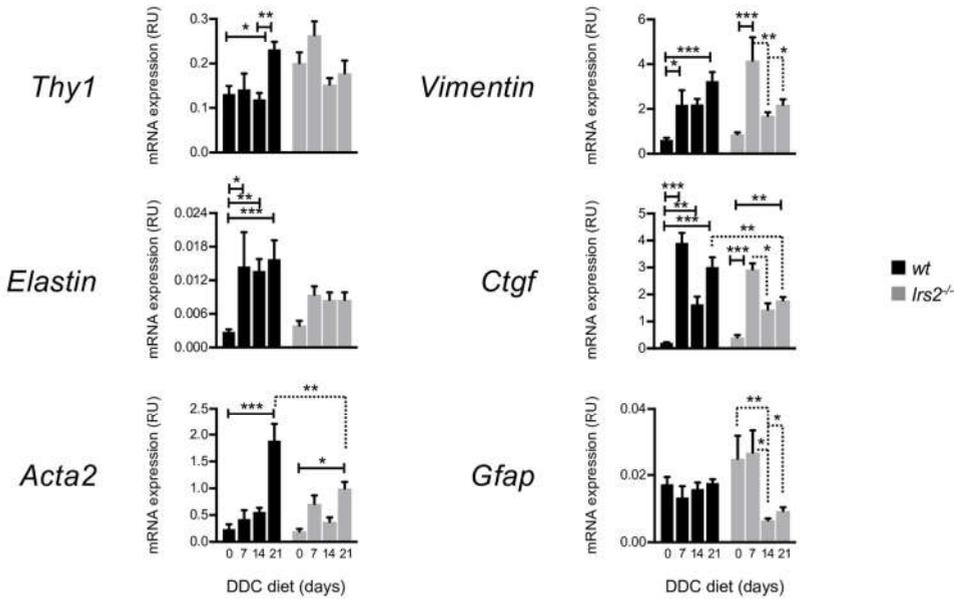
hepatocyte DNA content in whole-liver tissue sections during DDC injury ([S3A and S3B Fig](#)). We found that the population of small hepatocytes with approximately 2n DNA content (2c) was increased in the WT group during the later stages of DDC injury (days 14–21, 1.6-fold *P* = 0.0335), consistent with a regenerative response ([S3C Fig](#)). During the same period, 2c hepatocytes declined in numbers in the livers of *Irs2*^{-/-} mice, indicating a failure to maintain parenchymal tissue homeostasis during chronic injury.

Altered profile of stromal activation in *Irs2*^{-/-} mice highlights aberrant response by Fgf7-expressing mesenchymal cells

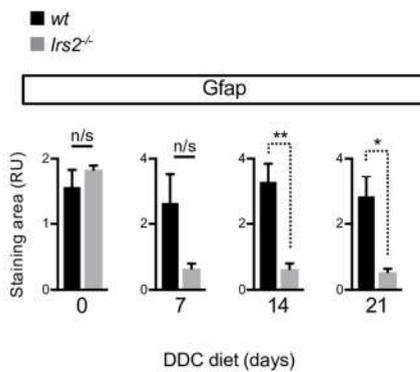
In rodent and human livers, Fgf7 is expressed by HSCs during injury [18]. However, in the DDC mouse model, resident Thy1+ PFs have also been identified as important Fgf7-expressing mesenchymal cells and first responders to cholestatic liver damage [4,19]. Profiling of stromal gene expression in WT mice during DDC injury revealed sustained induction of PF/myofibroblast genes *Thy1*, *Elastin*, *Vimentin*, and alpha-smooth muscle actin (α Sma/*Acta2*), together with profibrogenic gene Connective tissue growth factor (*Ctgf*) ([Fig 3A](#)), whereas in *Irs2*^{-/-} mice, the activation profile of these genes was either blunted (*Thy1*, *Elastin*), less sustained (*Acta2*), or down-regulated from day 7 (*Vimentin*, *Ctgf*, and *Thy1*), suggesting a negative impact on the PF/myofibroblast population within the activated stroma. Interestingly, we also observed a decline in expression of the HSC marker glial fibrillary acidic protein (*Gfap*) from day 7 ([Fig 3A](#)), coincident with significant reductions in mesenchymal marker *Vimentin* and in *Ctgf*, a regulator of epithelial mesenchymal transition. From day 7, a significant decrease in *Gfap* immunostaining in *Irs2*^{-/-} livers was also observed ([Fig 3B and 3C](#)). This reduction in *Gfap*+ cells was apparent throughout the parenchyma and in periportal areas where it colocalized with Fgf7-expressing stroma ([Fig 3C](#)).

In contrast with the results of messenger RNA (mRNA) analysis ([Fig 3A](#)), immunostaining for Thy1, Elastin, and α SMA tended towards increased expression in *Irs2*^{-/-} livers on day 21, while mesenchymal intermediate filament protein vimentin was similarly induced ([S4 Fig](#)). Thy1+ stroma were observed in close contact with Spp1+/Epcam+ LPCs in both WT and *Irs2*^{-/-} mice as previously described [19] ([S5A Fig](#)), and a similar relationship between α Sma-expressing myofibroblasts and Spp1+ LPCs was also apparent in both groups ([S5B Fig](#)), indicating that failure to induce Fgf7 was not due to the lack of myofibroblast-like cells in the LPC niche of *Irs2*^{-/-} livers per se. In contrast, lack of contact between *Gfap*+ HSCs and LPCs was observed in *Irs2*^{-/-} livers ([S5B Fig](#)). Hence, failure to induce Fgf7 coincided with an overall loss of *Gfap*+ HSCs and loss of association between HSCs and LPCs in portal tracts, whereas we were unable to confirm that stromal PFs were negatively influenced by *Irs2* deletion. However, increased Thy1 staining in *Irs2*^{-/-} livers was partially attributable to the increase in markers of bone-marrow-derived cells; cd45/protein tyrosine phosphatase receptor type C gene

A.



B.



C.

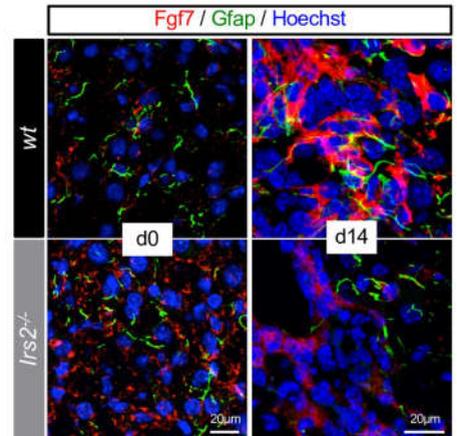


Fig 3. The stromal response to DDC injury in *Irs2*^{-/-} mice is characterized by loss of HSCs and blunted activation of PF/myofibroblast gene expression. (A) RT-qPCR analysis of whole-liver mRNA during a time course of DDC injury using a panel of genes associated with Fgf7-expressing stromal cells: PFs (*Thy1*, *Elastin*), myofibroblasts (*Acta2*, *Vimentin*, *Ctgf*), and HSCs (*Gfap*). In livers of *Irs2*^{-/-} mice, we observed impaired or less sustained induction of PF/myofibroblast markers (*Thy1*, *Elastin*, *Acta1*) combined with a tendency for all genes (except *Elastin*) to be down-regulated from day 7 in parallel with loss of *Gfap* ($n = 3-8$). (B) Gfap⁺ HSCs were depleted in *Irs2*^{-/-} mice during DDC injury.

Quantification of Gfap immunostaining in the livers of WT and *Irs2*^{-/-} mice during the time course of DDC injury (*n* = 3–4). (C) Loss of Gfap + HSCs in *Irs2*^{-/-} mice parallels the failure to induce Fgf7 in periportal areas. Confocal immunofluorescence images showing reduced Gfap/Fgf7 double staining in *Irs2*^{-/-} mice after 14 days of DDC feeding (day 14). Data information: underlying data are available in [S1 Data](#). Data are presented as mean + SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001. (A) Two-way ANOVA was used to compare means. Significance *P* values were calculated using Tukey's multiple comparison test. (B) Unpaired Student *t* test. *Acta1*, alpha-smooth muscle actin; *Ctgf*, Connective tissue growth factor; DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; Fgf7, fibroblast growth factor 7; Gfap, glial fibrillary acidic protein; HSC, hepatic stellate cell; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; mRNA, messenger RNA; PF, portal fibroblast; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; RU, relative unit; WT, wild type.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972.g003>

encoding CD45 cell surface antigen (*Ptprc*) and cd117/Proto-oncogene c-kit (*Kit*), on day 7, which coincided with early activation of matrix remodeling factors (tissue inhibitor of metalloproteinase 1 [*Timp1*] and Matrix metalloproteinase 9 [*Mmp9*]) and MYC proto-oncogene (*cMyc*) and a dramatic early peak in transforming growth factor beta (*Tgfβ*)—a master regulator of fibrogenesis and mobilizer of circulating populations of collagen-expressing fibrocytes [28] (S6A Fig). Consistent with this, we also observed greater Thy1/Cd45 colocalization in *Irs2*^{-/-} livers on day 21 (S6B Fig), suggesting more extensive incorporation of bone-marrow-derived cells into the stromal niche. Furthermore, the numbers of Cd3+ T cells were also increased in *Irs2*^{-/-} livers on day 21 (S6C Fig), suggesting that Thy1+ cells from the bone marrow, whose expression of Fgf7 is lower than that of resident Thy1+ fibroblast populations [4], played a more significant role in the altered stromal response to DDC injury in *Irs2*^{-/-} mice.

Survival of Fgf7-expressing HSCs is *Irs2* dependent

We assessed the survival of Fgf7-expressing stroma during the early phase of DDC injury, when *Irs2* was maximally expressed in WT livers (day 7) and before significant loss of Gfap + HSCs was observed. Analysis of cleaved caspase 3 (c-Casp3) staining revealed a 3.0-fold (*P* = 0.0395) increase in apoptosis in Fgf7-expressing cells in *Irs2*^{-/-} livers at this time, confirming accelerated loss of this subpopulation within the fibrotic stroma during injury (Fig 4A). In order to test the hypothesis that *IRS2* promoted survival of Fgf7-expressing stroma, we performed stable knockdown of *IRS2* in the human HSC (hHSC) cell line LX-2 using lentiviral short hairpin RNA (shRNA) (Fig 4B and 4C). Silencing of *IRS2* had no direct impact on LX-2 cell viability, Fgf7 expression, or fibrogenic gene expression under standard culture conditions (S7 Fig). However, exposure to cytotoxic alkylating agent mitomycin C (MitoC) resulted in cell-cycle arrest and apoptotic cell death, during which *IRS2* promoted survival (Fig 4B) by significantly reducing P53 expression and caspase 3 cleavage (Fig 4C). We confirmed a positive role for *IRS2* in protecting HSCs from apoptosis by treating primary hHSC cultures with an allosteric inhibitor of IRS proteins (NT-157). NT-157 triggers proteasomal depletion of *IRS1/IRS2* [29], which resulted in dramatic activation of P53/caspase 3 cleavage and apoptosis in hHSCs (Fig 4D). We therefore concluded that *IRS2* plays an indirect role in driving Fgf7 expression during DDC injury by protecting HSCs from apoptosis.

Irs2 promotes epithelial sensitivity to Fgf7 and hepatic re-epithelialization during injury

In addition to the defect in stromal Fgf7 expression, *Irs2* deletion also had a negative impact on sensitivity to Fgf7 in epithelial cells. Stromal Fgf7 drives re-epithelialization during skin wound healing, signaling exclusively to cells expressing the epithelial isoform of Fgfr2 (Fgfr2-IIIb), which is highly expressed by LPCs during DDC feeding [19]. In *Irs2*^{-/-} livers, we noted a sharp decline of *Fgfr2-IIIb* expression in the latter stages of DDC feeding (days 14–21), which contrasted with the steady increase in *Fgfr2-IIIb* observed in the WT group (Fig 5A). In WT mice, we observed increased antibody staining for Fgfr2 in periportal ducts surrounded

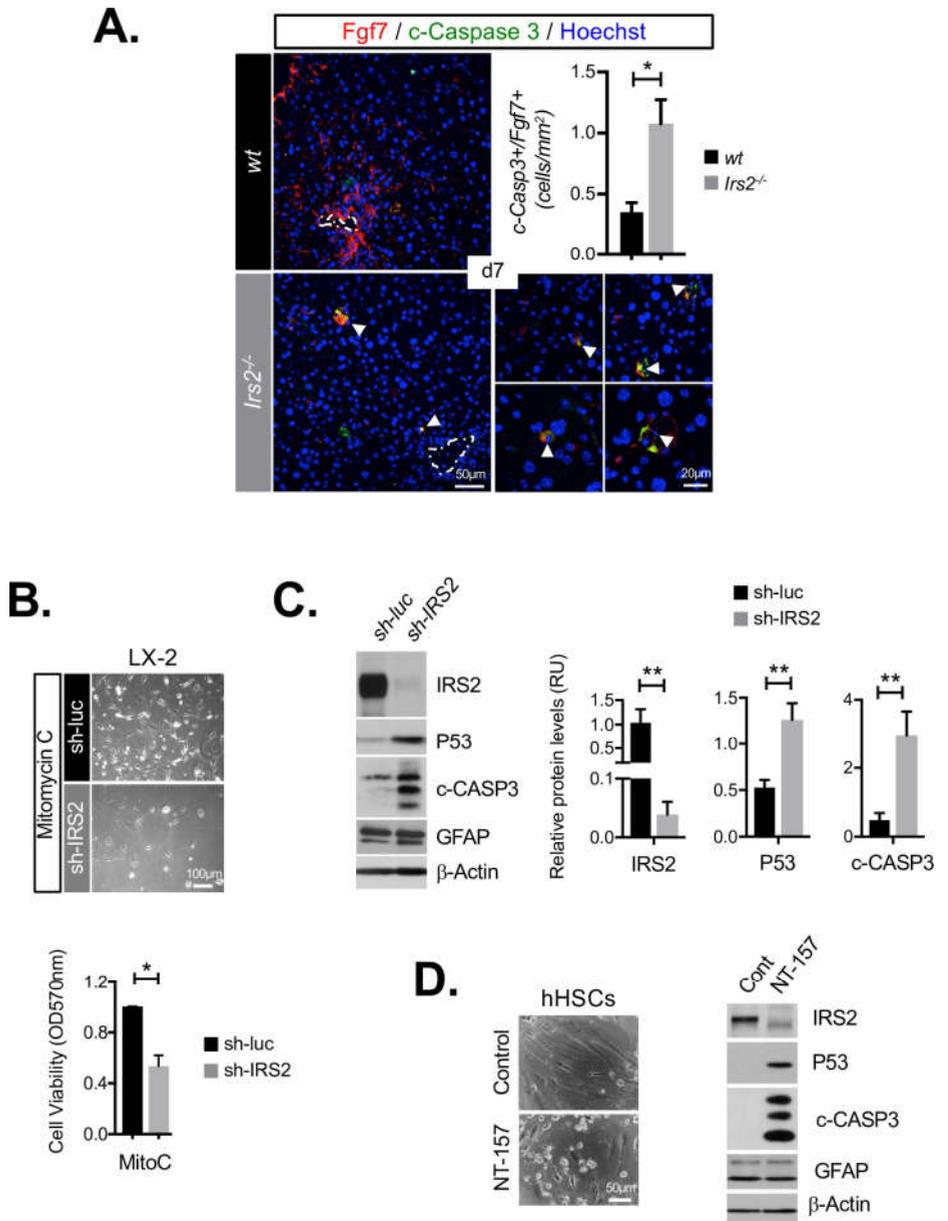


Fig 4. *Irs2* depletion leads to reduced survival of *Fgf7*-expressing stroma and human HSCs. (A) Representative immunofluorescence images and graphical quantification of cleaved caspase 3 staining in *Fgf7*-expressing stroma in livers of WT and *Irs2*^{-/-} mice after 7 days of DDC feeding (*n* = 3), duplicates analyzed for each animal, mean total area 33.9 mm² per section. Dotted lines indicate portal vein. (B–C) *IRS2* protects hHSC-derived LX-2 cells from apoptotic cell death following MitoC treatment in vitro. LX-2 cells were stably transfected with sh-luc or sh-*IRS2* and treated with MitoC. (C) Representative phase-contrast images showing reduced survival of sh-*IRS2* cells at 72 h post-

MitoC treatment (above). Graph below shows results of MTT cell-viability analysis, also performed at 72 h, confirming reduced survival ($n = 3$). (D) Western blot analysis with graphical quantitation of indicated relative protein expression levels ($n = 3-5$). (D) Inhibition of IRS proteins in primary hHSCs activates apoptotic cell death. Cells were treated with NT-157 (5 μ M) or Control (DMSO) for 72 h. Phase-contrast images showing dramatic cell death induced by NT-157 treatment (left) and western blot (representative of $n = 4$) showing cleaved caspase and P53 activation corresponded with reduced IRS2 levels. Data information: underlying data are available in [S1 Data](#). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. (A) Unpaired Student t test. (B-C) Paired Student t test. c-CASP3, cleaved caspase 3; Cont, control; Fgf7, fibroblast growth factor 7; Gfap, glial fibrillary acidic protein; hHSC, human HSC; HSC, hepatic stellate cell; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; MitoC, mitomycin C; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NT-157, allosteric inhibitor of IRS1 and 2; RU, relative unit; sh-IRS2, shRNA-targeting IRS2; sh-luc, control luciferase; shRNA, short hairpin RNA; WT, wild type.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972.g004>

by Fgf7+ stroma (Fig 5B). No such induction was observed in *Irs2*^{-/-} livers, consistent with a failure of *FGFR2-IIIb* expression in LPCs. We confirmed that diminished *Fgfr2-IIIb* expression resulted in reduced Fgf7-sensitivity in injured *Irs2*^{-/-} livers by testing the signaling response to intraperitoneal (i.p.) injection of recombinant Fgf7 (rFgf7) protein. In WT mice, rFgf7 robustly activated Fgf7/Fgfr2 signaling as assessed by western blot, demonstrating increased in vivo phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2 in whole-liver lysates (Fig 5C). This response to rFgf7 was abrogated in the *Irs2*^{-/-} livers, indicating that they were refractory to Fgf7. Taken together, our findings suggested that *Irs2* played a dual role in (i) promoting stromal expression of Fgf7 and (ii) sustaining sensitivity of the hepatic epithelia to Fgf7 during chronic DDC liver injury by promoting *Fgfr2-IIIb* expression (Fig 5D). Interestingly, the timing of *Fgfr2-IIIb* loss in *Irs2*^{-/-} mice (days 14–21) corresponded with a period during which the parenchymal architecture failed to re-epithelialize, as judged by quantitative analysis of β -catenin immunostaining in hepatocytes (Fig 5E), suggesting that in the later stages of DDC injury, *Irs2* was required upstream of Fgf7–Fgfr2-IIIb signaling to driving adaptive epithelial remodeling.

Insulin/IRS2 signaling and FGF7 synergize to promote FGFR2-IIIb expression and the emergence of hepatocytic epithelia in bipotent human HepaRG cells

We examined the possibility that IRS2 played a direct role in regulating LPC sensitivity to FGF7 and epithelialization using a human model of bipotent adult liver progenitor cells (HepaRG) [30]. Upon reaching confluence, HepaRG cells spontaneously differentiate in media supplemented with insulin to produce phase-bright epithelial “islands” of hepatocyte-like cells (Fig 6A and S8 Fig). Within these “islands,” cells express hepatocyte genes such as albumin, *HNF4a*, cytochrome P450 3A4 (*CYP3A4*), and apolipoprotein A2 (*APOA2*) (S8 Fig). Using this model, we found that *IRS2* was induced prior to *FGFR2-IIIb* and hepatocyte-specific genes such as *APOA2* (Fig 6B). Using a human *IRS2*-promoter construct to visualize the pattern of *IRS2* expression via green fluorescent protein (*pIRS2*-GFP), we also demonstrated colocalization of *IRS2* with albumin and FGFR2 in the early stages of hepatocyte island formation (Fig 6C). These data were consistent with an early role for *IRS2* in the patterning of FGF7 sensitivity during LPC differentiation.

Removal of insulin from the media (S8B and S8C Fig) or stable silencing of *IRS2* (Fig 6D, S8D–S8F Fig) resulted in a striking failure to generate hepatocytic epithelia within the cultures, together with concomitant loss of *FGFR2-IIIb* expression (Fig 6E). Importantly, the formation of epithelial islands and *FGFR2-IIIb* were restored by exogenous expression of a mouse *Irs2* not targeted by the human *IRS2* shRNA construct (Fig 6D and 6E); hence, we confirmed a cell-autonomous role for *IRS2* in promoting FGFR2-IIIb expression and differentiation in LPC-like cells.

Culturing of HepaRG cells with recombinant human FGF7 (rhFGF7) accelerated the formation of islands and increased hepatocyte differentiation, as determined by increased

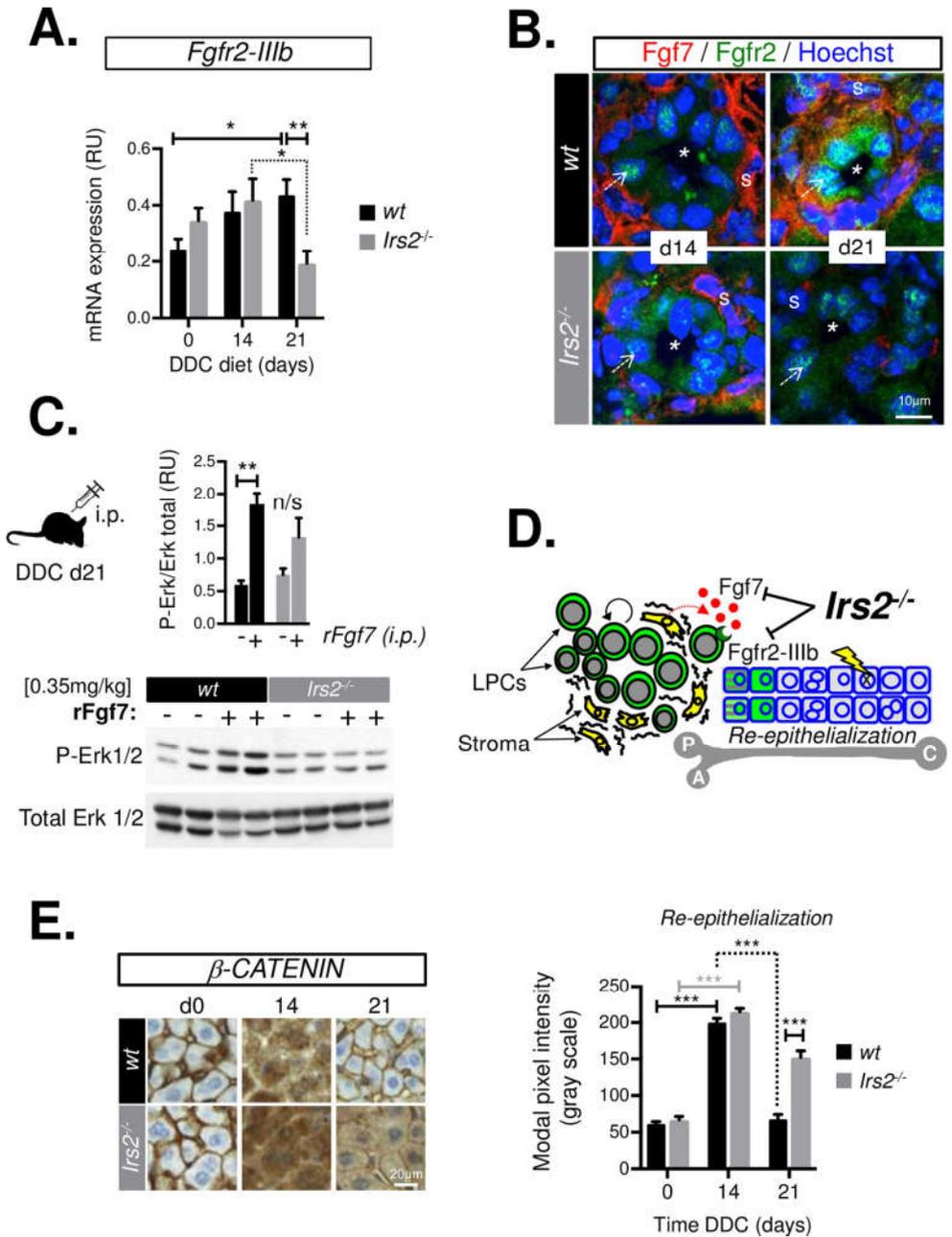


Fig 5. *Irs2* is required to sustain hepatic *Fgfr2-IIIb* expression and re-epithelialization during DDC injury. (A) RT-qPCR analysis of *Fgfr2-IIIb* expression in whole-liver mRNA from WT and *Irs2*^{-/-} mice during a time course of DDC feeding (*n* = 6–8). (B) Immunofluorescence images of WT and *Irs2*^{-/-} livers after 14 and 21 days of DDC feeding. Induction of Fgf2 occurred within duct-like structures in periportal areas (*) surrounded by Fgf7-expressing stroma (s). The failure to sustain Fgf7 expression in *Irs2*^{-/-} mice was paralleled by concomitant failure to induce Fgf2 in LPCs (arrows). (C) The livers of *Irs2*^{-/-} mice are refractory to exogenous Fgf7 stimulation following DDC injury. Western blot analysis of whole-liver extracts from DDC-treated WT and *Irs2*^{-/-} mice (day 21). 30 minutes prior to being killed, mice were administered rFgf7 or vehicle by i.p. injection. P-Erk levels relative to total Erk were quantified and are shown in the graph above (*n* = 4–7), and representative images of blots are shown below. (D) Schematic summarizing the observed negative impact of *Irs2* deletion on Fgf7 signaling between the hepatic stroma and LPCs during DDC injury. P = portal vein, A = hepatic artery, C = central vein. (E) Immunohistochemical staining for β-catenin in WT and *Irs2*^{-/-} liver parenchyma during a time course of DDC injury. Modal pixel intensity was graphed and used to quantify the dramatic remodeling of β-catenin staining (days 0–14) and reestablishment of epithelial architecture in livers of WT but not *Irs2*^{-/-} mice in the latter period of the diet (days 14–21) (*n* = 6–9). Data information: underlying data are available in [S1 Data](#). Data are presented as mean ± SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001. (A and E) Two-way ANOVA was used to compare means. Significance *P* values were calculated using Bonferroni test. (C) One-way ANOVA was used to compare means. Significance *P* values were calculated using Tukey's test. DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocolidine; Erk, extracellular signal-regulated kinase; Fgfr2-IIIb, Fgf7 ligand and receptor; Fgf7, fibroblast growth factor 7; i.p., intraperitoneal; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; LPC, liver progenitor cell; mRNA, messenger RNA; P-Erk, phosphorylated Erk (Tyrosine 204); RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; RU, relative unit; WT, wild type.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972.g005>

albumin/HNF4α and E-cadherin (E-cad) immunostaining, human APOA2-promoter (pAPOA2)-GFP reporter activity (Fig 6F), and analysis of hepatocyte-specific gene expression (Fig 6G). This occurred downstream of a rapid (3–6 h) and sustained induction in osteopontin/*SPPI* (S9 Fig), consistent with our in vivo observation that osteopontin/*Spp1* and *Fgf7* were both impaired in *Irs2*^{-/-} livers during injury (Fig 2). Importantly, the ability of rhFGF7 to promote expression of osteopontin/*SPPI*, as well as hepatocyte-specific genes such as albumin and APOA2, was both insulin and *IRS2* dependent (Fig 6G), revealing synergy between these two pathways in driving the differentiation of bipotent progenitor cells. Stable silencing of *IRS2* or omission of supplemented insulin from the medium was sufficient to abrogate the positive long-term effects of rhFGF7 on the hepatogenic program, thus demonstrating a functional requirement for insulin/*IRS2* upstream of paracrine FGF7 signaling. Interestingly, rhFGF7 treatment also increased *FGFR2-IIIb* expression, highlighting the potential for positive feedback between ligand and receptor—an effect that was also insulin/*IRS2* dependent (Fig 6C) and hence reinforced the conclusion that insulin/*IRS2* signaling in LPC-like cells primed FGF7 sensitivity.

Our data supported the hypothesis that insulin/*IRS2* signaling was functionally upstream of FGF7-mediated epithelialization of LPCs and highlighted a cell-intrinsic role for *IRS2* in promoting sensitivity to paracrine FGF7 produced by the fibrotic stroma. However, they also revealed that loss of stromal FGF7 could by itself be sufficient to explain a decline in *FGFR2-IIIb* expression and epithelialization in a non-cell-autonomous manner as a consequence of reduced positive feedback between ligand and receptor.

Insulin/*IRS2* resistance in fibrotic stroma limits hepatocyte differentiation and *FGFR2-IIIb* expression in cocultured LPCs

Our results highlighted the potential for a paracrine feed-forward loop in which FGF7 drove LPC differentiation and *FGFR2-IIIb* expression, potentiating both epithelialization and FGF7 sensitivity in an insulin/*IRS2*-dependent manner. To test this hypothesis further and to more rigorously address the role of insulin/*IRS2* signaling in the fibrotic stroma, we performed coculture experiments with hHSCs and HeparG cells, seeding the two cell types together in order to model the intimate heterotypic cell–cell interactions observed between LPCs and their stromal niche in periportal tracts during DDC injury (Fig 7A). LX-2 control (sh-luc) and *IRS2*-knockdown (sh-*IRS2*) cells were used to simulate "normal" versus "*IRS2*-deficient" fibrotic stroma and gauge how stromal insulin/IGF-1 resistance influenced the LPC response in a non-cell-autonomous manner.

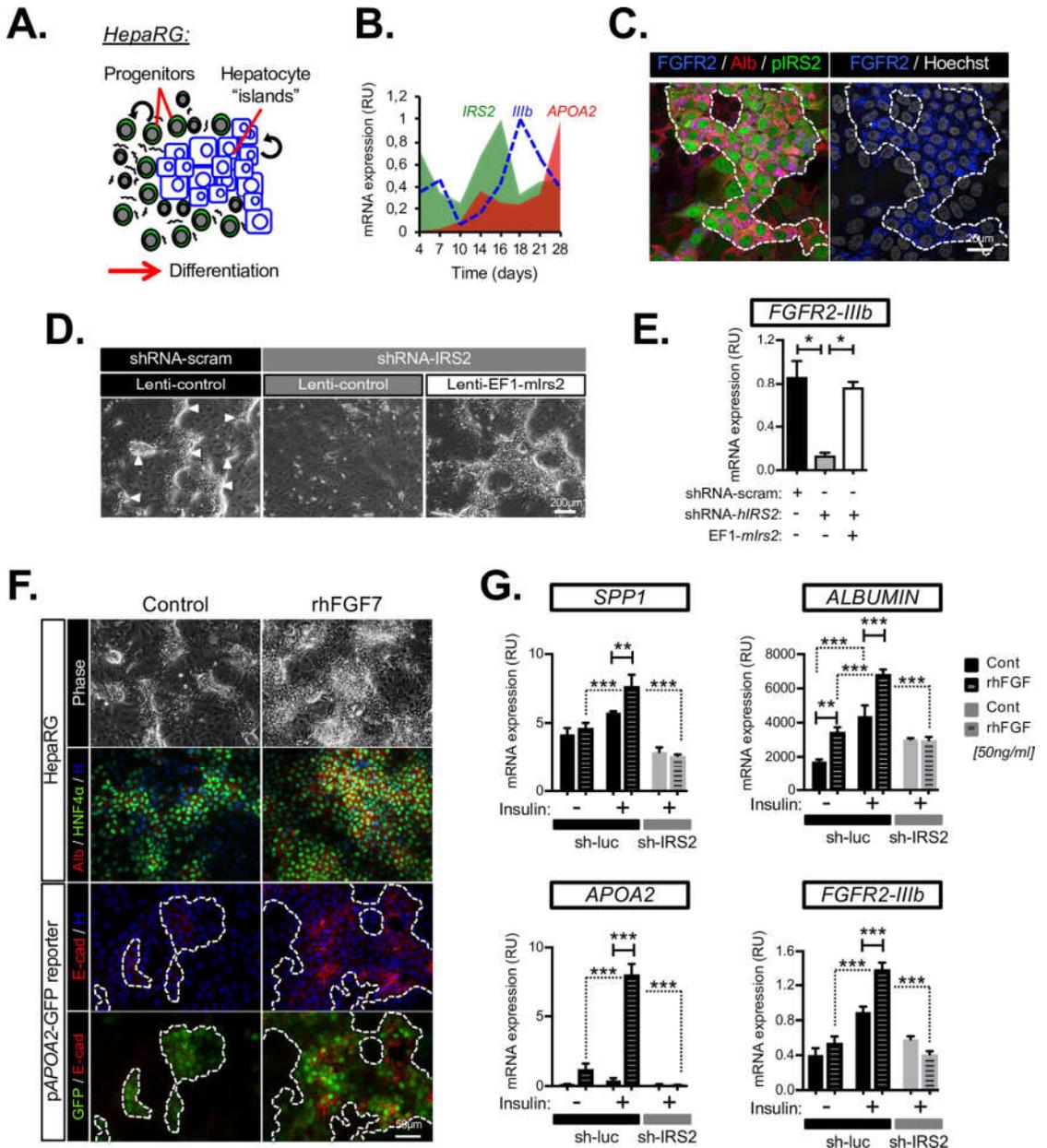


Fig 6. Insulin/IRS2 signaling promotes epithelialization and sensitivity to FG7 in vitro. (A) Schematic showing differentiation of bipotent HepaRG human LPCs in vitro produces epithelial "islands" containing hepatocyte-like cells. (B) RT-qPCR time course of HepaRG differentiation showing early induction of *IRS2*, and *FGFR2-IIIb* prior to hepatocyte differentiation (indicated by *APOA2*). (C) Colocalization of *Alb*, *FGFR2*, and *IRS2* by immunostaining within hepatocyte islands during the early stages of HepaRG differentiation (day 14). *IRS2* expression was visualized by stable transduction with a human *IRS2* promoter (p*IRS2*) GFP reporter. Dotted

line delimits "island." (D–E) *IRS2* is necessary for *FGFR2-IIIb* expression during HepaRG differentiation: (D) phase-contrast images of differentiated cells after stable silencing for *IRS2* using shRNA lentivirus (sh-*IRS2*). Arrowheads highlight "islands" observed in control cultures expressing sh-scram but not in sh-*IRS2* cells. Specificity of the knockdown phenotype was confirmed by a "rescue" in which Lenti-m*IRS2* was constitutively expressed in sh-*IRS2* cells. (E) RT-qPCR analysis of *FGFR2-IIIb* expression ($n = 3$). (F–G) Insulin/*IRS2* is required for functional sensitivity to rFGF7 in HepaRG cells and is necessary for feed-forward induction of *FGFR2-IIIb* by FGF7 ligand. (F) Phase-contrast and immunofluorescence images of HepaRG cells (day 15) cultured with rhFGF7 for 11 days, showing an increase in epithelial islands positive for Alb/HNF4 α and E-cad immunostaining and *pAPOA2*-GFP reporter expression (H = Hoechst). (G) RT-qPCR analysis for indicated genes following long-term (11-day) rhFGF7 treatment in the presence (+) or absence (–) of supplemented insulin in control (sh-luc) or *IRS2* knockdown cells (sh-*IRS2*) ($n = 3$). Data information: underlying data are available in [S1 Data](#). Data are presented as mean + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. (E and G) One-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using Newman–Keuls multiple comparison test. Alb, albumin; *APOA2*, apolipoprotein A2; Cont, control; E-cad, E-cadherin; EF1, Human elongation factor-1 alpha promoter; FGF7, fibroblast growth factor 7; *FGFR2*, fibroblast growth factor receptor 2; GFP, green fluorescent protein; HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4-alpha; *IRS2*, insulin receptor substrate 2; Lenti-m*IRS2*, murine *Irs2* transgene not targeted by human-gene-silencing construct; mRNA, messenger RNA; *pAPOA2*, human *APOA2* promoter; *pIRS2*, *IRS2* promoter; rFgf7, recombinant Fgf7; rhFGF7, recombinant human FGF7; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; RU, relative unit; sh-*IRS2*, shRNA-targeting *IRS2*; sh-luc, control luciferase; shRNA, short hairpin RNA; sh-scram, scrambled shRNA.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972.g006>

Consistent with the hypothesis that *FGF7* was indirectly regulated by stromal *IRS2*, we observed similar levels of *FGF7* in the early stages of LX-2/HepaRG coculture (Fig 7B). However, while *FGF7* expression was sustained in cocultures containing normal LX-2 stroma, a significant long-term decline was observed in those that contained *IRS2*-deficient LX-2 (Fig 7B), demonstrating an indirect role for stromal *IRS2* in promoting *FGF7* expression in coculture. The decline *FGF7* expression in the *IRS2*-deficient stromal cocultures also coincided with a striking failure to induce *FGFR2-IIIb* on day 14 (Fig 7B). Interestingly, we also observed blunted induction of *FGF10* within cocultures containing *IRS2*-deficient stroma (days 10–14), whereas *FGF22* expression was unaffected (S10A Fig). These data reinforced the notion that *FGFR2-IIIb* ligands such as FGF7/FGF10 were required to drive expression of their epithelial receptor in LPCs both in vivo and in vitro.

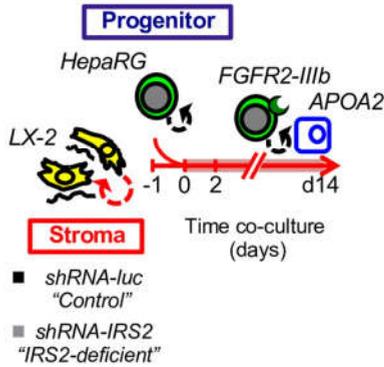
Using the coculture method, we also found that *FGFR2-IIIb* and *APOA2* induction by LPCs required insulin signaling via *IRS2* within the fibrotic stroma. Knockdown of *IRS2* in LX-2 cells completely abrogated the ability of insulin to potentiate epithelial sensitivity to FGF7 and hepatocyte differentiation within the cocultures, as judged by loss of time-dependent induction of *FGFR2-IIIb* and *APOA2*, respectively (Fig 7C). These results demonstrated a requirement for stromal *IRS2* in the non-cell-autonomous potentiation of FGF7 target genes in HepaRG cells. Moreover, we observed localized expression of *FGFR2* in HepaRG at sites of contact with LX-2 cells, suggesting regulation of LPC differentiation by the stroma at close range, consistent with the short-range paracrine actions of FGF7 (Fig 7D).

In order to further test whether paracrine FGF7 signaling was downstream of *IRS2*-dependent stromal-epithelial crosstalk in hHSC/HepaRG cocultures, we used primary hHSCs, which expressed higher levels of endogenous FGF7 than LX-2 (Fig 8). Interestingly, we found that both *FGF7* and *IRS2* expression were significantly increased in hHSCs following Mitoc-induced cell-cycle arrest (Fig 8A). This observation provided us with a useful means to modulate endogenous FGF7 expression prior to coculturing the cells with HepaRG. Consistent with the increase in *FGF7* expression, we observed a dramatic enhancement of *APOA2* expression in HepaRG cocultures using hHSCs pretreated with Mitoc (Fig 8B). Moreover, inclusion in the medium of a competitive FGF7 inhibitor, consisting of a chimeric rFGFR2-IIIb extracellular domain/Human IgG1 crystallizable fragment (Fc) domain protein (rhFGFR2-IIIb-Fc), significantly inhibited *APOA2* expression by HepaRG, confirming *APOA2* as a downstream target of paracrine FGF7 and demonstrating a role for FGF7 signaling in driving hepatocyte differentiation in coculture.

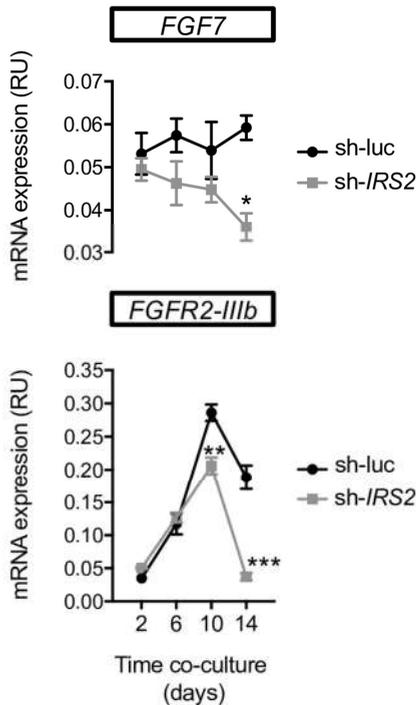
The diffusion of FGF7 is highly restricted because of its affinity for heparin-sulphate proteoglycans in extracellular matrix and cell membranes [23]. Consistent with this short-range mode of action, we found that hepatocyte differentiation within the cocultures (judged by

A.

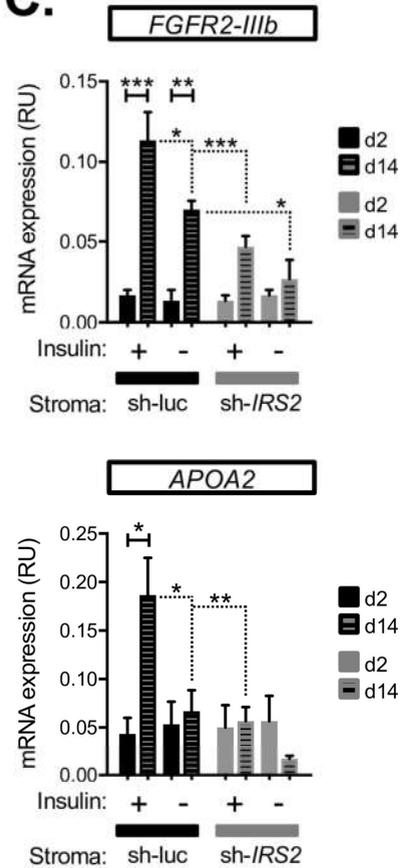
Co-culture model:



B.



C.



D.

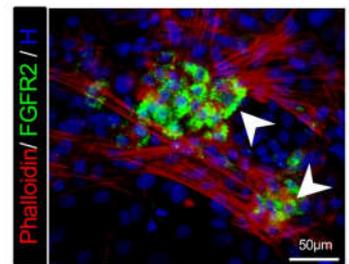


Fig 7. Heterotypic cell–cell crosstalk between HSCs and LPCs is IRS2 dependent. (A) Schematic illustrating the HSC/LPC coculture model designed to test whether *IRS2* expression in the stromal cell compartment was required for heterotypic interactions leading to increased *FGFR2-IIIb* expression and *APOA2* induction in adjacent HepaRG cells. Control (shRNA-luc) or *IRS2*-deficient (shRNA-*IRS2*) LX-2 cells were seeded for a day prior to addition of HepaRG cells as indicated, and the resulting cocultures were then studied for 2–14 days. (B) RT-qPCR time course of gene expression in the HSC/LPC coculture system showing stromal *IRS2* expression was required for sustained *FGF7* expression and induction of *FGFR2-IIIb* ($n = 3$). (C) RT-qPCR analysis of control (sh-luc) and *IRS2*-deficient (sh-*IRS2*) LX-2 cocultures performed in the presence (+) or absence (–) of supplemented insulin ($n = 3$). (D) Coculture immunostaining (day 14) highlighting localized *FGFR2* expression (arrows) at sites of contact between HepaRG and HSC stroma (marked by phalloidin). Data information: underlying data are available in [S1 Data](#). Data are presented as mean + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. (B) Two-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using Tukey's multiple comparison test. (C) Two-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using Sidak's multiple comparison test. *APOA2*, apolipoprotein A2; *Fgfr2-IIIb*, *Fgf7* receptor; *Fgf7*, fibroblast growth factor 7; H, Hoechst; HSC, hepatic stellate cell; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; LPC, liver progenitor cell; mRNA, messenger RNA; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; RU, relative unit; sh*IRS2*, shRNA-targeting *IRS2*; sh-luc, control luciferase; shRNA, short hairpin RNA.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972.g007>

HNF4 α immunostaining) was spatially limited to sites of contact between HepaRG and vimentin+ hHSCs (Fig 8C). To explore the properties of the HSC signal driving differentiation within the cocultures further, we developed a short-term bioassay using *APOA2* expression as a functional readout for FGF7 activity. Stimulation of HepaRG monocultures with a single dose of rhFGF7 rapidly induced *APOA2* at 48 h (Fig 8D). Hence, we collected conditioned medium from MitoC-treated hHSCs and added it to HepaRG cells; however, no induction of *APOA2* was observed, suggesting the factor was either labile or unavailable in the cellular supernatant because of cell/matrix binding (Fig 8E). Using a similar approach, we were able to confirm that direct contact between HepaRG and hHSCs (achieved by short-term 48 h coculture) was sufficient to induce *APOA2* expression in an FGF7-dependent manner, an effect that was blocked by inclusion of the competitive FGF7 inhibitor (Fig 8F). Importantly, the ability of hHSCs to induce *APOA2* within 48 h in this model was conditional upon the pretreatment of hHSCs with MitoC, confirming that paracrine FGF7 signaling in hHSCs was enhanced by mitotic inactivation.

Taken together, these data demonstrated a positive role for paracrine FGF7 signaling by human HSC in supporting FGF7 sensitivity and hepatocyte differentiation in adjacent epithelial progenitors.

***IRS2* deficiency promotes stromal activation at the expense of epithelial repair**

The stromal injury response precedes epithelial repair. In the liver, this is characterized by HSC-derived myofibroblast proliferation and the laying down of extracellular matrix, which is followed by cell-cycle exit, fibrogenic reversion, and apoptotic cell clearance that accompanies tissue repair. The equilibrium within the fibrotic stroma between activated and reverted HSCs is therefore central to the regulation of the stromal injury response and has important consequences for liver fibrosis and scarring in the context of chronic injury.

Our data showed that both *FGF7* and *IRS2* expression were induced in hHSCs upon triggering of cell-cycle arrest using MitoC (Fig 8A). MitoC treatment was also accompanied by a phenotypic shift in hHSCs and LX-2s consistent with fibrogenic reversion (Fig 9A), as judged by loss of Collagen 1A1 (*COL1A1*) expression and activation of antiapoptotic heat shock 70 kDa protein 1B (*HSPA1B*), previously identified as a biomarker of HSC reversion [31]. Importantly, the down-regulation of myofibroblast marker protein α SMA upon cell-cycle exit was delayed in LX-2 cells in which *IRS2* was silenced (Fig 9B), suggesting impaired transition from an activated to “reverted” state. These in vitro data, which suggested that *IRS2* could participate in the transition of HSCs to a “reverted” phenotype, were consistent with the in vivo

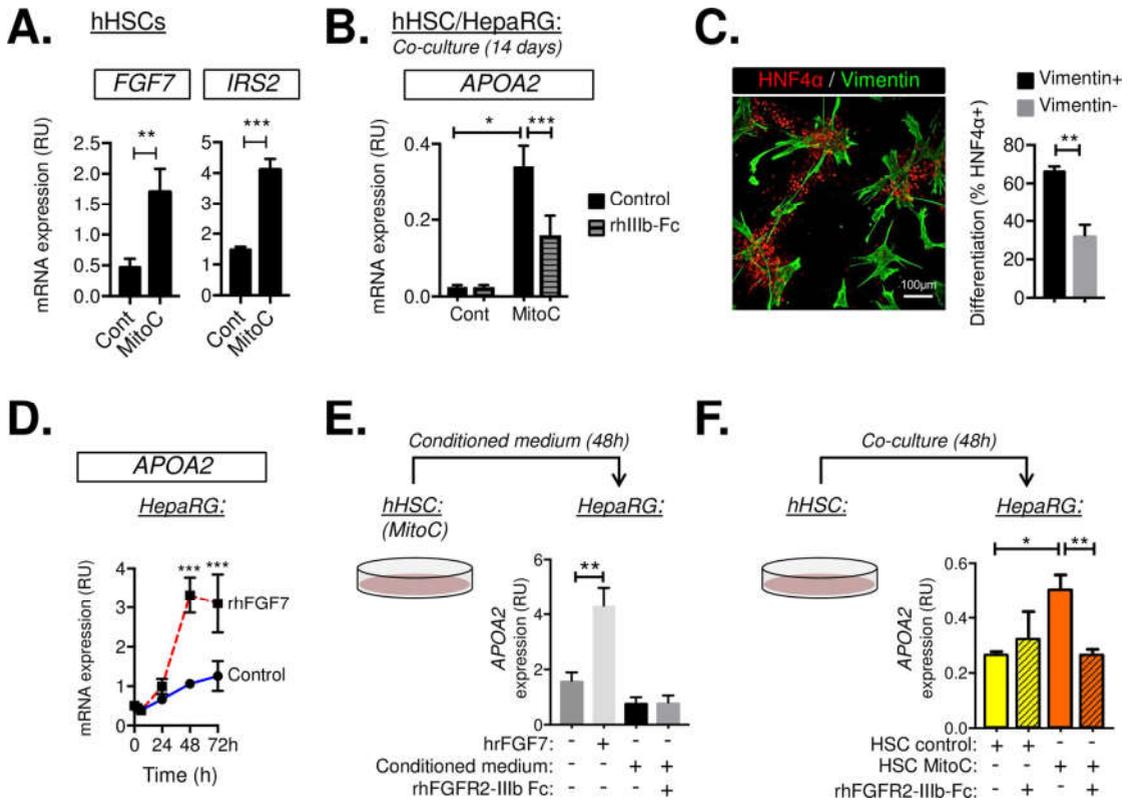


Fig 8. Paracrine FGF7 signaling by HSCs is activated during cell-cycle arrest. (A) RT-qPCR analysis of primary hHSC cultures treated with vehicle (cont) or Mitoc 72 h prior to harvesting. *FGF7* and *IRS2* expression were enhanced by Mitoc ($n = 3$). (B) Mitoc treatment of hHSCs increased paracrine FGF7 signaling. Cont/Mitoc-treated hHSCs were cocultured with HepaRG cells for 14 days in the presence/absence of the rhFGFR2-IIIb-Fc fusion protein (rhIIIb-Fc) used to block Fgf7 binding its receptor. Cocultures were then analyzed by RT-qPCR for *APOA2* expression ($n = 3$) as a functional readout of hepatocyte differentiation and FGF7 target gene activity. (C) HNF4 α /Vimentin immunostaining of Mitoc-treated hHSC/HepaRG cocultures (day 14). HepaRG differentiation (HNF4 α +) was highly localized to sites of contact between hHSCs (Vimentin+). Graph shows InCell analysis comparing the percentage of HNF4 α + cells in contact (vimentin+) or remote from sites of contact with hHSCs (vimentin-) ($n = 4$). Total of 6.69×10^5 cells analyzed. (D–F) Functional bioassay for FGF7 signaling reveals a requirement for direct coculturing of hHSCs with target cells. (D) RT-qPCR showing the time course response of HepaRG cells (day 13) to a single dose of vehicle (cont) or rhFGF7. Changes in *APOA2* expression at 48 h were used as a biological readout for FGF7 activity in E–F. (E) Conditioned medium from Mitoc-treated hHSCs was insufficient to illicit an *APOA2* response at 48 h, whereas (F) direct addition of hHSCs to HepaRG cultures activated *APOA2* expression in an FGF7-dependent manner, as judged by the ability of rhFGFR2-IIIb-Fc to block induction. Importantly, this effect was conditional upon prior treatment of hHSCs with Mitoc, thus confirming the positive effect of mitotic inhibition on the ability of hHSCs to communicate with LPCs via FGF7. Data information: underlying data are available in [S1 Data](#). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. (A) Paired Student *t* test. (B, E, F) One-way ANOVA was used to compare means. Significance *P* values were calculated using Tukey’s multiple comparison test. (D) Two-way ANOVA was used to compare means. Significance *P* values were calculated using Tukey’s multiple comparison test. *APOA2*, apolipoprotein A2; cont, control; Fgfr2-IIIb, Fgf7 receptor; Fgf7, fibroblast growth factor 7; hHSC, human HSC; HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4-alpha; HSC, hepatic stellate cell; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; LPC, liver progenitor cell; Mitoc, mitomycin C; mRNA, messenger RNA; rhFGFR2-IIIb-Fc or rhIIIb-Fc, recombinant protein comprising human Fgfr2-IIIb extracellular domain fused to Human IgG1 Fc domain used to inhibit FGF7 binding its receptor; rhFGF7, recombinant human FGF7; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; RU, relative unit.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972.g008>

observation that DDC-treated *Irs2*^{-/-} mice had increased periportal and perisinusoidal fibrosis, judged by Sirius Red collagen morphometry and α SMA immunostaining (Fig 9C).

We therefore returned to the LX-2/HepaRG cocultures to assess changes in fibrogenic markers. Using this method, we found that upon coculture with LPC-like cells, control (sh-

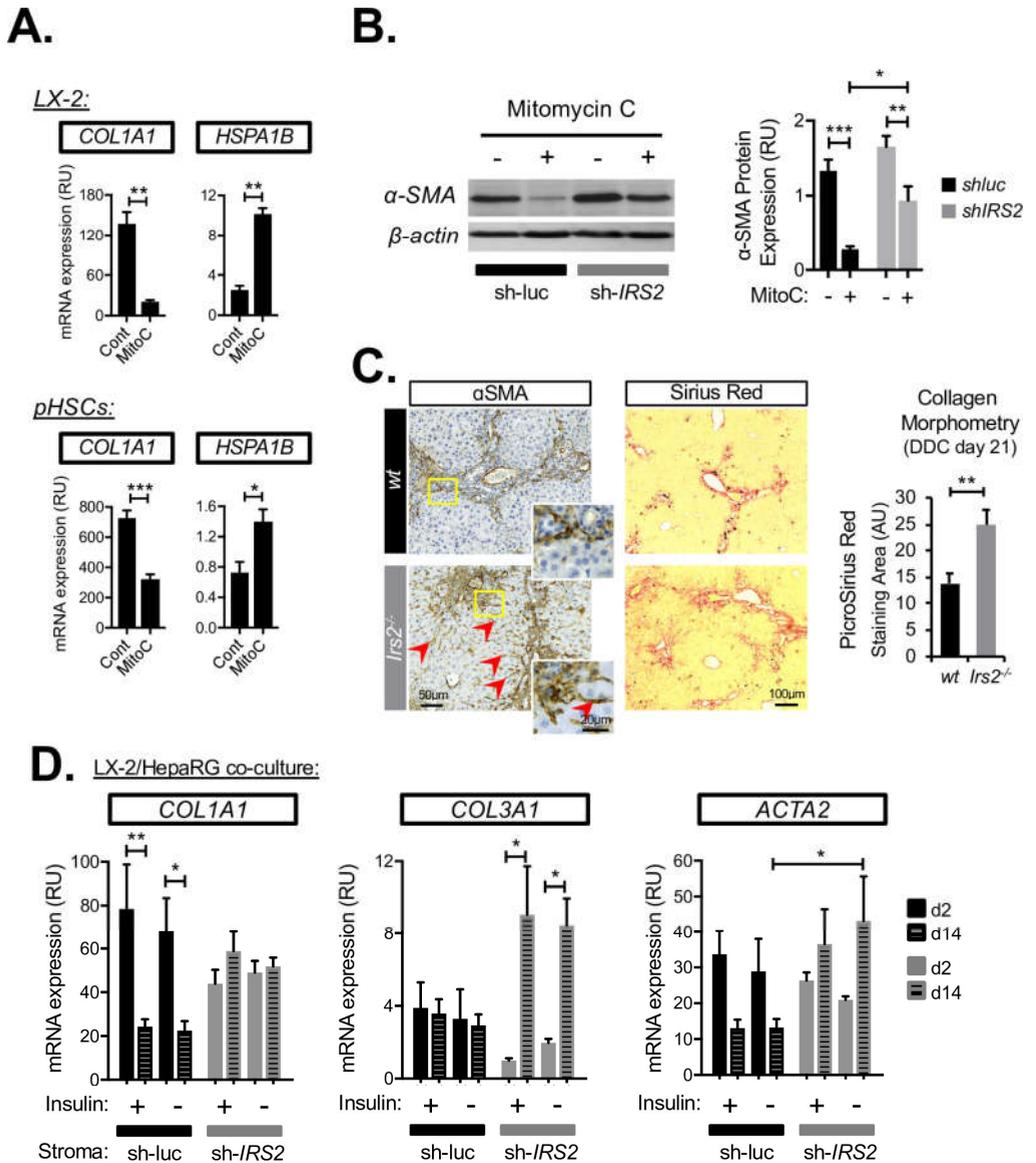


Fig 9. Loss of IRS2 promotes stromal activation and inhibits HSC reversion. (A–B) Cell-cycle arrest induced by MitoC leads to fibrogenic reversion of hHSCs, which was delayed by *IRS2* silencing. (A) RT-qPCR analysis of LX-2 cells and primary hHSC cultures treated with vehicle (cont) or MitoC for 72 h prior to harvesting showing decreased *COL1A1* expression together with concomitant increase in HSC reversion marker *HSPA1B* ($n = 3$). (B) Western blot analysis of α SMA protein down-regulation in cont (sh-luc) and silenced (sh-*IRS2*) LX-2 cells during MitoC treatment (72 h) ($n = 4-5$). (C) Hepatic fibrosis after 21 days of DDC treatment was exacerbated in *Irs2*^{-/-} mice. (Left) Representative immunohistochemical images of control (WT) and *Irs2*^{-/-} livers for myofibroblast marker α SMA together with Picro Sirius Red histochemistry used for collagen morphometry; quantified in graph (right) ($n = 8$). Red arrowheads highlight pattern of increased perisinusoidal fibrosis that was more pronounced in *Irs2*^{-/-} livers. (D) RT-qPCR analysis of cont (sh-luc) and *IRS2*-deficient (sh-*IRS2*) LX-2 cocultures with HepaRG cells performed in the presence (+) or absence (-) of supplemented insulin. Fibrogenic gene

expression was analyzed at 2 days and 14 days after seeding the two cell types together ($n = 3$). Data information: underlying data are available in [S1 Data](#). Data are presented as mean + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. (A) Paired Student t test. (B and D) Two-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using Sidak's multiple comparison test. (C) Unpaired Student t test. *Acta2*, gene encoding α SMA; AU, arbitrary unit; *COL1A1*, Collagen 1A1; cont, control; hHSC, human HSC; HSC, hepatic stellate cell; HSPA1B, heat shock 70 kDa protein 1B; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; MitoC, mitomycin C; mRNA, messenger RNA; pHSC, primary human HSC; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; RU, relative unit; shIRS2, shRNA-targeting IRS2; sh-luc, control luciferase; shRNA, short hairpin RNA; WT, wild type; α SMA, alpha-smooth muscle actin.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972.g009>

luc) LX-2 cells underwent a process of time-dependent fibrogenic reversion, during which fibrillar collagen (*COL1A1*) expression was significantly down-regulated and α SMA/*ACTA2* dampened (Fig 9D). In striking contrast to this, we found that silencing of *IRS2* in LX-2 cells abrogated their ability to suppress *COL1A1* in coculture, and we instead observed a dramatic induction of nonfibrillar type III collagen (*COL3A1*) indicative of an activated stromal injury response. Time-dependent switching from myofibroblast marker *THY1* to LPC-associated *SPP1* was also dampened by silencing of *IRS2* in the stroma (S10B Fig), and the numbers of GFP-expressing LX-2 cells at the end of the cocultures was increased (S10C Fig). Interestingly, unlike LPC and epithelial repair genes (*SPP1/APOA2/FGFR2-IIIb*), whose expression in coculture was both insulin and *IRS2* dependent (Fig 7C and S10 Fig), changes in fibrogenic/myofibroblast genes *COL1A1*, *COL3A1*, *ACTA2*, and *THY1* (Fig 9D and S10 Fig) were largely unaffected by omission of insulin from the medium, suggesting the ability of *IRS2* to restrain activation of the fibrogenic stroma was insulin independent. We concluded that silencing of *IRS2* in HSCs prolonged their fibrogenic activation in coculture while slowing fibrogenic reversion by MitoC and reducing the survival of mitotically inactivated cells in which FGF7 expression was increased. Thus, *IRS2* signaling in the fibrotic stroma served as a switch between states of stromal activation and fibrogenic reversion that potentiated heterotypic paracrine signaling between the two cell types and drove epithelial FGF7 sensitivity in LPCs. Together with our results demonstrating a cell-intrinsic role for *IRS2* in LPCs in promoting FGF7 sensitivity, we proposed a model in which *IRS2* exerted multiple proregenerative effects in both stromal and LPC cell compartments that favored epithelial repair over fibrogenesis during chronic liver injury (Fig 10).

Discussion

In this study, we provide compelling evidence that *Irs2* is required for hepatic wound healing and epithelial repair during chronic DDC feeding in mice and for sustaining local Fgf7/Fgfr2-IIIb signaling. Using human cell models, we have shown that *IRS2* can affect multiple processes in both the fibrotic stroma and bipotent LPC-like cells that impinge upon their abilities to communicate with one another via FGF7 signaling. In addition, coculture studies confirm that *IRS2* deficiency in HSCs disrupts paracrine crosstalk between the stromal niche and LPCs, resulting in failure to induce *FGFR2-IIIb* and epithelialization while simultaneously prolonging fibrogenic activation. Our data therefore support the hypothesis that insulin resistance could lead to defects in hepatic injury repair that exacerbate liver damage and progression of chronic liver disease because of reduced paracrine FGF signaling. These data also have profound implications for our understanding of how systemic insulin signals are interpreted by local injury-repair mechanisms and demonstrate that defects in insulin sensitivity can influence short-range communication between distinct cell types within a tissue, notably between the so-called "niche" and adult stem cells responsible for producing new epithelia.

Interestingly, insulin resistance in human liver disease is associated with increased fibrosis and the appearance of reactive periportal lesions called "ductular reactions" (DRs), in which intermediate "hepatobiliary" progenitors expand surrounded by fibrotic stroma [32]. These

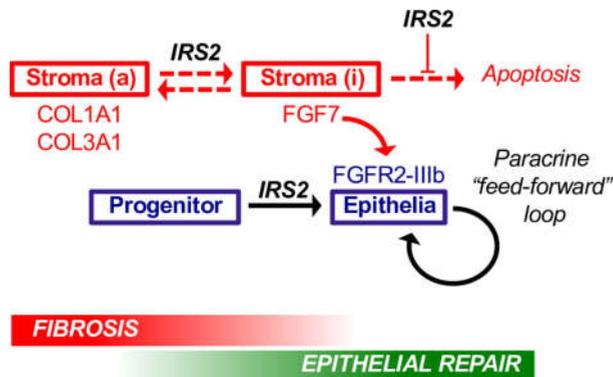


Fig 10. IRS2 promotes epithelial repair in the liver by potentiating HSC–LPC crosstalk. Model summarizing the major findings of our study in stromal (red) and epithelial (blue) cell compartments. IRS2 promoted reversion of activated (a) fibrogenic stroma and survival of inactivated (i) cells expressing high levels of FGF7. In progenitors, IRS2 was required for differentiation and *FGFR2-IIIb* expression—priming sensitivity to FGF7. Epithelial sensitivity to FGF7 was then further increased by the ability of the FGF7 ligand to increase *FGFR2-IIIb* expression, resulting in a feed-forward paracrine loop capable of sustaining epithelial repair by potentiating heterotypic cell–cell communication. Fgfr2-IIIb, Fgf7 receptor; Fgf7, fibroblast growth factor 7; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; HSC, hepatic stellate cell; LPC, liver progenitor cell.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972.g010>

lesions exhibit striking similarities with those observed in the DDC-injury model [33], although DRs are a feature of disrepair because of their correlation with poor prognosis. The association between insulin resistance and DRs has been demonstrated in liver disorders including NASH and chronic hepatitis C [32,34], in which defective *IRS2* expression has also been reported [10,11]. Our results suggest that reduced sensitivity to insulin in patients with chronic liver disease could alter the intrinsic abilities of LPCs to contribute to regenerative processes and lead to a derangement of heterotypic cell–cell interactions that mediate their expansion and differentiation, leading to DRs. Our discovery that *IRS2* silencing in HSCs also promoted fibrogenesis while limiting hepatocyte differentiation and *FGFR2-IIIb* expression in coculture recapitulated the increase in liver fibrosis and reduced *Fgf7/Fgfr2-IIIb* expression described in *Irs2*^{-/-} mice during DDC treatment. Hence, our data suggest that *IRS2* signaling may serve as a switch that regulates the transition between phases of stromal and epithelial expansion within DRs by promoting reversion and survival of FGF7-expressing stroma while simultaneously priming LPCs to express *FGFR2-IIIb* (Fig 10).

There is precedent that IRS proteins play an important role in driving epithelial growth via modification of the stromal microenvironment in the liver. NT-157, the allosteric inhibitor of *IRS1/2*, was recently found to limit colorectal cancer metastasis to the liver by reducing the trophic support received by stromal myofibroblasts or HSCs [35]. These findings exhibit striking parallels with our results and highlight the potential future impact of our feed-forward paracrine model in the field of cancer biology, in which subversion of injury-repair mechanisms by tumors are well documented. Consistent with this, *Irs2* was also recently implicated in a positive feedback loop driving disease progression and hepatocarcinogenesis in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [13]. Interestingly, the study identified hepatic *Irs2* expression as a downstream target of Yes-associated protein (YAP) and Tazazzin (TAZ)—two oncogenic effectors of the Hippo signaling pathway that reversibly control hepatocellular fate [36], LPC activation [37], and liver regeneration [38]. Hence, it seems likely that subversion of

Irs2-dependent aspects of the LPC response identified in our study also contribute to the pathophysiology of metabolic liver disease and cancer.

Insulin and FGF7 synergized via *IRS2* to promote osteopontin/*SPP1* expression and sustain hepatocyte differentiation, thus revealing a cell-intrinsic role for insulin/*IRS2* in priming and potentiating LPC sensitivity to paracrine FGF7 and other IIIb ligands such as FGF22 and FGF10. Insulin/*IRS2* signaling was required for the formation of “islands” in HepaRG cultures, which expanded because of a process of hepatocyte differentiation and epithelialization and conferred FGF7 sensitivity to the cultures by promoting FGFR2-IIIb expression. Conversely, in DDC-treated *Irs2*^{-/-} mice, the numbers of hepatocytes declined, and the process of re-epithelialization was impaired, as manifested by delayed restoration of the parenchymal architecture, delayed induction of *Epcam*, failure to sustain *Fgfr2-IIIb*, and failure to expand numbers of small hepatocytes. Thus, it is tempting to speculate that *IRS2* promotes hepatocyte differentiation of LPCs in vivo, although this would need to be empirically tested.

We have identified positive feedback between FGF7 and its receptor in HepaRG monocultures as well as HepaRG/HSC cocultures and demonstrated a role for *IRS2* in both cell compartments upstream of FGFR2-IIIb amplification (Fig 10). These data were highly consistent with the observed dual failure of Fgf7/Fgfr2-IIIb in *Irs2*^{-/-} mice during injury and provide new insight into the underlying synergies that help promote epithelial sensitivity to proregenerative stromal growth factors such as Fgf7. Positive feedback between Fgf10 and *Fgfr2-IIIb* has previously been reported during salivary gland development [15], and in nonmalignant tumors, Fgf7-mediated FGFR2-IIIb expression is thought to play a tumor-suppressive role by promoting epithelial differentiation [23,39]. Interestingly, synergy between Fgfr2-IIIb ligands and their receptor has previously been linked to crosstalk with phosphoinositide 3-kinase (PI3K)—one of the principle effectors of insulin/IGF-1 signaling recruited by *IRS2*-binding [15]. Indeed, inhibition of PI3K/Protein kinase B (AKT) limits hepatocellular reprogramming by Fgf10/Fgfr2-IIIb during DDC injury in vivo [22], suggesting *Irs2* could act upstream of this pathway in promoting cellular plasticity in the liver.

Further to impairment of Fgf7, we also describe reductions in *Fgf10* during DDC injury and in LX-2/HepaRG cell coculture. Hence, we cannot rule out the possibility that the *IRS2*-dependent paracrine feed-forward loop we have identified also involves other stromal FGFR2-IIIb ligands. HSC-derived Fgf10 plays an important role in the expansion of bipotent LPCs during liver development [40], and both FGF10 and 22 are induced by the fibrotic stroma during DDC injury [22]. A deeper understanding of the indirect nature of how *IRS2* regulates these genes within the stroma is therefore needed.

In recent years, FGFs have received increasing attention for their unexpected role in metabolic disease and for their potential to treat metabolic disorders by helping restore insulin sensitivity. FGF1, 19, and 21 have potent (albeit poorly understood) effects on metabolism and insulin signaling, largely through their putative actions in white adipose tissue and the liver [21,41], whereas impaired FGF-receptor signaling is associated with insulin resistance, liver disease [41,42], and impaired hepatic regeneration [43,44]. Blunted expression of FGF7 has also been previously linked to delayed skin wound healing in genetically diabetic leptin deficient (db/db) mice [45,46]. Our data therefore raise the intriguing possibility that a comparable wound-healing defect may also exist in the livers of *Irs2*^{-/-} mice following injury, resulting in a breakdown in stromal-epithelial paracrine signaling and consequent failure to coordinate the injury response. Combined future strategies to potentiate hepatic insulin sensitivity and FGF7 signaling may therefore improve patient outcomes by promoting epithelial repair in the liver.

The impact of insulin resistance on the stromal microenvironment in the liver during injury is poorly understood [5], as is the role played by *IRS* proteins in regulating HSC biology, which involves injury-dependent cycles of myofibroblast activation and cell clearance during

so-called "fibrogenic reversion." The model we present to explain impaired stromal induction of Fgf7 in the *Irs2*^{-/-} mice (Fig 10) incorporates how IRS2 influenced fibrogenic reversion and survival of HSCs—only one of several FGF7-expressing stromal subpopulations that respond to DDC injury. However, we also provide evidence that the cellular composition of the fibrotic milieu was different in the livers of *Irs2*^{-/-} mice and leave open the possibility that *Irs2*-deletion affected other resident FGF7-expressing cells such as PFs. Finally, we observed a greater increase in T cells and the incorporation of bloodborne mesenchymal cells, possibly to the detriment of resident stromal cells or simply to compensate for the failure of FGF7-expressing stroma. Fibrocytes from type II diabetic patients have recently been shown to display altered migratory and inflammatory characteristics that could also have contributed to the altered pattern of stromal gene expression and impaired wound healing in our model [47].

We show that DDC injury had a negative impact on Gfap+ HSCs in *Irs2*^{-/-} mice. Gfap is associated with quiescent or inactivated HSCs; hence, our data are consistent with accelerated turnover/loss of these cells in the livers of *Irs2*^{-/-} mice due to a combination of reduced survival and/or reduced myofibroblast reversion (Fig 10). Our investigation using hHSCs revealed that *IRS2* protected cells from apoptosis following mitotic inactivation using MitoC, providing a mechanism to explain the dampening of Fgf7 and increased apoptosis observed in the livers of *Irs2*^{-/-} mice during injury. Interestingly, both *IRS2* and *FGF7* were increased in primary hHSCs upon cell-cycle arrest and fibrogenic reversion while enhancing their ability to drive epithelial differentiation of HepaRG cells in an FGF7-dependent manner in coculture. Similarly, *IRS2* was required in LX-2 cells to sustain both FGF7 expression and to allow a process of fibrogenic reversion to proceed in the presence of HepaRG cells. These data provide new evidence to suggest that epithelial repair signals produced by HSCs are increased by a program of cell-cycle arrest or cell death, two processes that are more closely aligned with stromal reversion than myofibroblast activation. Given that the regulation of *FGF7* expression by the fibrotic stroma is poorly understood, we propose the hypothesis that fibrogenic reversion, rather than myofibroblast activation, drives FGF7 expression during injury and that *IRS2* preferentially favors reversion and survival of HSCs tasked with stimulating epithelial repair. Future work by this laboratory will seek to further test this hypothesis.

Materials and methods

Ethics statement

Mice were housed in the facility of the CIPF (Valencia, Spain), which is registered as an experimental animal Breeding, User, and Supplier Center (reg. no. ES 46 250 0001 002) under current applicable Spanish regulations (RD 53/2013). Animals were kept in ventilated racks with microisolators under specific-pathogen-free (SPF) conditions and handled by accredited personnel and treated in accordance with EU legislation and welfare guidelines. Procedures were approved by the CIPF "Comite Ético de Experimentación Animal" (CEEA) and the ministry for "Agricultura, pesca, alimentación y agua" of the Generalitat Valenciana (Valencia, Spain), under the authorization code 2014/VSC/PEA/00062 tipo 2. Mice were killed by fentanyl/pentobarbital overdose followed by cervical dislocation.

Animal experimentation

WT and *Irs2*^{-/-} C57BL/6 littermates (females aged 10–12 weeks, fasting blood glucose < 100 mg/dL) were fed a modified LabDiet (5015) containing 0.1% DDC (TestDiet, St. Louis, MO, USA). Animals were killed at intervals up to 21 days during the light cycle. FGF7 stimulation was performed by i.p. injection of (0.3 mg/kg) recombinant mouse KGF (Taper BioLegend, San Diego, CA, USA).

Liver injury and cholestasis markers

Serum transaminases were measured by ELISA according to manufacturer's instructions (MilliporeSigma, St. Louis, MO, USA), and serum total bilirubin (TBIL) was measured by colorimetric assay according to the Jendrassik-Grof method (MilliporeSigma). Bile acids were measured by metabolomic analysis. Briefly, samples were extracted from whole-liver tissue using the metanol-chloroform-H₂O method [48] and analyzed on a 600 MHz NMR spectrometer equipped with a cryoprobe. Metabolites were identified with the aid of the spectral databases HMDB [49] and BMRB [50] and quantified using MestreNova8.

Cell culture

HepaRG cells (kind gift of Anne Corlu and Cristiane Guillouzo) were passaged and differentiated as previously described [30] using Williams E medium (10% fetal calf serum, 50 μ M hydrocortisone hemisuccinate, 0.88 μ M insulin, and 2 mM L-glutamine and penicillin-streptomycin). DMSO (2%) was added from day 14. Insulin supplement was omitted from the medium where indicated 24 h postplating. rhFGF7 (50 ng/ml; Cell Guidance Systems, St. Louis, MO, USA) or rhFGFR2-IIIb Fc Chimera (100 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were added to media where indicated every 48 h. Cryopreserved primary hHSCs were obtained from a healthy 15-year-old Caucasian female donor using a previously described isolation method [51] (Innoprot, Derio, Spain). LX-2 cells (kind gift of Scott Friedman) and primary hHSCs were cultured in DMEM (2% fetal calf serum), and primary HSCs were used within 5 passages. LX-2/HSCs were inactivated for 3 h with 1mg/ml MitoC (MilliporeSigma) before seeding onto 0.1%-gelatin-coated plates. After 24 h, activated/inactivated HSC cultures were switched to HepaRG medium until the end of the experiments. Stable cell lines were generated by lentiviral transduction (vectors summarized in S1 Table) using a multiplicity of infection of 0.5–20 TU/cell in the presence of 8 μ M polybrene. Infections were performed 16 h postplating for 6 h in serum-free medium. Where applicable, cells were selected for 7 days in media containing 2.5 μ g/ml puromycin.

Cell viability

MTT assay: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (5 mg/ml, MilliporeSigma) was added to media in a 1:5 ratio and incubated in the dark for 4 h. Resulting formazan crystals were resuspended in DMSO, and optical density (OD) was measured at 570 nm using an automated microplate reader (Victor; PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Fluorescence immunostaining

Fresh frozen liver tissue sections (6 μ m, mounted in OCT, MilliporeSigma) or cells were fixed using 4% paraformaldehyde–PBS, washed, and permeabilized with 0.5% Triton-X100 before blocking (1% BSA, 5% horse serum, 0.2% Triton-X100). Primary antibodies (S2 Table) were incubated over night at 4 °C. Alexa-conjugated secondary antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were applied for 1 h together with 5 μ g/ml Hoechst 33342 prior to mounting. Confocal images were obtained using a Leica TCS-SP6 (Leica, Wetzlar, Germany). Fluorescence image analysis was performed using INCell Analyzer 1000 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) as outlined below.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (4 μ m) were processed automatically using the Autostainer Link 48 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) with EnVision FLEX reagents

according to manufacturers' instructions (Agilent). Antigen retrieval was performed using high-pH target retrieval solution (Agilent). Antibodies are provided in [S2 Table](#).

Collagen morphometry

Collagen was visualized in PFE liver sections using the Picro Sirius Red technique (Abcam, Cambridge, UK) according to manufacturer's instructions. Following imaging, threshold analysis was performed using FIJI software to quantify staining in a total area comprising >10 portal fields per animal.

Image analysis

Fluorescence immunostained cells/cryosections were analyzed using the "INcell 1000" imaging platform and software (GE Healthcare) where indicated. Individual cells were identified by Hoechst staining. Threshold analysis was used to determine the expression of the following markers: *pAPOA2-GFP*, albumin, CYP3A4, HNF4 α , Ki67, Spp1, and Vimentin. For replicate well/tissue sections, at least 20 fields were randomly analyzed for each replicate. PFE tissue sections were imaged using Panoramic Viewer (3DHISTEC) and analyzed with FIJI software; β -catenin staining was quantified using FIJI (histogram function) to calculate modal pixel intensity.

Hepatocyte ploidy

Interpolation of DNA content in HNF4 α /Hoechst-stained liver sections was performed using a methodology developed by our laboratory using INcell 1000 (GF Healthcare) that enabled in situ approximation of hepatocyte ploidy ([S3 Fig](#)). DNA content was calculated for all circular hepatocyte nuclei (nuclear elongation value > 0.8) as a combined function of Hoechst nuclear fluorescence intensity (DNA density) and nuclear volume (calculated as a spherical function of nuclear radius). Hepatocyte ploidy was then calibrated using circular HNF4 α - NPC cell population within the tissue as a 2n control. The 2c hepatocyte population was defined as the population of HNF4 α + nuclei within the 19.99 μm^2 –34.99 μm^2 nuclear size range with a nuclear circularity index >0.8.

Immunoblotting

Tissues were lysed in RIPA buffer containing complete protease and phosphatase inhibitors (Roche, Basel, Switzerland). Protein (20 μg /well) was separated using standard SDS-PAGE. Transferred PVDF membranes were blocked (TBS-Tween 3% BSA) and probed with primary antibodies ([S2 Table](#)).

RT-qPCR

Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) with DNaseI Digestion. Liver tissue was preprocessed using Trizol (MilliporeSigma). For experiments using cells, RNA from duplicate wells were analyzed. First-strand synthesis was performed using EcoDry Premix (Takara, Kusatsu, Japan), and real time-PCR was carried out in LightCycler 480 II (Roche) using SYBR PreMix ExTaq (Mi RNaseH Plus, Takara). Reverse transcriptase-quantitative PCR (RT-qPCR) was performed in triplicates for all RNAs analyzed. Primers are listed in [S3 Table](#). Relative gene expression was calculated by normalization to Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) in mouse liver and to Ribosomal Protein L19 (RPL19) in human cell lines.

Statistics and data processing

For experiments using animals, values of n reflect the number of animals per cohort. Cohort size was based on previous studies and expertise using the *Irs2*^{-/-} model. For nonanimal experiments, values of n reflect the number of independent experiments performed. When possible, automated methods of image analysis were employed to quantify immunostainings using the “INcell 1000” imaging platform and software (GE Healthcare). Statistical analyses were performed with Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com. One-way ANOVA was used to compare multiple means with one variable. Multiple comparisons were obtained applying Tukey’s test. Ordinary two-way ANOVA was used to analyze data sets with several variables and Bonferroni’s test for multiple comparisons. When two data sets were compared, unpaired Student t test was used. Results were represented as mean + SEM considering statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

Supporting information

S1 Fig. Impact of DDC injury on Fgfr2-IIIb ligand gene expression. Whole-liver mRNA levels were assessed for Fgf7 family member genes *Fgf10* and *Fgf22* in WT and *Irs2*^{-/-} mice during a time course of DDC feeding by RT-qPCR ($n = 3-8$). Data information: underlying data are available in [S2 Data](#). Data are represented as mean + SEM: Two-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using Tukey’s multiple comparison test (* $P < 0.05$). Dotted lines indicate statistically significant decrease with time. DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; Fgfr2-IIIb, Fgf7 receptor; Fgf7, fibroblast growth factor 7; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; mRNA, messenger RNA; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; WT, wild type. (TIF)

S2 Fig. Delayed expansion of NPCs parallels exacerbated parenchymal cell depletion in the livers of *Irs2*^{-/-} mice during DDC feeding. (A–C) HNF4 α immunostaining was used to quantify the parenchymal (HNF4 α +) and NPC (HNF4 α -) responses to DDC liver injury in WT and *Irs2*^{-/-} mice. (A) Representative images of HNF4 α immunostaining (DDC day 21). Below: masks used to gate and quantify hepatocyte and NPC densities in whole-liver sections using INcell Analyzer (total cells analyzed: 1.23×10^6). (B) Time course of DDC liver injury comparing the numbers of NPC nuclei (HNF4 α -) in livers of WT and *Irs2*^{-/-} mice ($n = 4-6$, total of 7.2×10^5 HNF4 α - nuclei analyzed). (C) Time course of DDC liver injury comparing the numbers of hepatocyte nuclei (HNF4 α +) in livers of WT and *Irs2*^{-/-} mice ($n = 4-6$, total of 5.1×10^5 HNF4 α + nuclei analyzed). (D) Size distribution of HNF4 α + hepatocyte nuclei in livers of WT and *Irs2*^{-/-} mice following DDC liver injury (d21), calculated in situ using INcell Analyzer. Data show significant depletion of small hepatocytes nuclear area $< 75 \mu\text{m}^2$. ($n = 4$, total of 1.2×10^5 HNF4 α + nuclei analyzed). Data information: underlying data are available in [S2 Data](#). Data are presented as mean + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Two-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using Bonferroni test. DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4-alpha; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; NPC, nonparenchymal cell; WT, wild type. (TIF)

S3 Fig. Loss of hepatocytes in *Irs2*^{-/-} mice during chronic DDC liver injury corresponds with failure to activate small “2c” hepatocyte populations. (A–B) Analysis of hepatocyte ploidy in HNF4 α immunolabelled liver sections. (A) High-content imaging was used to generate frequency, size, and morphometry profiles of HNF4 α + nuclei based on quantification of Hoechst DNA staining in liver tissue sections. Upper panel shows representative images of

hepatocyte nuclei of different sizes and shapes, with smaller nuclei ($<75 \mu\text{m}^2$) tending to have greater circularity indices (>0.8), whereas larger nuclei tended to be bilobular. We observed discrete peaks in nuclear “circularity” (I–IV) that we hypothesized corresponded to the major ploidy groupings in the liver: 2n, 4n, 8n, and 16n. Data shown from untreated WT livers ($n = 4$, 1.35×10^4 HNF4 α + nuclei per animal). (B) To test this hypothesis, all nuclei were gated for circularity (>0.8), and DNA content was calculated for peaks I–V as a function of interpolated nuclear volume and Hoechst intensity (formula below). Using HNF4 α –NPCs as an internal 2n control, we confirmed that populations I–IV accurately represented 2c, 4c, 8c, and 16c hepatocyte populations, respectively ($n = 4$, 1.1×10^4 HNF4 α + nuclei per animal). This original methodology to describe hepatocyte ploidy in situ was then applied to WT and *Irs2*^{−/−} livers during DDC feeding. (C) Quantification of small hepatocytes with an estimated 2n DNA content (2c) as calculated in situ using INCell Analyzer showing time-dependent increase in WT livers (days 14–21) and significant depletion in livers of *Irs2*^{−/−} mice following DDC feeding (day 21) ($n = 4$ –6, total of 4.8×10^4 HNF4 α + nuclei analyzed). Data information: underlying data are available in [S2 Data](#). Data are presented as mean + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Two-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using Bonferroni test. DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4-alpha; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; NPC, nonparenchymal cell; WT, wild type. (TIF)

S4 Fig. PF/myofibroblast markers are expressed at equivalent or increased levels in livers *Irs2*^{−/−} mice after DDC injury. (A–B) Analysis of PF/myofibroblast markers by immunostaining in periportal sections of WT and *Irs2*^{−/−} mice on day 21 of DDC feeding. (A) Representative confocal images of DDC livers using indicated antibodies. Dotted line = portal vein. (B) Graphical quantification of immunostainings by analysis of staining area ($n = 3$ –4). Data information: underlying data are available in [S2 Data](#). Data are presented as mean + SEM. * $P < 0.05$. (B) Unpaired Student t test was used to compare means. DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; PF, portal fibroblast; WT, wild type. (TIF)

S5 Fig. The stromal niche in *Irs2*^{−/−} mice is replete with cells expressing PF/myofibroblast markers Thy1 and α SMA but exhibits reduced contact between Gfap⁺ HSCs and LPCs. (A–B) Confocal images of immunofluorescence-stained DDC livers describing the stromal environment surrounding LPCs in WT and *Irs2*^{−/−} mice at the indicated time points. White dotted line = portal vein. (A) Thy1+ cells surrounded ducts containing Epcam+/Spp1+ LPCs in the livers of both WT and *Irs2*^{−/−} mice (indicated by arrows). Selected images are representative of $n = 5$. (B) The stromal niche in both WT and *Irs2*^{−/−} mice also contained α Sma+ myofibroblasts (arrowheads) surrounding Spp1+ LPCs. However, Gfap+ HSCs were reduced in number in the *Irs2*^{−/−} stroma, and contact between Gfap+ cells and LPCs (arrows) was reduced. Yellow dotted boxes mark expanded regions of interest containing representative duct-like structures (*). Selected images are representative of $n = 3$ –5. DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; Gfap, glial fibrillary acidic protein; HSC, hepatic stellate cell; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; LPC, liver progenitor cell; PF, portal fibroblast; Spp1, secreted phosphoprotein 1; Thy1, Thy-1 cell surface antigen; WT, wild type; α Sma, alpha-smooth actin muscle. (TIF)

S6 Fig. DDC injury in *Irs2*^{−/−} mice leads to more rapid activation of tissue-remodeling genes and mobilization of bone-marrow-derived stroma. (A) Early induction of fibrogenic

genes in *Irs2*^{-/-} mice coincided with increased leukocyte gene expression. RT-qPCR analysis of whole-liver mRNA using a panel of genes associated with tissue remodeling and bone-marrow-derived stroma (*n* = 6–8). *Irs2*^{-/-} mice displayed increased early induction of profibrogenic cytokine *Tgfβ*, transcription factor *Myc*, and tissue-remodeling factors *Timp1/Mmp9* on day 7. This coincided with a dramatic peak in myeloid stem cell factor (*Kit*) and leukocyte gene expression (*Ptprc/Cd45*). (B) Increased *Thy1/Cd45* colocalization in DDC livers of *Irs2*^{-/-} mice indicates greater incorporation of bone-marrow-derived cells into the stromal niche. Confocal immunofluorescence images of WT and *Irs2*^{-/-} livers after 21 days of DDC feeding. Rounded *Cd45+* cells typical of leukocytes were observed in WT livers (*), whereas *Cd45+* cells in *Irs2*^{-/-} livers coexpressed *Thy1* and were more flattened (dotted arrows). Selected images are representative of *n* = 4. White dotted line = portal vein. Yellow boxes mark expanded regions of interest. (C) Mobilization of T lymphocytes increased in DDC livers of *Irs2*^{-/-} mice. Immunohistochemical staining for T-cell marker *Cd3* on DDC day 21. (Left) Representative images of *Cd3* immunostaining highlighting T cells (red arrows). (Right) Graphical quantification of *Cd3+* T-cell numbers in WT and *Irs2*^{-/-} livers (*n* = 6). Data information: underlying data are available in [S2 Data](#). Data are presented as mean + SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001. (A) Two-way ANOVA was used to compare means. Significance *P* values were calculated using Tukey's multiple comparison test. (C) Unpaired Student *t* test. DDC, 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; *Kit*, proto-oncogene c-Kit; mRNA, messenger RNA; *Mmp9*, matrix metalloproteinase 9; *Myc*, MYCO proto-oncogene; *Ptprc*, Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type C gene encoding CD45; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; *Tgfβ*, transforming growth factor beta; *Thy1*, Thy-1 cell surface antigen; *Timp1*, tissue inhibitor of metalloproteinase 1; WT, wild type. (TIF)

S7 Fig. Stable silencing of IRS2 in LX-2 cells had no measurable impact on fibrogenic gene expression or cell viability. (A) Stable knockdown of *IRS2* was performed in LX-2 cells using lentiviral shRNA (sh-*IRS2*) versus control vector (sh-luc). RT-qPCR was then performed for indicated HSC genes under standard culture conditions (*n* = 3). (B) MTT assay was used to assess cell viability in *IRS2* knockdown (sh-*IRS2*) versus control (sh-luc) LX-2 cells (*n* = 3). Data information: underlying data are available in [S2 Data](#). Data are presented as mean + SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001. Paired Student *t* test was used to compare means. HSC, hepatic stellate cell; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; sh-*IRS2*, shRNA-targeting *IRS2*; sh-luc, control luciferase; shRNA, short hairpin RNA. (TIF)

S8 Fig. Differentiation of bipotent human HepaRG to hepatocytes is insulin and *IRS2* dependent. (A) Schematic: bipotent HepaRG cells differentiate to produce "islands" of hepatocyte-like cells. (B, C) Insulin signaling promotes HepaRG–hepatocyte differentiation. (B) Phase-contrast (Phase) and immunofluorescence images of HepaRG cells differentiated in "control" media with insulin supplement (0.88 μM) or in media in which the supplement was excluded (–). Cells stably transduced with a GFP reporter construct driven by the human *APOA2* promoter (p*APOA2*-GFP) or Albumin/*HNF4α* immunostaining were used to visualize hepatocyte islands. H = Hoechst. (C) Quantification of p*APOA2*-GFP expression with time during HepaRG differentiation in the presence (control) or absence (ins–) of supplemented insulin (*n* = 3). (D) Stable silencing of *IRS2* promotes insulin resistance in HepaRG cells. Above: schematic showing how the *IRS2* scaffold protein couples the activated receptor tyrosine kinase to intracellular effectors such as PI3K. Below: western blot showing stable

knockdown of *IRS2* and concomitant reduction in the activation of PI3K downstream of insulin stimulation, as judged by reduced phosphorylation PI3K effector AKT (Serine 473). (E, F) Stable silencing of *IRS2* in HepaRG blocked hepatocyte differentiation in the presence of insulin. (E) Immunofluorescence stainings for hepatocyte markers Albumin, HNF4 α , and CYP3A4 of differentiated HepaRG cells following stable lentiviral transduction with control (sh-scram) or sh*IRS2* coexpressing GFP. H = Hoechst. (F) INcell quantification of hepatocyte differentiation ($n = 3$). Data information: underlying data available in [S2 Data](#). Data are presented as mean + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. (C) Two-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using Bonferroni test. (F) Unpaired Student t test. AKT, Protein kinase B; *APOA2*, apolipoprotein A2; CYP3A4, cytochrome P450 3A4; GFP, green fluorescent protein; HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4-alpha; ins, insulin; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; *APOA2*, *APOA2* promoter; PI3k, phosphoinositide 3-kinase; sh*IRS2*, shRNA-targeting *IRS2*; shRNA, short hairpin RNA; sh-scram, scrambled shRNA.

(TIF)

S9 Fig. Treatment of HepaRG cultures with rhFGF7 promoted rapid induction of osteopontin/*SPP1* expression in vitro. RT-qPCR time course of rhFGF7 response in HepaRG cells (day 13). Changes in osteopontin/*SPP1* are compared to vehicle-treated cont. Data information: underlying data are available in [S2 Data](#). Data are presented as mean + SEM. Data are presented as mean + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Two-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using Tukey's multiple comparison test. cont, control; Fgf7, fibroblast growth factor 7; rhFGF7, recombinant human FGF7; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; Spp1, secreted phosphoprotein 1.

(TIF)

S10 Fig. Impact of stromal *IRS2* gene silencing on LX-2/HepaRG cocultures. (A) RT-qPCR time course showing changes in FGFR2-IIIb ligand gene expression in LX-2/HepaRG cocultures. Silencing of *IRS2* in LX-2 cells resulted in impaired *FGF10* induction (above) but had no impact upon *FGF22* expression (below) ($n = 3$). (B) *IRS2* was required for time-dependent switching between *THY1* and *SPP1*. Day 2 and day 14 LX-2/HepaRG cocultures maintained in media with (+) or without (-) supplemented insulin were analyzed for mesenchymal genes associated with myofibroblasts (*THY1*) or LPCs (*SPP1*) by RT-qPCR. Switching from *THY1* to *SPP1* was observed in cocultures using control LX-2 stroma (sh-luc) but not in those in which *IRS2* was silenced (sh-*IRS2*) ($n = 3$). (C) Silencing of *IRS2* favored expansion of LX-2 cells in HepaRG coculture. Phase-contrast (Phase) and immunofluorescence images (GFP) taken on day 14 of LX-2/HepaRG coculture. Stromal expansion within the cocultures (s) was tracked by lentiviral coexpression of GFP in control (sh-luc) or *IRS2*-deficient (sh-*IRS2*) LX-2 cells. (Images are representative of $n = 3$.) Data information: underlying data are available in [S2 Data](#). Data are presented as mean + SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Two-way ANOVA was used to compare means. Significance P values were calculated using (A) Tukey's or (B) Sidak's multiple comparison tests. Fgfr2-IIIb, Fgf7 receptor; Fgf7, fibroblast growth factor 7; *Irs2*, insulin receptor substrate 2; RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR; sh*IRS2*, shRNA-targeting *IRS2*; sh-luc, control luciferase; shRNA, short hairpin RNA; Spp1, secreted phosphoprotein 1; Thy1, Thy-1 cell surface antigen.

(TIF)

S1 Table. Lentiviral vectors used to generate stable cell lines.
(DOCX)

S2 Table. List of antibodies and conditions used for western blot, ICC, and IHC. ICC, immunocytochemistry; IHC, immunohistochemistry.
(DOCX)

S3 Table. List of primers used for RT-qPCR. RT-qPCR, reverse transcriptase-quantitative PCR.
(DOCX)

S1 Data. Underlying data for main figures.
(XLSX)

S2 Data. Underlying data for supporting figures.
(XLSX)

Acknowledgments

The authors thank Dr. Lothar Vassen at the Institut de recherches cliniques, Montréal (Canada) for the human *IRS2* promoter sequence; Alberto Hernandez Cano and Alicia Martinez (CIPF, Spain) for help with confocal imaging and INCell analysis; Martina Palomino (CIPF) for help with NMR analysis; Vicente Felipo (CIPF) for critical reading of the manuscript and Anne Corlu (University of Rennes) for HepaRG cells and support with project design; and Prof. Alexander Levitzki (The Hebrew University of Jerusalem) for providing NT-157.

Author Contributions

Conceptualization: Luke A. Noon.

Data curation: Luke A. Noon.

Formal analysis: Luke A. Noon.

Funding acquisition: Luke A. Noon.

Investigation: Fátima Manzano-Núñez, María José Arámbul-Anthony, Amparo Galán Albiñana, Aranzazu Leal Tassias, Carlos Acosta Umanzor, Irene Borreda Gascó, Antonio Herrera, Luke A. Noon.

Methodology: Luke A. Noon.

Project administration: Luke A. Noon.

Resources: Jerónimo Forteza Vila, Deborah J. Burks.

Supervision: Jerónimo Forteza Vila, Deborah J. Burks, Luke A. Noon.

Validation: Luke A. Noon.

Visualization: Luke A. Noon.

Writing – original draft: Luke A. Noon.

Writing – review & editing: Deborah J. Burks, Luke A. Noon.

References

1. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83: 835–870. <https://doi.org/10.1152/physrev.2003.83.3.835> PMID: 12843410
2. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.* 2007; 117: 1219–22. <https://doi.org/10.1172/JCI32169> PMID: 17476353

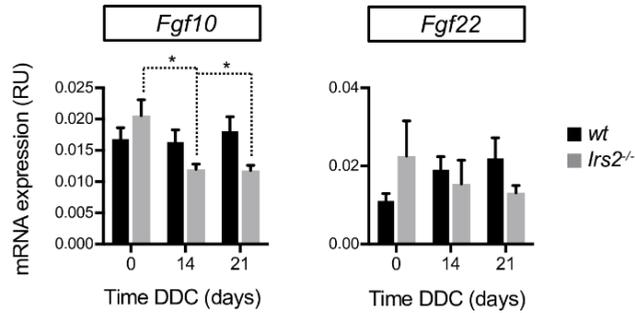
3. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*. 2015; 62:S47–S64. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012> PMID: [25920090](#)
4. Katsumata LW, Miyajima A, Itoh T. Portal fibroblasts marked by the surface antigen Thy1 contribute to fibrosis in mouse models of cholestatic liver injury. *Hepatol Commun*. 2017; 1: 198–214. <https://doi.org/10.1002/hep4.1023> PMID: [29404454](#)
5. Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *J Hepatol*. 2007; 47: 142–56. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.002> PMID: [17512085](#)
6. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 1998; 391: 900–904. <https://doi.org/10.1038/36116> PMID: [9495343](#)
7. Valverde AM, Burks DJ, Fabregat I, Fisher TL, Carretero J, White MF, et al. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in IRS-2-Deficient Hepatocytes. *Diabetes*. 2003; 52:2239–2248. PMID: [12941762](#)
8. Kubota N, Kubota T, Kajiwara E, Iwamura T, Kumagai H, Watanabe T, et al. Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity. *Nat Commun*. 2016; 7: 12977. <https://doi.org/10.1038/ncomms12977> PMID: [27708333](#)
9. Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, et al. Dynamic Functional Relay between Insulin Receptor Substrate 1 and 2 in Hepatic Insulin Signaling during Fasting and Feeding. *Cell Metab*. 2008; 8: 49–64. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.05.007> PMID: [18590692](#)
10. Rametta R, Mozzi E, Dongiovanni P, Motta BM, Milano M, Roviario G, et al. Increased insulin receptor substrate 2 expression is associated with steatohepatitis and altered lipid metabolism in obese subjects. *Int J Obes*. 2013; 37: 986–992. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.181> PMID: [23147115](#)
11. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, et al. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol*. 2004; 165: 1499–508. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63408-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63408-6) PMID: [15509521](#)
12. Boissan M, Beurel E, Wendum D, Rey C, Lécluse Y, Housset C, et al. Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 2005; 167: 869–77. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62058-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62058-5) PMID: [16127164](#)
13. Jeong S-H, Kim H-B, Kim M-C, Lee J, Lee JH, Kim J-H, et al. Hippo-mediated suppression of IRS2/AKT signaling prevents hepatic steatosis and liver cancer. *J Clin Invest*. 2018; 128: 1010–1025. <https://doi.org/10.1172/JCI95802> PMID: [29400692](#)
14. Lee K-P, Lee J-H, Kim T-S, Kim T-H, Park H-D, Byun J-S, et al. The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 8248–8253. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912203107> PMID: [20404163](#)
15. Steinberg Z, Myers C, Heim VM, Lathrop CA, Rebustini IT, Stewart JS, et al. FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development*. 2005; 132: 1223–1234. <https://doi.org/10.1242/dev.01690> PMID: [15716343](#)
16. Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development*. 1999; 126: 5611–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572038> PMID: [10572038](#)
17. Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, et al. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*. 1994; 266: 819–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7973639> PMID: [7973639](#)
18. Steiling H, Mühlbauer M, Bataille F, Schölmerich J, Werner S, Hellerbrand C. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol*. 2004; 165: 1233–1241. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63383-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63383-4) PMID: [15466389](#)
19. Takase HM, Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, et al. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev*. 2013; 27: 169–181. <https://doi.org/10.1101/gad.204776.112> PMID: [23322300](#)
20. Kaneko K, Kamimoto K, Miyajima A, Itoh T. Adaptive remodeling of the biliary architecture underlies liver homeostasis. *Hepatology*. 2015; 61: 2056–2066. <https://doi.org/10.1002/hep.27685> PMID: [25572923](#)
21. Itoh N, Nakayama Y, Konishi M. Roles of FGFs As Paracrine or Endocrine Signals in Liver Development, Health, and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 4: 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00001>
22. Utley S, James D, Mavila N, Nguyen M V., Vendryes C, Salisbury SM, et al. Fibroblast growth factor signaling regulates the expansion of A6-expressing hepatocytes in association with AKT-dependent β -catenin activation. *J Hepatol*. 2014; 60: 1002–1009. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.017> PMID: [24365171](#)

23. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signaling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 116–129. <https://doi.org/10.1038/nrc2780> PMID: 20094046
24. Chell JM, Brand AH. Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. *Cell*. 2010; 143: 1161–1173. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.007> PMID: 21183078
25. Cheetham SW, Brand AH. Cell biology. Insulin finds its niche. *Science*. 2013; 340: 817–8. <https://doi.org/10.1126/science.1238525> PMID: 23687033
26. Wang B, Zhao L, Fish M, Logan CY, Nusse R. Self-renewing diploid Axin2 + cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature*. 2015; 524: 180–185. <https://doi.org/10.1038/nature14863> PMID: 26245375
27. Font-Burgada J, Shalapur S, Ramaswamy S, Hsueh B, Rossell D, Umemura A, et al. Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer. *Cell*. 2015; 162: 766–779. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.026> PMID: 26276631
28. Xu J, Kisseleva T. Bone marrow-derived fibrocytes contribute to liver fibrosis. *Exp Biol Med*. 2015; 240: 691–700. <https://doi.org/10.1177/1535370215584933> PMID: 25966982
29. Reuveni H, Flashner-Abramson E. Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment. *Cancer Res*. 2013; 73: 4383–4394. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3385> PMID: 23651636
30. Parent R, Marion M-J, Furio L, Trépo C, Petit M-A. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology*. 2004; 126: 1147–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057753> PMID: 15057753
31. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2012; 109: 9448–9453. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201840109> PMID: 22566629
32. Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhatnath PS, et al. Progressive Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: Association With Altered Regeneration and a Ductular Reaction. *Gastroenterology*. Elsevier; 2007; 133: 80–90. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.012> PMID: 17631134
33. Fickert P, Stöger U, Fuchsichler A, Moustafa T, Marschall H-U, Weiglein AH, et al. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 2007; 171: 525–36. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061133> PMID: 17600122
34. Svegljati-Baroni G, Faraci G, Fabris L, Saccomanno S, Cadamuro M, Pierantonelli I, et al. Insulin resistance and necroinflammation drives ductular reaction and epithelial-mesenchymal transition in chronic hepatitis C. *Gut*. BMJ Publishing Group; 2011; 60: 108–15. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.219741> PMID: 20966027
35. Sanchez-Lopez E, Flashner-Abramson E, Shalapur S, Zhong Z, Taniguchi K, Levitzki A, et al. Targeting colorectal cancer via its microenvironment by inhibiting IGF-1 receptor-insulin receptor substrate and STAT3 signaling. *Oncogene*. 2016; 35: 2634–2644. <https://doi.org/10.1038/ncr.2015.326> PMID: 26364612
36. Yilmam D, Christodoulou C, Galli GG, Yanger K, Pepe-Mooney B, Gurung B, et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell*. Cell Press; 2014; 157: 1324–1338. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.060> PMID: 24906150
37. Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, et al. Mst1 and Mst2 Maintain Hepatocyte Quiescence and Suppress Hepatocellular Carcinoma Development through Inactivation of the Yap1 Oncogene. *Cancer Cell*. 2009; 16: 425–438. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.026> PMID: 19878874
38. Lu L, Finegold MJ, Johnson RL. Hippo pathway coactivators Yap and Taz are required to coordinate mammalian liver regeneration. *Exp Mol Med*. 2018; 50: e423. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.205> PMID: 29303509
39. Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropoulos S, McKeenan WL. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol*. 1993; 13: 4513–4522. <https://doi.org/10.1128/MCB.13.8.4513.Updated> PMID: 7687739
40. Berg T, Rountree CB, Lee L, Estrada J, Sala FG, Choe A, et al. Fibroblast growth factor 10 is critical for liver growth during embryogenesis and controls hepatoblast survival via β -catenin activation. *Hepatology*. 2007; 46: 1187–1197. <https://doi.org/10.1002/hep.21814> PMID: 17668871
41. Nies VJM, Sancar G, Liu W, van Zutphen T, Struik D, Yu RT, et al. Fibroblast Growth Factor Signaling in Metabolic Regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. Frontiers Media SA; 2015; 6: 193. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00193> PMID: 26834701

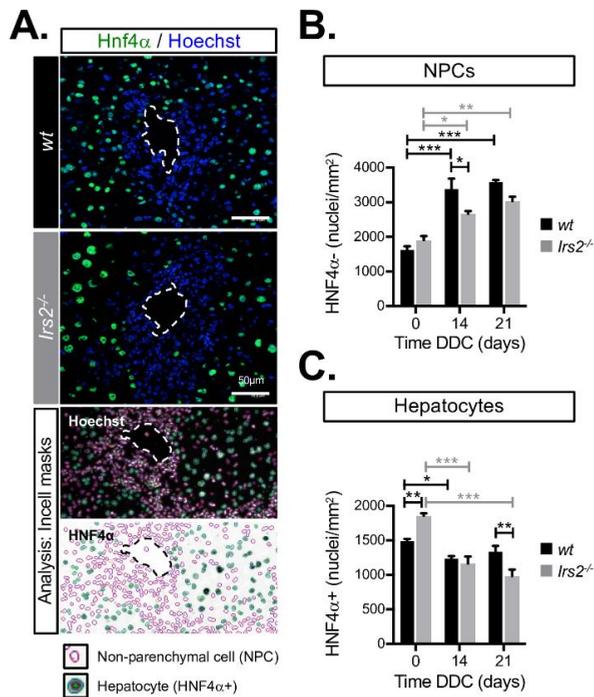
42. Steiling H, Wüstefeld T, Bugnon P, Brauchle M, Fässler R, Teupser D, et al. Fibroblast growth factor receptor signaling is crucial for liver homeostasis and regeneration. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2003; 22: 4380–4388. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206499> PMID: 12853974
43. Böhm F, Speicher T, Hellerbrand C, Dickson C, Partanen JM, Ornitz DM, et al. FGF receptors 1 and 2 control chemically induced injury and compound detoxification in regenerating livers of mice. *Gastroenterology*. 2010; 139: 1385–1396. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.069> PMID: 20603121
44. Padrissa-Altés S, Bachofner M, Bogorad RL, Pohlmeier L, Rossolini T, Böhm F, et al. Control of hepatocyte proliferation and survival by Fgf receptors is essential for liver regeneration in mice. *Gut*. 2015; 64: 1444–1453. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307874> PMID: 25416068
45. Werner S, Breeden M, Hübner G, Greenhalgh DG, Longaker MT. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol*. 1994; 103: 469–73. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12395564> PMID: 7930669
46. Peng C, Chen B, Kao H-K, Murphy G, Orgill DP, Guo L. Lack of FGF-7 Further Delays Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice. *Plast Reconstr Surg*. 2011; 128: 673e–684e. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318230c521> PMID: 22094769
47. Walker A, Nissen E, Geiger A. Migratory, metabolic and functional alterations of fibrocytes in type 2 diabetes. *IUBMB Life*. 2018; 70: 1122–1132. <https://doi.org/10.1002/iub.1920> PMID: 30184318
48. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc*. 2007; 2: 2692–2703. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376> PMID: 18007604
49. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46: D608–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089> PMID: 29140435
50. Ulrich EL, Akutsu H, Doreleijers JF, Harano Y, Ioannidis YE, Lin J, et al. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: D402–D408. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm957> PMID: 17984079
51. Weiskirchen R, Gressner AM. Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods Mol Med*. 2005; 117: 99–113. <https://doi.org/10.1385/1-59259-940-0:099> PMID: 16118448

Supplementary figures

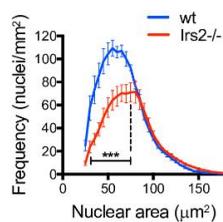
S1 Fig. Impact of DDC injury on *Fgfr2-IIIb* ligand gene expression.



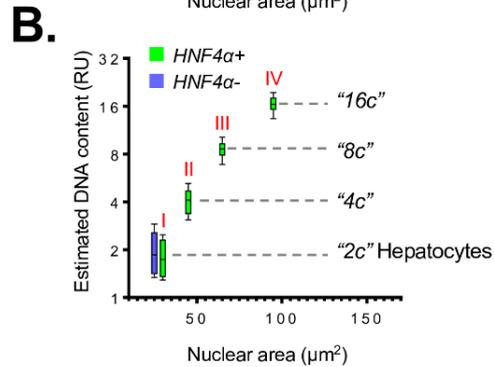
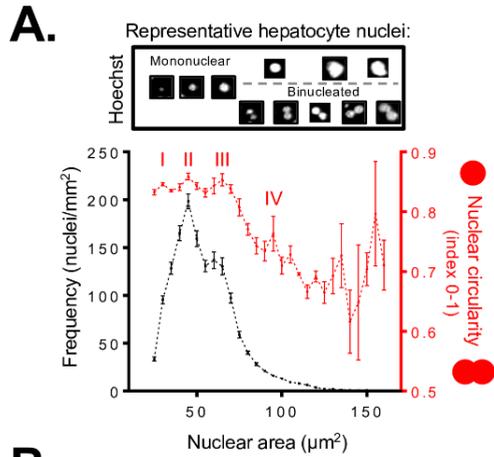
S2 Fig. Delayed expansion of NPCs parallels exacerbated parenchymal cell depletion in the livers of *Irs2*^{-/-} mice during DDC feeding.



D. Hepatocytes
Size distribution (d21)



S3 Fig. Loss of hepatocytes in *Irs2*^{-/-} mice during chronic DDC liver injury corresponds with failure to activate small “2c” hepatocyte populations.

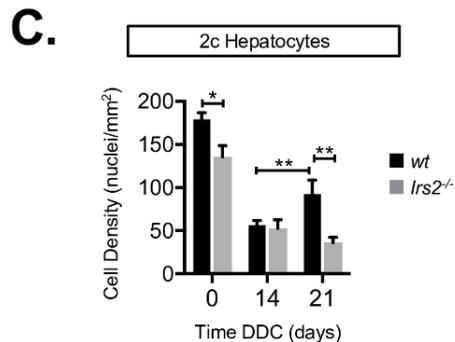


Ploidy analysis:

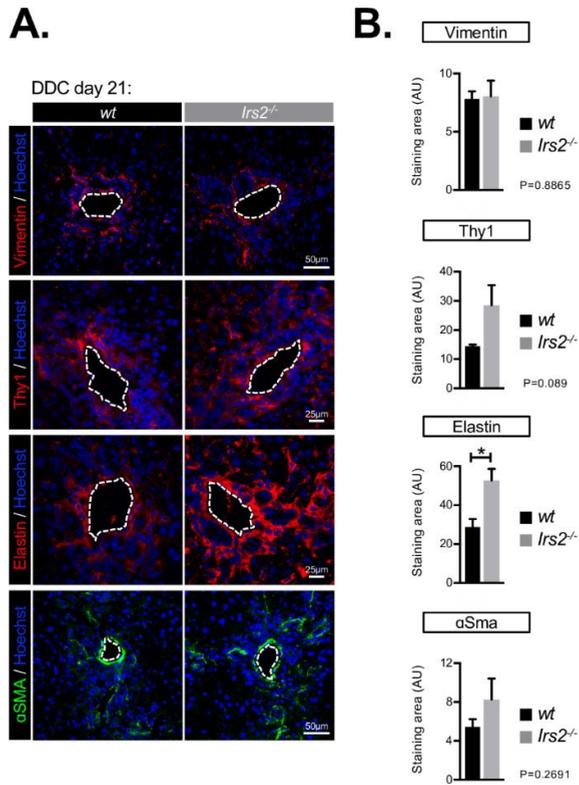
Gate for nuclei with circularity index (>0.8)



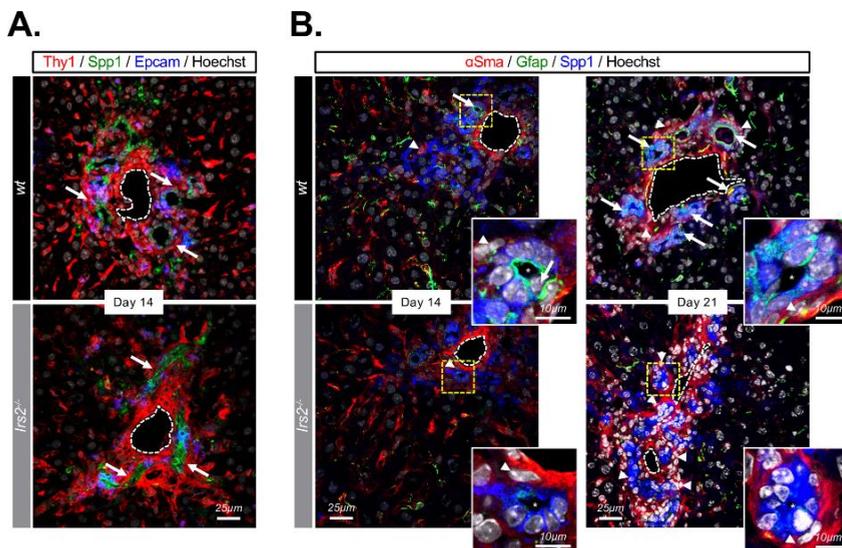
Interpolated Nuclear volume ($4/3 \cdot \pi \cdot r^3$)
x
DNA density (mean Hoechst intensity)



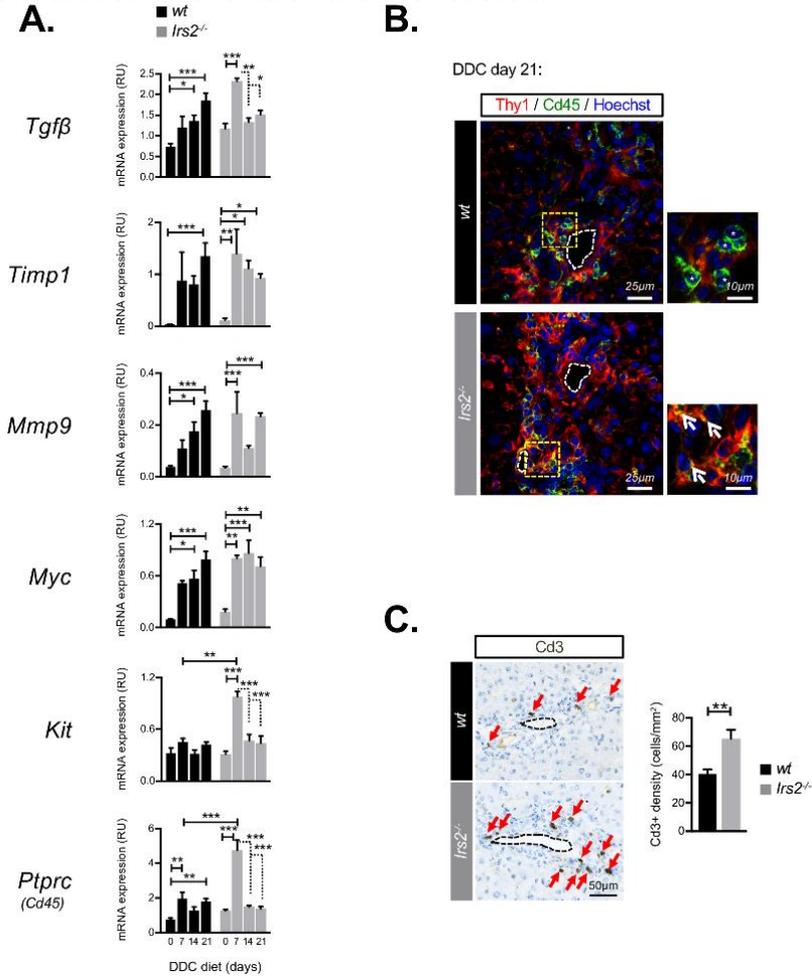
S4 Fig. PF/myofibroblast markers are expressed at equivalent or increased levels in livers *Irs2*^{-/-} mice after DDC injury.



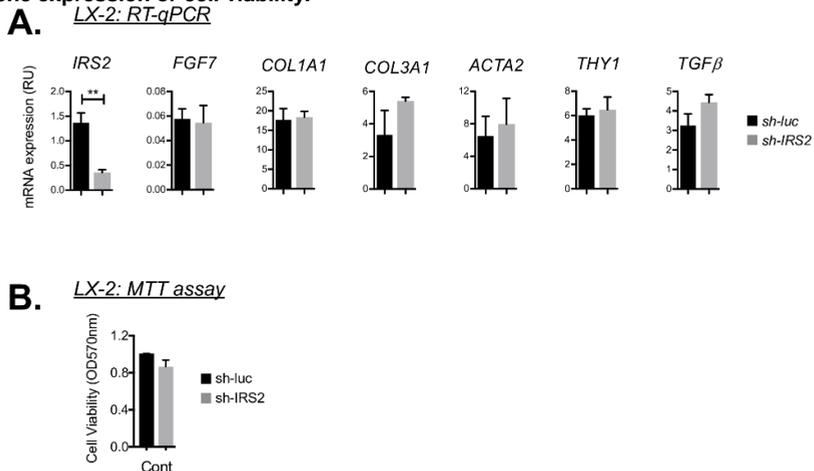
S5 Fig. The stromal niche in *Irs2*^{-/-} mice is replete with cells expressing PF/myofibroblast markers Thy1 and αSMA but exhibits reduced contact between Gfap⁺ HSCs and LPCs.



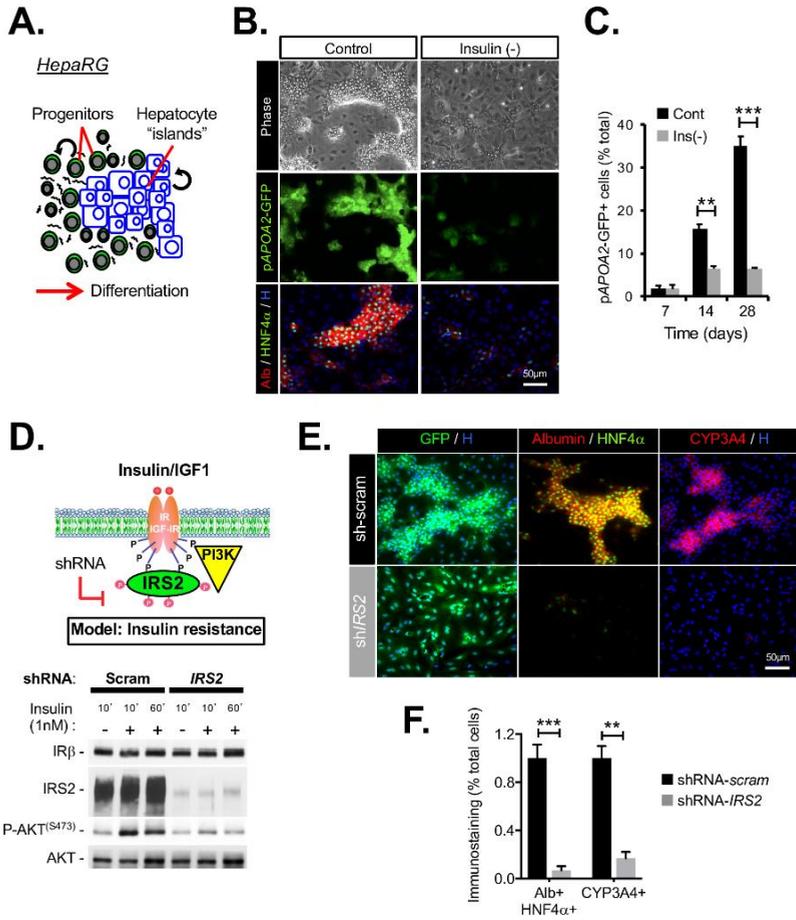
S6 Fig. DDC injury in *Irs2*^{-/-} mice leads to more rapid activation of tissue-remodeling genes and mobilization of bone-marrow-derived stroma.



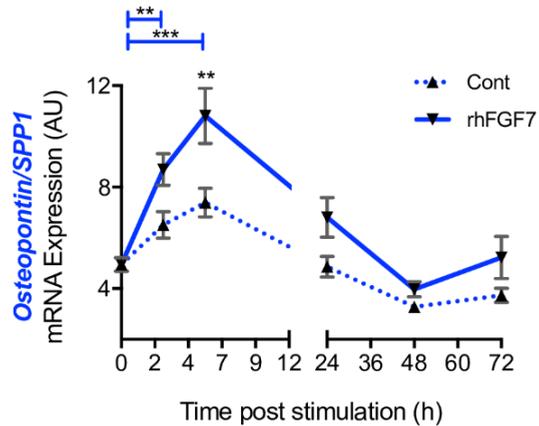
S7 Fig. Stable silencing of IRS2 in LX-2 cells had no measurable impact on fibrogenic gene expression or cell viability.



S8 Fig. Differentiation of bipotent human HepaRG to hepatocytes is insulin and IRS2 dependent.



S9 Fig. Treatment of HepaRG cultures with rhFGF7 promoted rapid induction of osteopontin/SPP1 expression in vitro.



S10 Fig. Impact of stromal IRS2 gene silencing on LX-2/HepaRG cocultures.

