

VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

**MODELOS *IN VITRO* PERSONALIZADOS
BASADOS EN CÉLULAS PLURIPOTENTES
PARA EL ESTUDIO DE LA TOXICIDAD
HEPÁTICA INDUCIDA POR FÁRMACOS DE
CARÁCTER IDIOSINCRÁSICO.**

María Pelechá Salvador

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

Dirigida por: Dra. María Teresa Donato Martín

Dra. Laia Tolosa Pardo

Unidad de Hepatología Experimental,
Instituto de Investigación Sanitaria La Fe



Instituto de Investigación
Sanitaria La Fe

Enero, 2023



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

**MODELOS *IN VITRO* PERSONALIZADOS
BASADOS EN CÉLULAS PLURIPOTENTES
PARA EL ESTUDIO DE LA TOXICIDAD
HEPÁTICA INDUCIDA POR FÁRMACOS DE
CARÁCTER IDIOSINCRÁSICO.**

María Pelechá Salvador

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

Dirigida por: Dra. María Teresa Donato Martín

Dra. Laia Tolosa Pardo

Unidad de Hepatología Experimental,
Instituto de Investigación Sanitaria La Fe



Instituto de Investigación
Sanitaria La Fe

Enero, 2023

D^a María Teresa Donato Martín, Doctora en Farmacia, profesora adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia e investigadora establecida en la Unidad de Hepatología Experimental y Trasplante Hepático del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

D^a Laia Tolosa Pardo, Doctora en Biología e investigadora establecida en la Unidad de Hepatología Experimental y Trasplante Hepático del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

Certifican que D^a María Pelechá Salvador, Graduada en Bioquímica y Ciencias Biomédicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección la presente Tesis Doctoral titulada “MODELOS IN VITRO PERSONALIZADOS BASADOS EN CÉLULAS PLURIPOTENTES PARA EL ESTUDIO DE LA TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR FÁRMACOS DE CARÁCTER IDIOSINCRÁSICO.” la cual reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y lectura.

Y para que conste a los efectos oportunos, autorizamos la defensa de la misma para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valencia.



Fdo. Dra. María Teresa Donato Martín

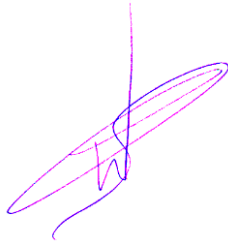


Fdo. Dra. Laia Tolosa Pardo

El Dr. CARLES SOLER VÁZQUEZ, professor adscrit al Departament de Biologia Cel·lular, Biologia Funcional i Antropologia Física de la Universitat de València i tutor d'aquesta Tesi Doctoral.

Certifica que la Sra. Maria Pelechà Salvador, Graduada en Bioquímica y Ciències Biomèdiques per la Universitat de València, ha realitzat la present Tesi Doctoral titulada "MODELOS IN VITRO PERSONALIZADOS BASADOS EN CÉLULAS PLURIPOTENTES PARA EL ESTUDIO DE LA TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR FÁRMACOS DE CARÁCTER IDIOSINCRÁSICO.", en el grup acreditat d'Hepatologia Experimental i Trasplantament Hepàtic de l'Institut d'Investigació Sanitària La Fe de València.

I, perquè així conste als efectes oportuns, autoritze la defensa de la mateixa per a optar al grau de Doctora per la Universitat de València.



Firma Dr. CARLES SOLER VÁZQUEZ

Esta investigación ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- «Estrategias innovadoras en el estudio de la hepatotoxicidad idiosincrásica inducida por medicamentos». Programa «Prometeo», 2019/060.
- «Evaluación preclínica de nuevas fuentes celulares y biomateriales en terapia celular para el tratamiento de metabopatías congénitas y fallo hepático». Instituto de Salud Carlos III, PI18/00993.
- «Hepatotoxicidad idiosincrásica por fármacos: estrategias *in vitro* para diagnóstico retrospectivo, atribución de la causalidad y evaluación del potencial riesgo clínico en pacientes susceptibles». Instituto de Salud Carlos III, PI16/00333.

María Pelechá Salvador recibió una subvención ACIF por la Generalitat Valenciana para la contratación de personal investigador predoctoral. Código ACIF2018/257.



Unión Europea
Fondo Social Europeo
El FSE invierte en tu futuro



AGRADECIMIENTOS

Ya hace algunos años que me gradué, pero nunca olvidaré que mi primer contacto con la investigación biomédica empezó en la Unidad de Hepatología Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (Valencia). Es por ello que quiero agradecer, en primer lugar, a todo el grupo por la confianza que desde el principio ha depositado en mí. Gracias de nuevo, porque las oportunidades que me habéis brindado son incomparables.

Mis más sinceros agradecimientos a mis directoras la Dra. María Teresa Donato Martín y la Dra. Laia Tolosa Pardo por creer en mí y permitirme realizar esta tesis doctoral en su laboratorio y a la Dra. María José Gómez Lechón por el apoyo que siempre he sentido de su parte. Gracias por estos años de formación, aprendizaje y sabiduría que me han guiado durante todo este recorrido.

No quiero dejar pasar la oportunidad de agradecer a todos mis compañeros que forman o han formado parte del grupo por su amistad y comprensión. Anabel, Quique, Estela V., Nuria, María B., Polina, Rebeca, Estela S., Julio, etc. habéis sido ese rayito de luz que me daba fuerzas día a día y, sin vosotros, esta tesis no habría sido posible, ¡Mil gracias!

Gracias a mis amigas de la universidad, especialmente a ti Marta S., a pesar de la distancia, tu apoyo siempre se ha sentido cerca.

También quiero agradecer a las personas que, fuera del ámbito científico han estado desde el principio conmigo, MI FAMILIA. A mis padres, a mi hermano y a Julienne, por la unión, el cariño y el afecto que me habéis dado siempre, especialmente en estos últimos años. Soy afortunada de teneros.

Por último, doy gracias a la vida por la ayuda que, tanto a nivel personal como profesional, me has dado Yeray. Gracias por tu paciencia, por estar siempre a mi lado, aun cuando creía que no era capaz de seguir adelante, aun cuando perdía la confianza. No hay palabras suficientes que describan el pilar que has sido estos años. Sin duda, lo he conseguido gracias a ti.

ÍNDICE

<u>LISTADO DE FIGURAS</u>	17
<u>LISTADO DE TABLAS</u>	20
<u>ABREVIATURAS</u>	21
<u>RESUMEN</u>	24
<i>Resumen</i>	24
<i>Abstract</i>	26
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	27
1.1. El hígado.	29
1.1.1. Anatomía del hígado.	29
1.1.2. Microanatomía del hígado.	29
1.1.3. Funciones del hígado.	32
1.1.4. Metabolismo de xenobióticos: detoxificación de fármacos.	34
1.1.4.1. Fase I de la detoxificación de xenobióticos.	34
1.1.4.2. Fase II de la detoxificación de xenobióticos.	35
1.1.4.3. Fase III de la detoxificación de xenobióticos.	36
1.2. Daño hepático inducido por fármacos (DILI)	37
1.2.1. DILI: concepto y relevancia.	37
1.2.2. Mecanismos implicados del DILI.	39
1.2.3. Diagnóstico del DILI.	41
1.2.4. DILI de carácter idiosincrásico (iDILI), epidemiología y factores de riesgo.	43
1.2.5. Amoxicilina/Clavulánico como causante de iDILI.	46
1.3. Modelos preclínicos para el estudio de DILI.	47
1.3.1. Modelos preclínicos in vivo: uso de animales de experimentación.	47
1.3.2. Modelos preclínicos in vitro: modelos basados en células humanas.	49
1.3.2.1. Hepatocitos primarios humanos.	49
1.3.2.2. Líneas celulares de hepatoma y modelos basados en PHH modificados.	49
1.3.2.3. Cocultivos.	51
1.3.2.4. Cultivos tridimensionales.	51
1.3.2.5 Células madre pluripotentes.	52
1.4. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC): concepto, generación y utilidad.	52
1.4.1. Concepto.	52
1.4.2. Reprogramación celular: estrategias para la generación de iPSC.	53
1.4.3. El potencial de las iPSC en biomedicina.	55

1.5. Células hepáticas derivadas de iPSC: generación y uso como modelo in vitro en iDILI.	57
1.5.1. Organogénesis del hígado.....	57
1.5.2. Protocolos para la obtención de HLC y su potencial para el estudio del iDILI.....	60
1.6. Técnicas analíticas avanzadas para el estudio del DILI.	64
<u>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>.....	67
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</u>	71
3.1. Materiales.....	73
3.2. Obtención de muestras de donantes.	75
3.3. Generación de iPSC.....	76
3.3.1. Aislamiento de PBMC.	76
3.3.2. Generación de iPSC derivadas de PBMC.....	77
3.3.3. Generación de placas con matriz feeder-free de Matrigel®.....	80
3.3.4. Adaptación de iPSC a placas con matriz feeder-free de Matrigel®.	81
3.3.5. Cultivo de mantenimiento y expansión de iPSC.....	81
3.3.6. Test de micoplasma.	82
3.3.7. Criopreservación de células.	83
3.4. Caracterización de iPSC.....	83
3.4.1. Inmunofluorescencia	83
3.4.2. Extracción y purificación de RNA.	84
3.4.3. Transcripción reversa (RT) del RNA mensajero (mRNA): síntesis de cDNA.	85
3.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR).	85
3.4.5. Análisis y cuantificación de la expresión génica.....	86
3.4.6. Cariotipo.	86
3.5. Diferenciación de iPSC a HLC.....	86
3.6. Caracterización del proceso de diferenciación y de las HLC.....	89
3.6.1. Inmunofluorescencia.	90
3.6.2. Análisis de la expresión génica.	90
3.6.3. Análisis transcriptómico: RNA sequencing (RNAseq).	90
3.6.4. Determinación de la producción de albúmina.....	91
3.6.5. Medida de la actividad ureogénica.	91
3.6.6. Almacenamiento de glucógeno.	91
3.6.7. Medida de actividades citocromo P450.	92

3.6.8. Análisis metabonómico.	93
3.7. Ensayos de toxicidad.	94
3.7.1. Compuestos seleccionados.	94
3.7.2. Evaluación de la toxicidad mediante ensayos multiparamétricos High Content Screening (HCS)	95
3.8. Medida de actividades citocromo p450 en tejido hepático.	97
3.8.1. Obtención de microsomas de tejido hepático.	97
3.8.2. Valoración de las actividades enzimáticas CYP450 en microsomas de tejido hepático.	98
3.9. Análisis estadístico.	98
<u>4. RESULTADOS.</u>.....	99
4.1. Generación y caracterización de iPSC humanas.	101
4.1.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).	101
4.1.2. Reprogramación de PBMC.	101
4.1.3. Caracterización de iPSC.	102
4.2. Diferenciación de iPSC a HLC.	106
4.2.1. Monitorización del proceso de diferenciación.	106
4.3. Caracterización de las HLC.	115
4.3.1. Caracterización transcripcional de las HLC.	115
4.3.2. Caracterización metabólica de las HLC.	120
4.3.3. Caracterización funcional de las HLC.	123
4.3.4. Caracterización de la capacidad de metabolización de xenobióticos.	124
4.4. HLC como modelo in vitro para estudios de hepatotoxicidad.	130
4.4.1. Estudio la hepatotoxicidad inducida por fármacos en HLC.	130
4.4.2. HLC para modelizar la esteatosis inducida por fármacos.	133
4.4.3. HLC para la identificación del agente causal en iDILI: estudio mecanístico de la hepatotoxicidad inducida por amoxicilina-clavulánico.	135
<u>5. DISCUSIÓN.</u>.....	139
5.1. Las PBMC constituyen una fuente de células somáticas apta para la reprogramación celular.	141
5.2. Las iPSC recapitulan la pluripotencia de las ESC.	142
5.3. Las iPSC son capaces de diferenciarse a células con fenotipo hepático.	143

<i>5.4. Las HLC poseen características hepáticas a nivel transcripcional, metabólico y funcional.</i>	<i>146</i>
<i>5.5. Las HLC son sensibles a fármacos hepatotóxicos y pueden ser un modelo celular adecuado para el estudio del DILI y los mecanismos implicados.</i>	<i>149</i>
<i>5.6. Las HLC procedentes de pacientes con sospecha de iDILI permiten el estudio de la toxicidad causada por el fármaco sospechoso.....</i>	<i>150</i>
<i>Perspectivas de futuro.....</i>	<i>154</i>
<u>6. CONCLUSIONES.</u>	157
<u>7. REFERENCIAS</u>	161
<u>CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS</u>	189

LISTADO DE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Estructura del lobulillo hepático y morfología del hepatocito.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 1.2. Funciones hepáticas.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 1.3. Metabolismo de fármacos en el hígado.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 1.4. Mecanismos implicados en el daño hepático inducido por fármacos (DILI).</i>	<i>40</i>
<i>Figura 1.5. Grupos de factores asociados a la susceptibilidad del DILI idiosincrásico en el ser humano.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 1.6. Estrategias de reprogramación celular.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 1.7. Aplicaciones de las iPSC.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 1.8. Principales marcadores asociados a cada fase del proceso de diferenciación de células pluripotentes a HLC.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 3.1. Aislamiento de PBMC mediante gradiente de densidad obtenido por centrifugación con Histopaque-1077.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 3.2. Esquema del proceso de reprogramación de PBMC mediante el kit de reprogramación Cytotune™-iPS 2.0 Sendai Reprograming kit.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 3.3. Imagen de contraste de fases de PBMC en cultivo a día -2 del proceso de reprogramación.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 3.4. Procedimiento para la diferenciación de iPSC a HLC.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 4.1. Figura representativa del proceso de generación de iPSC (donante C1).</i>	<i>102</i>
<i>Figura 4.2 Caracterización por microscopía de las iPSC (donante C1).</i>	<i>103</i>
<i>Figura 4.3. Caracterización por microscopía de las iPSC (donante P1).</i>	<i>104</i>
<i>Figura 4.4. Niveles de expresión de genes de pluripotencia (DNMT3B, NANOG, OCT3/4 Y SOX2) en iPSC a pases bajos ($P \leq 20$).</i>	<i>105</i>
<i>Figura 4.5. Caracterización de las líneas de iPSC generadas mediante bandeado cromosómico tipo G. ...</i>	<i>105</i>
<i>Figura 4.6. Análisis de la expresión de marcadores endodérmicos a día 3 del proceso de diferenciación en presencia (+) y ausencia (-) de WNT-3A.</i>	<i>106</i>
<i>Figura 4.7. Caracterización del proceso de diferenciación desde pluripotencia (día 0) a estadio de endodermo definitivo (día 3).</i>	<i>107</i>
<i>Figura 4.8. Caracterización del proceso de diferenciación en estadio hepatoblasto (día 9).</i>	<i>108</i>
<i>Figura 4.9. Caracterización del proceso de diferenciación en estadio hepatocito (día >25).</i>	<i>109</i>

Figura 4.10. Evolución de la expresión génica de marcadores característicos de pluripotencia y de la etapa de endodermo en el proceso de diferenciación de los donantes C1 y P1.....	113
Figura 4.11. Evolución de la expresión génica de marcadores característicos de las etapas de hepatoblasto y hepatocito en el proceso de diferenciación de los donantes C1 y P1.	114
Figura 4.12. Evolución de la expresión génica de marcadores representativos de pluripotencia y de fenotipo hepático durante el proceso de diferenciación de los donante C1 a C4 y P1.	115
Figura 4.13. Heatmap de los DEG obtenidos a partir del análisis de RNAseq de distintas diferenciaciones de PSC a HLC.....	116
Figura 4.14. Volcano plot que muestra la distribución de los DEG cuando comparamos PSC con HLC.	117
Figura 4.15. Heatmap de la expresión de genes implicados en rutas metabólicas hepáticas en iPSC y sus respectivas HLC.....	120
Figura 4.16. Estudio metabonómico en PSC y HLC.....	121
Figura 4.17. Análisis de enriquecimiento metabólico basado en los metabolitos más discriminantes entre las PSC y las HLC.....	122
Figura 4.18. Acumulación de glucógeno en las HLC detectada mediante tinción (ácido peryódico-Schiff).	124
Figura 4.19. Ejemplo representativo del efecto de la insulina y el glucagón en la acumulación de glucógeno (tinción magenta) detectada mediante tinción (ácido peryódico-Schiff) en HLC del donante C3.	124
Figura 4.20. Diagrama de sectores de los perfiles metabólicos de los principales CYP450 en HLC y tejido hepático de los donantes C1 a C4.	127
Figura 4.21. Diagrama de sectores del perfil metabólico de los principales CYP450 en HLC del donante P1.....	128
Figura 4.22. Inducción de CYP1A1 y CYP1A2 por 3-metilcolantreno.	129
Figura 4.23. Inducción de CYP2B6 por fenobarbital. La actividad CYP2B6 se midió utilizando bupropión como sustrato en células HLC previamente tratadas con fenobarbital 1 mM durante 48 h y en células control (no expuestas al inductor).	129
Figura 4.24. Ensayo de hepatotoxicidad para evaluar la respuesta de las líneas no hepáticas HeLa y A549, la línea hepática HepG2 y las HLC (de los donantes C1, C2, C3 y P1) a la exposición a concentraciones crecientes del fármaco hepatotóxico amiodarona.	131
Figura 4.25. Cuantificación de la toxicidad producida por la amiodarona en las HLC de los diferentes donantes por medio del ensayo multiparamétrico.	132
Figura 4.26. Imágenes representativas de la toxicidad producida por la amiodarona en las HLC de los donantes C1 y C3.....	133

Figura 4.27. Imágenes representativas de la acumulación de lípidos neutros y fosfolípidos en HLC incubadas con valproato y amiodarona.	134
Figura 4.28. Cuantificación de la acumulación de lípidos neutros y fosfolípidos en HLC incubadas con fármacos modelo.	135
Figura 4.29. Cuantificación del potencial de membrana mitocondrial y del Ca²⁺ intracelular de las HLC procedentes del donante P1 tras la exposición a concentraciones crecientes de A/C (8/4, 10/5 y 12/6 mM).	136
Figura 4.30. Estudio transcriptómico en HLC del donante P1 incubadas con A/C.	137
Figura 5.1. Mecanismos propuestos implicados en la hepatotoxicidad mediada por A/C.	153

LISTADO DE TABLAS

<i>Tabla 1.1. Células parenquimáticas y no parenquimáticas y sus características.</i>	32
<i>Tabla 1.2. Método RUCAM para el diagnóstico del DILI.</i>	43
<i>Tabla 1.3. Protocolos de referencia para la generación de células hepáticas derivadas de células pluripotentes (HLC).</i>	61
<i>Tabla 3.1. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia.</i>	73
<i>Tabla 3.2. Secuencia de los cebadores para las cuantificaciones de mRNA por qPCR.</i>	74
<i>Tabla 3.3. Características clínicas de los donantes seleccionados.</i>	76
<i>Tabla 3.4. Medios de cultivo y complementos utilizados en la reprogramación de PBMC.</i>	78
<i>Tabla 3.5. Medios de cultivo y complementos utilizados en la diferenciación hepática.</i>	89
<i>Tabla 3.6. Sustratos utilizados y metabolitos generados en los ensayos de valoración de actividades CYP450.</i>	93
<i>Tabla 3.7. Compuestos utilizados en los ensayos de toxicidad con HLC.</i>	94
<i>Tabla 3.8. Concentraciones de uso de los compuestos utilizados en los ensayos de toxicidad en HLC.</i>	95
<i>Tabla 3.9. Sondas fluorescentes utilizadas en los ensayos de toxicidad con HLC.</i>	97
<i>Tabla 4.1. Análisis de enriquecimiento KEGG: vías celulares representativas moduladas en función de los genes diferencialmente expresados en PSC y HLC.</i>	118
<i>Tabla 4.2. Producción y secreción de albúmina y urea en HLC.</i>	123

ABREVIATURAS

A/C: Amoxicilina/Clavulánico

AB: ácidos biliares

AFP: alfafetoproteína

ALB: albúmina

ALP: fosfatasa alcalina, del inglés *alkaline phosphatase*

ALT: alanina aminotransferasa

APOB: apolipoproteína B

AST: aspartato aminotransferasa

BMP: proteína morfogénica ósea, del inglés *bone Morphogenetic Protein*

BSA: albúmina sérica bovina, del inglés *bovine serum albumin*

BSEP: bomba de exportación de sales biliares, del inglés *bile salt export pump*

CDB: tampón de disociación celular, del inglés *cell dissociation buffer*

CK: citoqueratina, del inglés *cytokeratin*

CYP450: citocromo P450

DEG: genes diferencialmente expresados, del inglés *differentially expressed genes*

DILI: daño hepático inducido por fármacos, del inglés *Drug-induced liver injury*

DMSO: dimetilsulfóxido

DPBS: tampón salino fosfato Dubecco, del inglés *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

ECM: matriz extracelular, del inglés *Extracellular matrix*

EGF: factor de crecimiento epidérmico, del inglés *epidermal growth factor*

ESC: células madre embrionarias, del inglés *embryonic stem cells*

EpCAM: molécula de adhesión de célula epitelial, del inglés *epithelial cell adhesion molecule*

EROD: etoxiresorufina-O-deetilasa

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés *fibroblast growth factor*

FLT3: fms como la tirosina quinasa 3, del inglés *fms like tyrosine kinase 3*

Fluo4: fluo-4 acetoximetil éster

FOXA2: proteína A2 de la caja *forkhead*, del inglés *forkhead box protein A2*

GGT: gamma-glutamil transpeptidasa

GSH: glutation en estado reducido

GST: glutatión s-transferasa

HCS: cribado de alto contenido, del inglés *high content screening*

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos, del inglés *hepatocyte growth factor*

HLA: antígenos leucocitarios humanos, del inglés *Human leukocyte antigen*

HLC: células con fenotipo hepático, del inglés *hepatocyte-like cells*

HNF4A: factor nuclear hepático 4 alfa, del inglés *hepatocyte nuclear factor 4 alpha*

Hhex: proteína homeobox expresada hematopoyéticamente del inglés *Hematopoietically Expressed Homeobox*)

iDILI: daño hepático inducido por fármacos de carácter idiosincrático, del inglés *idiosyncratic drug-induced liver injury*

IF: inmunofluorescencia

IL: interleucina

iPSC: células madre pluripotentes inducidas, del inglés *induced pluripotent stem cells*

KOSM: cóctel de factores de Yamanaka (KLF4-OCT4-SOX2-cMyc).

LSN: límite superior normal

MEC: concentración mínima efectiva

MEF: fibroblastos murinos embrionarios, del inglés *mouse embryonic fibroblasts*

MHC: complejo mayor de inmunohistocompatibilidad, del inglés *major histocompatibility complex*

MMP: potencial de membrana mitocondrial

MRP: proteínas de resistencia asociadas a fármacos, del inglés *multidrug resistance-associated proteins*

NAT: N-acetiltransferasa

NTCP: co-transportador de sodio-taurocólico, del inglés *Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide*

OSM: oncostatina M

PBGD: porfobilinógeno deaminasa

PBMC: células mononucleares de sangre periférica, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*

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

PHH: hepatocitos primarios humanos, del inglés *primary human hepatocytes*

PSC: células madre pluripotentes, del inglés *pluripotent stem cells*

qPCR reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*

RLT: tampón de lisis, del inglés *RNeasy Lysis Buffer*

ROS: especies reactivas de oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*

RT: transcripción reversa, del inglés *reverse transcription*

RT-qPCR: transcripción reversa PCR cuantitativa, del inglés *quantitative reverse transcription PCR*

RUCAM: evaluación de la causalidad de Roussel Uclaf, del inglés *Roussel Uclaf Causality Assessment Method*

SBF: suero bovino fetal

SeV: Sendai Virus

SOX17: factor 17 de la caja de transcripción SRY, del inglés *SRY-box transcription factor 17*

SULT: sulfotransferasa

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

TMRM: tetrametil rodamina metil éster

UHH: hepatocitos humanos Upcytes[®]

UGT: UDP-glucuronosiltransferasa

RESUMEN

El daño hepático inducido por fármacos (DILI) es una reacción adversa a medicamentos y otros xenobióticos que representa una de las causas más relevantes de fallo hepático agudo y es uno de los principales motivos de retirada de fármacos en las fases de desarrollo y farmacovigilancia.

El DILI es un proceso patológico multifactorial que no se puede recapitular en los modelos *in vitro* actuales. Además, el DILI idiosincrático (iDILI), que es aquel que aparece en un reducido número de pacientes susceptibles, es difícil de diagnosticar y predecir en los modelos propuestos hasta el momento. Por esta razón, se han propuesto nuevos modelos capaces de reproducir las características específicas de pacientes concretos, lo suficientemente adaptables para ser de aplicación práctica, lo cual, es particularmente importante para el diagnóstico diferencial y la predicción del iDILI.

En la presente tesis, se ha explorado el uso de células con fenotipo hepático derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) de diferentes donantes como modelo para el estudio del DILI. Las líneas de iPSC se obtuvieron mediante reprogramación de las células mononucleares de sangre periférica, se diferenciaron a fenotipo hepático (HLC o *hepatocyte-like cells*) y se caracterizaron a nivel de expresión y funcionalidad.

Los resultados mostraron que las HLC obtenidas a partir de la diferenciación de iPSC de diferentes donantes presentan rasgos transcriptómicos, metabolómicos y funcionales hepáticos y, además, emulan el perfil de actividades de biotransformación de los donantes de origen, aunque con un estado inmaduro o temprano.

Los ensayos de toxicidad demostraron que las HLC son sensibles a la exposición a fármacos hepatotóxicos con una respuesta equiparable a las células de origen hepático y reproducen los mecanismos de hepatotoxicidad inducidos por fármacos modelo. Además, exhiben una respuesta diferencial a los fármacos según el donante, indicando su potencial para estudios de susceptibilidad interindividual a la hepatotoxicidad inducida por fármacos. Por último, la exposición de las HLC de un paciente con sospecha de iDILI al agente supuestamente responsable del episodio de hepatotoxicidad reveló cambios a nivel transcripcional compatibles con el patrón de daño colestásico mostrado

por el paciente, evidenciando su potencial como modelo personalizado para el estudio *in vitro* de casos concretos de iDILI.

ABSTRACT

Drug-induced liver injury (DILI) is an adverse reaction to drugs and other xenobiotics which is a leading cause of acute liver failure and is one of the main reasons for drug withdrawal in the drug development process and in pharmacovigilance phases.

DILI is a multifactorial pathological process which cannot be recreated in current *in vitro* models. Furthermore, idiosyncratic DILI (iDILI), which appears in a small number of susceptible patients, poses a challenging diagnostic and a difficult prediction. Thus, new cell-based models that are able to reproduce the specific characteristics of individual patients and are sufficiently adaptable to be of practical application, which is particularly important for the differential diagnosis and prediction of iDILI, have been proposed.

In this thesis, the use of induced-pluripotent stem cells (iPSC)-derived hepatocyte-like cells (HLC) from different donors has been explored as a cell-based model for DILI studies. iPSC lines were obtained by peripheral blood mononuclear cells reprogramming and differentiated into HLC. HLC were characterized at an expression and functional level.

The results showed that HLC obtained from the differentiation of different donor-derived iPSC exhibit transcriptomic, metabolomics and functional hepatic features, and these cells mimic the biotransformation activity profile of the original donors although at an immature state.

Toxicity assays demonstrated that HLC are sensitive to hepatotoxic drugs with a comparable response to other hepatic cell models and that they reproduce the mechanisms implicated in drug-induced hepatotoxicity. In addition, the incubation of HLC from an iDILI patient with the suspicious drug revealed changes at a transcriptional level that could be compatible with the cholestatic pattern observed in this patient, evidencing the potential of HLC as a personalized cell-based model for *in vitro* studies for some specific iDILI cases.

1

INTRODUCCIÓN

1.1 El hígado

1.1.1. Anatomía del hígado

El hígado es el órgano de mayor tamaño del cuerpo humano y constituye alrededor del 2-3% del peso total en adultos (entre 1400 g y 1800 g). Es un órgano multifuncional con un papel fundamental en el metabolismo de proteínas, grasas e hidratos de carbono y posee capacidades secretoras y excretoras esenciales para el organismo. Anatómicamente, se localiza en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal y en él podemos diferenciar cuatro lóbulos: derecho, izquierdo, caudado y cuadrado (Abdel-Misih & Bloomston, 2010; Chen et al., 2017; Sibulesky, 2013). La vesícula biliar está conectada al hígado y se sitúa en una depresión localizada de la cara visceral del lóbulo derecho hepático (Housset et al., 2016).

El hígado es uno de los órganos más vascularizados. El 70-75% del flujo sanguíneo recibido procede de la vena porta, la cual aporta sangre enriquecida con nutrientes, fármacos, toxinas o microorganismos que se absorben en el aparato digestivo. El 25-30% restante procede de las arterias hepática derecha e izquierda que aportan sangre oxigenada (Latarjet & Liard, 2004; Sibulesky, 2013). La sangre venosa y la arterial se mezclan en los sinusoides hepáticos (finos capilares sanguíneos), donde los hepatocitos absorben los nutrientes y otras sustancias y, a su vez, liberan sus productos (hormonas, glucosa, sustancias detoxificadas etc.) al torrente sanguíneo sinusoidal. La sangre filtrada y cargada de productos hepáticos sale por las venas hepáticas que desembocan en la vena cava inferior cerrando así el sistema portal hepático (Abdel-Misih & Bloomston, 2010; Latarjet & Liard, 2004).

1.1.2. Microanatomía del hígado

El parénquima hepático se divide en unidades mínimas funcionales conocidas como lobulillos hepáticos (Figura 1.1A). Un lobulillo está compuesto por pilas de cordones de hepatocitos de una célula de espesor separados por el sistema de sinusoides (que irriga las células con sangre venosa y arterial) y los canalículos biliares. Estos sinusoides desembocan en la vena central que se ubica en el centro del lobulillo. Los cordones de hepatocitos se disponen de forma radial desde la vena central y se proyectan hasta el borde del lobulillo dando a este una morfología hexagonal. En cada uno de los vértices

de este hexágono se ubican las tríadas portales dentro del espacio portal (espacio compuesto por tejido conectivo laxo). Cada tríada portal está formada por una ramificación de la vena porta, una ramificación de la arteria hepática y un ducto biliar, aunque el término “tríada” no es totalmente correcto ya que también se incluyen vasos del sistema linfático (Chen et al., 2017; Ross & Pawlina, 2015).

El hígado está constituido por diferentes tipos celulares con características y funciones diferenciadas (Tabla 1.1). Estos tipos celulares se dividen en dos grandes grupos, las células parenquimáticas (hepatocitos) y las células no parenquimáticas (células Kupffer, células estrelladas y células de Pit) (Kierszenbaum, 2016; Ross & Pawlina, 2015; Si-Tayeb et al., 2010a). Los hepatocitos constituyen el tipo celular más abundante y desempeñan la mayoría de las funciones del hígado. Su morfología es poligonal y pueden ser mononucleados (diploides, 2d) o binucleados (tetraploides, 4d). Los hepatocitos tienen dos dominios celulares: basolateral y apical (Kierszenbaum, 2016; Ross & Pawlina, 2015). El dominio basolateral posee prolongaciones a modo de microvellosidades que proyectan hacia el espacio de Disse, el espacio perisinusoidal que existe entre las células endoteliales y los hepatocitos (Figura 1.1B). Debido a las grandes brechas en la capa endotelial de los sinusoides y a la falta de una lámina basal continua, el plasma llega con facilidad al espacio de Disse y se produce el intercambio de sustancias entre el hepatocito y el torrente sanguíneo (Ross & Pawlina, 2015; Kierszenbaum, 2013). El dominio apical limita el canalículo biliar (Figura 1.1B).

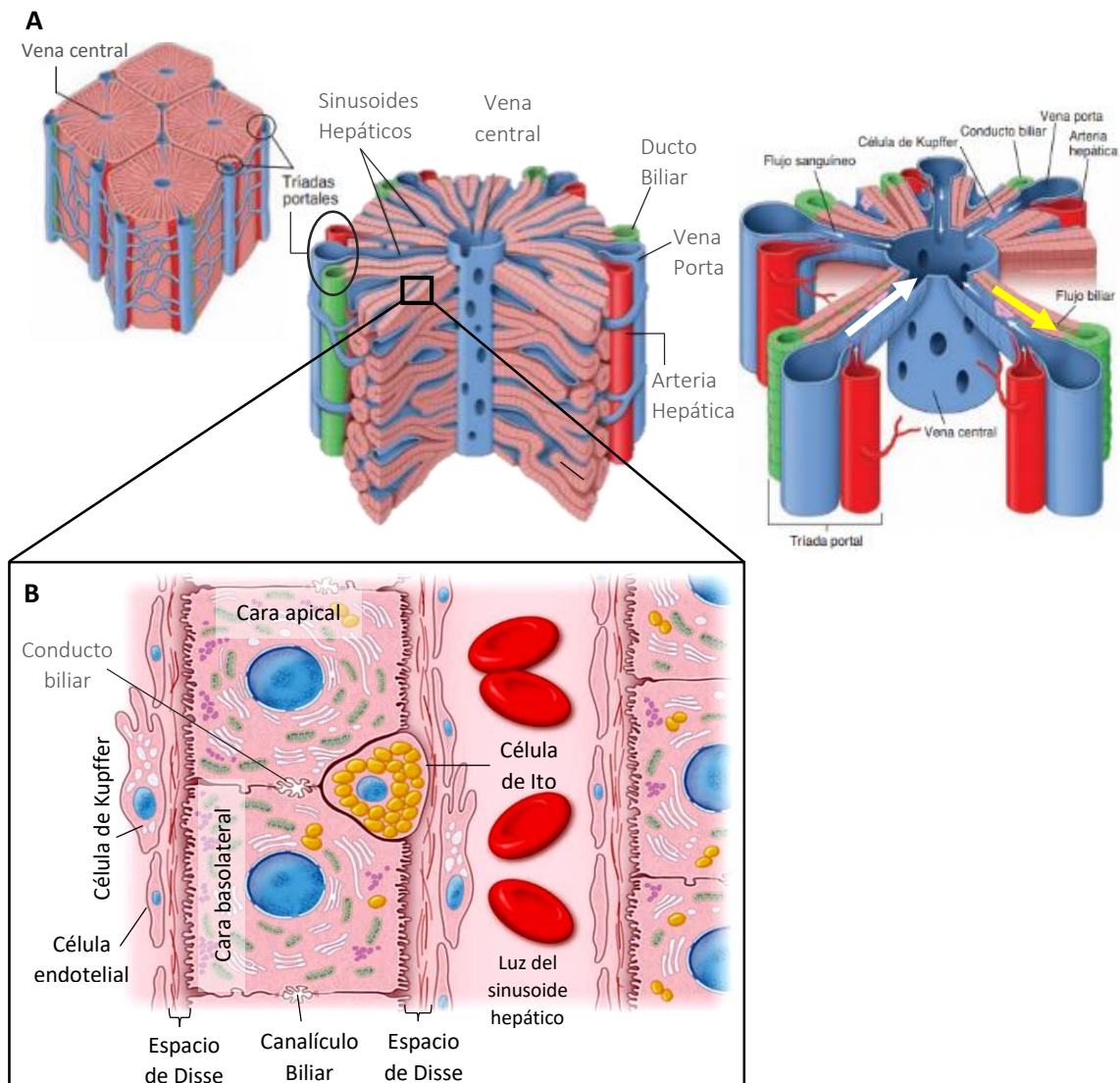


Figura 1.1. Estructura del lobulillo hepático. A) Los hepatocitos se disponen en pilas de cordones de una célula de espesor. Los cordones están separados por los sinusoides y los canalículos biliares cuyos flujos tienen sentidos opuestos (flechas). Los sinusoides desembocan en la vena central que constituye el epicentro del lobulillo hepático, desde donde los cordones de hepatocitos proyectan radialmente hasta la periferia del lobulillo dándole una morfología hexagonal. En los vértices del hexágono se disponen las triadas portales. B) Los hepatocitos son células poligonales con dos dominios: un dominio basolateral y un dominio apical. El dominio basolateral posee microvellosidades que proyectan hacia el espacio de Disse mientras que el dominio apical delimita el canalículo biliar. Entre las células endoteliales del sinusoides se localizan las células de Kupffer y en el espacio de Disse se observan las células de Ito llenas de inclusiones citoplasmáticas de vitamina A. Adaptado de Ross & Pawlina, 2015 y Netter, 2015.

Tabla 1.1. Células parenquimáticas y no parenquimáticas y sus características.

Tipo celular	Características
Hepatocito	<ul style="list-style-type: none"> • Ubicación: parénquima. • ≈ 80% de la población de células hepáticas. • Absorción de sustancias transportadas por la sangre. • Detoxificación de xenobióticos y endobióticos. • Secreción de proteínas plasmáticas. • Síntesis de sales biliares. • Metabolismo de colesterol. • Metabolismo de la glucosa y del glucógeno. • Metabolismo de la Urea.
Colangiocito	<ul style="list-style-type: none"> • Ubicación: epitelio biliar. • ≈ 3% de la población de células hepáticas. • Revestimiento del árbol biliar, forman los ductos. • Control del flujo de bilis. • Secreción de agua y bicarbonato. • Control del pH de la bilis.
Célula endotelial del sinusoides hepático	<ul style="list-style-type: none"> • Ubicación: sinusoides. • ≈ 2,5% de la población de células hepáticas. • Formación de los sinusoides hepáticos. • Intercambio de sustancias plasma-hepatocito. • Secreción de citoquinas. • Presentación de antígenos. • Participación en la degradación de desechos macromoleculares.
Célula Kupffer	<ul style="list-style-type: none"> • Ubicación: sinusoides. • ≈ 2% de la población de células hepáticas. • Degradación final de eritrocitos dañados o envejecidos procedentes del bazo. • Almacenamiento de parte del hierro ferritínico en forma de gránulos de hemosiderina. • Eliminación de material exógeno. • Secreción de citoquinas y proteasas entre otros.
Célula hepática estrellada	<ul style="list-style-type: none"> • Ubicación: Espacio de Disse • ≈ 1,4% de la población de células hepáticas. • Almacenamiento de vitamina A en forma de ésteres retinílicos • Síntesis y depósito de colágeno tipo I y III en el espacio de Disse (recambio de matriz extracelular) • Regulación del flujo de sangre en los sinusoides
Célula Pit	<ul style="list-style-type: none"> • Células <i>Natural Killer</i> del hígado • Raras • Actividad citotóxica

1.1.3. Funciones del hígado.

El hígado desempeña numerosas actividades esenciales para la homeostasis del organismo (Figura 1.2). Es destacable su participación en numerosos procesos metabólicos e inmunológicos y es clave en la detoxificación de moléculas endógenas y exógenas.

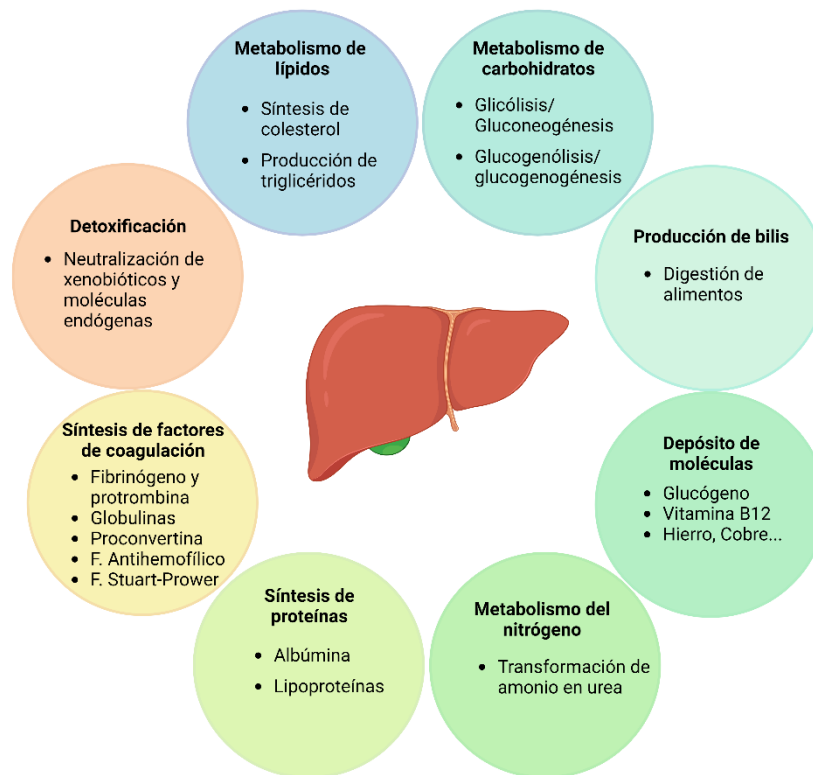


Figura 1.2. Funciones hepáticas. Manterola et al., 2017 (adaptada).

Este órgano recibe las sustancias absorbidas en el intestino y juega un papel decisivo en la distribución de nutrientes, así como en la regulación de la glucemia y en el metabolismo de los hidratos de carbono. Es capaz de almacenar glucosa en forma de glucógeno (glucogenogénesis) cuando existe un excedente en sangre, y degrada el glucógeno almacenado (glucogenólisis) cuando la glucemia es baja o aumentan los requerimientos energéticos en el organismo. Además, el hígado puede sintetizar glucosa *de novo* (gluconeogénesis) a partir de precursores no glucídicos cuando los depósitos de glucógeno se han agotado (Han et al., 2016; López-Chicharro & López-Mojares, 2019; Nelson & Cox, 2018).

Su papel en el metabolismo lipídico es muy versátil: es capaz de obtener energía a través de la oxidación de ácidos grasos (β -oxidación) y de generar cuerpos cetónicos (Alves-Bezerra & Cohen, 2018; Jones, 2016; Nelson & Cox, 2018); puede sintetizar ácidos grasos *de novo* y almacenarlos en forma de triglicéridos (Alves-Bezerra & Cohen, 2018; Jones, 2016); y sintetiza colesterol, de gran importancia en la fluidez de membranas y precursor

de las hormonas esteroideas, la vitamina D y los ácidos biliares (AB) (Boyer, 2013; Nelson & Cox, 2018; Trefts et al., 2017).

Además del glucógeno y de los triglicéridos, el hígado actúa almacenando también otras moléculas como vitaminas (vitamina A) y metales (ej. hierro) (Blaner et al., 2016; Vogt et al., 2021).

El hígado es el responsable de la síntesis del 85-90% de proteínas circulantes, siendo la albúmina la más abundante. Además, sintetiza muchos de los factores de la coagulación sanguínea (fibrinógeno, protrombina y factores de la coagulación V, VII y IX) y algunas lipoproteínas (principalmente las lipoproteínas de muy baja densidad) encargadas de transportar triglicéridos desde el hígado a otros tejidos (Kierszenbaum, 2016; Ross & Pawlina, 2015; Trefts et al., 2017). También participa activamente en el catabolismo de aminoácidos, pudiendo utilizarlos como fuente de energía alternativa a la glucosa. Además, participa en la eliminación del exceso de ion amonio (NH_4^+), producto altamente tóxico generado durante el catabolismo de aminoácidos. El ciclo de la urea que transcurre entre la mitocondria y el citoplasma de los hepatocitos convierte el NH_4^+ en urea, la cual pasa a la sangre para su excreción a través de la orina (Nelson & Cox, 2018; Trefts et al., 2017; Wang et al., 2014).

1.1.4. Metabolismo de xenobióticos: detoxificación de fármacos.

El metabolismo de xenobióticos es un proceso de biotransformación que consta de tres fases, en las que intervienen proteínas diferentes. Los enzimas de fase I se encargan de convertir el xenobiótico en un compuesto más hidrosoluble; los enzimas de fase II catalizan reacciones de conjugación con sustratos endógenos y, finalmente los transportadores se encargan de la eliminación definitiva del compuesto vía orina o vía biliar, proceso conocido como fase III (Almazroo et al., 2017).

1.1.4.1. Fase I de la detoxificación de xenobióticos

Los enzimas de fase I son enzimas fundamentalmente microsomales que introducen grupos funcionales en la molécula de xenobiótico mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. Entre los enzimas de esta fase se incluyen: citocromos P450 (CYP450), mono-oxigenasas de flavina, molibdeno hidroxilasas, prostaglandina sintasas, amino oxidasas, lipooxigenasas, la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa

entre otras. Los CYP450, en especial las familias CYP1, CYP2 y CYP3, se encargan del metabolismo de más del 80% de los fármacos (Almazroo et al., 2017; Omari & Murry, 2007; Iyanagi, 2007). De hecho, CYP2C8/9, CYP2D6, CYP2C19 y CYP3A4/5 son las enzimas responsables del 90% de las reacciones de biotransformación (Omari & Murry, 2007).

Existe una gran variabilidad interindividual de los CYP450 en la población humana que conlleva diferencias en la capacidad metabólica del individuo. No solo los polimorfismos están detrás de esta variabilidad individual sino también la capacidad que tienen estas enzimas de ser inducidos o inhibidos en presencia de otras moléculas (Lynch & Price, 2007). Es por ello que la inducción o inhibición de enzimas CYP450 puede dar lugar a interacciones metabólicas entre fármacos con consecuencias importantes en sus efectos terapéuticos (y/o tóxicos) (Ahmed et al., 2016; Phillips et al., 2001). Por ejemplo, la administración del fármaco amiodarona que actúa como inhibidor de los CYP3A4 y CYP2C9, puede aumentar el riesgo de sangrados con la coadministración del anticoagulante warfarina que es metabolizado por el CYP2C9 (Heimark et al., 1992).

1.1.4.2. Fase II de la detoxificación de xenobióticos

Los enzimas de fase II conjugan los xenobióticos, o sus metabolitos generados en la fase I, con moléculas endógenas de bajo peso molecular. Esta reacción implica generalmente detoxificación o inactivación farmacológica, aunque algunos fármacos se activan con la conjugación. Muchos de los metabolitos conjugados son sustratos de proteínas transportadoras que facilitan la excreción del xenobiótico (Almazroo et al., 2017; Jancova et al., 2010).

Los enzimas más importantes de la fase II en humanos son: glutatión s-transferasa (GST), N-acetiltransferasa (NAT), UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), epóxido hidrolasa, sulfotransferasa (SULT) y metiltransferasa, siendo las GST y UGT las que se encargan de la biotransformación de la mayor parte de los fármacos utilizados en clínica (Brunton et al., 2017; Jancova et al., 2010).

Se han descrito varias familias de enzimas UGT, siendo las UGT1 y UGT2, las encargadas de la mayoría de las conjugaciones de fármacos en el hígado (Almazroo et al., 2017; Brunton et al., 2017; Jancova et al., 2010). Catalizan reacciones de conjugación de

xenobióticos con ácido UDP-glucurónico y como resultado, se obtienen compuestos más hidrofílicos y fácilmente eliminados por la vía biliar o a través de la orina (Almazroo et al., 2017; Jancova et al., 2010). Esta glucuronidación puede ser revertida en el intestino por las β -glucuronidasas de la microbiota intestinal, permitiendo que el compuesto vuelva a su estado original, pueda ser reabsorbido en el intestino y volver al hígado en un proceso conocido como circulación enterohepática. Este ciclo, que fisiológicamente se encarga del reciclaje de AB desde el intestino al hepatocito, puede ser aprovechado por algunos fármacos y es uno de los motivos por los cuales el efecto de un fármaco puede prolongarse o inducir toxicidad (Hofmann, 2009; Roberts et al., 2002)

Las GST catalizan la conjugación de GSH con los xenobióticos y su principal función biológica es defender las células (principalmente hepatocitos) frente al estrés oxidativo generado en las reacciones catalizadas por los enzimas de fase I (Jancova et al., 2010).

1.1.4.3. Fase III de la detoxificación de xenobióticos

Los xenobióticos y sus metabolitos deben ser transportados fuera del hepatocito para su excreción vía biliar o vía renal. Los transportadores de salida, que se localizan en la membrana basolateral y la membrana canalicular, permiten el paso de los compuestos inactivados desde el hepatocito al torrente sanguíneo o al canalículo biliar, respectivamente (Figura 1.3). Entre estos transportadores de salida, los transportadores de resistencia al cáncer de mama y los asociados a resistencia a fármacos (*multidrug resistance-associated proteins*, MRP) se encargan de exportar numerosos fármacos antibióticos, antivirales y anticancerígenos, mientras que los transportadores BSEP (bomba de exportación de sales biliares del inglés *bile salt export pump*) o MRP2 son los principales transportadores canaliculares encargados de excretar AB (Almazroo et al., 2017; Boyer, 2013; Pan, 2019).

Los llamados transportadores de entrada, localizados en la membrana basolateral, permiten el paso de moléculas desde la sangre al citosol del hepatocito (Figura 5). Los transportadores de aniones orgánicos son los encargados de la entrada de la mayor parte de fármacos de uso clínico como los diuréticos, antibióticos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos etc., mientras que el co-transportador de sodio-

taurocólico (NTCP, del inglés *Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide*) es el principal transportador de entrada de AB (Almazroo et al., 2017; Pan, 2019).

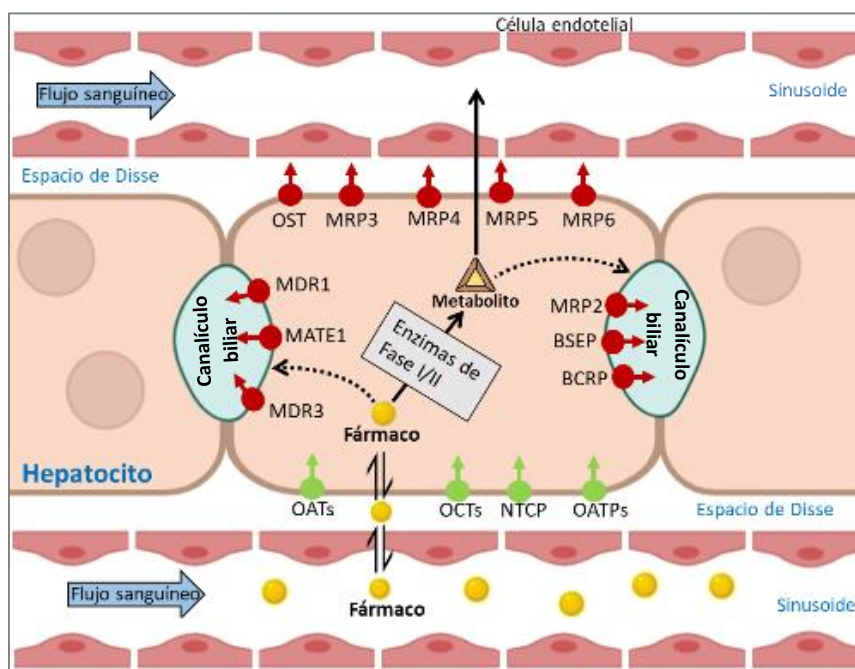


Figura 1.3. Metabolismo de fármacos en el hígado. Los fármacos entran al hepatocito desde el torrente sanguíneo gracias a los transportadores de entrada (verde). En el citosol, el fármaco es detoxificado por los enzimas de fase I y fase II. Los productos y metabolitos resultantes pueden ser expulsados al canalículo biliar o al torrente sanguíneo gracias a los transportadores de salida (rojo) específicos que constituyen la fase III del proceso de detoxificación. BCRP = proteínas de resistencia al cáncer de mama, BSEP = bomba de exportación de sales biliares, OCT = transportadores de cationes orgánicos, OAT = transportadores de aniones orgánicos, OATP = polipéptidos transportadores de aniones orgánicos, MDR = Proteínas de resistencia a fármacos, MAT = proteínas de extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos, MRP = transportadores asociados a resistencia a múltiples fármacos, NTCP = co-transportador de sodio-taurocólico, OST = transportador de solutos orgánicos. Imagen generada con Biorender® y adaptada Budingen et al., 2014.

1.2. Daño hepático inducido por fármacos (DILI)

1.2.1. DILI: concepto y relevancia.

El daño hepático inducido por fármacos o DILI (del inglés, *drug-induced liver injury*) es un fenómeno que comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas (cirrosis, esteatosis, colestasis, fosfolipidosis, hepatitis) y puede ser ocasionado por el consumo de fármacos, productos de herboristería o suplementos alimenticios (Donato & Tolosa, 2021). Si bien en algunos casos la hepatotoxicidad cursa con un cuadro clínico leve, en otros casos puede desencadenar un fallo hepático agudo. El DILI es una de las principales causas de muerte relacionada con efectos adversos a fármacos y uno de los principales motivos de retirada de fármacos durante su desarrollo o en la fase de farmacovigilancia

post-autorización y una de las razones por las que el uso de un fármaco puede verse restringido (Katarey & Verma, 2016). Por ello, la toxicidad hepática por fármacos se ha convertido en un problema de salud pública y ha generado interés desde el punto de vista científico y farmacéutico (Alempijevic et al., 2017; Roth & Lee, 2017; Yokoi & Oda, 2020).

Los estudios epidemiológicos sugieren que la incidencia del DILI varía según el tipo de investigación (Björnsson, 2019), pudiendo oscilar de 2,4 casos cada 100000 habitantes por año (en estudios retrospectivos en Reino Unido) (De Abajo et al., 2004) hasta 13,9 casos cada 100000 habitantes por año (en estudios prospectivos en Francia) (Sgro et al., 2002). En España, la incidencia del DILI entre los años 1998 y 2003 fue de 34 casos por cada 1000000 habitantes por año, siendo la incidencia para los casos más graves de 17 casos cada 1000000 habitantes por año (Andrade et al., 2005). Es complejo establecer la incidencia real del DILI en la población debido a la variabilidad en las manifestaciones clínicas, al carácter retrospectivo de muchos de los datos recopilados (la mayoría de los cuales proceden de casos aislados) y a la falta de estandarización de criterios diagnósticos, así como a la ausencia de marcadores específicos, lo que predispone al diagnóstico erróneo (Fontana et al., 2010; Katarey & Verma, 2016).

Se distinguen dos tipos de DILI según su relación con la dosis administrada del fármaco y su predicción (Meunier & Larrey, 2019; Tejada, 2010). Por una parte, el DILI intrínseco se desarrolla en función de la dosis administrada del fármaco y posee un periodo de latencia corto. Esta toxicidad es reproducible en los modelos preclínicos y los mecanismos implicados han podido ser estudiados con mayor profundidad. Sólo unos pocos fármacos causan DILI intrínseco. Tal es el caso del paracetamol (o acetaminofeno), responsable de aproximadamente el 50% de los fallos hepáticos fulminantes en los Estados Unidos con el consumo de dosis única superior a 7,5 g (Fisher et al., 2015; Fontana, 2014; Katarey & Verma, 2016; Kullak-Ublick et al., 2017).

Por otra parte, el DILI idiosincrásico o iDILI, se caracteriza por no ser dosis-dependiente y poseer un periodo de latencia mayor (semanas o meses). La mayoría de los episodios de DILI son de carácter idiosincrático y cursan con una reacción adversa hepática tras la administración de dosis terapéuticas del fármaco (Aithal et al., 2011; Teschke & Danan, 2016). Datos procedentes de estudios prospectivos sugieren que los antibióticos,

seguidos de los productos de herboristería, son los compuestos que con mayor frecuencia causan iDILI, (Katarey & Verma, 2016).

1.2.2. Mecanismos implicados en DILI.

El hígado es uno de los órganos que desarrolla con mayor frecuencia toxicidad por fármacos debido a que recibe la mayor parte de los fármacos de administración oral y a su gran capacidad de biotransformación. Aunque en la mayoría de los casos el metabolismo hepático de los fármacos conduce a su detoxificación (Almazroo et al., 2017), ocasionalmente, algunos fármacos pueden sufrir una bioactivación durante su metabolismo dando lugar a la formación de especies reactivas altamente tóxicas para el hepatocito.

El metabolismo de los fármacos y la formación de metabolitos reactivos se han relacionado con el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la depleción del glutathion en estado reducido (GSH), el principal escudo antioxidante del hepatocito. El estrés oxidativo generado durante la bioactivación favorece la interacción de las especies reactivas con moléculas como el DNA, las proteínas o los lípidos y promueve la formación de aductos por la unión covalente de estas especies con las macromoléculas celulares (Gu & Manautou, 2012; Park et al., 2005; Roth & Lee, 2017). Los aductos generados con las bases nitrogenadas del DNA pueden dar lugar a mutaciones y producir carcinogénesis. Los aductos con proteínas pueden modificar su funcionalidad o inducir alteraciones químicas (oxidación, fosforilación, acetilación etc.) que pueden interferir en las rutas de señalización celular. Estos, además, también pueden ser los responsables de iniciar una respuesta inmunitaria al actuar como nuevos antígenos y pueden inducir la liberación de interleucinas e iniciar un proceso inflamatorio que exacerba el daño hepático original (Andrade et al., 2019). Además, las especies radicales pueden reaccionar con ácidos grasos polinsaturados y fosfolípidos para dar lugar a peróxidos lipídicos altamente reactivos y pueden afectar a la integridad estructural y funcional del DNA y de las membranas celulares (Donato & Tolosa, 2021). De este modo, se desencadena el daño en las mitocondrias, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, peroxisomas y demás orgánulos celulares, y en la propia membrana celular (Figura 1.4). En particular, el daño mitocondrial causado por el estrés oxidativo y las especies reactivas pueden conducir a la muerte celular por apoptosis, si el daño mitocondrial

conlleva la permeabilización de la membrana mitocondrial mediante la liberación del citocromo c, o por necrosis, si el daño implica la destrucción de la membrana mitocondrial (Andrade et al., 2019; Chen et al., 2015; Roth & Lee, 2017; Sebode et al., 2017).

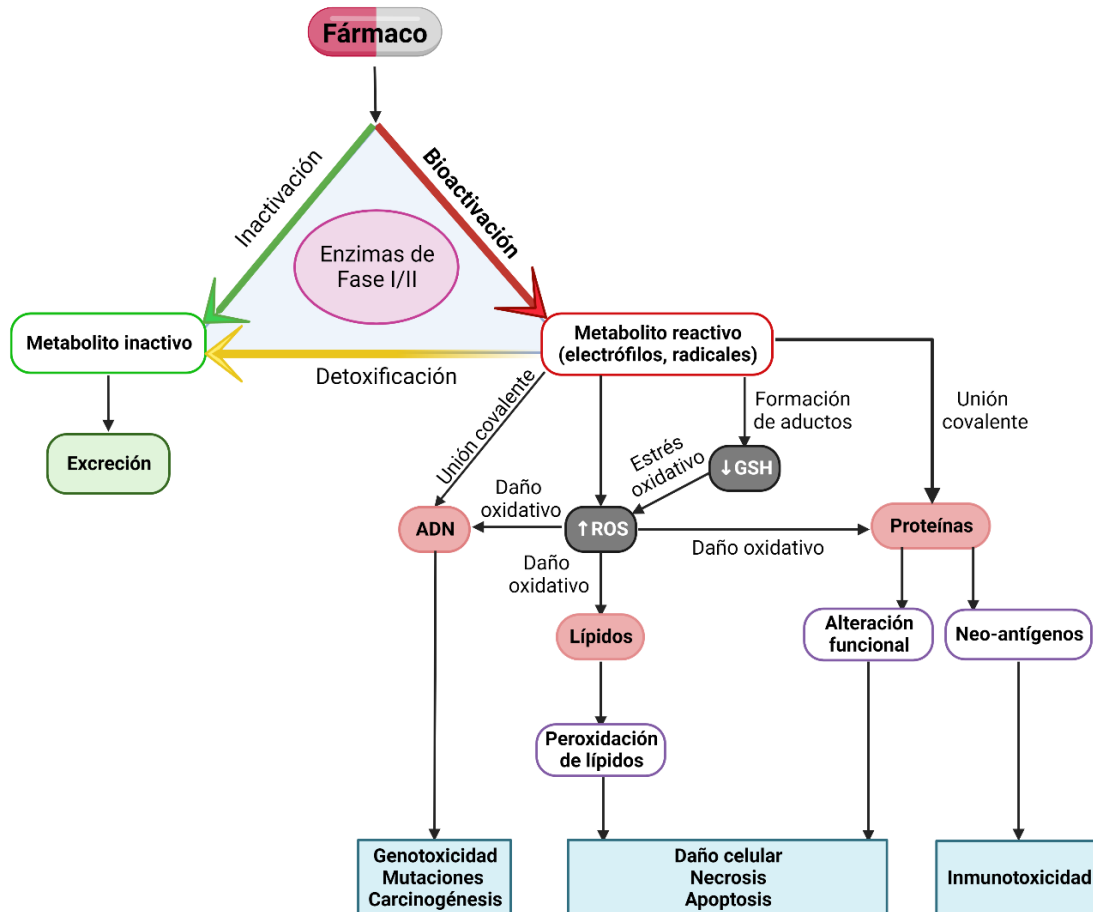


Figura 1.4. Mecanismos implicados en el daño hepático inducido por fármacos (DILI).

Por otro lado, el DILI se puede clasificar según sus manifestaciones patológicas generales y los hallazgos histológicos en varios fenotipos clínicos que a menudo comparten características con otras enfermedades hepáticas generadas por causas no tóxicas. Además de la necrosis ya comentada, otros subtipos fenotípicos de DILI son la esteatosis o esteatohepatitis, fosfolipidosis y la colestasis (Kim et al., 2010). La esteatosis o acumulación excesiva de lípidos neutros (fundamentalmente triglicéridos) en el hígado, es un hallazgo histopatológico frecuente en biopsias hepáticas de pacientes con DILI. La disfunción mitocondrial, y en particular la inhibición de enzimas de la β -oxidación o la alteración de la cadena de transporte electrónico, desempeña un papel clave en la esteatosis inducida por fármacos (Donato et al., 2009). La fosfolipidosis es otro trastorno de almacenamiento de lípidos que provoca la acumulación excesiva de

fosfolípidos en forma inclusiones citosólicas conocidas como cuerpos lamelares (Anderson & Borlak, 2006). Actualmente aún no se conocen con precisión los mecanismos implicados en la fosfolipidosis inducida por fármacos, si bien parecen estar relacionados con una inhibición directa de las fosfolipasas lisosomales o con la formación de complejos de fármaco-fosfolípido resistentes a la degradación enzimática (Donato & Gomez-Lechon, 2012a). Finalmente, el daño de tipo colestásico puede aparecer hasta en el 50% de los casos de DILI (Aithal et al., 2011; Chalasani et al., 2015; Licata, 2016). En la colestasis se altera el flujo de la bilis del hígado hacia el duodeno, lo que conduce a la acumulación intrahepática de AB y la subsiguiente hepatotoxicidad (Andrade et al., 2006; Sousa et al., 2019). La alteración funcional de los sistemas de transporte hepatobiliar, y en concreto la inhibición de BSEP, el principal transportador responsable de la salida canalicular de BA, se considera un mecanismo importante de la colestasis inducida por fármacos (Morgan et al., 2013).

1.2.3. Diagnóstico del DILI

Algunos de los síntomas descritos en los episodios de DILI son poco específicos, tales como fatiga, disminución del apetito o dolor epigástrico, por lo que su diagnóstico no es sencillo. Si la toxicidad cursa con colestasis es frecuente la aparición de ictericia o de prurito y puede adquirir cronicidad y derivar en hepatitis crónica, fibrosis hepática, cirrosis o incluso en procesos tumorales. En los casos en los que se desencadena una reacción inmunitaria, las manifestaciones clínicas registradas incluyen fiebre, erupciones cutáneas, eosinofilia (>5%) y otros daños en tejidos extrahepáticos. Sin embargo, en general las manifestaciones clínicas son variables (desde un episodio asintomático hasta un fallo hepático agudo) y el periodo de latencia puede variar sustancialmente de días a meses (Yu et al., 2017). Todo ello, sumado a la ausencia de marcadores específicos de hepatotoxicidad, hace que el diagnóstico del DILI se realice por exclusión de otras patologías hepáticas como la hepatitis vírica (hepatitis A, B, C, E, o el virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus del herpes y otros), el abuso de alcohol, hígado graso no alcohólico o enfermedades genéticas como la enfermedad de Wilson o la hemocromatosis (Khoury et al., 2015; Tajiri & Shimizu, 2008).

La información proporcionada por el propio paciente acerca de sus hábitos y estilo de vida (consumo de alcohol, de suplementos dietéticos o productos de herboristería, la

toma de fármacos de forma individual o coadministrada, la duración del tratamiento etc.), los factores de riesgo individuales, el historial clínico (episodios anteriores de DILI), así como los resultados en los test analíticos son útiles para fundamentar la sospecha de DILI (EASL, 2019; Yu et al., 2017). De hecho, en la actualidad, los resultados de los análisis bioquímicos de marcadores hepáticos clásicos, en los que se incluye la alanina aminotransferasa (ALT), la fosfatasa alcalina (ALP, del inglés *alkaline phosphatase*), la gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) y la bilirrubina, aunque no son específicos de hepatotoxicidad, son utilizados para el diagnóstico del DILI. De esta manera, se sospecha de DILI cuando se da alguna de las siguientes combinaciones en los niveles séricos de ALT, ALP y bilirrubina total: 1) los valores de ALT superan cinco veces el límite superior normal (LSN); 2) los niveles de ALP superan dos veces el LSN; 3) los niveles de ALT son superiores a tres veces su LSN combinado con niveles de bilirrubina total superiores a dos veces su LSN (EASL, 2019). Estos mismos tests, además, son utilizados para el cálculo del valor R [$R = (ALT/LSN) / (ALP/LSN)$] que permite identificar el tipo celular más afectado y clasificar en el daño hepático en tres tipos: hepatocelular ($R \geq 5$), colestásico ($R \leq 2$) o mixto (si $2 < R < 5$) (Aithal et al., 2011; Teschke & Danan, 2016).

Ante a la ausencia de biomarcadores específicos y de tests que confirmen el diagnóstico de DILI, los ensayos de causalidad son una de las estrategias seguidas para determinar la probabilidad de que un daño hepático sea causado por un fármaco. El Método de Ensayo de Causalidad Roussel Uclaf o RUCAM (del inglés *Roussel Uclaf Causality Assessment Method*) es el más utilizado para diagnosticar DILI debido a su sensibilidad (86%), especificidad (89%) y reproducibilidad (Benichou et al., 1993). Este método consiste en una escala de puntuación que evalúa siete categorías que ayudan a definir el diagnóstico de DILI (Tabla 1.2). La puntuación final obtenida oscila entre -9 y +14 y permite clasificar como muy probable (≥ 8), probable (6-8), posible (3-5), improbable (1-2) o excluido (≤ 0) un evento como episodio de DILI (EASL, 2019). Sin embargo, el método RUCAM no está exento de limitaciones ya que la puntuación en algunos apartados resulta arbitraria, como por ejemplo que entre los factores de riesgo se considere el consumo de alcohol, pero no se contemple la cantidad o el tiempo de consumo, lo que dificulta un diagnóstico certero (Aithal et al., 2011; Fu et al., 2020). De esta manera, el diagnóstico del DILI y la identificación del fármaco causal constituyen un verdadero

desafío clínico en la actualidad y existe el convencimiento generalizado de que muchos de los casos de DILI no son identificados.

Tabla 1.2. Método RUCAM para el diagnóstico del DILI.

Categorías	Puntuación
1 Latencia: tiempo transcurrido entre la exposición y la aparición de los efectos.	+1 o +2
2 Curso de la patología tras la retirada del medicamento.	-2, 0, +1, +2 o +3
3 Factores de riesgo (consumo de alcohol, embarazo, edad).	0 o +1 por subcategoría.
4 Comedicación.	-3, -2, -1 o 0
5 Búsqueda de causas alternativas (otras patologías o complicaciones no relacionadas con el fármaco).	3, -2, 0, +1, o +2
6 Información previa del fármaco sospechoso (efectos descritos en la ficha técnica del compuesto o descritos en la literatura científica).	0, +1, o +2
7 Respuesta a la reexposición al fármaco.	-2, 0, +1, o +3

PUNTAJACIÓN TOTAL	De -9 a +14
	Muy probable >8
	Probable (6-8)
	Posible (3-5)
	Improbable (1-2)
Excluido (≤0)	

1.2.4. DILI de carácter idiosincrásico (iDILI), epidemiología y factores de riesgo.

La etiopatogenia del iDILI es compleja y resulta de la interacción entre las propiedades del fármaco administrado, las características del huésped y las condiciones ambientales a las que está expuesto (Figura 1.5).

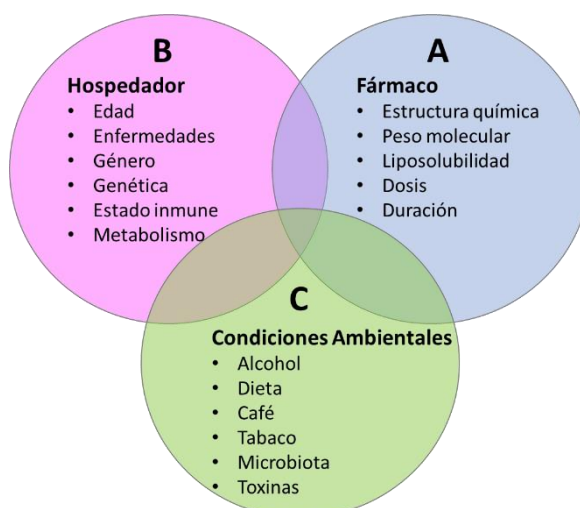


Figura 1.5. Grupos de factores asociados a la susceptibilidad del DILI idiosincrásico en el ser humano. Esta susceptibilidad depende de la interacción entre las propiedades del fármaco administrado (A), las características intrínsecas del huésped (B) y las condiciones ambientales a las que está expuesto (C). Imagen basada en Fontana et al., 2014 (adaptada).

Las características del fármaco (estructura química, peso molecular, liposolubilidad o dosis) son factores a tener en cuenta en el riesgo de aparición iDILI. Aunque la dosis del fármaco no está directamente relacionada con la aparición de episodios idiosincrásicos, se ha observado que los fármacos administrados a dosis ≤ 10 mg causan raramente episodios de iDILI, y la probabilidad de sufrir algún episodio aumenta si la dosis administrada es > 50 mg (Lammert et al., 2008). Una alta liposolubilidad está relacionada con una mayor propensión al iDILI, pues los fármacos más liposolubles pueden acumularse en el hígado con mayor facilidad, aumentando la probabilidad de formación de especies inestables (Chen et al., 2015; Fisher et al., 2015). Además, la formación de metabolitos reactivos puede verse aumentada por la presencia de determinados grupos químicos (“toxicóforos”) en la estructura del fármaco.

Las características intrínsecas del individuo son las que tienen un papel más determinante en la aparición de iDILI. El género es un factor que condiciona la susceptibilidad y, por ejemplo, numerosos estudios muestran que las mujeres tienen mayor probabilidad a desarrollar fallo hepático fulminante por iDILI (Fisher et al., 2015). La edad también influye, de hecho, se han observado dos picos de prevalencia de hepatotoxicidad inducida por fármacos (de 40 a 49 años y de 60 a 69 años en la población española entre 1994 y 2007) (Lucena et al., 2009) o que la incidencia de daño hepático por fármacos aumenta de 9 casos cada 100000 habitantes en individuos de 15 a 29 años hasta 41 casos cada 100000 habitantes en individuos mayores de 70 años según estudios basados en la población de Islandia entre el 2010 y 2011 (Hoofnagle & Navarro, 2013).

Por otro lado, los polimorfismos asociados a los genes implicados en el metabolismo de fármacos, así como la inducción o inhibición de enzimas en presencia de otras moléculas son los grandes responsables de las variaciones la eficiencia de detoxificación de un fármaco (Chen et al., 2015). En concreto, se han identificado variantes de las isoformas CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4 con relevancia clínica en el iDILI (Roth & Lee, 2017). Algunos de estos polimorfismos provocan una disminución total o parcial de la actividad enzimática (fenotipo metabolizador lento o intermedio, respectivamente), desencadenando una acumulación del fármaco que puede ser tóxica. Así, por ejemplo, los portadores de las variantes alélicas CYP2C9*2 y

CYP2C9*3 poseen una actividad CYP2C9 disminuida y metabolizan de forma lenta fármacos como el anticoagulante warfarina, de manera que los portadores de estos polimorfismos parecen ser más susceptibles a sufrir reacciones adversas cuando son tratados con dicho fármaco, especialmente en las fases iniciales (Lee et al., 2002). Por el contrario, existen individuos con más de dos copias para genes implicados en el metabolismo o que presentan polimorfismos que se traducen en un aumento de la actividad enzimática (fenotipo metabolizador rápido) (Zanger & Schwab, 2013). Las variantes alélicas *CYP3A7*1B* y *CYP3A7*1C* confieren mayor actividad CYP3A7 y oxidan de forma más eficiente algunos fármacos (ácidos retinoicos isoméricos, estrona, dehidroepiandrosterona y dehidroepiandrosterona sulfato), por lo que el efecto terapéutico en individuos con estas variantes podría no ser el esperado, como se ha demostrado con el tratamiento de la osteoporosis con dehidroepiandrosterona sulfato (Crettol et al., 2010).

Ciertas mutaciones en los enzimas de fase II (UGT, GST, NAT y SULT) también aumentan el riesgo de sufrir DILI. De hecho, la variante alélica *2 de *UGT2B7* (de mayor frecuencia en la población europea) aumenta la probabilidad de sufrir toxicidad por diclofenaco (antiinflamatorio no esteroideo o AINE) pues se cree que aumenta la bioactivación oxidativa del fármaco y la formación del intermediario citotóxico quinoneimina (Stephens & Andrade, 2020). Asimismo, algunas variaciones genéticas presentes en transportadores de fármacos (fase III) también aumentan el potencial de un fármaco a desarrollar toxicidad hepática. Tal es el caso de un polimorfismo en el gen *ABCB1* (gen codificante del transportador MDR1) asociado al riesgo de toxicidad por atorvastatina (Stephens & Andrade, 2020).

Las variantes génicas de las moléculas del complejo de inmunohistocompatibilidad (MHC) I y II y de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) también se consideran factores de susceptibilidad importantes (Stephens & Andrade, 2020). Así, por ejemplo, se ha descrito que los portadores del alelo HLA-B*57:01 tienen mayor riesgo de sufrir una reacción adversa tras el tratamiento con flucloxacilina (antibiótico) (Daly et al., 2009; Monshi et al., 2013; Wuillemin et al., 2014).

Finalmente, el ambiente al que está expuesto el organismo y el estilo de vida también son importantes. Así, entre otros factores, el consumo de alcohol puede disminuir la

dosis tóxica del paracetamol al aumentar la formación de especies reactivas generadas por CYP2E1 y contribuir a la depleción de los niveles GSH. Además, una dieta poco variada y rica en grasas puede resultar en una disminución en la tasa de eliminación de los fármacos, potenciando las reacciones de toxicidad hepática (Andrade et al., 2019; Chen et al., 2015).

1.2.5. Amoxicilina/Clavulánico como causante de iDILI

El antibiótico amoxicilina/clavulánico (A/C) es uno de los principales fármacos causantes de iDILI en Estados Unidos y Europa (Andrade et al., 2005; Chalasani et al., 2008) y se encuentra entre los 5 primeros fármacos inductores de iDILI a nivel global (Teschke, 2018). Las manifestaciones clínicas asociadas a la toxicidad por A/C son predominantemente colestásicas, con síntomas como la ictericia, el dolor abdominal o el prurito, aunque se han reportado casos minoritarios de daño hepatocelular derivado del tratamiento con este fármaco (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012).

La etiopatogenia de la toxicidad causada por A/C no es del todo conocida. Diferentes estudios relacionan los alelos del HLA tipo II DRB1*15 y DRB1*06 a una mayor susceptibilidad a la hepatotoxicidad por A/C (Lucena et al., 2011). No obstante, la presencia de ciertos haplotipos del HLA no es suficiente para explicar la susceptibilidad al daño hepático debido a A/C. Por un lado, se ha relacionado la toxicidad hepática causada por A/C con una reacción inmunológica en la que intervienen linfocitos T (deLemos et al., 2016; Kim et al., 2015) y se ha observado que la exposición a A/C activa la respuesta de linfocitos CD8(+) y CD9(+) independientemente del haplotipo del HLA (Kim et al., 2015). Por otro lado, no se ha podido asociar hasta el momento un alelo del HLA a la toxicidad de un único fármaco (por ejemplo, el haplotipo DRB1*15:01 asociado a la toxicidad por A/C también está asociado con la toxicidad por lumiracoxib) y tampoco es posible predecir el patrón de daño generado teniendo en cuenta únicamente los haplotipos HLA (por ejemplo, la A/C desencadena un patrón colestásico o mixto mientras que el lumiracoxib produce daño hepatocelular) (Daly, 2022) de manera que otros mecanismos deben estar implicados en el desarrollo de esta toxicidad.

En ese sentido, más allá de los haplotipos HLA y del papel del sistema inmunológico en la toxicidad hepática inducida por A/C, no se ha profundizado en el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la misma. Recientemente, un estudio *in vitro* ha relacionado el efecto colestásico de la A/C con la depleción de los principales transportadores de AB (tanto de entrada como de salida), con la alteración de las síntesis de AB (y las vías de señalización implicadas en su control) y con la activación de la vía NFR2, una de las principales vías antioxidantes que se activan en respuesta al estrés oxidativo (Petrov et al., 2021). No obstante, serían necesarios más estudios para esclarecer los mecanismos moleculares implicados en la hepatotoxicidad mediada por A/C, incluyendo el uso de modelos *in vitro* personalizados que permitan analizar su naturaleza idiosincrásica.

1.3. Modelos preclínicos para el estudio de DILI.

Los ensayos clínicos suponen la parte más costosa del proceso de desarrollo de fármacos. Es por ello que una identificación eficaz en las fases preclínicas de aquellos compuestos con poder de desencadenar DILI, facilitaría el cribado de moléculas. Esto mejoraría la elección de los candidatos válidos que avanzarían a las siguientes fases del desarrollo farmacológico, reduciendo la inversión económica y acortando los plazos necesarios para el desarrollo del fármaco. En este contexto, resulta particularmente difícil el abordaje de la hepatotoxicidad idiosincrásica debido a su estrecha dependencia de las características del paciente. En consecuencia, existe una necesidad de disponer de estrategias y modelos preclínicos que permitan profundizar en el estudio del DILI y de forma particular del iDILI, con el objetivo de conocer mejor sus mecanismos y los factores de riesgo implicados en su aparición y así poder discriminar de manera eficaz entre fármacos potencialmente hepatotóxicos y aquellos que no lo son.

1.3.1. Modelos preclínicos *in vivo*: uso de animales de experimentación.

En el uso animales de experimentación para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos se han seguido diferentes estrategias. Algunos modelos están basados en la alteración o supresión de los mecanismos citoprotectores de los hepatocitos para facilitar una respuesta tóxica tras la administración de un fármaco sospechoso. En este

sentido, el modelo *knockdown* para la síntesis de GSH en rata ha resultado ser altamente sensible para la detección de la hepatotoxicidad inducida por el diclofenaco y la flutamida, fármacos desencadenantes de iDILI (Morita et al., 2009). También, se ha tratado de recrear condiciones pro-inflamatorias por estimulación del sistema inmunitario para dirigir la toxicidad por fármacos hacia un carácter idiosincrático (Roth et al., 2003). Este es el caso de la coadministración del lipopolisacárido en roedores, el cual estimula la activación de neutrófilos y la producción de factor de necrosis tumoral alfa (Liguori et al., 2010). Algunos fármacos conocidos como desencadenantes de DILI de carácter idiosincrático en humanos como la isoniazida, la amiodarona o la trovafloxacin entre otros, se han coadministrado con lipopolisacárido a concentraciones no tóxicas en roedores y se ha observado una respuesta hepatotóxica (Lu et al., 2012; Shaw et al., 2007; Su et al., 2014). Sin embargo, este modelo presenta características no consistentes con el DILI como por ejemplo el tipo de inmunidad predominante en la patología, ya que la respuesta a lipopolisacárido está mediada fundamentalmente por neutrófilos (inmunidad innata) mientras que en el caso de la hepatotoxicidad inducida por fármacos en humanos la respuesta inmunitaria está mediada por linfocitos (inmunidad adaptativa) (Utrecht & Naisbitt, 2013). Así mismo, inducir condiciones pro-inflamatorias previas al tratamiento en un modelo animal es una estrategia controvertida ya que otros estudios apuntan a que la estimulación del sistema inmunitario enmascara los efectos que tiene el propio fármaco sospechoso en la respuesta inmunitaria e incluso podría tener un efecto protector (Mak & Utrecht, 2015).

A pesar de los esfuerzos realizados hasta ahora, la comunidad científica sigue teniendo dificultades para generar modelos *in vivo* para el estudio de la hepatotoxicidad debido a las diferencias interespecies entre los animales de experimentación y los humanos no solo a nivel genético, sino también a nivel metabólico y funcional, aspectos que aumentan la complejidad que supone crear un modelo *in vivo* reproducible (Donato & Tolosa, 2019; Godoy et al., 2013). Además, cuestiones éticas limitan el uso de animales e impulsan el desarrollo de modelos alternativos siguiendo los principios de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento) en la experimentación animal y un ejemplo de

ello es el uso y desarrollo de modelos *in vitro* basados en células humanas para estudios de hepatotoxicidad (Gorzalczany & Rodriguez-Basso, 2021; Törnqvist et al., 2014).

1.3.2. Modelos preclínicos *in vitro*: modelos basados en células humanas.

1.3.2.1. Hepatocitos primarios humanos.

Los modelos preclínicos basados en células de origen humano permiten realizar estudios de hepatotoxicidad obviando la variabilidad inherente a la especie. Los hepatocitos primarios humanos (PHH, del inglés *primary human hepatocytes*) constituyen el modelo por excelencia (*gold standard*) para los estudios de metabolismo, transporte y toxicidad ya que es el sistema que más se aproxima a los hepatocitos en su ambiente fisiológico. Sin embargo, los PHH presentan limitaciones como la incapacidad de proliferar o la pérdida rápida y gradual de la funcionalidad durante su cultivo en monocapa (Gómez-Lechón et al., 2014). Algunos formatos de cultivo en sándwich, en los que la monocapa de PHH queda cubierta por una fina capa de matriz extracelular (ECM), retrasan la desdiferenciación de los PHH, mantienen su morfología y polaridad y prolongan su funcionalidad hasta 14 días (Elaut et al., 2006; Rowe et al., 2013). A priori, la posibilidad de disponer de preparaciones de hepatocitos aislados a partir de tejido hepático de diferentes donantes es una excelente oportunidad para estudiar la variabilidad interindividual característica del metabolismo y la hepatotoxicidad de los fármacos. No obstante, la estricta necesidad de disponer de muestras de hígado fresco para el aislamiento de hepatocitos limita su disponibilidad por razones éticas (Godoy et al., 2013), e impide el análisis de perfiles genéticos y polimorfismos relevantes que puedan ser responsables de episodios idiosincráticos en un número suficiente de donantes (Choudhury et al., 2017). De ahí la necesidad de explorar modelos celulares alternativos que permitan superar los inconvenientes y limitaciones de los PHH.

1.3.2.2. Líneas celulares de hepatoma y modelos basados en hepatocitos modificados.

Las principales ventajas de las líneas celulares de hepatoma son su proliferación casi infinita, fácil manejo y fenotipo estable. Sin embargo, su aplicabilidad a estudios de toxicidad está seriamente limitada por su baja capacidad metabólica. Este es el caso de la línea HepG2, muy utilizada en estudios de hepatotoxicidad *in vitro*, cuya expresión de

enzimas de fase I y II se encuentra muy reducida (Donato et al., 2015; Wu et al., 2019; Yokoi & Oda, 2020).

Por esta razón, se ha propuesto el uso de otras líneas de hepatoma con una funcionalidad más próxima a los PHH, como la línea HepaRG, procedente de un paciente con hepatocarcinoma causado por el virus de la hepatitis C. Las células HepaRG proliferantes pueden adquirir un fenotipo hepático diferenciado al ser cultivadas en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO). Una vez diferenciadas, las células HepaRG presentan niveles relativamente elevados de enzimas CYP450, transportadores de membrana y receptores nucleares (Aninat et al., 2006) durante al menos dos semanas de cultivo, lo que ha permitido su aplicación en ensayos de toxicidad a largo plazo para estudiar los efectos crónicos de los fármacos (Donato et al., 2013; Jossé et al., 2008). A pesar de ello, no hay que perder de vista que HepaRG es una línea transformada cuyas rutas de señalización se encuentran posiblemente alteradas de manera que su respuesta a la toxicidad puede no reflejar la de un hepatocito “normal”. Del mismo modo, estudiar la toxicidad idiosincrásica en este modelo no es posible debido fundamentalmente a la falta de variabilidad genotípica (Godoy et al., 2013).

Algunos modelos celulares más recientes permiten analizar la respuesta a fármacos e incluir la variabilidad genotípica en el análisis, aunque de forma limitada. Este es el caso de los hepatocitos humanos Upcytes® (UHH), un modelo basado en células derivadas de hepatocitos que han adquirido capacidad replicativa limitada gracias a un proceso de transducción lentiviral (Burkard et al., 2012). Estudios transcripcionales sitúan a los UHH más cercanos a los PHH que a la línea HepG2. Los UHH poseen funciones típicas de hepatocitos como la síntesis de albúmina, acumulación de glucógeno y actividades CYP450, aunque estas últimas dependen del donante del que derive (Tolosa et al., 2016b). Este modelo ha mostrado ser ventajoso para los estudios de hepatotoxicidad con dosis repetidas de fármacos gracias a su capacidad para mantener sus funcionalidad durante largos periodos de cultivo (hasta 21 días) (Tolosa et al., 2019). Además, dada la posibilidad de generar UHH de diferentes donantes, es posible estudiar la variabilidad paciente-específica en los estudios de hepatotoxicidad. Sin embargo, es un modelo cuya proliferación finita impide su disponibilidad ilimitada, por lo que su uso continuo requeriría la generación de múltiples preparaciones de UHH a partir del tejido del

paciente, lo que implica restricciones éticas y una falta de estandarización de los resultados obtenidos a largo plazo.

1.3.2.3. Cocultivos.

El uso de cocultivos es una estrategia *in vitro* de aproximación a las condiciones fisiológicas que se dan en el hígado. Diversos estudios muestran que el cocultivo de hepatocitos con otras células hepáticas (células Kupffer, endoteliales, estrelladas, etc.) favorece su estabilidad funcional y prolonga su supervivencia en el cultivo, lo que permite realizar estudios a largo plazo, sobre 2-3 semanas (Krause et al., 2009; Pfeiffer et al., 2015). Además, existen evidencias de que la hepatotoxicidad no es una cuestión exclusiva del hepatocito y el papel que juegan en el DILI las células no parenquimáticas del hígado es cada vez más reconocido. Entre las combinaciones de cocultivo que se han explorado para estudios de hepatotoxicidad, el cultivo mixto de hepatocitos y células Kupffer es una de las más destacadas. A modo de ejemplo, este modelo permite recrear la respuesta inflamatoria tras la exposición a fármacos hepatotóxicos como la trovafloxacina (Rose et al., 2016). Pese a sus ventajas, a día de hoy los cocultivos no constituyen un modelo muy extendido en el cribado de fármacos y su uso más generalizado requeriría un esfuerzo adicional de optimización técnica (Roth & Ganey, 2020).

1.3.2.4. Cultivos tridimensionales.

Los cultivos tridimensionales (3D) tratan de recrear de forma más precisa la fisiología del órgano y las interacciones célula-célula y célula-ECM para que las células sean capaces mejorar su funcionalidad con respecto al cultivo 2D o en monocapa (Edmondson et al., 2014). Los modelos hepáticos 3D disponibles en la actualidad varían tanto en los biomateriales utilizados para generar la matriz 3D como en los tipos celulares empleados (PHH, líneas HepG2 o HepaRG, UHH® etc.) y sus combinaciones con células no parenquimáticas (Baze et al., 2018; Fang & Eglen, 2017; Godoy et al., 2013; Langhans, 2018). Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que el cultivo 3D mejora la funcionalidad metabólica de las células hepáticas (aumento de la expresión basal de los genes codificantes de enzimas de Fase I y II) y proporciona una mayor estabilidad a lo largo del tiempo de cultivo con respecto al formato 2D (Andersson, 2017;

Basharat et al., 2020). Su aplicación a estudios de hepatotoxicidad posibilitaría realizar tratamientos largos con dosis repetidas del fármaco (Bell et al., 2016). Sin embargo, los cultivos 3D deben enfrentarse a la complejidad añadida del diseño y a la síntesis de los armazones que mimetizan la arquitectura del parénquima hepático, la reducida reproducibilidad de los resultados y el coste económico que supone generarlos (Anton et al., 2015).

1.3.2.5. Células madre pluripotentes.

Recientemente, los hepatocitos derivados de células madre pluripotentes (PSC, del inglés *pluripotent stem cells*) han sido descritos como un modelo *in vitro* para estudios de hepatotoxicidad. Este modelo permite obtener células con fenotipo hepático de forma ilimitada y, además, permite establecer líneas genotípicamente diferentes a partir de donantes diferentes (Kuna et al., 2018). De este modo, los hepatocitos derivados de PSC podrían ser una buena aproximación para el estudio del DILI, y en particular, del iDILI tal y como se justifica en los siguientes apartados.

1.4. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC): concepto, generación y utilidad.

1.4.1. Concepto.

Las PSC son células con capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular derivado de las tres capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo) y poseen una autorenovación ilimitada (Wills & Rajagopalan, 2020).

De forma fisiológica estas células se forman en la masa celular interna del blastocito durante el desarrollo embrionario y se conocen como células madre embrionarias (ESC). En 2006 Shinya Yamanaka y su equipo descubrieron que el estado pluripotente de una célula dependía fundamentalmente de la expresión de cuatro factores de transcripción: OCT3/4, SOX2, KLF4 y C-MYC (KOSM) de manera que la expresión ectópica de estos factores en células somáticas era suficiente para revertir su estado unipotente a pluripotente (Takahashi & Yamanaka, 2006). Este procedimiento de “desdiferenciación” recibió el nombre de reprogramación y la célula pluripotente obtenida se denominó

célula madre pluripotente inducida (iPSC). Las iPSC recrean a las ESC en muchos aspectos como la morfología celular, la capacidad de proliferar indefinidamente y de diferenciarse a cualquier tipo celular de las tres capas germinales, la capacidad de formar teratomas o su actividad telomerasa (Takahashi et al., 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006).

Diferentes tejidos han sido considerados como fuente de células somáticas para la generación de iPSC. Debido a la facilidad de aislamiento (aunque invasivo), los fibroblastos han sido el tipo celular predominante usado para llevar a cabo la reprogramación. También se han usado otros tipos celulares como los queratinocitos (Aasen et al., 2008; Piao et al., 2014), células de la pulpa dental (Tamaoki et al., 2010), progenitores del tejido adiposo (Qu et al., 2012), células mesenquimales del folículo piloso (Wang et al., 2013) o células del tracto urinario (Zhou et al., 2012). Recientemente, la sangre periférica está ganando popularidad como fuente de células somáticas para la reprogramación debido a su extracción fácil y mínimamente invasiva para el paciente (Vlahos et al., 2019).

1.4.2 Reprogramación celular: estrategias para la generación de iPSC.

La reprogramación celular se puede llevar a cabo mediante diferentes técnicas que se pueden dividir en dos grandes grupos: sistemas integrativos y sistemas no integrativos (Andargie et al., 2016; González et al., 2011). La Figura 1.6 esquematiza las diferentes estrategias de reprogramación usadas para generar iPSC.

Los sistemas integrativos llevan a cabo la reprogramación a través de la introducción de genes exógenos inductores de la pluripotencia (KOSM) en el genoma de la célula a reprogramar. La expresión de estos genes es transitoria y acaban siendo silenciados al final de la reprogramación por modificaciones epigenéticas. De hecho, la reprogramación solo se considera exitosa cuando la célula reprogramada empieza a sobreexpresar los genes endógenos de pluripotencia y silencia los exógenos (Al Abbar et al., 2020; González et al., 2011). Los retrovirus, como el virus de la leucemia murina de Moloney y sus derivados, son los que presentan mayor eficiencia de reprogramación, pero únicamente pueden utilizarse en células proliferativas. Por el contrario, los lentivirus actúan tanto en células proliferativas como no proliferativas pero su eficiencia

de reprogramación es menor (Figura 1.6). En cualquier caso, la integración de material genético en el genoma celular es, precisamente, una desventaja de los sistemas integrativos, pues la integración aleatoria puede causar mutaciones en la célula de partida. También la reactivación de los transgenes podría alterar el proceso de diferenciación celular o incluso inducir la formación de células tumorales (Al Abbar et al., 2020; Andargie et al., 2016; González et al., 2011).

Los sistemas no integrativos incluyen una variedad de estrategias que comprenden desde el uso de material genético hasta el uso de proteínas o pequeñas moléculas (Figura 1.6). Los adenovirus defectivos en la replicación se han utilizado para introducir material genético en la célula a reprogramar sin integrarlo en el genoma. La desventaja de este sistema es que la eficiencia de reprogramación es notablemente menor con respecto a los sistemas integrativos (hasta tres órdenes de magnitud). Sin embargo, los vectores introducidos acaban desapareciendo con los ciclos de proliferación de las células reprogramadas (Al Abbar et al., 2020; González et al., 2011; Maherali & Hochedlinger, 2008).

Entre los sistemas víricos no integrativos ha cobrado especial interés la transfección de RNA mediante virus Sendai (SeV). El material genético de SeV es una cadena negativa de RNA no segmentada en la que se ha sustituido la información genética no necesaria para la replicación por la información de reprogramación (KOSM). Los SeV recombinantes son defectivos en la proteína de fusión y no es posible la formación de nuevos SeV para la reinfección. De esta manera, la estrategia SeV es segura y la expresión ectópica es transitoria pues los vectores acaban diluyéndose con la replicación celular. Su eficiencia de reprogramación es menor que la de los sistemas integrativos, pero en la actualidad se ha optimizado cambiando la estequiometría en la expresión de OSKM. Además, la estrategia SeV permite que la expresión de los transgenes sea más rápida (Borgohain et al., 2019; Nakanishi & Otsu, 2012).

También es posible hacer uso de vectores episomales, evitando así la envuelta vírica (Figura 1.6). Estos vectores entran en la célula diana mediante sistemas como la electroporación haciendo que su manejo sea sencillo y seguro. No obstante, en ocasiones la expresión de los vectores episomales se reduce antes de que la célula diana

llegue a reprogramarse de forma completa haciendo que la eficiencia de reprogramación sea sustancialmente baja (Andargie et al., 2016; Silva et al., 2015).

Otras aproximaciones de reprogramación no integrativa sin hacer uso de virus son las que implican microRNAs, RNAs sintéticos, proteínas o pequeñas moléculas (Figura 1.6). Por ejemplo, los miR-291-3p, miR-294, y miR-295 han sido utilizados para generar colonias homogéneas de iPSC sin hacer uso de c-myc. Por otro lado, las proteínas OSKM unidas a poliarginina (para asegurar la entrada a la célula diana) también han sido usadas con éxito para la reprogramación celular (Al Abbar et al., 2020; Borgohain et al., 2019; González et al., 2011).

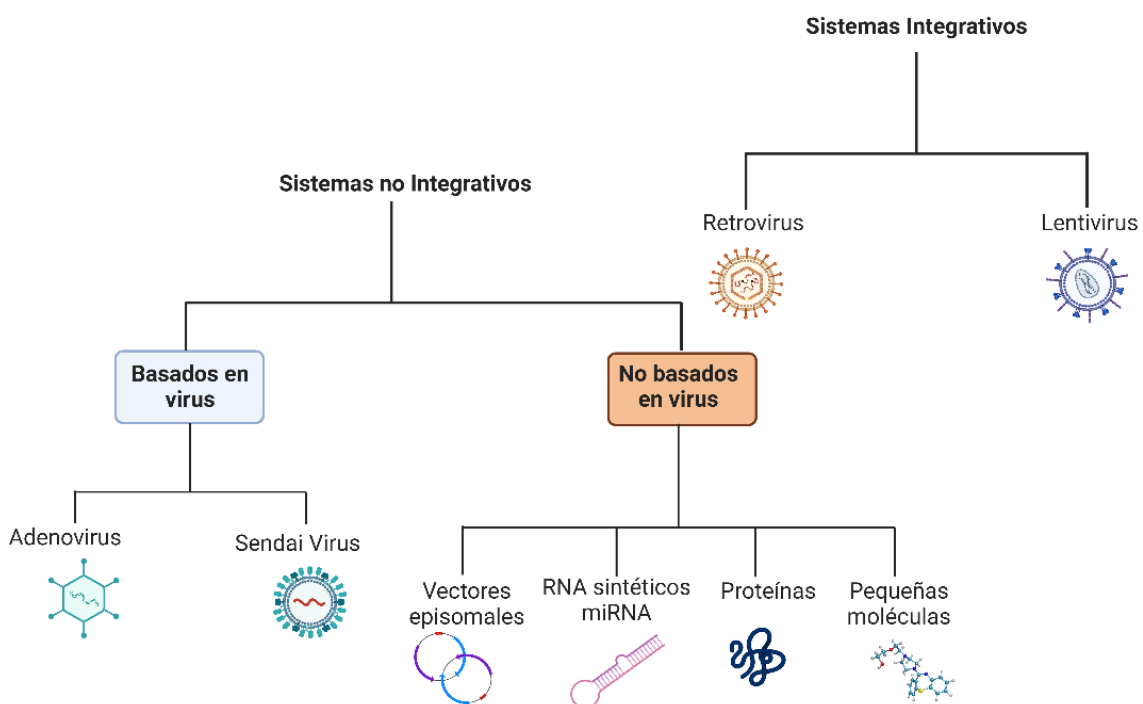


Figura 1.6. Estrategias de reprogramación celular. La reprogramación celular puede llevarse a cabo mediante sistemas integrativos (izquierda) o sistemas no integrativos (derecha). Los sistemas no integrativos se diferencian entre los sistemas basados y los no basados en virus. En los sistemas no basados en virus son los vectores episomales, los RNA, las proteínas y otras pequeñas moléculas las estrategias predominantes. Imagen generada con Biorender®.

1.4.3 El potencial de las iPSC en biomedicina.

La posibilidad de generar células PSC sin recurrir a la destrucción de los blastocistos supuso un hito al permitir la generación de diferentes tipos celulares de forma ilimitada al mismo tiempo que se evitaban las restricciones éticas que implicaba el uso de ESC. La producción de estas células a demanda permitió su uso terapéutico por sustitución de células con una patología concreta por células reprogramadas corregidas y sanas,

eludiendo el rechazo inmunológico en los pacientes. Su aplicación en terapia celular (Figura 1.7), aunque con resultados muy prometedores, en la actualidad todavía está siendo objeto de estudio (Yamanaka, 2020).

Asimismo, aprovechando la posibilidad de obtener células reprogramadas de pacientes con patologías (fundamentalmente de origen genético), las células derivadas de iPSC también han sido propuestas como modelos *in vitro* para estudiar los mecanismos subyacentes en diferentes enfermedades con el objetivo de identificar nuevas dianas terapéuticas. Además, debido a su capacidad de recapitular el fenotipo patológico, las células derivadas de iPSC también están siendo utilizadas para el estudio y desarrollo de nuevos fármacos (Figura 1.7) (Shi et al., 2017; Sternecker et al., 2014).

Por último, las iPSC han supuesto una nueva estrategia para estudios de toxicidad y en particular de hepatotoxicidad (Figura 1.7). La posibilidad de diferenciar iPSC en células con fenotipo de hepatocito conocidas como *hepatocyte-like cells* (HLC) es el punto de partida para su aplicación al análisis de los factores que rigen la susceptibilidad individual, por lo que se postulan como un modelo para estudiar el DILI y, en especial, el iDILI (Donato & Tolosa, 2019; Wills & Rajagopalan, 2020). Estudios transcriptómicos y funcionales llevados a cabo hasta el momento indican que las HLC expresan enzimas de fase I y fase II y algunos transportadores hepáticos y exhiben características típicas de hepatocitos como es una morfología poligonal, la producción y secreción de albúmina, síntesis de urea y el almacenamiento de glucógeno, aunque en menor grado que los PHH (Chen et al., 2012; Hannan et al., 2013; Song et al., 2009). El potencial de las HLC como modelo celular para discriminar el potencial hepatotóxico de nuevos fármacos en los estudios preclínicos de seguridad parece indiscutible (Gao & Liu, 2017). De hecho, gracias a la ventaja que supone la obtención de iPSC de diferentes donantes, es posible generar HLC con perfiles genéticos y fenotípicos diferentes permitiendo estudiar la relación entre la variabilidad interindividual y el metabolismo de fármacos (Takayama et al., 2014). A este respecto, la generación de HLC procedentes de pacientes que han sufrido un episodio de hepatotoxicidad por fármacos puede permitir el estudio de la vinculación del fármaco sospechoso con el episodio de hepatotoxicidad acontecido en cada paciente (Choudhury et al., 2017). La identificación retrospectiva de fenotipos metabolizadores con mayor susceptibilidad a la hepatotoxicidad de ciertos fármacos

(idiosincrasia metabólica) también permitiría el estudio de los mecanismos celulares y moleculares implicados en el iDILI. De ese modo, con el modelo celular basado en HLC es posible aumentar la precisión en los estudios de iDILI, con resultados más fiables y personalizados que pueden resultar de gran ayuda en el desarrollo farmacéutico (Donato & Tolosa, 2019).

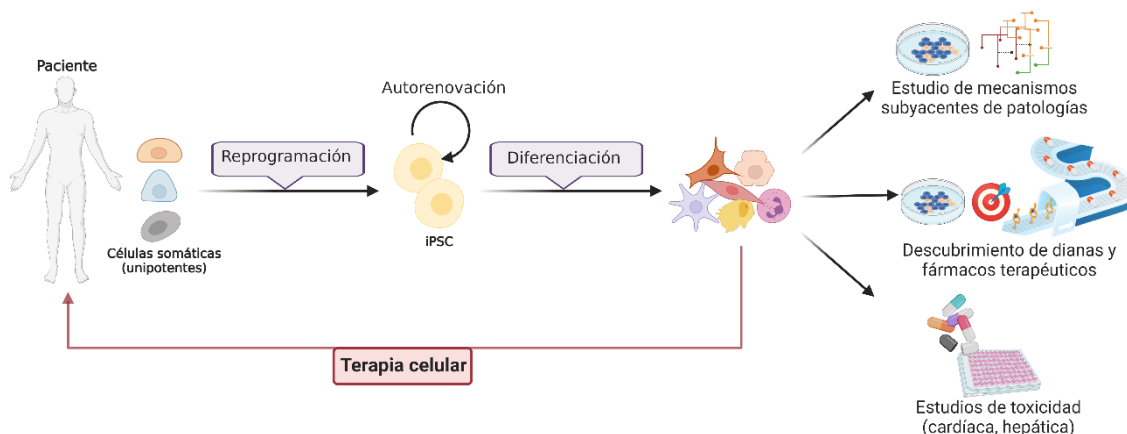


Figura 1.7. Aplicaciones de las iPSC. Las células somáticas patológicas de pacientes pueden ser reemplazadas por células diferenciadas sanas (terapia celular). Las células derivadas de iPSC pueden ser utilizadas para estudiar los mecanismos implicados en el desarrollo de la patología, así como para descubrir nuevas dianas y fármacos terapéuticos. Al mantener el genotipo del paciente, las iPSC pueden diferenciarse en células somáticas para estudios de toxicidad, permitiendo estudiar la variabilidad interindividual en cuanto a la respuesta a fármacos. Imagen generada con Biorender®.

1.5. Células hepáticas derivadas de iPSC: generación y uso como modelo *in vitro* en iDILI.

1.5.1 Organogénesis del hígado.

La organogénesis del hígado es el punto de partida de los protocolos de diferenciación hepática de células progenitoras. El hígado se desarrolla a partir del endodermo, una de las tres capas germinales que se forma durante la gastrulación, un proceso que sucede aproximadamente a los 16 días de gestación en humanos. A nivel molecular, la formación del endodermo viene regida fundamentalmente por la activación de la vía de señalización Nodal, cuyos integrantes pertenecen a la familia de los factores de crecimiento transformante beta (TGF β , del inglés *transforming growth factor β*) y actúan como ligandos para los receptores de activina tipo I y II y correceptores Cripto. Niveles elevados de Nodal se correlacionan con la expresión del factor 17 de la caja de transcripción SRY (SOX17, del inglés *SRY-box transcription factor 17*) y de la proteína A2

de la caja *forkhead* (FOXA2, del inglés *forkhead box protein A2*) promoviendo la formación del endodermo definitivo (Grapin-Botton, 2008; Zorn & Wells, 2007).

Si bien la mayor parte de las células que formarán el hígado proceden del endodermo (hepatocitos y colangiocitos), otras células residentes en el hígado adulto proceden del mesodermo (células Kupffer, células estrelladas, células endoteliales, leucocitos). Es por ello que el mesodermo y el endodermo poseen una estrecha comunicación durante la organogénesis hepática (Zong & Friedman, 2014). De esta manera, tras la gastrulación, el endodermo definitivo forma un tubo a lo largo del eje anteroposterior que queda rodeado por el mesodermo. Este tubo está dividido en tres dominios progenitores: intestino anterior, intestino medio y el intestino posterior, formados gracias a la secreción diferencial de factores por el mesodermo adyacente (Zorn, 2008). Estudios de rastreo celular durante el desarrollo embrionario de ratones indican que el hígado se origina en la región ventral del intestino anterior adyacente al mesodermo cardíaco y al *septum transversum* (la región del mesodermo que dará lugar al mesenterio ventral) (Gordillo et al., 2015; Rossi et al., 2001; Si-Tayeb et al., 2010a). El compromiso hepático de las células competentes del intestino anterior ventral se inicia gracias a señales moleculares procedentes del mesodermo cardíaco y del *septum transversum* en las que se incluyen factores de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés *fibroblast growth factor*) y de la familia las proteínas morfogénicas óseas (BMP, del inglés *bone morphogenetic protein*), respectivamente (Rossi et al., 2001; Shin et al., 2013).

Tras recibir las señales moleculares propicias, el intestino anterior ventral se engrosa y forma un pequeño bolsillo celular llamado divertículo hepático (23-26 días de gestación). El divertículo hepático es el primer indicio morfológico de la formación del hígado ya que las células endodérmicas dejan su morfología cuboide y su disposición en monocapa para formar múltiples capas de epitelio pseudoestratificado cuyas células acabarán invadiendo el *septum transversum* tras la rotura de la lámina basal, gracias a la expresión de genes como el que codifica la proteína homeobox expresada hematopoyéticamente (*Hhex*, del inglés *Hematopoietically Expressed Homeobox*) (Bort et al., 2006). Estas células reciben el nombre de hepatoblastos y son proliferativas y bipotenciales (26-32 días de gestación), pues a partir de ellas se generarán los

hepatocitos y los colangiocitos (Rossi et al., 2001; Zorn, 2008). Los hepatoblastos expresan algunos de los marcadores que se expresan en hepatocitos como la albúmina (*Alb*), el factor nuclear hepático 4 alfa (*Hnf4a*, del inglés *hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) y la citoqueratina 18 (*Ck18*, del inglés *cytokeratin 18*), así como marcadores de colangiocitos como la citoqueratina 19 (*Ck19*, del inglés *cytokeratin 19*). Además, los hepatoblastos expresan marcadores más específicos como la alfafetoproteína (*Afp*), E-cadherina o la molécula de adhesión de célula epitelial (*Epcam*, del inglés *epithelial cell adhesion molecule*) (Tanaka et al., 2009; Wauthier et al., 2008).

La invasión del *septum transversum* progresa con la expansión celular en la que están implicados numerosos factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, del inglés *hepatocyte growth factor*), FGF, TGF β y ácido retinoico. La mayoría de estos factores son secretados por las células del *septum transversum* (incluyendo las células endoteliales) y los propios hepatoblastos y están implicados en la proliferación y supervivencia celular (Zorn, 2008). Finalmente, desde 56-58 días de gestación hasta aproximadamente los 210 días, los hepatoblastos llevan a cabo su diferenciación para formar hepatocitos y colangiocitos (Ober & Lemaigre, 2018; Zhao & Duncan, 2005).

Los hepatoblastos cercanos a la vena portal darán lugar a los colangiocitos y los que se localizan en el parénquima y no están en contacto con el mesénquima portal se diferencian a hepatocitos (Zong & Friedman, 2014). Factores secretados por las células hematopoyéticas del hígado como la oncostatina M (OSM) son clave para la diferenciación hacia hepatocitos ya que induce la maduración metabólica y promueve la polarización celular. La OSM en combinación con hormonas corticoides (por ejemplo, dexametasona) y el factor de crecimiento HGF promueven la maduración hepática (Shin et al., 2013) mediante una regulación compleja en la que juega un papel esencial el factor de transcripción HNF4 α . Este factor está implicado en la expresión de casi la mitad de los genes asociados a la polaridad hepática, la estabilidad de la adhesión celular y las funciones metabólicas específicas del hígado (Parviz et al., 2003). Con la diferenciación de los hepatoblastos, los cordones de hepatocitos se disponen formando lobulillos dentro del parénquima y los colangiocitos forman los ductos biliares. La maduración total del hepatocito llega a término en etapas posteriores al nacimiento, cuando las

células hepáticas desarrollan el nivel funcional necesario para llevar a cabo todas las actividades hepáticas (Beath, 2003).

1.5.2 Protocolos para la obtención de HLC.

Los protocolos para generar células hepáticas a partir de células pluripotentes tratan de recrear la organogénesis del hígado y nacieron con las ESC como células de partida, aunque posteriormente se aplicaron también a las iPSC. Se han propuesto numerosos protocolos para generar HLC derivadas de células pluripotentes cuyo proceso de diferenciación se divide fundamentalmente en tres etapas: diferenciación a endodermo definitivo (especificación), diferenciación a hepatoblasto (compromiso hepático) y diferenciación a hepatocito (maduración) (Saito et al., 2020).

Aunque algunos protocolos hacen uso de pequeñas moléculas o microRNA para la diferenciación de ESC/iPSC a HLC (Gao et al., 2020; Jaafarpour et al., 2019; Loh et al., 2019; Mathapati et al., 2016; Tasnim et al., 2015), el uso de factores de crecimiento con roles clave en el desarrollo del hígado es la estrategia que concede mayor eficiencia de diferenciación. Además, numerosos protocolos también incluyen hormonas, inhibidores de la apoptosis y otras moléculas con la finalidad de aumentar dicha eficiencia. La tabla 1.3 destaca diferentes estrategias para la diferenciación hepática de PSC y las características fenotípicas más destacadas de las HLC generadas.

Tabla 1.3. Protocolos de referencia para la generación de células hepáticas derivadas de células pluripotentes (HLC).

Ref.	Tipo de célula pluripotente	Método de reprogramación	Principales factores empleados en la diferenciación				Duración (días)	Características fenotípicas de las HLC
			Endodermo	Hepatoblasto	Hepatocito			
(Song et al., 2009)	Línea hESC-H1 e iPSC-3U1, -3U2 derivadas de fibroblastos.	Lentivirus	Activina A	bFGF BMP4 (especificación) ----- HGF KGF (FGF7) (expansión)	OSM Dexa	21	<ul style="list-style-type: none"> - Morfología poligonal - A1AT+, CYP3A4+. - Expresión génica de <i>ALB</i>, <i>CK18</i>, <i>AFP</i>, <i>CK19</i>, <i>A1AT</i>, <i>CYP3A4</i>. - Almacenamiento de glucógeno. - Síntesis y secreción de urea y albúmina detectada. - Actividad CYP450 detectada. 	
(Si-Tayeb, et al., 2010b)	Línea hESC-H9 e iPSC derivadas de la línea CRL2097 de fibroblastos humanos.	Lentivirus	Activina A	BMP4, bFGF	HGF	20	<ul style="list-style-type: none"> - Morfología poligonal. - ALB+, AFP+, HNF4-A+, FOXA2+. - Secreción de albúmina, síntesis de urea, acumulación de glucógeno, lípidos y LDL. - Expresión génica de marcadores hepáticos como <i>AFP</i> y <i>HNF4α</i>. - Expresión detectada genes que codifican enzimas de fase I y II. 	
(Touboul et al., 2010)	Línea hESC-H9 e iPSC procedentes de fibroblastos humanos.	Retrovirus	LY294002 ^a , Activina A, BMP4, bFGF	FGF10, RA, SB431542 ^b	FGF4, EGF, HGF	20	<ul style="list-style-type: none"> - Morfología poligonal. - ALB+, AFP+, HNF4-A+, A1AT+, CK18+. - Expresión génica de marcadores específicos como <i>AFP</i>, <i>HNF4α</i>, <i>HNF6</i>, <i>A1AT</i>, <i>F9</i>, <i>CK18</i>, <i>ALB</i> y de enzimas de detoxificación como <i>CYP3A7</i> y <i>CYP7A1</i> entre otros. - Actividad CYP3A5 y CYP3A7 detectada. 	
(Hannan et al., 2013)	5 líneas hESC (H9, Val9, FES22, -29 y hSF-6) y 20 líneas de iPSC derivadas de fibroblastos humanos.	-	Activin A WNT3A BMP4 bFGF ChIR LY294002 ^a	BMP4 FGF10	HGF OSM	30	<ul style="list-style-type: none"> - Morfología poligonal. - ALB+, HNF4-A+, A1AT+, CK18+. - Secreción de Albúmina y A1AT detectada. - Actividad CYP3A4 inducible. - Expresión génica: <i>AFP</i>, <i>ALB</i>, <i>A1AT</i>, <i>APOF</i>, <i>TAT</i>, <i>TDO2</i>, <i>TTR</i> y <i>CYP3A7</i>, <i>CYP3A4</i>. - Almacenamiento de glucógeno - Incorporación de LDL. - Incorporación de verde de indocianina. 	
(Choudhury et al., 2017)	iPSC derivadas de linfocitos inmortalizados de sangre periférica humana.	Vector episomal	Activina A WNT3A BMP4 bFGF	FGF1 bFGF FGF8	HGF Folistatina-288 ^c OSM	20	<ul style="list-style-type: none"> - Morfología poligonal. - ALB+. - Expresión génica de marcadores fetales (o de hepatoblasto) como <i>HNF4-α</i>, <i>AFP</i>, <i>CK18</i> y <i>CYP3A7</i>. - Baja expresión de genes de fenotipo hepático maduro como <i>ALB</i>, <i>A1AT</i>, <i>ASGPR</i>, <i>CYP1A2</i>, <i>CYP3A4</i>, <i>UGT1A1</i> y <i>UGT1A3</i>. - Producción de urea. 	
(Wang et al., 2017)	Líneas hESC-H9 y iPSC 33D6.	-	Activina A WNT3A	DMSO	HGF, OSM	15-18	<ul style="list-style-type: none"> - Morfología poligonal. - HNF4α⁺, E-CAD⁺. - Expresión génica de genes hepáticos como <i>HNF4α</i> y <i>ALB</i>. - Actividad CYP3A4 detectada. - Síntesis y secreción de albúmina. 	

^a Pequeña molécula que inhibe la pluripotencia y promueve la diferenciación a endodermo (Tasnim et al., 2015); ^b Inhibidor de TGFβ que promueve la maduración hepática (Tasnim et al., 2015); A1AT = alfa 1 antitripsina, Dexa= dexametasona; F9= factor IX de coagulación; APOF= apolipoproteína F; TAT= Tirosina aminotransferasa; TDO2= triptófano 2,3-dioxigenasa; TTR= transtiretina; LDL= lipoproteína de baja densidad; ASGPR= receptor de asialoglicoproteína.

Para conducir la diferenciación de las iPSC hacia el estadio de endodermo la mayoría de protocolos coinciden en el uso de altas concentraciones de activina A entre 3 y 5 días (Si-Tayeb et al., 2010b). Se ha demostrado que la presencia de activina A y bFGF combinados de forma transitoria durante 24 h aproximadamente con otros factores como WNT3A, o pequeñas moléculas que imitan el efecto señalizador de este ligando como CHIR99021 (Sineva & Pospelov, 2010) y BMP4 son importantes para reprimir la expresión génica ligada a la pluripotencia e incentivar la señalización de la activina A en su propósito de inducir la formación del DE en ESC (Loh et al., 2014). Siguiendo este esquema, se consigue inducir la expresión génica de genes implicados en la formación de la línea primitiva en las primeras 24-48 h para dar paso a la expresión de genes de perfil endodérmico como *SOX17* o *FOXA2* (Choudhury et al., 2017; Hannan et al., 2013; Touboul et al., 2010).

Tal y como se ha venido describiendo en los estudios sobre el desarrollo del hígado, la combinación de factores de la familia BMP y FGF permite que las células en estadio de DE puedan comprometerse con el destino hepático al inducir la expresión de marcadores hepáticos (Calmont et al., 2006; Rossi et al., 2001). En su mayoría, los protocolos de diferenciación de células pluripotentes a HLC, destacan la participación de BMP4 junto con FGF1, bFGF, FGF4 y/o FGF10 durante aproximadamente 5 días para conducir la diferenciación hacia el estadio de hepatoblasto (Choudhury et al., 2017; Hannan et al., 2013; Si-Tayeb et al., 2010b; Touboul et al., 2010) aunque el uso de DMSO, por su capacidad de modificar la acetilación de histonas, es también recurrente en la inducción hepática del DE (Hay et al., 2008a; Kajiwara et al., 2012).

Finalmente, la maduración hepática suele ser el último paso en el protocolo de diferenciación para obtener HLC. En general, el uso de medios específicos para el cultivo de hepatocitos, suplementados con factores, citoquinas y hormonas implicadas en la formación del hígado durante el desarrollo embrionario, es la elección más popular para inducir la maduración de los hepatoblastos. El factor HGF, implicado en la diferenciación hepática junto con la citoquina OSM y la hormona corticoide dexametasona, que inducen la maduración hepática promoviendo la expresión génica de los enzimas CYP450 y la síntesis de proteínas *in vitro* (Zhang et al., 2012), son clave en la diferenciación y maduración de los hepatoblastos. Su uso está ampliamente extendido

en la fase final del protocolo de diferenciación en el que se establece un rango general de 7 a 20 días de exposición a estas condiciones para obtener HLC (Hannan et al., 2013; Hay et al., 2008a).

En todos los protocolos para la generación de HLC se considera clave la monitorización de la expresión de marcadores específicos asociados a cada una de las etapas del proceso, con el objetivo de verificar que las células están siguiendo correctamente los diferentes estadios pautados. En la figura 1.8 se resume la combinación de marcadores más comunes que se analizan en cada una de las etapas de la diferenciación.

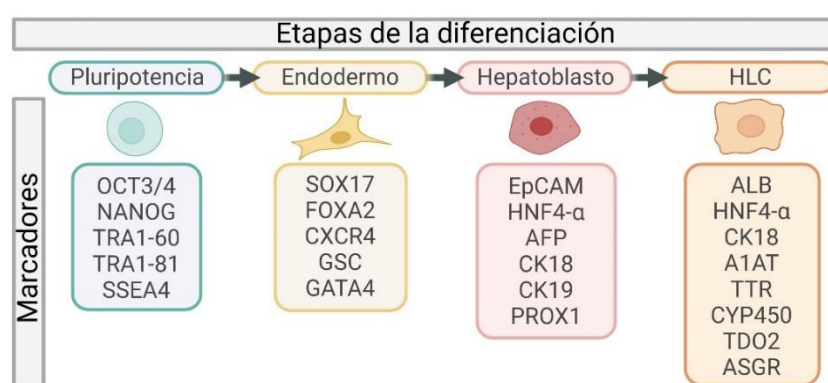


Figura 1.8. Principales marcadores asociados a cada fase del proceso de diferenciación de células pluripotentes a HLC.; Imagen generada con Biorender®.

Adicionalmente, tras la maduración hepática, es clave determinar el grado de funcionalidad hepática que poseen las HLC (Tabla 1.3). Algunos de estos ensayos funcionales incluyen la determinación de la síntesis y secreción de albúmina, la producción de urea, la determinación de actividades CYP450 basales (especialmente CYP3A4) y/o tras la inducción con compuestos inductores específicos y la capacidad de almacenar glucógeno, de incorporar lipoproteínas de baja densidad o de incorporar verde de indocianina (Li et al., 2019). Gracias a esta caracterización, se ha evidenciado que en la mayoría de los casos las HLC obtenidas expresan marcadores fetales (AFP, CYP3A7, CK19) y reflejan una baja expresión de marcadores de hepatocito maduro (ALB, alfa-1-antitripsina (A1AT) así como una actividad reducida de los CYP450 predominantes en el hígado adulto (CYP1A2, CYP3A4), no alcanzando a recapitular el estado de madurez del hepatocito primario (Tabla 1.3) (Baxter et al., 2015; Chen et al., 2012; Hannan et al., 2013; Hay et al., 2008a; Loh et al., 2019; Si-Tayeb et al., 2010b; Song et al., 2009;

Takayama et al., 2014). Entre las propuestas barajadas para mejorar el grado madurativo de las HLC, los cultivos 3D están siendo una elección prometedora ya que tratan de imitar la citoarquitectura hepática y favorecer las interacciones célula-célula y célula-ECM para potenciar la expresión de marcadores típicos de hepatocitos maduros (Wills & Rajagopalan, 2020; Xie et al., 2021). Los protocolos de generación de HLC siguen en constante optimización con el objetivo final de mimetizar el hepatocito adulto y alcanzar una estandarización metodológica. En esta optimización también se ha evaluado el grado de similitud entre ESC e iPSC como un factor vinculante a la variabilidad de la eficacia de diferenciación entre líneas de iPSC. En este sentido, es sabido que las iPSC retienen algunos rasgos epigenéticos de las células somáticas de origen, especialmente en patrones de metilación de DNA, que pueden favorecer la diferenciación al tipo celular de origen (Kim et al., 2010; Nishizawa et al., 2016; Ohi et al., 2011). No obstante, aunque se han correlacionado patrones de metilación con la eficiencia de diferenciación en las células pluripotentes (Bertero et al., 2015; Bock et al., 2011; Butcher et al., 2016), el patrón de metilación y la memoria epigenética no parecen explicar *per se* la variabilidad en la eficiencia de diferenciación de las iPSC (Kajiwara et al., 2012; Vanhove et al., 2016), de manera que han de tenerse en cuenta otros aspectos como el método de reprogramación, las condiciones de cultivo, el número de pases y sobre todo el *background* genético (Keller et al., 2018; Ohi et al., 2011). El estudio de la (epi)genética en las células pluripotentes promete esclarecer algunas de las incógnitas que hoy en día se plantean con respecto a la eficiencia de la diferenciación celular.

1.6. Técnicas analíticas avanzadas para el estudio del DILI.

El uso de compuestos hepatotóxicos conocidos en modelos celulares hepáticos puede ser una buena aproximación para entender los mecanismos implicados en la toxicidad. El desarrollo de esta estrategia viene de la mano del avance de técnicas analíticas con el objetivo de proporcionar cada vez más información acerca de los procesos biológicos relacionados con la hepatotoxicidad (Donato et al., 2013; Donato & Tolosa, 2019).

Tradicionalmente, los ensayos de hepatotoxicidad a tiempo final que miden uno o unos pocos indicadores de toxicidad como la función mitocondrial (ensayos con sales de tetrazolio tipo MTT o MTS), la integridad de la membrana celular (liberación de la lactato

deshidrogenasa), la pérdida de macromoléculas (depleción de ATP o GSH), los efectos antiproliferativos (inhibición de la síntesis de DNA/proteínas) o la apoptosis (activación de las caspasas) han sido de gran utilidad para determinar el potencial citotóxico de un compuesto, pero aportan poca información acerca de los procesos celulares subyacentes a la toxicidad (Dambach et al., 2005; Funk & Roth, 2017; Xu et al., 2004). Por ello, nuevas aproximaciones tecnológicas han sido aplicadas para estudiar los eventos desencadenados en la toxicidad hepática inducida por fármacos.

A este respecto, las ómicas permiten detectar cambios globales que abarcan desde la identificación de variantes genéticas (especialmente polimorfismos de un solo nucleótido o SNP) asociadas a una mayor susceptibilidad a sufrir DILI (toxicogenómica) (Andrade et al., 2009; Petros et al., 2017) hasta la detección de patrones diferenciales en la expresión de genes (toxicotranscriptómica) (Buck et al., 2008) y proteínas (toxicoproteómica) (George et al., 2010; Heijne et al., 2005) causadas por la exposición a fármacos, incluyendo la obtención perfiles metabólicos asociados a la toxicidad (toxicometabolómica) (García-Cañaveras et al., 2016). Con ello, las ómicas, son útiles para identificar cambios en las rutas de señalización (especialmente aquellas relacionadas con la apoptosis, necrosis e inflamación) (Joseph, 2017), fluctuaciones en la concentración de proteínas y metabolitos en las células, así como la presencia de modificaciones en proteínas causadas por fármacos (como puede ser la formación de aductos) (George et al., 2010) posibilitando el estudio mecanístico del DILI y el descubrimiento de nuevos biomarcadores pronóstico y diagnóstico (Jennen et al., 2015; Kohonen et al., 2017; Ma et al., 2019; Van Summeren et al., 2012; Xie et al., 2019). No obstante, las ómicas siguen teniendo ciertas limitaciones como la falta de estandarización de la metodología y el análisis, el coste económico que implica la infraestructura tecnológica necesaria y el reto que supone el manejo de la gran cantidad de datos obtenidos *in silico* (Dias & Koal, 2016; Rao et al., 2019).

Por otro lado, las técnicas de imagen también han evolucionado hacia aproximaciones que analizan cambios globales en las células. Lejos de ser meramente descriptivas, las técnicas de cribado de alto contenido o *high content screening* (HCS) combinan la microscopía multiparamétrica con la cuantificación a gran escala de parámetros morfológicos (tamaño nuclear, celular, tamaño de orgánulos, etc.) y celulares (potencial

de membrana mitocondrial, estrés oxidativo, apoptosis, localización de proteínas, almacenamiento de ácidos grasos etc.) gracias al uso de sondas fluorescentes específicas (Pegoraro & Misteli, 2017). La técnica de HCS combina las propiedades de las técnicas de imagen y de fluorescencia con el análisis cuantitativo célula a célula que proporciona la citometría de flujo, todo ello en un formato multipocillo que permite analizar una gran cantidad de condiciones dentro de una misma adquisición automatizada. La ventaja del análisis en placa multipocillo frente a la suspensión celular necesaria en citometría de flujo es la posibilidad de analizar estructuras subcelulares y de preservar las condiciones de cultivo de células adherentes (Tolosa et al., 2015a).

En el ámbito de la hepatotoxicidad, la tecnología de HCS aporta mayor sensibilidad y mejora la capacidad predictiva de la toxicidad inducida por fármacos en estudios *in vitro* en comparación a los estudios clásicos en los que se analiza un único parámetro de toxicidad (Bickle, 2010). En este sentido, gracias a su carácter multiparamétrico, los ensayos HCS permiten analizar parámetros indicativos de efectos citotóxicos pre-letales (morfología celular, integridad de la membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, niveles de ROS y de Ca^{2+} intracelular, acumulación de lípidos neutros y fosfolípidos, acumulación de AB etc.) tras la exposición a dosis sub-citotóxicas de fármacos, pudiendo identificar y estudiar los mecanismos implicados en el desarrollo del DILI que preceden a la muerte celular. Esta información es de gran utilidad durante las fases preclínicas en el descubrimiento de fármacos y es de gran relevancia clínica ya que permite estudiar la respuesta celular a los fármacos utilizando dosis comparables a las alcanzadas en plasma o en el tejido hepático tras la administración terapéutica (Bickle, 2010; Donato et al., 2017; Donato & Tolosa, 2021; Li & Xia, 2019; Mandavilli et al., 2018; Tolosa et al., 2012).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La toxicidad idiosincrática es muy dependiente de factores propios de paciente, por lo que se presenta únicamente en un grupo reducido de individuos susceptibles a un determinado fármaco. Debido a su impredecibilidad y gravedad, el conocimiento en detalle de estos episodios hepatotóxicos permitiría anticipar estos fenómenos, así como identificar pacientes potencialmente vulnerables y desarrollar fármacos más seguros. Los modelos *in vivo* e *in vitro* de uso habitual en ensayos de hepatotoxicidad son incapaces de reproducir las características de individuos concretos y, por tanto, no son adecuados para su aplicación al estudio del iDILI. La aproximación ideal sería el uso de los hepatocitos del paciente, aunque por razones éticas y clínicas, esto es prácticamente imposible. Sin embargo, la obtención de células de manera menos invasiva y su diferenciación a fenotipo hepático permitiría disponer de un modelo *in vitro* que reflejara el comportamiento de los hepatocitos de un determinado paciente.

Estudios previos han propuesto las células con fenotipo hepático o HLC derivadas de ESC y líneas de células madre pluripotentes iPSC como un modelo celular para el estudio de diversas patologías hepáticas, incluyendo su uso para estudios de toxicidad. En base a estos antecedentes, hipotetizamos que la generación de líneas de iPSC a partir de células somáticas de individuos control y pacientes con sospecha de iDILI y su diferenciación posterior a HLC permitiría disponer de un modelo celular personalizado que recapitule las características genéticas de cada individuo. Pretendemos usar este modelo personalizado para reproducir en las HLC de pacientes con iDILI el episodio de hepatotoxicidad desencadenado por el fármaco (o fármacos) sospechoso e investigar su mecanismo para entender el fenómeno de la hepatotoxicidad idiosincrática. Además, el modelo desarrollado podría ser usado como modelo preclínico para estudiar la hepatotoxicidad inducida por fármacos *in vitro*.

Por ello, el objetivo principal de esta tesis es obtención de un modelo celular hepático derivado de iPSC con aplicación al cribado preclínico de fármacos hepatotóxicos y al estudio de los mecanismos moleculares implicados en iDILI. En base a ello, los objetivos específicos propuestos son:

1. **Generar una librería de líneas de iPSC que reflejen la variabilidad poblacional mediante procedimientos poco invasivos.**

2. **Desarrollar un modelo celular que mimetice *in vitro* el fenotipo hepático de los donantes de origen, incluyendo pacientes que hayan sufrido iDILI.** Se caracterizarán los distintos estadios del proceso de diferenciación para comprobar que las células siguen una diferenciación guiada hacia fenotipo hepático. Se caracterizarán las HLC mediante pruebas funcionales hepáticas y análisis de la expresión para verificar su fenotipo hepático.

3. **Valorar la idoneidad de las HLC como modelo celular para los estudios *in vitro* de hepatotoxicidad, especialmente la hepatotoxicidad de carácter idiosincrásico.** Para ello, las HLC se tratarán con compuestos modelo hepatotóxicos y se estudiarán mediante ensayos multiparamétricos los procesos celulares implicados en la toxicidad. Asimismo, se analizará el comportamiento de las HLC procedentes del paciente con sospecha de iDILI tras la exposición al fármaco sospechoso a fin de estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a la toxicidad.

3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

Salvo que se indique lo contrario, los medios y los suplementos para el cultivo celular utilizados en este estudio se adquirieron de Gibco®, el material de cultivo se obtuvo de Thermo Fisher Scientific Inc., las citoquinas y factores de crecimiento fueron obtenidos de Peprotech®, y el resto de materiales, reactivos y compuestos fueron obtenidos de Merck.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia (IF) para la detección de proteínas en las distintas fases del proceso de diferenciación se recogen en la tabla 3.1. De igual modo, los cebadores utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para la detección de la expresión génica de marcadores implicados en los diferentes estadios de la diferenciación, así como en la caracterización de las HLC se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.1. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Estadio	Marcaje	Casa comercial	Referencia	Dilución
Primarios					
Oct3/4	P	N	Santa Cruz Biotechnology	sc-5279	1:200
Nanog	P	N	R&D systems	AF1997	1:100
TRA-1-60	P	M	Thermo Scientific	41-1000	1:200
FoxA2/HNF3β	E	N	Cell Signaling	D56D6	1:200
SOX17	E	N	R&D Systems	AF1924	1:200
EpCAM	HB	M	Santa Cruz Biotechnology	sc-66020	1:200
CK18	HLC	C	Dako	M7010	1:200
CK19	HB	C	Dako	M0888	1:200
HNF4α	HB, HLC	N	Cell Signaling	3113S	1:100
A1AT	HLC	C	Cell Marque	223A-15	1:200
AFP	HLC	C	Cell Marque	203A-15	1:200
ALB	HLC	C	Bethyl	A80-229A	1:200
Secundarios					
Alexa Fluor 488 Donkey-α-Mouse			Thermo Scientific	A21202	1:200
Alexa Fluor 488 Donkey-α-Goat			Thermo Scientific	A11055	1:200
Alexa Fluor 594 Donkey-α-Goat			Thermo Scientific	A11058	1:200
Alexa Fluor 488 Donkey-α-Rabbit			Thermo Scientific	A21206	1:200
Alexa Fluor 594 Donkey-α-Rabbit			Thermo Scientific	A21207	1:200
Alexa Fluor 594 Donkey-α-Goat			Thermo Scientific	A11058	1:200

P: pluripotencia; E: endodermo; HB: hepatoblasto; HLC: *hepatocyte-like cell*; N: nuclear; M: membrana; C: citoplasmático.

Tabla 3.2. Secuencia de los cebadores para las cuantificaciones de mRNA por qPCR.

Gen	Estadio	Secuencia forward (5'→3')	Secuencia reverse (5'→3')
PBGD	-	CGG AAG AAA ACA GCC CAA AGA	TGA AGC CAG GAG GAA GCA CAG T
β-Actina	-	CGT ACC ACT GGC ATC GTG AT	GTG TTG GCG TAC AGG TCT TTG
TBP	-	AAA ATG GTG TGC ACA GGA GCC	CAC ATC ACA GCT CCC CAC CAT
NANOG	P	TGA TGC CCA TCC AGT CAA TC	AAT ATT AGC CGG GCG AGG TG
OCT3/4	P	AGT TTG TGC CAG GGT TTT TG	ACT TCA CCT TCC CTC CAA CC
DNMT3B	P	AAG TCG AAG GTG CGT CGT G	GCA ATT TGT CTT GAG GCG CT
SOX2	P	GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG	TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG
h-HEX	E	CGG ACG GTG AAC GAC TAC A	TTT GAC CTG TCT CTC GCT GA
GATA4	E	CTA GAC CGT GGG TTT TGC AT	TGG GTT AAG TGC CCC TGT AG
CXCR4	E	ATT TTC TGA CAC TCC CGC CCA A	TGA GCC CAT TTC CTC GGT GTA G
FOXA2	E	GTA TGC TGG GAG CGG TGA AGA T	TTC ATG TTG CTC ACG GAG GAG T
SOX17	E	AGA AAA GCA TTC TGG AAT GAG CC	TGG GGG CAG GTC AAG CTT AT
EpCAM	HB	AAT CGT CAA TGC CAG TGT ACT T	TCT CAT CGC AGT CAG GAT CAT AA
CK19	HB	TCC AGA TGA GCA GGT CCG AGG TTA	GCT GCG GTA GGT GGC AAT CTC C
HNF4α	HB, HLC	GCC TAC CTC AAA GCC ATC AT	GAC CCT CCC AGC AGC ATC TC
AFP	HLC	GCG AGG GAG CGG CTG ACA TT	TGT TTG CAG CGC TAC ACC CTG A
ALB	HLC	TGA GAA AAC GCC AGT AAG TGA C	TGC GAA ATC ATC CAT AAC AGC
CK18	HLC	CCC GTC ACG CCC TAC AGA T	ACC ACT TTG CCA TCC ACT ATC C
CYP1A2	HLC	ATC CCC AAG AAA TGC TGT GT	GCC AGG ACT TCC CCG ATA CA
CYP2C19	HLC	ACG GAT TTG TGT GGG AGA GGG	GTG AAA TTT GGA CCA GA
CYP2E1	HLC	AAG CAA CCC GAG ACA CCA TT	GAA ACA ACT CCA TGC GAG CC
CYP2C9	HLC	TCA AGA TTT TGA GCA GCC CC	AGT CAA CTG CAG TGT TTT CCA AG
CYP2D6	HLC	AAG TAC AGG GCT TCC GCA TCC	GGG CTC ACC AGG AAA GCA A
GSTA1	HLC	CCT GAG GAA AAA GAT GCC AA	GAC TGG AGT CAA GCT CCT CG
GPX2	HLC	TCG CTC TGA GGC ACA ACC AC	ATG CTC GTT CTG CCC ATT CA
ApoB	HLC	TGG GAA GGA AAA GCG CAC CTC A	TCC TCA TCA GAT TCC CGG ACC CT
ApoC3	HLC	GTT ACA TGA AGC ACG CCA CC	CTC GCA GGA TGG ATA GGC AG
MRP2	HLC	TCA GAC GAC CAT CCA AAA CGA	GGG TCC AGG GAT TTG TAG CAG
NTCP	HLC	TGC CAA AAT GTC CAA CTC T	GTT GTG GCA GCT GTG TAG AT
BSEP	HLC	GGG CTC CAT TTC AGC TAT GT	ACT TGC GAG TCA GGT CGA G
BAAT	HLC	AGA GGG TCT CTT CCC AGG GGT	ACT ACC CCA ACG CCT GAG CCA
OTC	HLC	GCT GAT TAC CTC ACG CTC CA	TGG TTA CAC TAG CAT CCG GC
G6Pc	HLC	AGA ACC TGG GCA CGC TCT TT	GGC GAG GCA GTA GGG GAT GA
PPARα	HLC	TGC CTT TCT GTC GGG ATG TCA	GAC CTC CGC CTC CTT GTT CTG
FGF19	HLC	CGC GCA CAG TTT GCT GGA	CGG TGC TTC TCG GAT CGG TA
CYP7A1	HLC	ATC GCT GAG GCT TTC CAG TG	TTA AAA GTC AAA GGG TCT GGG TAG A
CYP8B1	HLC	TGG ACC CTG ACA CAC CAC TA	GGC CAA GCT CAC TCT GTA GG
CYP27A1	HLC	ATG GCT GGA GTG GAC ACG AC	ACC ACA GGG TAG AGA CGC AG
TXNRD1	HLC	GGT GCT TGT GGC CTT TCT GA	GGA CCC AGT ACG TGA AAG CC
AKR1B10	HLC	AGT GAT GAG GAG ATG GCA ACC	AAA TGG GAC ATG AGT GGA GGT
GSR	HLC	ACA GTG GGA CTC ACG GAA GA	GTA GGG TGA ATG GCG ACT GT
SLC7A11	HLC	ATG GGA CAA GAA ACC CAG GTG	TCC CTA TTT TGT GTC TCC CCT TG
GPX1	HLC	ACC ACA GGG TAG AGA CGC AG	TCT TGG CGT TCT CCT GAT GC
GPX2	HLC	TCG CTC TGA GGC ACA ACC AC	ATG CTC GTT CTG CCC ATT CA
GCLC	HLC	GGT GCT TGT GGC CTT TCT GA	GGA CCC AGT ACG TGA AAG CC
GCLM	HLC	AAT CTT GCC TCC TGC TGT GTG	ACT CGT GCG CTT GAA TGT CAG

P, pluripotencia; E, endodermo; HB, hepatoblasto; HLC, *hepatocyte-like cell*.

3.2. Obtención de muestras de donantes.

Las muestras (de sangre y en algunos casos también de tejido hepático) de 4 donantes control y 1 donante con sospecha de DILI (diagnosticado de acuerdo a los criterios internacionales de la *EASL*, 2019) fueron proporcionadas por la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital Universitario La Fe de Valencia, la Unidad de Investigación Clínica y de productos con Actividad Biológica (UICAB) del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe) de Valencia y la Unidad Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia. Previamente todos los donantes habían firmado un consentimiento informado por escrito. El estudio fue aprobado con el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (número de registro 2016/0226).

Los donantes control (donantes C1 a C4) presentaban patologías hepáticas no relacionadas con DILI que requerían una resección de tejido hepático mediante intervención quirúrgica, lo que permitió disponer, además de la muestra de sangre, de una pequeña muestra de tejido hepático que se utilizó para la obtención de microsomas (ver apartado 3.8). En cuanto al donante P1, presentaba sospecha de DILI con patrón colestásico tras la exposición a la combinación de fármacos Amoxicilina/Clavulánico y únicamente se obtuvo muestra de sangre. En la tabla 3.3 se detallan los datos de los donantes y la información clínica relacionada con la funcionalidad hepática de relevancia para el estudio.

Tabla 3.3. Características clínicas de los donantes seleccionados.

Donante	C1	C2	C3	C4	P1
Edad (años)	76	67	60	58	78
Sexo	M	H	M	H	H
Patología	Metástasis hepática (CCR ^a)	Colangiocarcinoma	Metástasis hepática (GIST ^b)	Metástasis hepática (CCR ^a)	DILI
Enfermedad hepática previa	No	Hepatitis VHB	No	No	No
Quimioterapia (neoadyuvante)	Xelox	No	Imatinib	Xelox	No
Consumo de tabaco	No	No (extabaquismo hace >4 años)	No	No	No
Consumo alcohol	No	Sí	No	No	No
Bilirrubina total (mg/dL)	Normal	Normal	Normal	Normal	Elevada (6,3)
AST (UI/L)	16	40	42	26	53
ALT (UI/L)	8	37	55	26	40
GGT (UI/L)	45	57	63	20	135
ALP (UI/L)	85	71	82	106	231
IQ% ^b	69	100	100	97	100
INR ^c	1,27	1	1	1,02	1
Fármacos adicionales	Olmersartan, Amlodipino	Zyloric Twynsta (Telmisartán/ Amlodipino)	Bisoprolol Ranitidina	No	Amoxicilina-clavulánico ibuprofeno

^aCCR: carcinoma colorrectal; ^b GIST: tumor del estroma gastrointestinal; ^b índice de Quick; ^c índice internacional normalizado.

3.3. Generación de iPSC.

3.3.1. Aislamiento de PBMC.

Las muestras de sangre fueron obtenidas en tubos de extracción con EDTA dipotásico (BD Vacutainer®). La sangre diluida con tampón salino fosfato Dubecco (DPBS, del inglés *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) 1X 1:1 (vol:vol) se introdujo en tubos de 50 ml tipo SepMate™ (StemCell Technologies) en los que previamente se había añadido 15 ml de Histopaque®-1077. Las distintas fases de la sangre se separaron en gradiente de densidad por centrifugación a 1200 x g durante 10 min (Figura 3.1). El anillo de PBMC se transfirió a un tubo nuevo y las células se lavaron tres veces con tampón de lavado (5% de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) en DPBS-EDTA 2 mM) seguido de una centrifugación a 300 x g, 10 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en medio de cultivo StemPro™-34 SFM completo y las PBMC se contabilizaron mediante contador automático (TC10™, Bio-Rad) haciendo una dilución previa 1:1 (vol:vol) con

azul tripán para determinar la viabilidad celular. Las células no utilizadas en fresco para la reprogramación celular fueron criopreservadas hasta su uso (ver apartado 3.3.7).

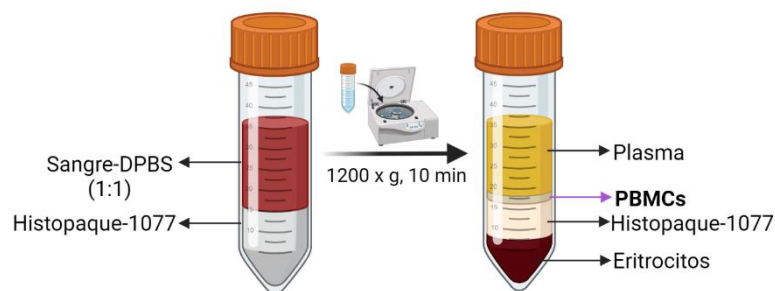


Figura 3.1. Aislamiento de PBMC mediante gradiente de densidad obtenido por centrifugación con Histopaque-1077. Tras la centrifugación la sangre queda separada en cuatro fases: plasma, PBMC, Histopaque-1077 y eritrocitos. Imagen creada con BioRender®.

3.3.2. Generación de iPSC derivadas de PBMC.

La reprogramación de las PBMC recién aisladas o criopreservadas se llevó a cabo mediante el kit de reprogramación Cytotune™-iPS 2.0 Sendai Reprograming kit (ThermoFisher Scientific) tal y como se esquematiza en la Figura 3.2.

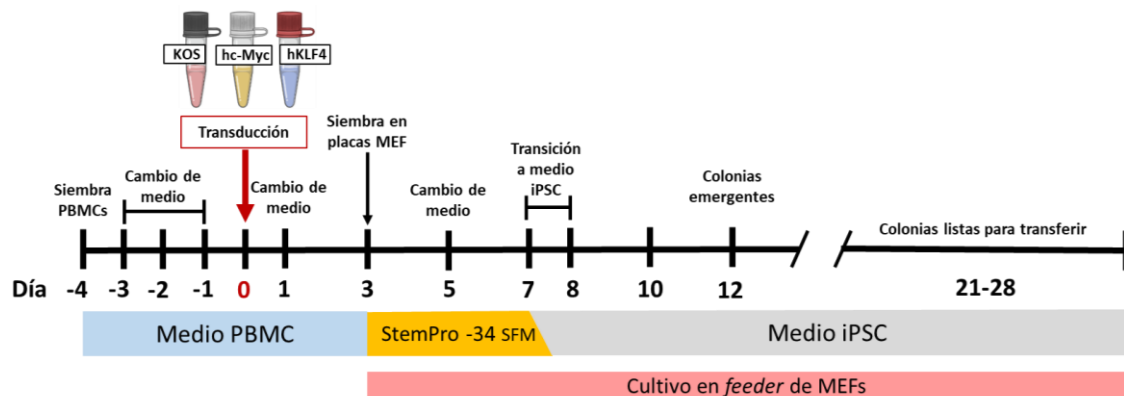


Figura 3.2. Esquema del proceso de reprogramación de PBMC mediante el kit de reprogramación Cytotune™-iPS 2.0 Sendai Reprograming kit. Imagen creada con BioRender®.

Día -4 a -1: siguiendo las instrucciones del fabricante, 5×10^5 PBMC vivas/pocillo se cultivaron en placa de cultivo celular de 24 pocillos en 1ml/pocillo de medio PBMC (Tabla 3.4) durante 4 días a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ (Figura 3.3). Cada día se recogió la mitad del volumen de cada pocillo (500 µl/pocillo), se centrifugó a 200 x g, 10 min y, tras retirar el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 500 µl de medio fresco. Dicho volumen se añadió de nuevo al pocillo correspondiente de la placa de cultivo como cambio de medio.

Tabla 3.4. Medios de cultivo y complementos utilizados en la reprogramación de PBMC.

Medio PBMC	
Componente	Concentración de uso
StemPro™ -34 SFM	-
StemPro®-34 Nutrient Supplement	1,3 ml/ml StemPro™ -34 SFM
L-Glutamina	2 mM
Penicilina-Estreptomicina	1X
SCF (Peprotech)	100 ng/mL
FLT3 (Peprotech)	100 ng/mL
IL3 (Peprotech)	20 ng/mL
IL6 (Peprotech)	20 ng/mL

Medio MEF	
Componente	Concentración de uso
DMEM alto en glucosa	-
SBF (LINU-8460)	10%
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	1X
β-mercaptoetanol	55 μM
Penicilina-Estreptomicina	1X

Medio iPSC	
Componente	Concentración de uso
KnockOut™ DMEM/F-12	-
KnockOut™ Serum Replacement – KSR	20%
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	1X
GlutaMAX™-100X	1X
β-mercaptoethanol	50 μM
Penicilina-Estreptomicina	1X
bFGF (Peprotech) <i>*Añadir en el momento de uso</i>	4 ng/ml

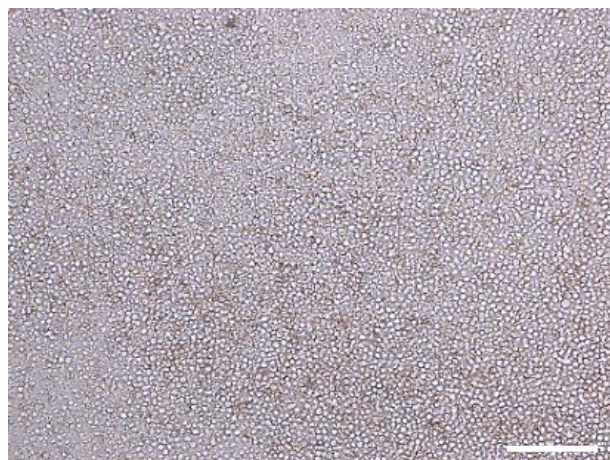


Figura 3.3. Imagen de contraste de fases de PBMC en cultivo a día -2 del proceso de reprogramación. Barra de escala = 100 μm.

Día 0: para llevar a cabo la infección, se realizó el conteo automatizado de las PBMC haciendo una dilución previa 1:1 (vol:vol) con azul tripán. A continuación, se separaron fracciones de $2,5 \times 10^5$ PBMC vivas en tubos limpios y se centrifugaron a $200 \times g$, 10 min. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 300 μ l del cóctel de SeV portadores de los transgenes de reprogramación h-KOS (Klf4-Oct3/4-Sox2), hc-Myc y h-Klf4 con un MOI 5:5:3 respectivamente, en medio PBMC y Polibrene 4 μ g/mL. Las suspensiones celulares se sembraron en placa de 24 pocillos y se incubaron durante 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Día 1: tras 24 h de cultivo, las células se recogieron en tubos y se centrifugaron a $200 \times g$, 10 min. El sobrenadante se descartó (descarte de virus) y el pellet se resuspendió en medio PBMC. La suspensión celular se sembró de nuevo en placa de 24 pocillos y se mantuvo a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 48 h. En paralelo a la siembra de las PBMC, se prepararon placas de cultivo de 6 pocillos gelatinizadas con un *feeder* de fibroblastos murinos embrionarios (MEF) mitóticamente inactivados por radiación. Las placas se gelatinizaron con solución de gelatina 0,1% y se incubaron 30 min a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Los MEF criopreservados (A24903, Gibco) se descongelaron en baño a 37°C. La suspensión se transfirió a un tubo limpio en el que previamente se añadieron 5 ml de medio de cultivo MEF (Tabla 3.4) precalentado a 37°C en baño y se centrifugó a $200 \times g$, 5 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en medio MEF para su conteo automatizado en dilución 1:1 (vol:vol) con azul tripán. Se retiró la gelatina de las placas de cultivo y se sembraron $2,5 \times 10^5$ células MEF vivas por pocillo en 1 ml de medio.

Día 3: Las PBMC infectadas se recogieron en tubos independientes y los pocillos se lavaron con 500 μ l de medio StemPro™ -34 SFM completo sin citoquinas, obteniendo así un volumen final de 1 ml/tubo. Se realizó el conteo celular automatizado en dilución 1:1 (vol:vol) con azul tripán y se sembraron distintas densidades celulares ($1, 2, 3, 4$ y 5×10^4 células vivas) en 2 ml de medio StemPro™ -34 SFM completo sin citoquinas por pocillo en las placas de 6 pocillos con MEF (a los que retiramos el medio MEF inmediatamente antes de la siembra de las PBMC). Las células se incubaron durante 3 días a 37°C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Se realizó un cambio de la mitad del medio a día 5 con medio StemPro™ -34 SFM completo sin citoquinas centrifugando

el medio retirado (1 ml retirado/pocillo en tubos individuales) a 200 x g, 10 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1 ml de medio StemPro™ -34 SFM completo sin citoquinas. La suspensión se devolvió al pocillo de origen, completando así los 2 ml totales/pocillo.

Día 7: Se llevó a cabo la transición a medio de cultivo iPSC. Para ello se retiró 1 ml medio/pocillo y se añadió 1 ml de medio iPSC (Tabla 3.4). Las placas se incubaron 24 h a 37°C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Tras 24 h, a **día 8**, se completó la transición a medio iPSC retirando todo el volumen de los pocillos y sustituyéndolo por 2 ml de medio iPSC por pocillo. Las células se volvieron a incubar a 37°C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂. A partir de este punto, el medio se cambió diariamente con medio iPSC observando cada día el cultivo al microscopio de contraste de fases en busca de pequeños agregados celulares indicativos de colonias nacientes de iPSC. Las colonias empezaron a formarse a partir del día 12 y cuando tuvieron el tamaño adecuado fueron transferidas a placas de cultivo con matriz *feeder-free* de Matrigel® hESC-Qualified Matrix (Corning). El cultivo sobre MEF se mantuvo hasta 28 días tras la transducción vírica.

3.3.3. Preparación de placas con matriz *feeder-free* de Matrigel®.

Las placas de cultivo se recubrieron con una matriz de Matrigel® siguiendo las instrucciones del fabricante. El Matrigel® se descongeló en hielo y en nevera durante toda la noche y se alícuotó según el factor de dilución indicado para cada lote. Las alícuotas se almacenaron a -20 °C.

Para llevar a cabo el recubrimiento, las alícuotas necesarias se descongelaron en hielo y en nevera durante toda la noche. Una vez descongelado, el Matrigel® se diluyó con medio DMEM frío, siguiendo el factor de dilución y se repartió entre los pocillos de las placas de cultivo. Después, las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 30 min para promover la gelificación de la matriz. Si las placas no iban a ser usadas en el momento, se guardaron selladas con Parafilm (Bemis™) a 4 °C hasta dos semanas. En el momento de uso, el volumen de Matrigel® que quedaba en el pocillo se retiró inmediatamente antes de añadir el medio de cultivo de elección, evitando que la matriz se seque.

3.3.4. Adaptación de iPSC a placas con matriz feeder-free de Matrigel®.

Las colonias de iPSC obtenidas tras la reprogramación fueron transferidas a placas de cultivo con un recubrimiento *feeder-free* de Matrigel®. Para ello, la colonia lista para transferir se localizó con lupa en condiciones de esterilidad (cabina de esterilidad con superficie calefactora y lupa Olympus SZX7 integrada). Con una punta de 100 µl acoplada a una micropipeta de 100 µl, y visualizando la colonia con la lupa, se levantaron de forma mecánica los bordes de la colonia al tiempo que se aspiraban los agregados de iPSC que empezaban a desprenderse (secciones de la misma colonia). La suspensión aspirada se transfirió a una placa de cultivo con un recubrimiento *feeder-free* de Matrigel® en la que se había añadido medio de cultivo mTeSR PLUS™ completo (StemCell Technologies) suplementado con 10 µM del inhibidor de ROCK Y-27632 (StemCell Technologies). Una vez transferidas todas las colonias, se cambió el medio de las placas con el *feeder* de MEF con medio iPSC fresco. Tras 48 h, se realizó el cambio de medio de las colonias transferidas con medio de cultivo mTeSR PLUS™ completo. El medio se cambió cada dos días hasta que el cultivo llegó a la confluencia adecuada para su pase. Cada colonia transferida se consideró como un clon de manera que para un mismo donante se obtuvieron tantos clones como colonias transferidas.

3.3.5. Cultivo de mantenimiento y expansión de iPSC.

El cultivo de iPSC se realizó en paralelo con la línea embrionaria VAL9 (Banco Nacional de Líneas Celulares, RRID:CVCL_9968) la cual se utilizó como control de pluripotencia. Las colonias de células pluripotentes se dejaron crecer hasta llegar al 70% de confluencia aproximadamente antes de realizar el pase tolerando un porcentaje de diferenciación espontánea de hasta el 20%. Las colonias con diferenciación espontánea fueron levantadas mecánicamente para ser eliminadas posteriormente al retirar el medio.

Para el pase de iPSC, se retiró el medio mTeSR PLUS™ completo y se lavaron los pocillos con DPBS 1X precalentado a 37°C. Tras retirar el DPBS, se añadió 1U/ml de dispasa en DMEM/F-12 (StemCell Technologies) precalentada a 37°C. Las placas de cultivo con dispasa se incubaron entre 5 y 7 min a 37°C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ hasta observar en lupa el levantamiento de los bordes de las colonias (bordes brillantes). Entonces, el medio con dispasa se retiró y la monocapa se lavó dos veces con medio mTeSR PLUS™ completo, dejando al final la monocapa en medio mTeSR PLUS™

completo. Las colonias se disgregaron en pequeñas agrupaciones de células de forma mecánica mediante una punta de pipeta de 200 µl, dibujando una rejilla en toda la monocapa. El medio con la suspensión de agregados de células pluripotentes se recogió y se centrifugó a 1000 x g, 5 min. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió con medio mTeSR PLUS™ completo y se homogeneizó suavemente (evitando disgregar en exceso los agregados de iPSC) para, finalmente, sembrar los pequeños agregados de células pluripotentes en nuevos pocillos con Matrigel®. Cada agregado adherido a la matriz dio lugar a la formación de una nueva colonia.

Para realizar un pase de mantenimiento se utilizó una placa de cultivo de 3,5 cm² al 70% de confluencia para sembrar una placa de 6 pocillos (ratio 1:6) con 1,5 ml de medio mTeSR PLUS™ completo/pocillo. Los cambios de medio se realizaron cada dos días con 1,5 ml de medio mTeSR PLUS™ completo/pocillo a excepción del viernes donde el cambio de medio se realizó con 2 ml evitando el cambio de medio durante el fin de semana.

3.3.6. Test de micoplasma.

De forma periódica se descartó la contaminación por micoplasma mediante la aplicación de un test basado en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Para ello se tomaron muestras del medio de cultivo de las células en mantenimiento incubado al menos 24 h y se conservaron a -20 °C hasta su uso. Tras su descongelación en hielo (junto con un control positivo almacenado con anterioridad), todas las muestras se centrifugaron a 16000 x g, 5 min. Se separaron 100 µl de sobrenadante de cada muestra, se calentaron a 100 °C en baño termostático y se dejaron enfriar en hielo 1 min. Las muestras se volvieron a centrifugar a 16000 x g, 5 s y los 100 µl se trasvasaron a tubos tipo Eppendorf® a los que previamente se había añadido 10 µl de resina StrataClean (Agilent). El contenido resultante de cada tubo se mezcló con un agitador y se incubó 1 min a temperatura ambiente. De nuevo, las muestras se centrifugaron a 16000 x g, 5 s (observando la formación de un pellet blanquecino) y se trasvasaron 10 µl del sobrenadante a un Eppendorf® al que previamente se había añadido 90 µl de agua destilada estéril. La dilución 1/10 obtenida se utilizó para la detección de DNA de micoplasma mediante qPCR.

Cada reacción de PCR consistió en 3 μ l de la dilución 1/10 de la muestra en 3 mM de $MgCl_2$, 0,3 mM de primer *forward* (YGC CTG VGT AGT AYR YWC GC, donde Y es C o T; V es A, C o G; R es A o G y W es A o T) y *reverse* (GCG GTG TGT ACA ARM CCC GA) y el mix FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) incorporado según las instrucciones del fabricante. El anidamiento y la extensión se llevaron a cabo a 55 °C y 26 s, respectivamente. Los resultados se compararon con el control positivo añadido para determinar si las muestras analizadas presentaban contaminación por micoplasma.

3.3.7. Criopreservación de células.

La criopreservación de PBMC se llevó a cabo resuspendiendo el pellet de células obtenido tras el aislamiento en medio de cultivo StemPro™ -34 SFM con 30% SBF y 10% DMSO para obtener una densidad de entre 1 y 1,5 x 10⁶ células vivas/ml. Se añadieron 2 ml por criotubo (Greiner) y los criotubos se almacenaron a -80°C durante toda la noche en un contenedor de criotubos CoolCell®LX (Corning) el cual permite controlar la bajada de temperatura -1°C/min. Transcurrido el tiempo de congelación, los crioviales se almacenaron en nitrógeno líquido a -196°C.

En cuanto a la criopreservación de las iPSC, se tomó la referencia de un pocillo de placa de 6 pocillos (o una placa de 3,5 cm²) al 70% de confluencia como densidad celular adecuada para criopreservar por criotubo. De esta forma, la monocapa de cada pocillo se levantó con dispa del mismo modo que se realizaría para llevar a cabo el pase de células (ver apartado 3.3.5). El pellet resultante se resuspendió en medio KnockOut™ DMEM/F-12 con 30% del sustitutivo del suero KnockOut™ (KSR, del inglés *knockout serum replacement*) y 10% DMSO y se criopreservó siguiendo el protocolo descrito anteriormente para las PBMC.

3.4. Caracterización de iPSC.

3.4.1. Inmunofluorescencia.

Los cultivos de células pluripotentes (iPSC y ESC) se fijaron en 4% de paraformaldehído durante 20 min a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados de la monocapa con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) 1X. Para el marcaje intracelular (nuclear o citoplasmático), se realizó una permeabilización de la membrana

con 0,5% de Triton X-100 en PBS 1X durante 20 min y se realizó el bloqueo en 3% de BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Para el marcaje de proteínas de membrana se realizó directamente el bloqueo en 3% de BSA durante 1 h a temperatura ambiente, excluyendo el paso de permeabilización. Tras el bloqueo, cada pocillo se incubó toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios para la detección de proteínas implicadas en la fase de pluripotencia diluidos en PBS-BSA 1% (Tabla 3.1). Al día siguiente y tras 3 lavados con PBS 1X, se incorporaron los anticuerpos secundarios diluidos en PBS-BSA 1% (Tabla 3.1) y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 1h. Los núcleos celulares fueron teñidos después con la sonda Hoechst 33342 (1 µg/ml en PBS-BSA 1%) durante 5 min y finalmente, las monocapas se lavaron dos veces en Tween 0,1% - PBS-BSA 1%. Tras el último lavado, los pocillos se conservaron en PBS 1X a 4 °C en oscuridad hasta la realización de las fotografías. Las imágenes se capturaron con el microscopio invertido de fluorescencia Leica DMI 4000 B y se procesaron en el software ImageJ.

3.4.2. Extracción y purificación de RNA.

Para preparar las muestras para la extracción de RNA, se levantó la monocapa de células del mismo modo que en un pase celular. El pellet de células obtenido se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C hasta el momento de la extracción.

La purificación del RNA total se llevó a cabo mediante el kit de purificación RNeasy Mini Kit (Qiagen). Se añadieron 350 µl de tampón de lisis (RLT, del inglés *RNeasy Lysis Buffer*) con 3,5 µl de β-mercaptoetanol 14,3M a cada pellet y se homogeneizó con pipeta. Para asegurar la lisis total de las células, la suspensión se hizo pasar 5 veces por una jeringuilla de insulina. A continuación, se añadieron 350 µl de etanol 70% al lisado, se homogeneizó con pipeta, se transfirió a la columna de purificación acoplada al tubo colector y se centrifugó a $\geq 8000 \times g$, 15 s. Tras descartar el eluido del tubo colector, se añadieron 700 µl del tampón de lavado RW1 a la columna para eliminar trazas de biomoléculas (carbohidratos, proteínas, ácidos grasos etc.) procedentes de las células lisadas, se centrifugó a $\geq 8000 \times g$, 15 s y se descartó la elución del tubo colector, eliminando las biomoléculas unidas de forma inespecífica a la membrana de la columna. Seguidamente, se añadieron 500 µl del tampón de lavado RPE y se centrifugó a $\geq 8000 \times g$, 15 s con el objetivo de eliminar las sales procedentes de los tampones usados anteriormente. Una

vez descartado el contenido eluido en el tubo colector se volvió a añadir 500 µl del tampón RPE a la columna y se centrifugó a $\geq 8000 \times g$, 2 min para eliminar las trazas de sales procedentes de los tampones usados en los pasos anteriores que permanecían en la columna. Para secar la membrana, la columna se transfirió a un nuevo tubo colector y se centrifugó a $10\,000 \times g$, 1 min. Finalmente, la columna se acopló a un tubo tipo Eppendorf®, se añadieron 40 µl de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y se centrifugó a $\geq 8000 \times g$, 1 min para eluir completamente el RNA.

Tras la purificación, el RNA se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), en el que también se pudo obtener su pureza mediante la ratio de absorbancias 260/280nm. El RNA se conservó a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su uso.

3.4.3. Transcripción reversa (RT) del RNA mensajero (mRNA): síntesis de cDNA.

Para llevar a cabo la transcripción reversa (RT) la solución de 1 µg de RNA en 10 µl de agua libre de RNAsas se mezcló con 20 µl de tampón de reacción que contiene desoxinucleótidos trifosfato 500 µM (Thermo Scientific), oligo d(T)₁₄ 3 µM (Thermo Scientific), 10 U del inhibidor de RNAsas A, B y C RNaseOUT™ (Invitrogen), ditiotreitól 10 mM, 1X de *First Strand Buffer* (Invitrogen) y 200 U de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (Invitrogen). El volumen total de la mezcla (30 µl) se incubó 1 h a $42\text{ }^\circ\text{C}$ en baño para iniciar la RT. La reacción se detuvo por inactivación térmica de los enzimas a $70\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min en un Thermomixer (Eppendorf®). El cDNA obtenido se conservó a $-40\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

3.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-qPCR).

El cDNA diluido 1/30 en tampón Tris-EDTA 0,1X con 2X del colorante amarillo de quinoleína (Merck) se amplificó por RT-qPCR mediante el termociclador LightCycler 480 (Roche Applied Sciences). Cada reacción de PCR consistió en la mezcla de 2,5 µl de cDNA diluido con el mix de reacción que contiene 0,5 µM de los cebadores *forward* y *reverse* específicos de cada gen implicado en la pluripotencia (Tabla 3.2), 0,8X de DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Sciences) y una dilución 1/20 del colorante azul xileno cianol en DNA Master SYBR Green I, ajustando a 7 µl el volumen del mix con agua libre

de nucleasas. El volumen final de 9,5 μ l por reacción adquiere un color verdoso indicativo de la presencia de los dos componentes de la reacción (cDNA + Mix).

El programa de amplificación en el termociclador se configuró para obtener un total de 45 ciclos, cada uno formado por las etapas de desnaturalización (95°C, 15 s), hibridación (55-60 °C, 10 s) y extensión (72 °C, 10-20 s). La temperatura de hibridación y el tiempo de extensión se adaptó a la composición de AT-GC de los cebadores y al tamaño del amplicón con el objetivo de aumentar la especificidad de la reacción. Tras la amplificación, el programa del termociclador inició una etapa final de análisis de temperatura de fusión (curva de *melting*) que permitió determinar la especificidad del producto de la PCR.

3.4.5. Análisis y cuantificación de la expresión génica.

La concentración de los mRNA se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Los datos cuantitativos obtenidos se normalizaron con la media de tres genes *housekeeping* *PBGD* (porfobilinógeno deaminasa), β -Actina y *TBP* (proteína de unión a la caja TATA) (Tabla 3.2) para estandarizar las posibles variaciones en la expresión génica entre las muestras analizadas. Asimismo, los datos normalizados se referenciaron al control de pluripotencia VAL9, al que se le asignó el valor de 1.

3.4.6. Cariotipo.

La posible presencia de anomalías cariotípicas en las líneas de iPSC generadas se detectó a través de un estudio citogenético mediante técnicas de bandeo cromosómico tipo G de cromosomas metafásicos con un rango de resolución de 300 a 400 bandas. El análisis citogenético lo realizó el grupo acreditado de Investigación Traslacional en Genética del IIS La Fe.

3.5. Diferenciación de iPSC a HLC.

El protocolo de diferenciación de iPSC para obtener HLC se esquematiza en la figura 3.4. Este protocolo consiste en un proceso multi-etapa que, mediante cambios en la composición del medio de cultivo, así como la adición de factores de crecimiento y citoquinas, trata de mimetizar la organogénesis hepática conduciendo a las células por los estadios del desarrollo embrionario del hígado. Estos estadios se engloban en tres

grandes etapas consecutivas: etapa de endodermo, etapa de hepatoblasto y etapa de maduración hepática (Figura 3.4).

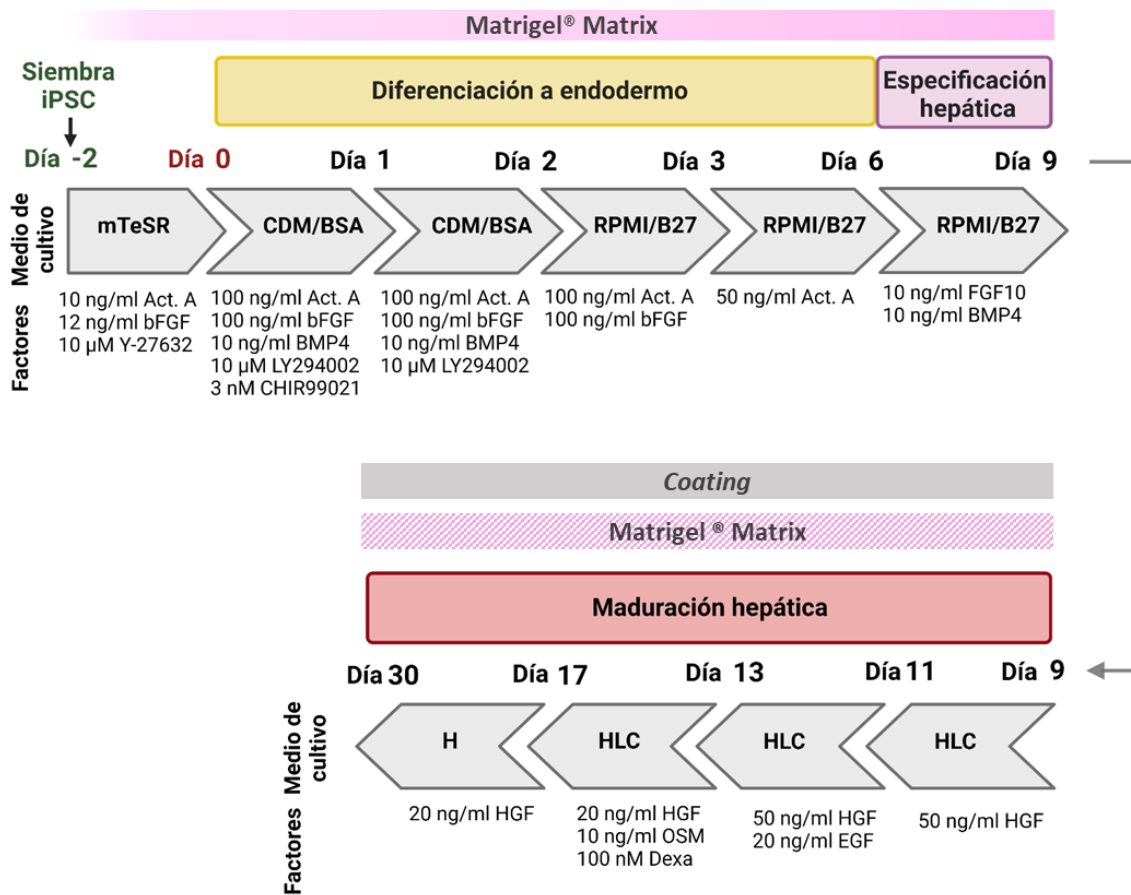


Figura 3.4. Procedimiento para la diferenciación de iPSC a HLC. El protocolo consiste en un proceso multi-etapa que incluye la combinación de diferentes medios de cultivo (flechas grises) con diferentes factores de crecimiento y hormonas y distintas matrices de cultivo durante un periodo de cuatro semanas aproximadamente. Act A = Activina A; Dexa = Dexametasona. Imagen creada con BioRender®.

Para llevar a cabo el proceso de diferenciación, la monocapa de iPSC a un 70% de confluencia procedente del cultivo de mantenimiento se levantó en forma de célula única mediante el método no enzimático con *cell dissociate buffer* (CDB) 1X (EDTA 2 mg/ml, BSA 10 mg/ml en DPBS 1X, pH 7,5). La monocapa se incubó con el CDB 1X a 37°C en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ hasta observar la separación entre sí de las células de las colonias (obtención de célula única), momento en el que se inactivó la reacción con medio mTeSR PLUS™. Las células en formato de célula única se recogieron en un tubo de 15 ml y la suspensión se centrifugó a 1000 x g, 5 min. Tras decantar el sobrenadante, el pellet de células se resuspendió en medio mTeSR PLUS™ suplementado con 10 ng/ml de activina A, 12 ng/ml de bFGF y además se añadió 10 µM

del inhibidor Y-27632 durante 24 h. La suspensión celular se sembró en pocillos de 2 cm² recubiertos de Matrigel®.

El proceso de diferenciación empezó cuando la monocapa alcanzó el 90% de confluencia, mediante un cambio de medio con el medio CDM/BSA (Tabla 3.7) suplementado con 100 ng/ml de activina A, 100 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de BMP4, 10 μM del inhibidor de la fosfatidilinositol-3-quinasa LY294002 (Cayman Chemical) y 3 nM del inhibidor de las glucógeno sintasa quinasa 3 α y β CHIR99021 (Cayman Chemical) (día 0). Tras 24 h, se realizó un cambio de medio con CDM/BSA suplementado con 100 ng/ml de activina A, 100 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de BMP4 y 10 μM de LY294002 (día 1). A día 2 el cambio de medio se realizó con RPMI 1640-GlutaMAX™ suplementado con B-27, 100 ng/ml de activina A, 100 ng/ml de bFGF. A día 3, se alcanzó el estadio de endodermo y se cambió el medio diariamente hasta día 5 (inclusive) con RPMI 1640-GlutaMAX™ suplementado con B-27 (1X), 50 ng/ml de activina A. Desde el día 6 al día 8 (inclusive), el cambio de medio se llevó a cabo mediante RPMI 1640-GlutaMAX™ suplementado con B-27, 10 ng/ml del factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF10) y 10 ng/ml de BMP4. A día 9, las células alcanzaron el estadio de hepatoblasto y se transfirieron a la matriz *coating* (3mg/100ml de colágeno, 1mg/100ml de fibronectina y 10mg/100ml de BSA en medio DMEM alto en glucosa) que habitualmente se usa en nuestro grupo para el cultivo de hepatocitos. Además, en este día se llevó a cabo el cambio a medio HLC (Tabla 3.5) suplementado con 50 ng/ml del HGF. Para la maduración hepática se cambió el medio a día 11 con medio HLC suplementado con 50 ng/ml de HGF y 20 ng/ml del factor de crecimiento epitelial (EGF). Desde el día 13 al día 16 (inclusive) se realizó un cambio de medio cada dos días con medio HLC suplementado con 20 ng/ml de HGF y 10 ng/ml de OSM y 100 nM de dexametasona. Finalmente, desde el día 17 las células se mantuvieron en medio HLC suplementado con 20 ng/ml de HGF hasta día 25-30, cambiando el medio cada dos días.

Tabla 3.5. Medios de cultivo y complementos utilizados en la diferenciación hepática.

Medio CDM/BSA	
Componente	Concentración de uso
Ham's F-12 : IMDM	1:1
BSA	5mg/ml
GlutaMAX™ 100X	1X
Lipid Concentrate	1X
Tioglicerol	1 µl/25ml
Transferrina	0,0025 mg/ml
Insulina	0,42 µM
Penicilina-Estreptomicina	1X
Medio HLC	
Componente	Concentración de uso
Ham's F-12 : Williams	1:1
BSA	0,2%
Penicilina-Estreptomicina	1X
L-Glutamina	2 mM
Glucosa	17 mM
NAME ^a	0,64 mM
Transferrina	0,0025 mg/ml
Insulina (Insulatard)	9,03 x 10 ⁻⁸ M
Ácido Ascórbico	0,62 mM
Ácido Linoleico	7,17 µM
^a N ω -Nitro-L-arginina metil éster clorhidrato.	

En el ensayo exploratorio para la mejora del compromiso endodérmico, se utilizaron 50 ng/ml del factor WNT-3A (R&D Systems) los tres primeros días de la diferenciación (día 0, 1 y 2), manteniendo las condiciones descritas en el resto del proceso de diferenciación.

3.6. Caracterización del proceso de diferenciación y de las HLC.

Para la monitorización del proceso de diferenciación se tomaron muestras en los días representativos de cada una de las etapas de la diferenciación: día 3 para la etapa de endodermo, día 9-11 para la etapa de hepatoblasto y día >25 para la etapa de maduración hepática y HLC.

3.6.1. Inmunofluorescencia.

La detección mediante IF de marcadores de cada una de las etapas del protocolo de diferenciación, así como de las HLC se llevó a cabo de acuerdo con el epígrafe 3.4.1. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para cada etapa se indican en la tabla 3.1.

3.6.2. Análisis de la expresión génica.

La purificación de RNA, la RT y el análisis de la expresión de genes implicados en la diferenciación se realizó de la misma manera que se describe en los apartados 3.4.2 a 3.4.5. Los cebadores utilizados para monitorizar el proceso de diferenciación y caracterizar las HLC se describen en la tabla 3.2. Los datos de expresión génica se relativizaron al día 0 de cada donante al que se le asignó el valor de 1 y se representaron en escala logarítmica de manera que el valor de expresión del día 0 fue 0.

3.6.3. Análisis transcriptómico: RNA sequencing (RNAseq).

Al menos 1 µg de RNA procedente de PSC no diferenciadas (iPSC y ESC) y diferenciadas a HLC fue extraído tal y como se describe en el epígrafe 3.4.2. para ser analizado por RNAseq. Para la cuantificación e identificación de los mRNA, se generaron un total de entre aproximadamente 24,5 y 56 millones de lecturas (*reads*) en cada librería. El alineamiento se llevó a cabo mediante la herramienta STAR tomando como referencia la secuencia del genoma *Homo sapiens* GRCh38p13, se contabilizaron las lecturas (*counts*) eliminando los duplicados de PCR y se realizó el análisis de la expresión diferencial de genes con el apoyo de Making Genetics S.L (Pamplona).

La representación de los datos se realizó utilizando el software MetaboAnalyst versión 5.0. Para ello, inicialmente se representaron los datos utilizando un *heatmap* que permitió diferenciar entre células pluripotentes y HLC.

El siguiente paso consistió en identificar los genes que muestran buena evidencia de estar diferencialmente expresados. Por ello, se realizó un diagrama en volcán (*Volcano plot*), que es un diagrama de dispersión que permite identificar los genes que están regulados hacia arriba o hacia abajo (*up* y *down regulated*) ya que se concentran en los extremos derecho e izquierdo superiores del gráfico. Con los datos obtenidos en el *Volcano plot*, se realizó un análisis de enriquecimiento de genes utilizando la plataforma XGR.

3.6.4. Determinación de la producción de albúmina.

La producción y secreción de albúmina se cuantificó en el medio de cultivo de las HLC tras 24 h de incubación de la monocapa de células. Las muestras de medio de cultivo se centrifugaron a 1000 x g y los sobrenadantes se conservaron a -80 °C hasta el momento de su valoración. Se tomó como blanco el medio de cultivo no incubado con las células. La determinación se realizó en 100 µl de muestra mediante un ensayo colorimétrico de cuantificación de albúmina humana por ELISA tipo sándwich (Bethyl Laboratories) en placa de 96 pocillos. La lectura se realizó a una λ de 450 nm mediante el lector Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek). Los valores se expresan como ng de albúmina formados por hora y por µg de RNA.

3.6.5. Medida de la actividad ureogénica.

La capacidad ureogénica se determinó en el medio de cultivo tras 6 o 24 h de incubación de la monocapa de células. Las muestras de medio de cultivo se centrifugaron a 1000 x g y se conservaron los sobrenadantes a -20 °C hasta el momento de su valoración. Se tomó como blanco el medio de cultivo incubado en la monocapa durante 30 min. La producción de urea se cuantificó a través del Kit Quantichrom™ Urea (Bioassay Systems). La lectura se realizó a una λ de 520 nm mediante el lector Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek). Los valores se expresan como nanogramos de urea formados por hora y por µg de RNA.

3.6.6. Almacenamiento de glucógeno.

La acumulación de glucógeno se evaluó mediante la tinción PAS (ácido peryódico-Schiff) que permite detectar grupos aldehídos producto de la oxidación de los hidratos de carbono revelando, de esa manera, una coloración rosa-púrpura. La monocapa se incubó con el medio de cultivo estándar durante 24 h, con medio suplementado con 30 mM de glucosa y 10^{-6} M de insulina durante 24 h, o bien con medio suplementado con 30 mM de glucosa y 10^{-6} M de insulina durante 24 h seguido de medio con 10^{-6} M de glucagón durante las siguientes 24 h. Tras el tratamiento, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 10 min y se lavaron con agua destilada. A continuación, la monocapa se cubrió con 0,5% de solución de ácido peryódico durante 5 min y se lavó con agua destilada durante 2-3 min. Tras la oxidación, se cubrió la monocapa con la

solución de Schiff durante 15-30 min en oscuridad. La reacción se detuvo realizando 3 lavados con agua del grifo (2 min por lavado) cuando la tinción magenta-purpúrea quedó evidenciada. Finalmente, la presencia de glucógeno se identificó en microscopio de campo brillante (Donato et al., 2015).

3.6.7. Medida de actividades citocromo P450.

Las actividades CYP450 se midieron en células control o en células previamente tratadas con inductores prototipo de enzimas CYP450. Para los ensayos de inducción las células se trataron previamente con fenobarbital 1000 μM o 3-metilcolantreno 2 μM durante 48 h, incluyendo una dosis repetida a las 24 h de tratamiento.

Las actividades se midieron mediante la incubación directa de la monocapa de células con el sustrato específico para cada CYP450 y la cuantificación posterior del metabolito formado y liberado al medio de cultivo. En la tabla 3.6 se recogen los detalles del ensayo de cada actividad. Tras la incubación con el sustrato, se recogió el medio, se centrifugó a 3000 x g, 3 min y el sobrenadante se conservó a -80 °C hasta su uso. La monocapa de células se levantó para la obtención y cuantificación del RNA tal y como se explica en el epígrafe 3.4.2.

La cuantificación de metabolitos por espectrometría de masas HPLC/MS/MS se realizó con el apoyo de la Unidad Analítica del IIS La Fe, tal y como se ha descrito en trabajos anteriores (Lahoz et al., 2008). En el ensayo de la actividad CYP1A1/2 mediante la reacción etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD) la cuantificación de la fluorescencia (λ excitación 535 nm y λ emisión 584 nm) debida a la formación del producto resorufina se realizó utilizando el lector de fluorescencia Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek). Los valores resultantes se expresaron como pmoles de producto formado por hora y por μg de RNA.

Tabla 3.6. Sustratos utilizados y metabolitos generados en los ensayos de valoración de actividades CYP450.

Enzima	Sustrato	Concentración de uso (μM)	Tiempo de incubación (h)	Metabolito	Método ^b
CYP1A1/2	7-Etoxiresorufina	8	3	Resorufina	Fluorescencia ^a
CYP1A2	Fenacetina	10	24	Acetaminofen	HPLC/MS/MS
CYP2B6	Bupropión	100	24	Hidroxibupropión	HPLC/MS/MS
CYP3A4	Midazolam	50	24	1'-Hidroximidazolam	HPLC/MS/MS
CYP2C19	Mefenitoina	50	24	4'-HO-Mefenitoina	HPLC/MS/MS
CYP2C9	Diclofenaco	10	24	4'-HO-Diclofenaco	HPLC/MS/MS
CYP2D6	Bufuralol	10	24	Hidroxibufuralol	HPLC/MS/MS
CYP2E1	Clorzoxazona	50	24	6-HO-clorzoxazona	HPLC/MS/MS

^a Donato et al., 1993 ; ^b Lahoz et al., 2008

3.6.8. Análisis metabólico.

Para la extracción de metabolitos de cultivos de PSC (iPSC y ESC) no diferenciadas y diferenciadas a HLC, se retiró el medio de cultivo mediante aspiración y las células se lavaron una vez con PBS 1X a temperatura ambiente. La extracción se realizó añadiendo 100 μl de solvente de extracción frío (40:40:20 acetonitrilo:MeOH:agua +0,5% de ácido fórmico) a la monocapa según el protocolo previamente descrito (García-Cañaveras et al., 2021). Después de 1 min, las células se levantaron mediante *cell scraper* y se transfirieron a un tubo tipo Eppendorf® donde el extracto fue neutralizado mediante la adición de 13,2 μl de bicarbonato amónico al 15%. El extracto se conservó a -80 °C hasta el momento de su uso.

Los extractos se analizaron en la Unidad Analítica del IIS La Fe usando una estrategia no dirigida mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se utilizó un espectrómetro de masas cuadrupolo-orbitrap (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific) acoplado a cromatografía de interacción hidrofílica mediante ionización por *electrospray*. Los datos se analizaron utilizando el software EI-MAVEN (v 0.2.4, Elucidata), con compuestos identificados en base a su masa exacta y tiempo de retención comparado con estándares comerciales. Los datos de abundancia de metabolitos se normalizaron por el contenido total en proteína que se valoró mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

El análisis de los datos se llevó a cabo con la plataforma MetaboAnalyst versión 5.0 mediante un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) que

permite un modelado predictivo y descriptivo, así como la selección de variables discriminantes (*VIP score*).

A partir de la información de los metabolitos discriminantes entre los dos grupos experimentales se representaron las principales vías metabólicas diferenciales en las células pluripotentes y las diferenciadas a fenotipo hepático mediante un análisis de enriquecimiento usando la misma plataforma.

3.7. Ensayos de toxicidad.

3.7.1. Compuestos seleccionados.

Los compuestos amiodarona, tetraciclina y valproato fueron seleccionados como fármacos modelo de DILI en base a la información previa descrita sobre su potencial hepatotóxico y los mecanismos implicados en la toxicidad (Chalasani et al., 2015; deLemos et al., 2016; Gómez-Lechón et al., 2010; O'Brien et al., 2006; Tolosa et al., 2012, 2018) (Tabla 3.7). Como control negativo (no hepatotóxico) se utilizó el compuesto citrato trisódico dihidratado. En los estudios de toxicidad con el donante P1 se incluyó también la combinación A/C, al ser considerado el agente causal sospechoso de haber desencadenado el episodio de DILI en este paciente.

Tabla 3.7. Compuestos utilizados en los ensayos de toxicidad con HLC.

Compuesto	Grupo terapéutico ^a	Etiqueta ^b	Tipo de daño ^b	Grado de DILI ^{b,d}	C _{máx} (μM)	Mecanismo toxicidad ^c
Amiodarona	Antiarrítmico	BBW	H	Severo	2,2 ^e	ST, PL
Amoxicilina-Clavulánico	Antibiótico	RA	I ^c	Casos reportados	41/11 ^d	CH ^f , ID ^f
Tetraciclina	Antibiótico		HT, CH	Moderado	14,19 ^e	MI ^g , ST ^g
Valproato	Anticonvulsivante	BBW	B, X	Severo	481 ^e	EO, MI, ST, ID
Citrato	-		ND	ND	NA	NA

BBW, *Black Box Warning* según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA); RA, reacciones adversas; H, hepatitis; I, ictericia; X, muerte; HF, hepatitis fulminante; M, aumento de los biomarcadores clínicos hepáticos; HT, hepatotoxicidad; CH, colestasis; B, hiperbilirrubinemia; ST, esteatosis; EO, estrés oxidativo; MI, daño mitocondrial; ID, idiosincrásico; ND, no descrito; NA, no aplicable. ^a Gómez-Lechón et al., 2010; ^b O'Brien et al., 2006; ^c Chalasani et al., 2015; ^d Tolosa et al., 2018; ^e Tolosa et al., 2012; ^f deLemos et al., 2016; ^g Tolosa et al., 2016a

Los stocks de los compuestos se prepararon en agua o DMSO y se añadieron al medio de cultivo para obtener la concentración final deseada (Tabla 3.8). En ningún caso se excedió el 0,5% (v/v) de DMSO en el medio de cultivo y los controles recibieron la misma

concentración del solvente. Las concentraciones de los compuestos se seleccionaron en base a la concentración mínima efectiva (MEC) descrita para la línea celular HepG2, es decir, la mínima concentración que induce un efecto tóxico en comparación con las células sin tratar (Donato et al., 2012b; Tolosa et al., 2012).

Tabla 3.8. Concentraciones de uso de los compuestos utilizados en los ensayos de toxicidad en HLC.

Compuesto	Concentración	MEC en HepG2
Amiodarona	12.5, 25, 50 (μ M)	10 (μ M)
Amoxicilina-Clavulánico	4/2, 8/4, 10/5,12/6 (mM)	8/4 (mM)
Tetraciclina	150, 300, 600 (μ M)	100 (μ M)
Valproato	2, 4, 8 (mM)	1 (mM)
Citrato	50, 100, 200 (μ M)	-

3.7.2. Evaluación de la toxicidad mediante ensayos multiparamétricos HCS.

En los ensayos de toxicidad, además de las HLC, se utilizaron en paralelo la línea celular de origen hepático HepG2 y las líneas celulares no hepáticas HeLa y A549 para demostrar la especificidad de las HLC como modelo celular para el estudio de la hepatotoxicidad. El cultivo de las células HepG2 (ECACC No.85011430) se llevó a cabo en medio Ham's F-12/Leibovitz L-15 (1:1 v/v) suplementado con 7% SBF, 50 U de penicilina/ml, 50 μ g de estreptomycin/ml y 2 mM L-glutamina. Las células HeLa (ECACC No.93021013) se cultivaron en DMEM suplementado con 10% SBF, 2 mM L-glutamina, 1X de aminoácidos no esenciales, 50 U de penicilina/ml y 50 μ g de estreptomycin/ml. Las células A549 (ECACC No. 86012804) se cultivaron en DMEM suplementado con 10% SBF, 2 mM L-glutamina y 1% gentamicina. Para los ensayos de toxicidad, las células HepG2, HeLa y A549 se despegaron con 0,25% tripsina/0,02% EDTA at 37°C y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5000 células/pocillo. Por su parte, las células en estadio de hepatoblasto fueron transferidas a placas de 96 pocillos recubiertos de *coating* donde finalizaron el proceso de diferenciación hasta HLC tal y como se especifica en el apartado 3.5. Finalmente, todas las líneas celulares, incluyendo las HLC, se expusieron durante 24 h a concentraciones crecientes de amiodarona (fármaco hepatotóxico) y de citrato (control negativo) (Tabla 3.8).

En los ensayos de esteatosis/fosfolipidosis las HLC se incubaron previamente con 62 μ M de la mezcla de ácidos grasos oleato:palmitato (ratio 2:1) durante 14 h y a continuación

se trataron durante 24 h con los compuestos amiodarona, tetraciclina, valproato y citrato (Tabla 3.8) en formato de placa de 96 pocillos tal y como se ha descrito arriba.

Tras el tratamiento, la monocapa de células se incubó con medio de cultivo fresco sin fármacos junto con una selección de sondas fluorescentes para medir diferentes parámetros indicativos de toxicidad celular (Tabla 3.9) tal y como se ha descrito en trabajos anteriores del grupo (Donato et al., 2017; Tolosa et al., 2015b). Las sondas fueron incubadas durante 30 min, a excepción de la sonda HCS LipidTOX™ cuyo periodo de incubación fue de 24 h, y se combinaron de acuerdo con su compatibilidad óptica. Tras la tinción, las monocapas celulares fueron analizadas con el microscopio automático de análisis multiparamétrico INCELL Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences). Las imágenes se analizaron con el software INCELL Analyzer Workstation que permite la cuantificación simultánea de estructuras subcelulares que están marcadas con diferentes sondas fluorescentes y medir la intensidad de fluorescencia asociada a compartimentos predefinidos (p.ej. núcleo y citoplasma). El conteo celular se realizó con el marcaje para Hoechst 33342 aplicando un algoritmo "top-hat". La viabilidad celular se determinó por la exclusión de yoduro de propidio en el núcleo. El resto de marcajes se cuantificaron el citoplasma celular según lo descrito previamente (Tolosa et al., 2012; Tolosa et al., 2018). Cada medida se realizó en células individuales.

Los datos obtenidos fueron expresados en porcentaje con respecto al control de células no tratadas cuyo valor se estableció como 100%.

Tabla 3.9. Sondas fluorescentes utilizadas en los ensayos de toxicidad con HLC.

Sonda	Casa comercial	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm) ^a	Conc. ^b	Parámetro analizado
TMRM	Molecular Probes, ThermoFisher	549/576	0,15 mM	MMP
Fluo4	Molecular Probes, ThermoFisher	494/516	0,25 μ M	Ca ²⁺ intracelular
CellROX™	Molecular Probes, ThermoFisher	644/665	5 μ M	ROS
BODIPY 493/503	Molecular Probes, ThermoFisher	493/503	14,3 nM	Lípidos neutros
HCS LipidTOX™	Molecular Probes, ThermoFisher	595/615	1X	Fosfolípidos
PI	ThermoFisher	494/516	2,2 μ M	Viabilidad
Hoechst 33342	ThermoFisher	361/486	2,7 μ M	Conteo celular

^a Donato et al., 2017; ^b Tolosa et al., 2015b; TMRM, tetrametil rodamina metil éster; Fluo4, fluo-4 acetoximetil éster; PI, Yoduro de Propidio; MMP, potencial de membrana mitocondrial; ROS, especies reactivas de oxígeno.

3.8. Medida de actividades citocromo P450 en tejido hepático.

3.8.1. Obtención de microsomas de tejido hepático.

Los microsomas fueron obtenidos de muestras de tejido hepático procedentes de los cuatro donantes control (C1 a C4). Cada muestra de tejido (entre 1 y 3 g) fue congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -80 °C hasta el momento de su uso.

Todo el proceso de obtención de los microsomas hepáticos se realizó a 4 °C (sobre hielo). Las muestras de tejido congelado fueron troceadas con una hoja de bisturí y sumergidas en tampón de homogenización (3 ml/g de hígado) consistente en tampón fosfato potásico 1M, pH 7,4, KCl 0,5 M, EDTA 1 mM. El tejido fue disgregado con el homogeneizador de tejidos Precellys 24 Dual (Precellys, Francia) equipado con un sistema de refrigeración Cryolys y aplicando dos pulsos de 25 s a 6000 x g. A continuación, la preparación de tejido homogenizado se transfirió a tubos de centrifuga (Beckman Coulter Polycarbonate, 16 x 80mm) y se centrifugó a 9000 x g, 4 °C durante 30 min (Ultracentrifuga Beckman Coulter AVANTI J-301). El sobrenadante (fracción S9) se centrifugó a 100000 x g, 4 °C durante 1 h y se descartó el sobrenadante (fracción citosólica). El pellet resultante se centrifugó nuevamente a 100000 x g, 4 °C durante 1 h. Finalmente, el sedimento obtenido (fracción microsomal) se resuspendió en tampón de conservación (tampón fosfato potásico 0,1M pH 7,4, glicerol 20%) y se repartió en alícuotas de 100 μ l las cuales fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenada a -

80 °C hasta el momento de su valoración y caracterización. Una alícuota de la preparación de microsomas se utilizó para la determinación del contenido en proteína mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

3.8.2. Valoración de las actividades enzimáticas CYP450 en microsomas de tejido hepático.

Para la medida de actividades, los microsomas (50 µg de proteína) se colocaron en tubos tipo Eppendorf® code 1,5 ml junto con 80 µl de tampón fosfato potásico 0,1M pH 7,4 que contenía el sustrato específico para cada actividad (Tabla 3.8) y la mezcla se aatemperó durante 5 min a 37 °C en un baño termostatzado. La reacción se inició por adición de 20 µl del sistema de regeneración de NADPH (1 mM de NADP, 5 mM Cl₂Mg, 10 mM glucosa 6 fosfato y 0.3 U/mL de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) y tras 20 min a 37 °C en un baño de agua con agitación, la reacción se paró por adición de 200 µl de acetonitrilo frío (4 °C). Las muestras se centrifugaron a 15000 x g, 10 min a 4 °C y los sobrenadantes se conservaron -80 °C hasta su uso. La cuantificación de los metabolitos formados se realizó mediante HPLC/MS/MS (Lahoz et al., 2008) tal y como se describe en el apartado 3.6.7. Las actividades se expresaron como pmoles de producto formado por minuto y mg de proteína microsomal.

3.9. Análisis estadístico.

El tipo de análisis estadístico para cada conjunto de datos queda especificado en la propia figura dentro del apartado de resultados y se llevó a cabo empleando los programas estadísticos GraphPad Prism 8.0 y SPSS Statistics 25.0. Para la comparación de dos conjuntos de datos (poblaciones) se utilizó la prueba t-student para muestras independientes o pareadas. Para la comparación de múltiples poblaciones se utilizaron los test ANOVA de 1 y 2 factores con *post-hoc* Dunnet o Bonferroni. El tamaño muestral (n) mínimo para cada estudio fue de 2. Los datos se encuentran representados como la media aritmética ± la desviación estándar (DS) o como la media aritmética ± el error estándar de la media (SEM). El intervalo de confianza empleado para la determinación de la significancia estadística fue del 95%. Se consideró un p_valor de 0,05.

4

RESULTADOS

4.1. Generación y caracterización de iPSC humanas.

4.1.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Con la finalidad de obtener una cantidad adecuada de células somáticas que permitiese llevar a cabo el proceso de reprogramación, se eligió la sangre periférica como fuente de células somáticas ya que mediante la extracción de sangre es posible obtener el volumen necesario para aislar PBMC, una fracción de la sangre total que incluye linfocitos, monocitos y células dendríticas.

Para llevar a cabo el aislamiento de PBMC con vistas a su reprogramación, se recolectaron las muestras de sangre periférica en tubos con anticoagulante EDTA y se realizó el aislamiento mediante el uso de un medio de gradiente de densidad que permite separar las distintas fases de la sangre, incluida la fracción de PBMC, tras la centrifugación. Mediante esta técnica de aislamiento, se obtuvo un promedio de $1,18 \times 10^6 \pm 4,57 \times 10^5$ células vivas/ml de sangre y una viabilidad media del $41 \pm 10\%$. Estos resultados entran dentro del rango habitual de rendimiento del aislamiento de PBMC en nuestro grupo durante el periodo 2017-2021.

4.1.2. Reprogramación de PBMC.

Para la reprogramación de PBMC, se utilizaron muestras criopreservadas de los donantes C2, C3 y P1 y muestras frescas de los donantes C1 y C4. El proceso de criopreservación no afectó a la viabilidad celular (no mostrado).

Las PBMC reprogramadas empezaron a formar pequeños agregados celulares sobre el soporte celular o *feeder* de MEF (Figura 4.1A) que crecieron formando agrupaciones de células con un alto grado de compactación conocidas como colonias (Figura 4.1B). Las colonias formadas se transfirieron a una matriz *feeder-free* de Matrigel® y mostraron el mismo comportamiento de crecimiento y proliferación que la línea de ESC de referencia VAL9 (Figura 4.1C-D).

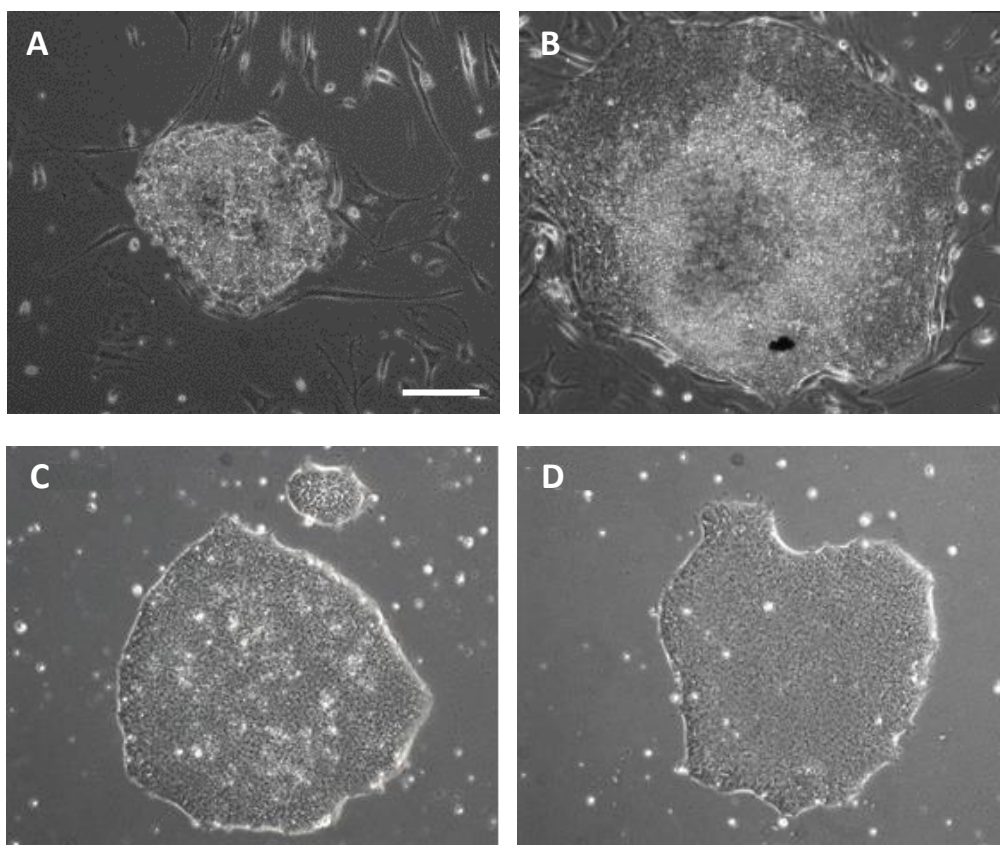


Figura 4.1. Figura representativa del proceso de generación de iPSC (donante C1). A) Las iPSC generadas proliferan sobre el soporte de MEF formando agrupaciones de células (colonias). B) La proliferación de las iPSC en las colonias promueve el crecimiento de las mismas. Las colonias de iPSC con el tamaño adecuado se transfieren a condiciones feeder-free (C) en las que se observa un crecimiento y expansión típico de células pluripotentes tal y como se observa para la línea de ESC VAL9 (D). Barra de escala = 200 μ m aplica a todas las imágenes.

4.1.3. Caracterización de iPSC.

Tras la reprogramación, las cinco líneas de iPSC generadas (cuatro líneas control C1, C2, C3, C4 y una línea derivada de paciente de DILI P1) fueron caracterizadas considerando la línea embrionaria VAL9 como control positivo de pluripotencia. Todas las líneas de iPSC crecieron en colonias y expresaron marcadores típicos de células pluripotentes como OCT3/4, NANOG y TRA1-60, tal y como se muestra en las imágenes de IF para las líneas C1 y P1 como ejemplos representativos (Figuras 4.2 y 4.3).

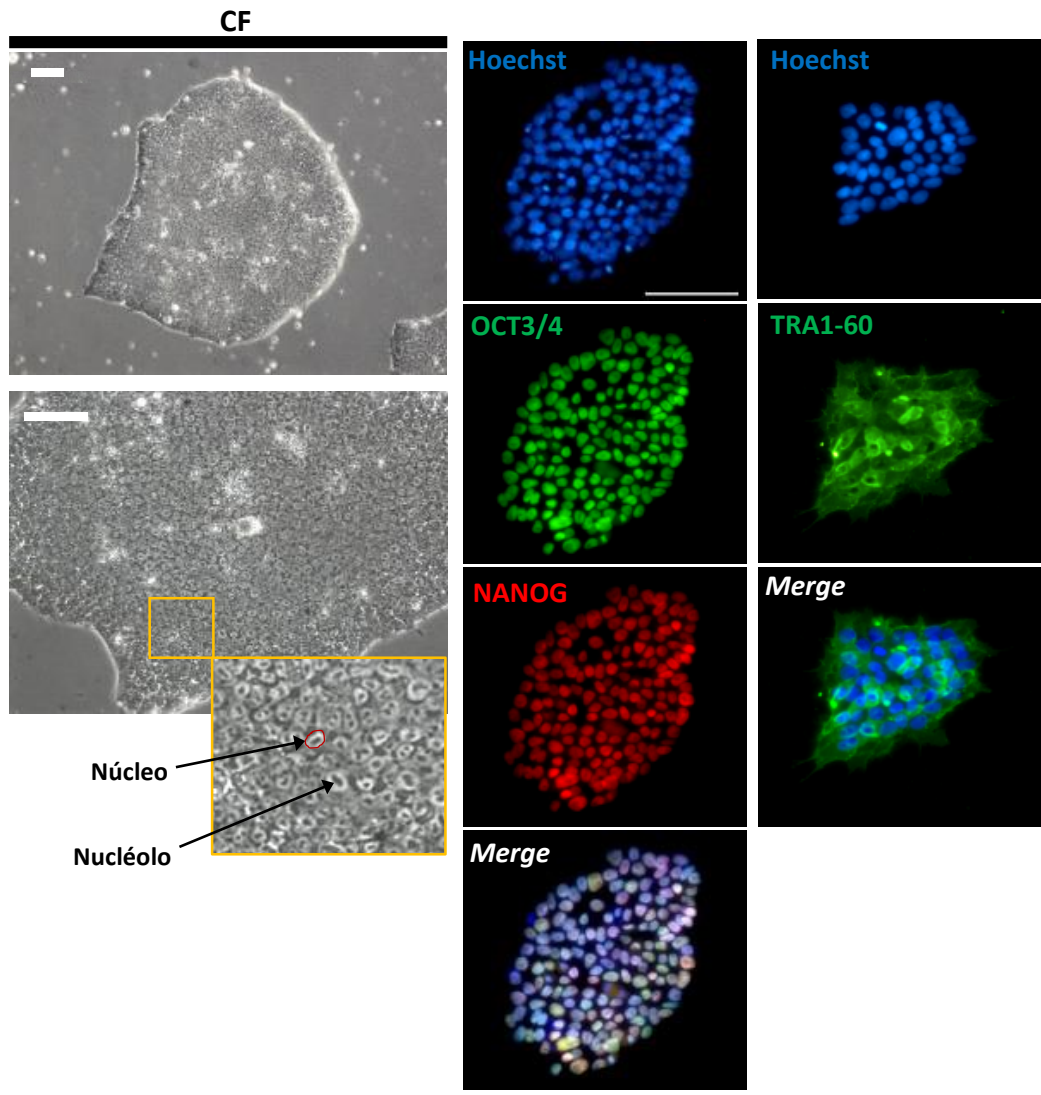


Figura 4.2 Caracterización por microscopía de las iPSC (donante C1). En la parte izquierda se muestran fotografías en contraste de fases (CF) de células pluripotentes tomadas con una magnificación del 10X (imagen superior) y 20X (imagen inferior, en la que se ha ampliado una sección con zoom digital). En la parte derecha se muestran los de marcadores de pluripotencia (NANOG, OCT3/4 y TRA1-60) mediante IF. Barra de escala = 100 μ m (aplica a todas las imágenes).

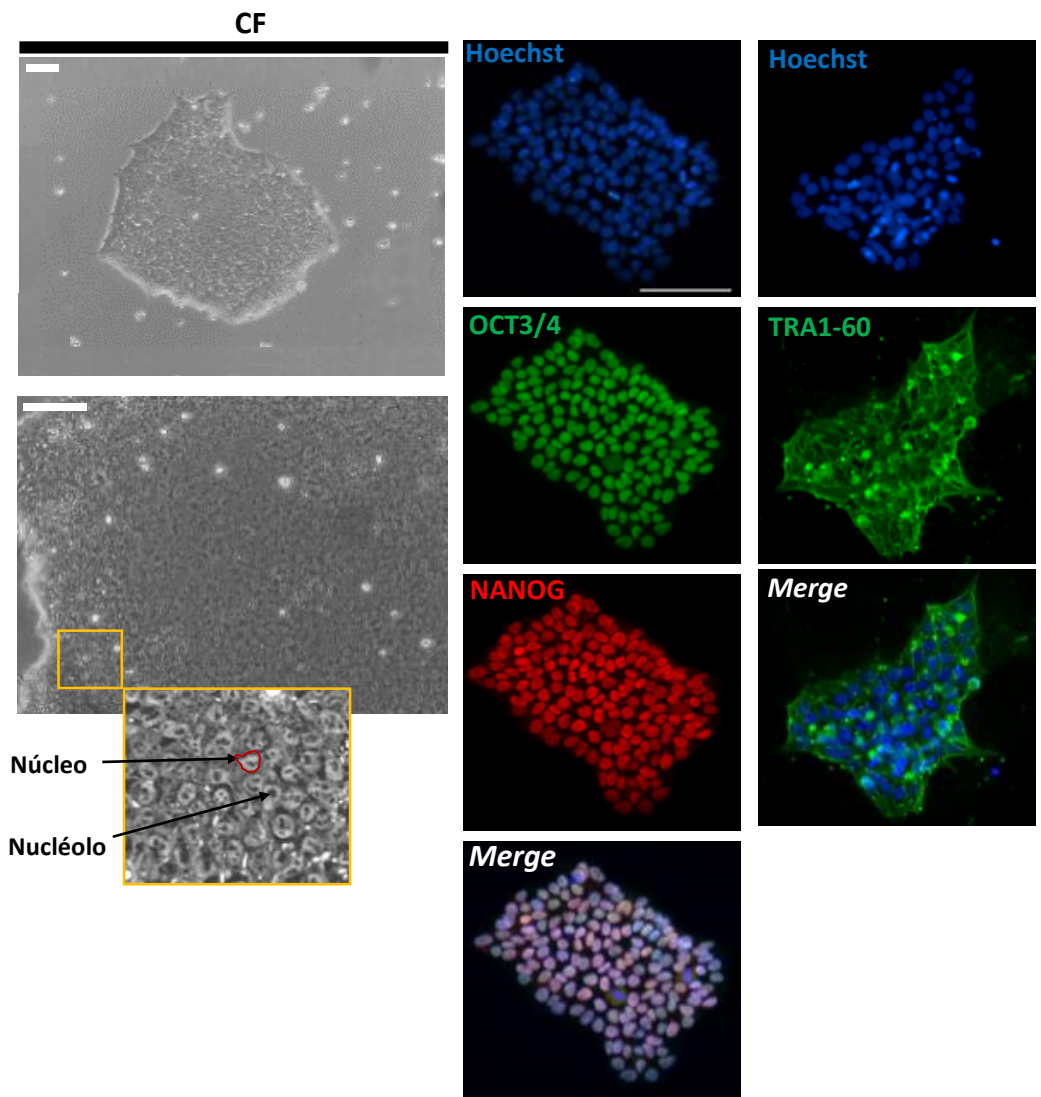


Figura 4.3. Caracterización por microscopía de las iPSC (donante P1). En la parte izquierda se muestran fotografías en contraste de fases (CF) de células pluripotentes tomadas con una magnificación del 10X (imagen superior) y 20X (imagen inferior, en la que se ha ampliado una sección con zoom digital). En la parte derecha se muestran los marcadores de pluripotencia (NANOG, OCT3/4 y TRA1-60) mediante IF. Barra de escala = 100 μ m (aplica a todas las imágenes).

La caracterización de las líneas de iPSC también se llevó a cabo a nivel transcripcional. Las iPSC mostraron expresión de los genes implicados en pluripotencia *DNMT3B*, *NANOG*, *OCT3/4* y *SOX2* a pases bajos (≤ 20). La expresión de *DNMT3B* fue similar a la de VAL9 en todas las líneas control y significativamente más baja en la línea P1. La expresión de *NANOG* fue significativamente mayor para los donantes C1, C3 y C4, mientras que la expresión de *OCT3/4* fue menor en las líneas C1 y C3. Por último, la expresión endógena de *SOX2* fue significativamente menor para C2, C3 y C4 con respecto el control VAL9 (Figura 4.4).

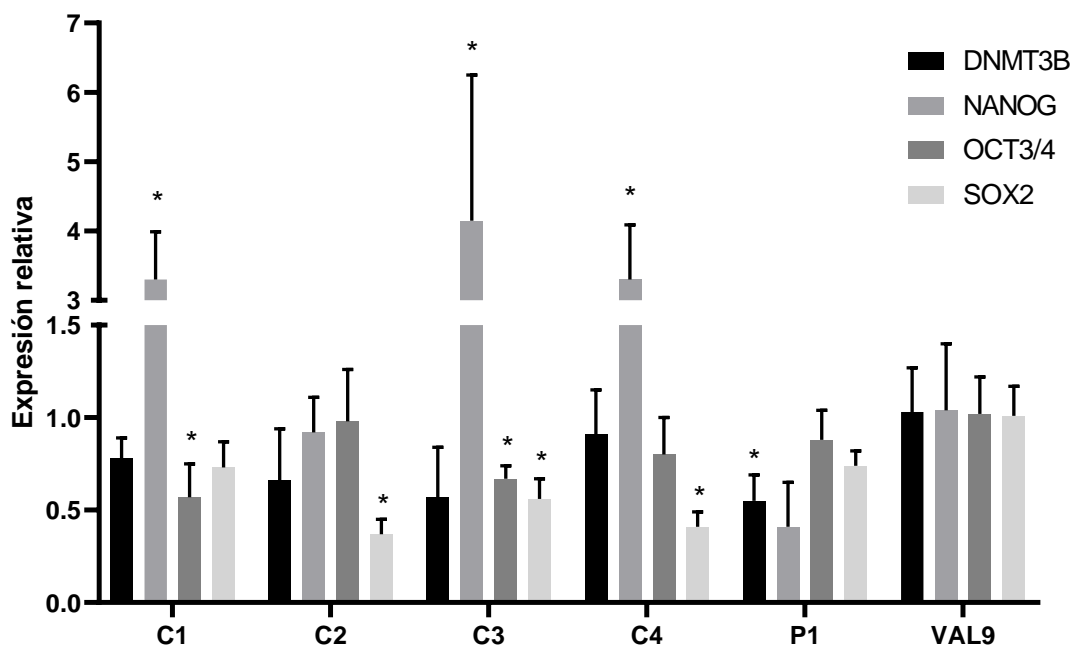


Figura 4.4. Niveles de expresión de genes indicadores de pluripotencia (DNMT3B, NANOG, OCT3/4 Y SOX2) en iPSC a pasas bajas (P≤20). Los niveles de expresión se encuentran normalizados con VAL9 cuyo valor asignado es 1. Los datos se expresan como el promedio de la expresión ± desviación estándar (DS) (n=5). ANOVA de 1 factor con post-hoc Dunnet, *p<0,05 con respecto a VAL9.

Por otro lado, el cariotipo de las iPSC mediante el estudio citogenético por bandeo cromosómico G no reveló la presencia de anomalías cariotípicas en ninguna de las líneas generadas (Figura 4.5).

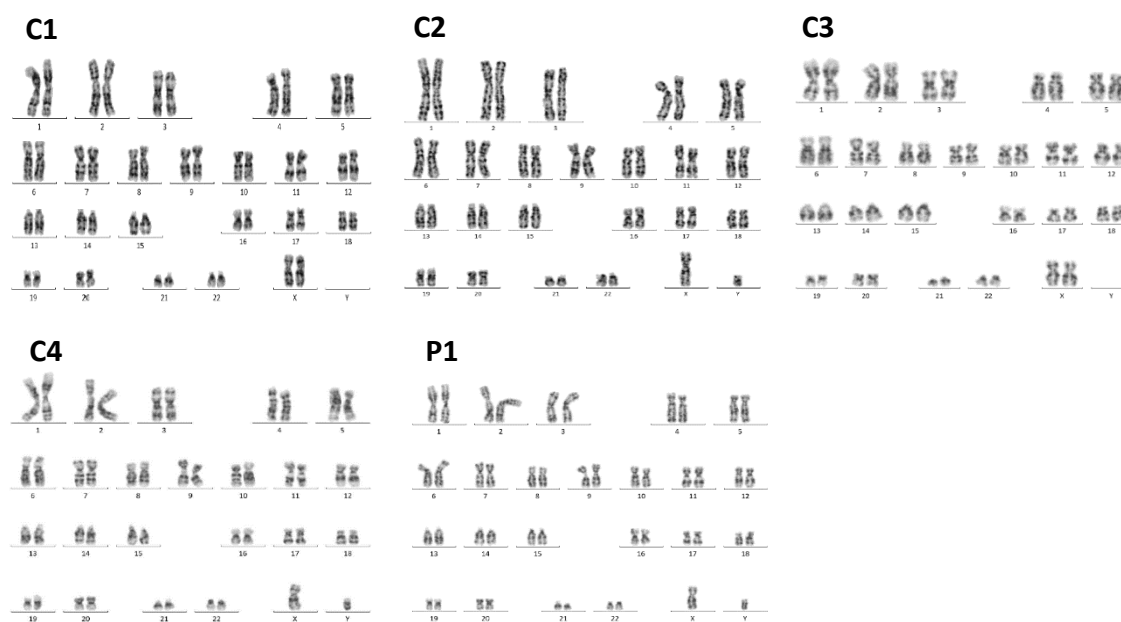


Figura 4.5. Caracterización de las líneas de iPSC generadas mediante bandeo cromosómico tipo G.

4.2. Diferenciación de iPSC a HLC.

4.2.1. Monitorización del proceso de diferenciación.

Durante a optimización del proceso de diferenciación se exploró la opción de introducir el factor WNT-3A junto con el resto de factores empleados para inducir la fase de endodermo, con el objetivo de mejorar la cantidad de células comprometidas con el linaje endodérmico. Para ello, realizamos en paralelo diferentes diferenciaciones de las iPSC de los donantes C1 y C3 en presencia y ausencia de WNT-3A y analizamos los marcadores específicos de endodermo mediante IF y RT-qPCR (Figura 4.6). Los resultados por IF no mostraron diferencias en la presencia de los marcadores SOX17 y FOXA2 (Figura 4.6A). Tampoco hubo diferencias en la expresión génica de SOX17 cuando las células fueron expuestas a WNT-3A (Figura 4.6B). Por ello, se decidió no hacer uso de este factor en las posteriores diferenciaciones.

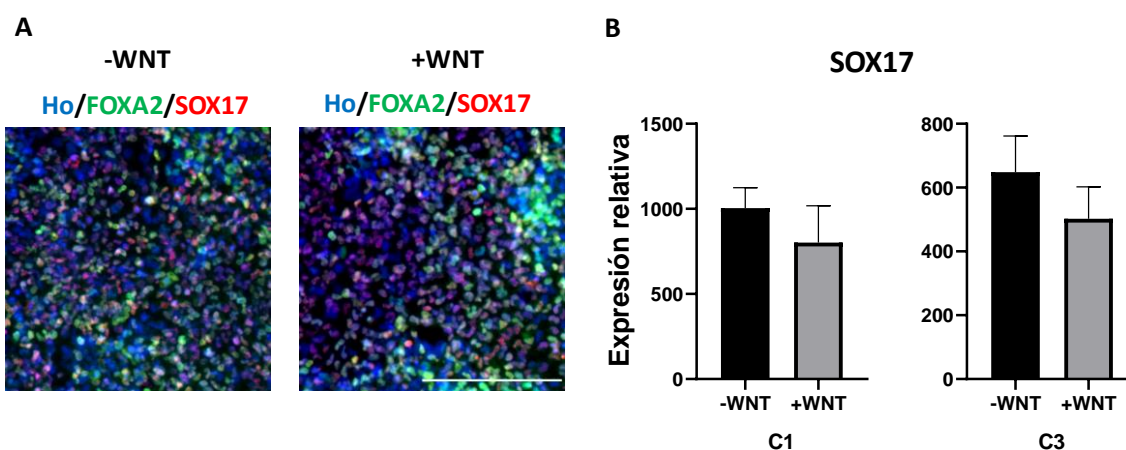


Figura 4.6. Análisis de la expresión de marcadores endodérmicos a día 3 del proceso de diferenciación en presencia (+) y ausencia (-) de WNT-3A. A) Imagen representativa de la presencia de células positivas para FOXA2 y SOX17 en el donante C1 por IF. B) Análisis comparativo de la expresión génica de SOX17 en los donantes C1 y C3. Se representa la media \pm el error estándar de la media (SEM), $n=8$. Barra de escala = 200 μ m (aplica a las dos imágenes). Ho = Hoechst.

Una vez definido el protocolo de diferenciación, se aplicó a las diferentes líneas de iPSC para comprobar si era posible obtener un conjunto de HLC de distintos donantes que recreasen la variabilidad interindividual. Para ello, se realizó una caracterización y un seguimiento de las células durante todo el proceso. En las figuras 4.7 a 4.9 se muestran los resultados del seguimiento morfológico por microscopía de contraste de fases, y los estudios mediante IF y RT-qPCR de cada etapa del proceso de diferenciación para los donantes C1 y P1 como ejemplos representativos.

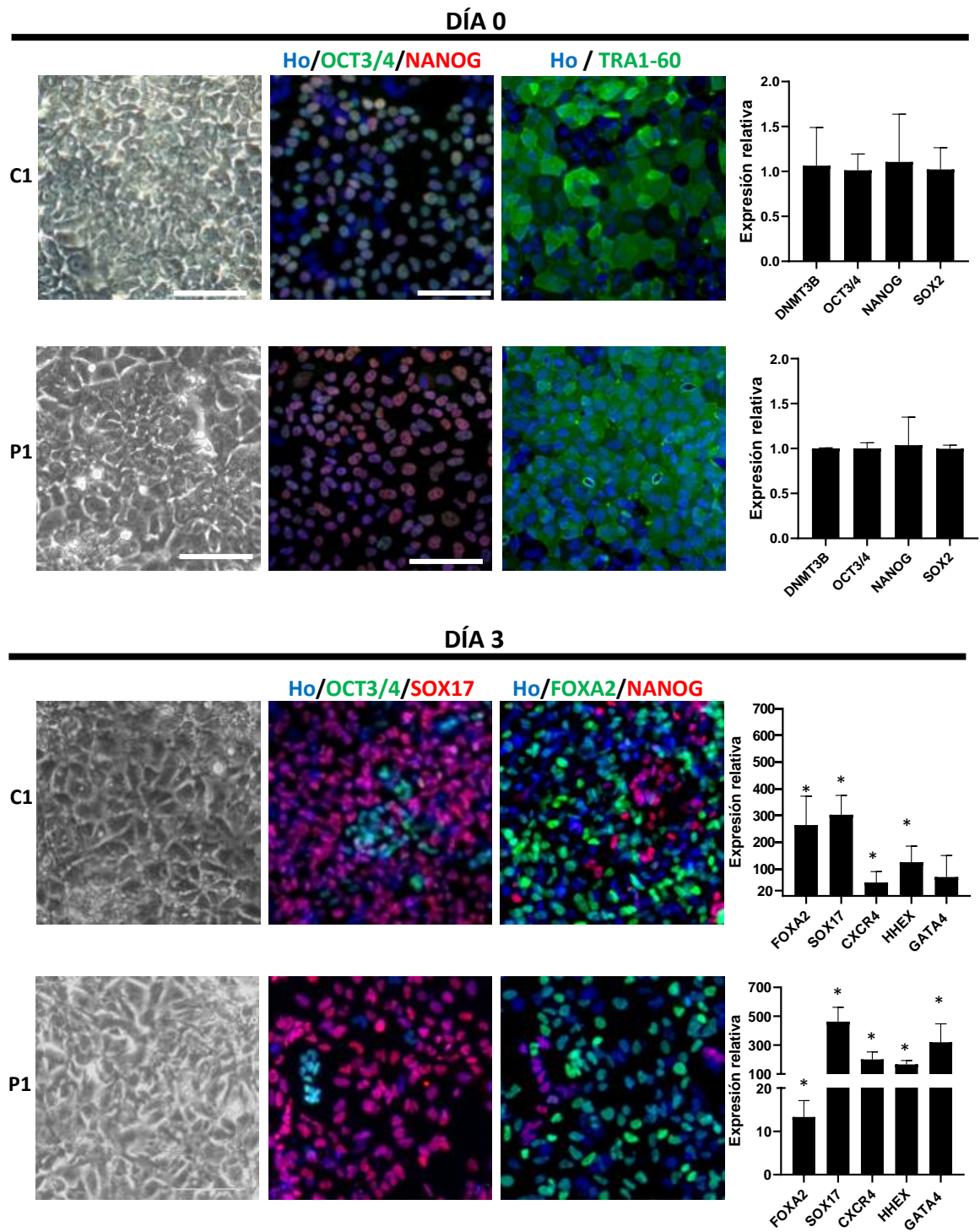


Figura 4.7. Caracterización del proceso de diferenciación desde pluripotencia (día 0) a estadio de endodermo definitivo (día 3). Análisis por microscopía de contraste de fases, IF, y RT-qPCR a días 0 y 3 de C1 y P1. Los datos transcripcionales corresponden a los niveles de mRNA medidos en distintas diferenciaciones de las líneas iPSC C1 y P1 y se presentan como la media de los niveles de expresión respecto a día 0 \pm DS (n=4). Prueba t-student para muestras pareadas, * $p < 0,05$ respecto a día 0. Barra de escala = 100 μ m (aplica a todas las imágenes). Ho = Hoechst.

DÍA 9

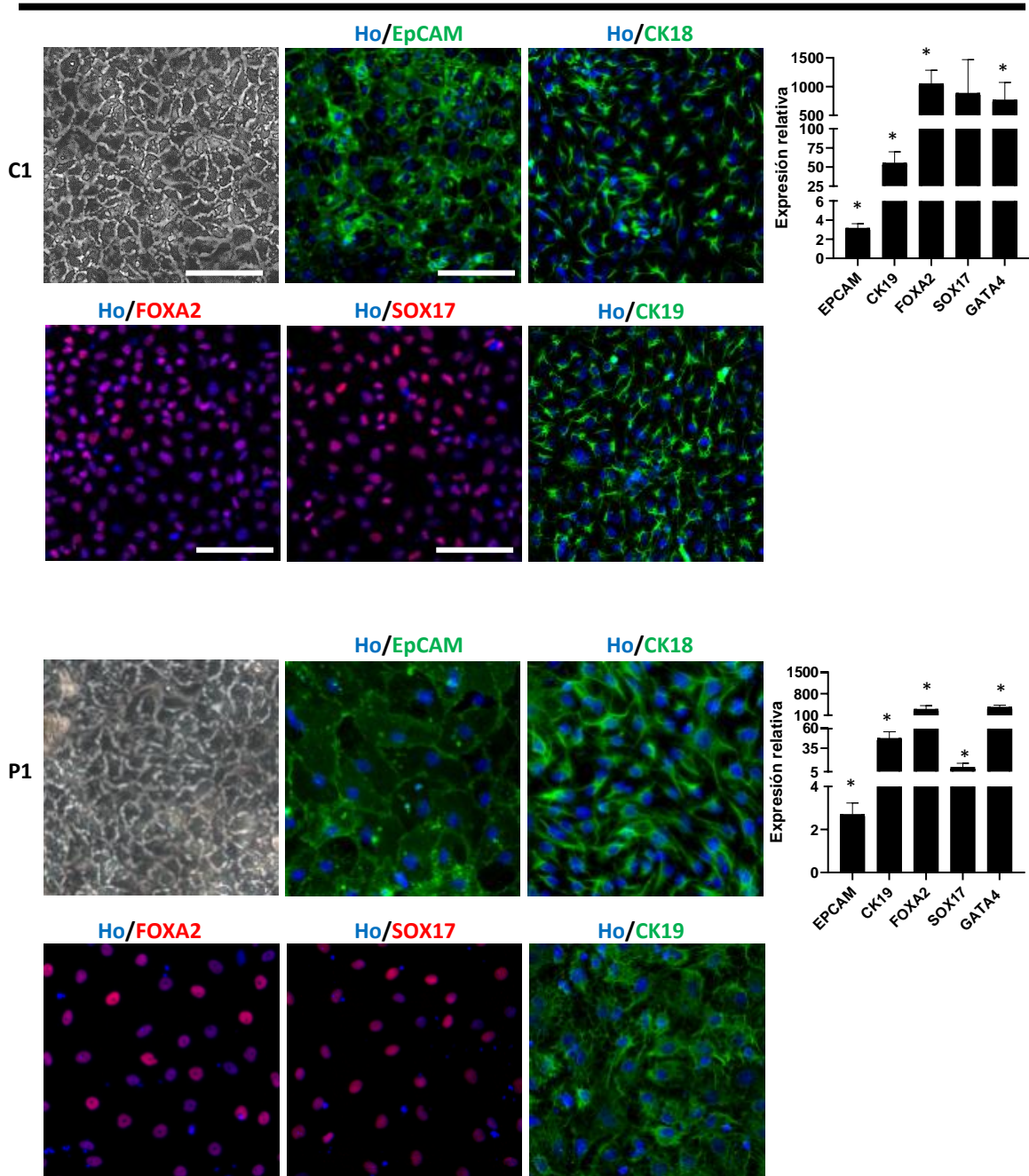


Figura 4.8. Caracterización del proceso de diferenciación en estadio hepatoblasto (día 9). Análisis por microscopía de contraste de fases, IF y RT-qPCR a día 9 de C1 y P1. Los datos transcripcionales corresponden a los niveles de mRNA medidos en distintas diferenciaciones de las líneas iPSC C1 y P1 y se presentan como la media de los niveles de expresión respecto a día 0 \pm DS (n=4). Prueba t-student para muestras pareadas, * $p < 0,05$ respecto a día 0. Barra de escala = 100 μ m (aplica a todas las imágenes). Ho = Hoechst.

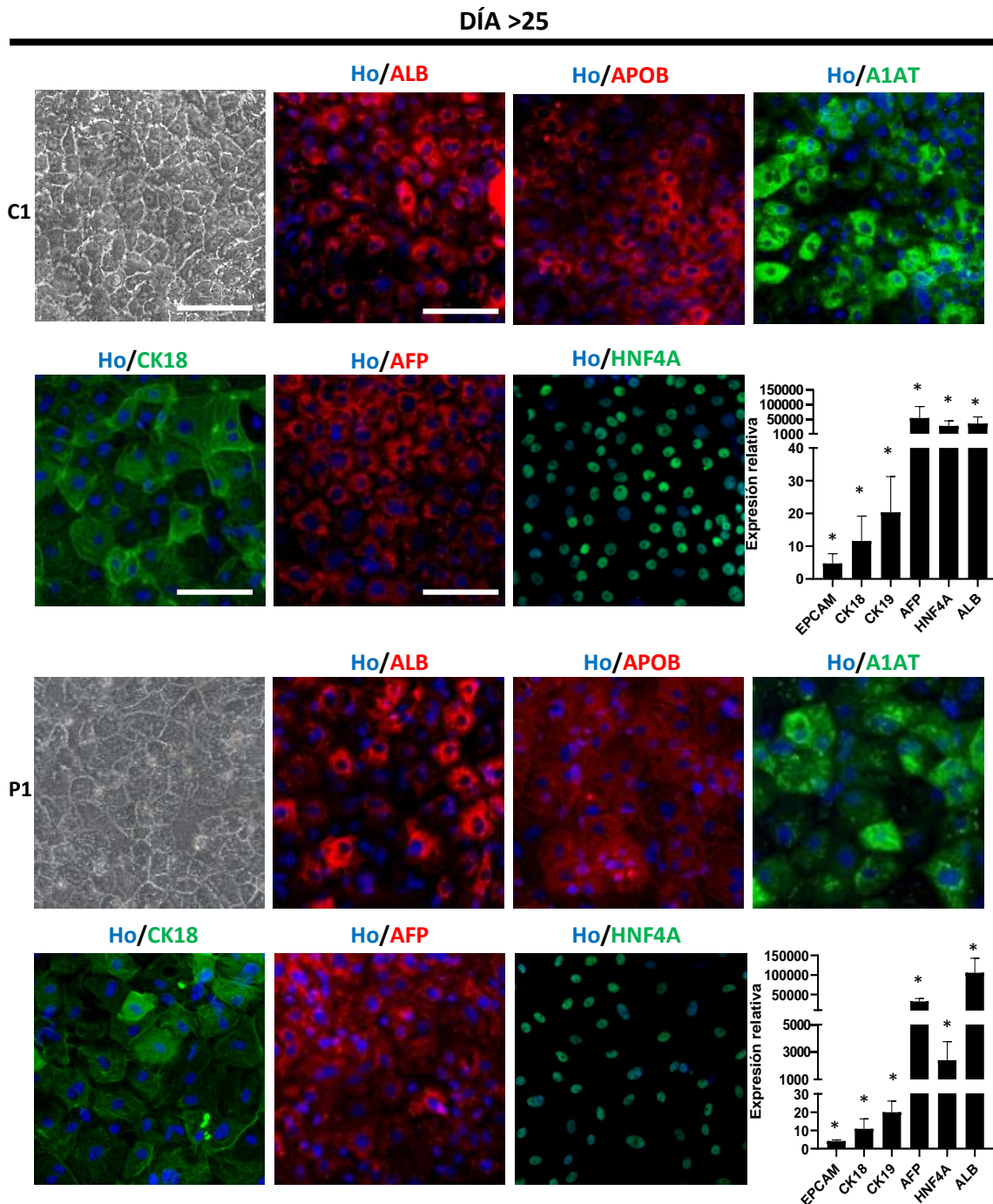


Figura 4.9. Caracterización del proceso de diferenciación en estadio hepatocito (día >25). Análisis por contraste de fases, IF y RT-qPCR a día 9 de C1 y P1. Los datos transcripcionales corresponden a los niveles de mRNA medidos en distintas diferenciaciones de las líneas iPSC C1 y P1 y se presentan como la media de los niveles de expresión respecto a día 0 ± DS (n=4). Prueba t-student para muestras pareadas *p<0,05 respecto a día 0. Escala de barra = 100 µm (aplicada a todas las imágenes). Ho = Hoechst.

El proceso de diferenciación se monitorizó en los días clave de cada una de las etapas (días 0, 3, 9 y >25). En primer lugar, se realizó un seguimiento mediante microscopía de contraste de fase que evidenció la transformación morfológica de las células durante el proceso de diferenciación (Figuras 4.7 a 4.9). Se observó una evolución desde una

morfología típica de célula pluripotente con un ratio núcleo:citoplasma elevado (día 0), a una morfología espinosa propia de las células del endodermo definitivo (día 3) (Figura 4.7). En el estadio de hepatoblasto (día 9) las células adquieren una morfología epitelial (Figura 4.8) que evoluciona hacia la morfología poligonal con núcleo redondeado característica del hepatocito en la etapa final de la diferenciación (día >25) (Figura 4.9).

Los resultados de IF y RT-qPCR mostraron la detección de los marcadores específicos de cada una de las etapas de la diferenciación (Figuras 4.7 a 4.9). A día 0, se observó por IF la expresión de marcadores típicos del estadio pluripotente como TRA1-60, OCT3/4 y NANOG. Los resultados transcriptómicos confirmaron la expresión de marcadores específicos de pluripotencia y también mostraron la variabilidad en los niveles de expresión de *DNMT3B*, *OCT3/4*, *NANOG* y *SOX2* existente entre las diferentes preparaciones (cultivos) de una misma línea iPSC, pudiéndose observar una mayor variabilidad en el donante C1 (Figura 4.6).

La presencia de los marcadores OCT3/4 y NANOG disminuyó en la fase de endodermo (día 3 en comparación con día 0), tal y como se observa en las imágenes de IF, si bien aún fue posible detectar pequeñas agrupaciones de células que conservaban la expresión de estos marcadores de pluripotencia. A pesar de ello, en esta etapa se detectó la expresión de marcadores específicos de endodermo tanto a nivel proteico (*FOXA2*, *SOX17*) como transcripcional (*FOXA2*, *SOX17*, *HHEX*, *CXCR4* y *GATA4*). Se apreciaron diferencias de expresión entre donantes, con niveles de expresión de *FOXA2* menores en el donante P1 respecto al donante C1, en contraposición con los niveles de *CXCR4* y *GATA4* que fueron mayores en P1. No obstante, la expresión génica de los marcadores de endodermo analizados aumentó con respecto al inicio de la diferenciación, evidenciando un aumento significativo de los niveles de mRNA de *FOXA2*, *SOX17*, *HHEX* y *CXCR4* en ambos donantes y de *GATA4* en P1 (Figura 4.7).

Tal y como muestran los resultados de IF y mRNA (Figura 4.8), a día 9 comenzó a apreciarse la presencia de marcadores característicos del estadio de hepatoblasto como CK19 o EpCAM en las células de ambos donantes, aunque también se detectaron marcadores *FOXA2*, *GATA4* o *SOX17*, siendo para este último la expresión génica visiblemente mayor para el donante C1 que para P1.

Finalmente, tras 25 días de diferenciación, las células expresaban marcadores propios de hepatocitos como HNF4A, ALB, CK18, APOB, AFP o A1AT con niveles significativamente elevados de expresión génica de todos en ambos donantes (Figura 4.9). Si bien las HLC del donante P1 mostraban menor expresión de *HNF4A* que las de C1, el resto de marcadores hepáticos mostraron niveles similares en ambos donantes.

Las figuras 4.10 y 4.11 visualizan la evolución comparativa del perfil de expresión génica de los marcadores característicos de cada uno de los estadios (pluripotencia, endodermo, hepatoblasto, hepatocito) durante el proceso completo de diferenciación de las células de los donantes C1 y P1.

Los marcadores de pluripotencia disminuyeron de forma continua a lo largo de todo el proceso de diferenciación hasta ser prácticamente indetectables a día final (día 25) (Figura 4.10). No obstante, esta caída fue más rápida en las células del donante P1 para las que ya se detectaban niveles de expresión génica muy reducidos para *DNMT3B*, *OCT3/4* y *SOX2* a día 3 y, aunque la expresión continuó disminuyendo en el resto de etapas, no se observaron diferencias significativas entre ellas. Por el contrario, el donante C1 mostró una disminución paulatina de los marcadores de pluripotencia, de modo que los niveles medidos a día 25 fueron significativamente más bajos que los detectados en etapas anteriores (días 3 y 9).

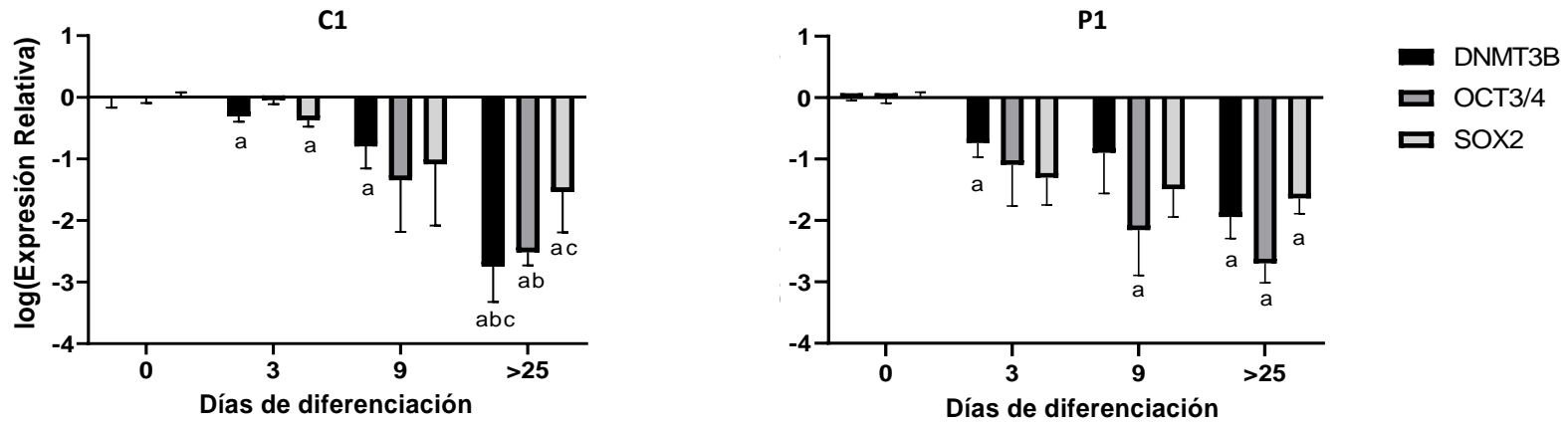
En las células de ambos donantes se observó un aumento significativo de la expresión génica de marcadores de endodermo a partir del día 3 (Figura 4.10). En concreto para el donante P1 los niveles de expresión máxima de los genes *SOX17*, *CXCR4*, *HHEX* y *GATA4* se alcanzaron a día 3. Estos niveles se mantuvieron durante el resto del proceso para *GATA4*, mientras que los de *SOX17*, *CXCR4* y *HHEX* disminuyeron en las siguientes etapas, con un repunte de expresión de *CXCR4* a día >25. Excepcionalmente, la expresión de *FOXA2* alcanzó el nivel máximo a día 9 y decayó a día >25. Para el donante C1, la expresión de *FOXA2*, *SOX17* y *HHEX* experimentó un aumento muy acusado a día 3 y se mantuvo elevadas hasta la etapa final de la diferenciación; mientras que los niveles más elevados de mRNA de *GATA4* y *CXCR4* se alcanzaron de forma más tardía.

Los marcadores de hepatoblasto mostraron un perfil similar en ambos donantes con un aumento progresivo hasta alcanzar los niveles más elevados de mRNA de *CK19* y de *EpCAM* a día 9 y día >25, respectivamente (Figura 4.11).

Finalmente, respecto a la evolución de los marcadores hepáticos es destacable mencionar que, mientras en el donante C1 solo se observó un aumento significativo de la expresión una vez completado el proceso de diferenciación (día >25), en el donante P1 el aumento empezó en etapas anteriores (*CK18* a día 3 y *HNF4A*, *ALB* y *AFP* a día 9) y se mantuvo en niveles similares hasta el final de la diferenciación (Figura 4.11). A pesar de estas diferencias en el perfil temporal, el nivel de expresión génica a día >25 en ambos donantes fue similar para todos los marcadores de hepatocito, con excepción de *HNF4A* que presentó niveles más bajos en P1 que en C1.

En definitiva, a lo largo del proceso de diferenciación celular se observó la pérdida de marcadores de pluripotencia, al tiempo que iban apareciendo el resto de los marcadores indicadores de la diferenciación a fenotipo hepático. Si bien se observaron ciertas diferencias entre donantes en el perfil temporal de los marcadores (por ejemplo, la desaparición de marcadores de endodermo y la aparición de marcadores de hepatoblasto fue, en general, más temprana en el caso del donante P1 que en C1), en la etapa final de diferenciación las células de ambos donantes mostraron un nivel de expresión similar para la mayoría de los genes.

PLURIPOTENCIA



ENDODERMO

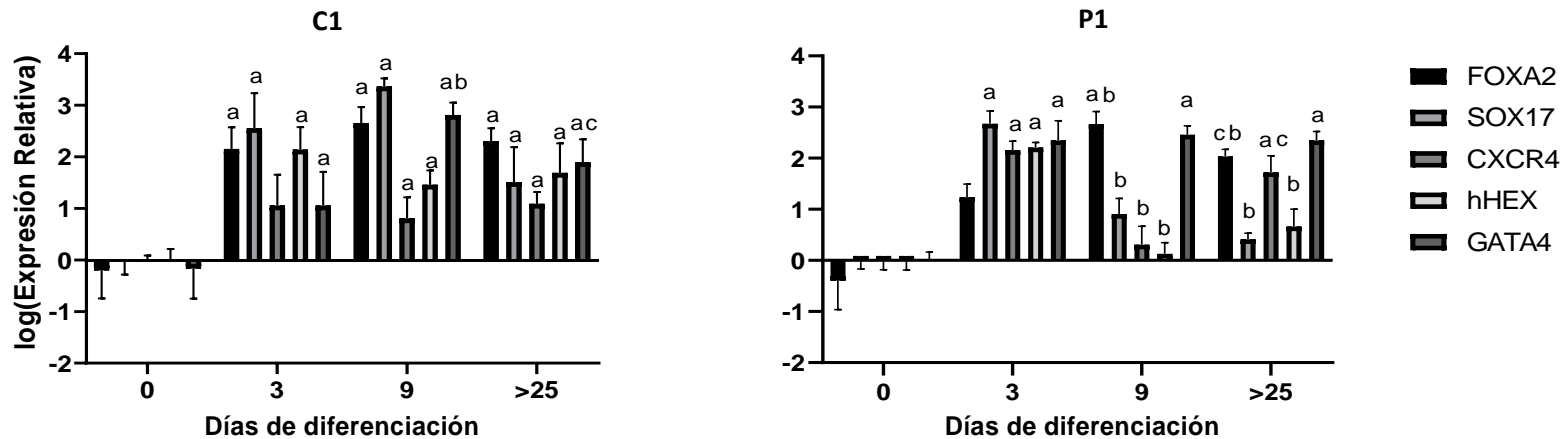
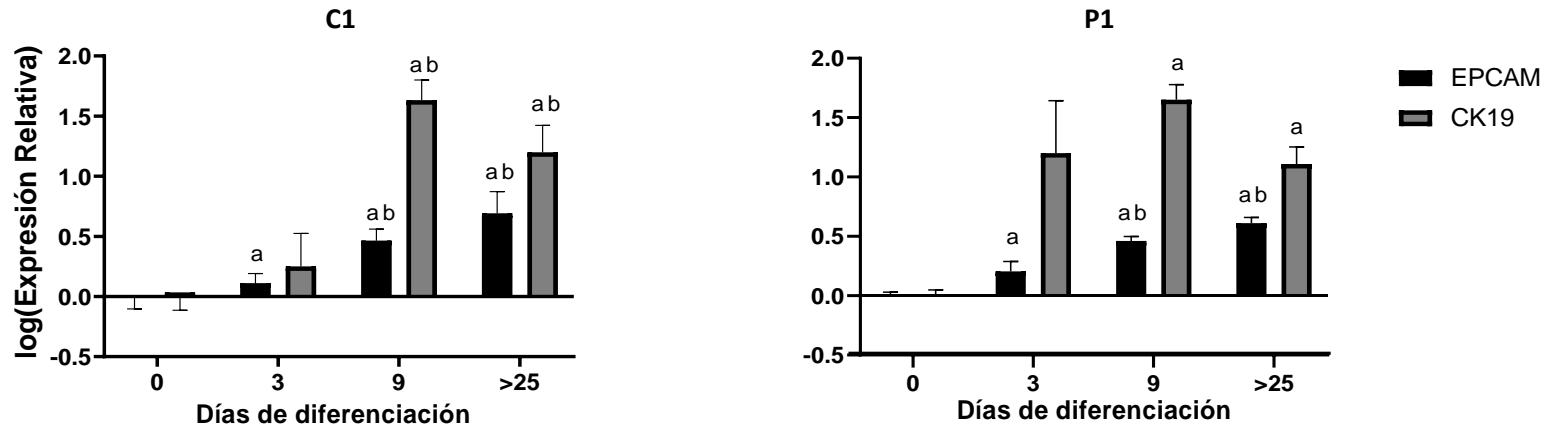


Figura 4.10. Evolución de la expresión génica de marcadores característicos de pluripotencia y de la etapa de endodermo en el proceso de diferenciación de los donantes C1 y P1. Los datos transcripcionales se presentan como la media de los niveles de expresión respecto a día 0 \pm DS (C1 n=6; P1 n=5). ANOVA de 1 factor de medidas repetidas post-hoc Bonferroni, ^a $p < 0,05$ respecto a día 0; ^b $p < 0,05$ respecto a día 3; ^c $p < 0,05$ respecto a día 9.

HEPATOBLASTO



HEPATOCITO

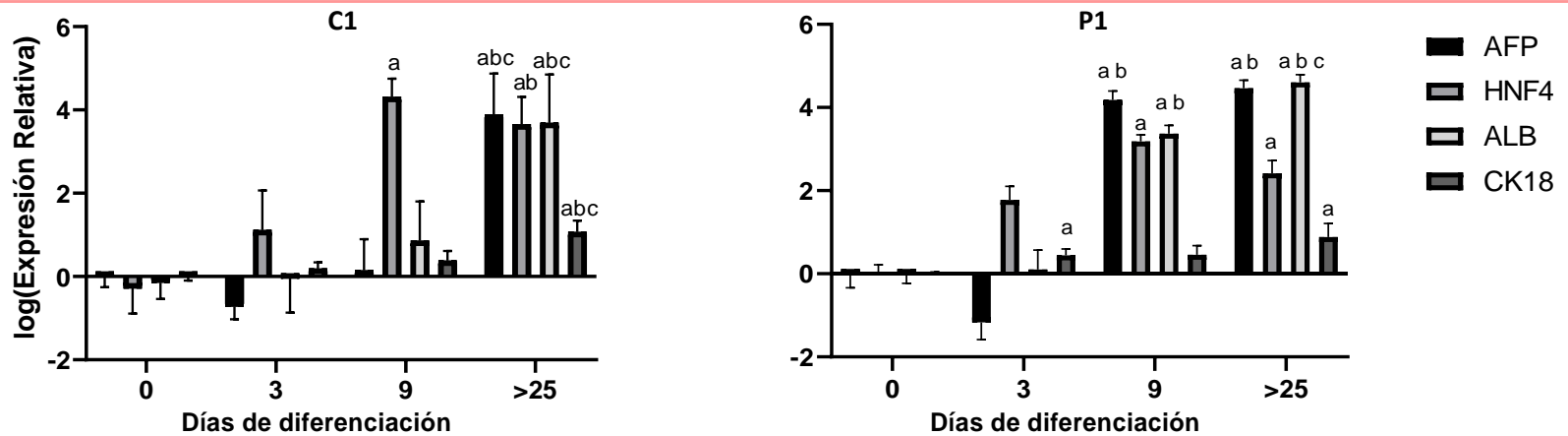


Figura 4.11. Evolución de la expresión génica de marcadores característicos de las etapas de hepatoblasto y hepatocito en el proceso de diferenciación de los donantes C1 y P1. Los datos transcripcionales se presentan como la media de los niveles de expresión respecto a día 0 \pm DS (C1 n=6; P1 n=3). ANOVA de 1 factor de medidas repetidas post-hoc Bonferroni, ^ap<0,05 respecto a día 0; ^bp<0,05 respecto a día 3; ^cp<0,05 respecto a día 9.

Para visualizar los cambios en la expresión experimentados durante la diferenciación por el conjunto de todas las células generadas en nuestro estudio, la figura 4.12 muestra de forma comparativa la evolución de la expresión génica de un marcador representativo de pluripotencia como *OCT3/4* y de un marcador hepático representativo como *AFP* en el conjunto de todas diferenciaciones llevadas a término de a partir de las iPSC de cinco donantes (C1, C2, C3, C4 y P1). Como era de esperar, se observa que a medida que el marcador de pluripotencia decae durante el proceso de diferenciación, el perfil hepático aumenta (Figura 4.12).

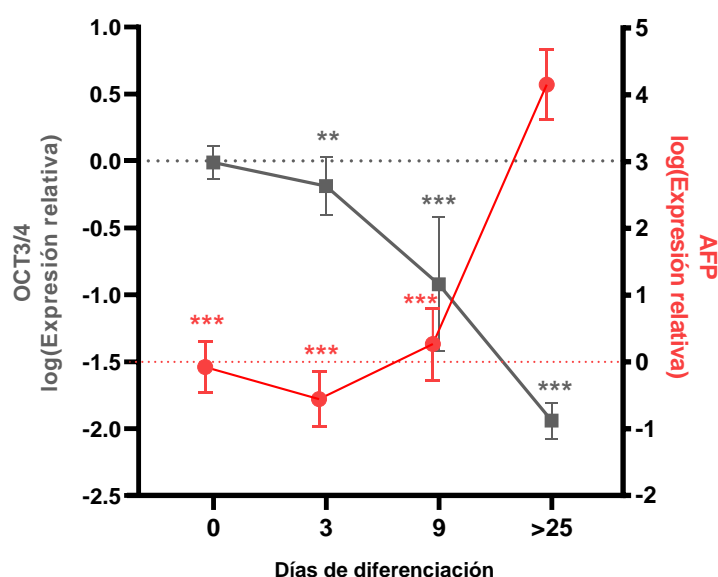


Figura 4.12. Evolución de la expresión génica de marcadores representativos de pluripotencia y de fenotipo hepático durante el proceso de diferenciación de los donantes C1 a C4 y P1. Los datos transcripcionales se presentan como la media de los niveles de expresión respecto a día 0 ± DS (n=23). ANOVA de 1 factor con post-hoc Tuckey, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; en gris se muestra la comparativa con respecto a día 0; en rojo se muestra la comparativa con respecto a día >25.

4.3. Caracterización de las HLC.

4.3.1. Caracterización transcripcional de las HLC.

Con el objetivo de comparar el perfil transcriptómico de las HLC y de las células pluripotentes se llevó a cabo un análisis de RNAseq. En este estudio se incluyeron muestras de las HLC obtenidas a partir de todos los donantes control (varias diferenciaciones para cada donante) y sus correspondientes iPSC, así como de la línea VAL9 de células progenitoras de origen embrionario y sus HLC.

Inicialmente, para visualizar los datos se realizó un *heatmap* de agrupación jerárquica de las muestras analizadas utilizando los 2000 genes diferencialmente expresados (DEG) (Figura 4.13). Se observó una clara separación de grupos entre las muestras procedentes de las HLC y de las iPSC. Así mismo se observó que las HLC procedentes de la línea VAL9 se diferenciaban jerárquicamente del resto de HLC y éstas, a su vez, se agrupaban según el donante, a excepción de una de las diferenciaciones del donante C3 cuyo perfil se agrupaba con las HLC del donante C2. No obstante, a pesar de las posibles diferencias observadas entre donantes y entre las diferenciaciones de cada línea, los resultados muestran que el perfil transcriptómico de las HLC es claramente diferente al de las células pluripotentes.

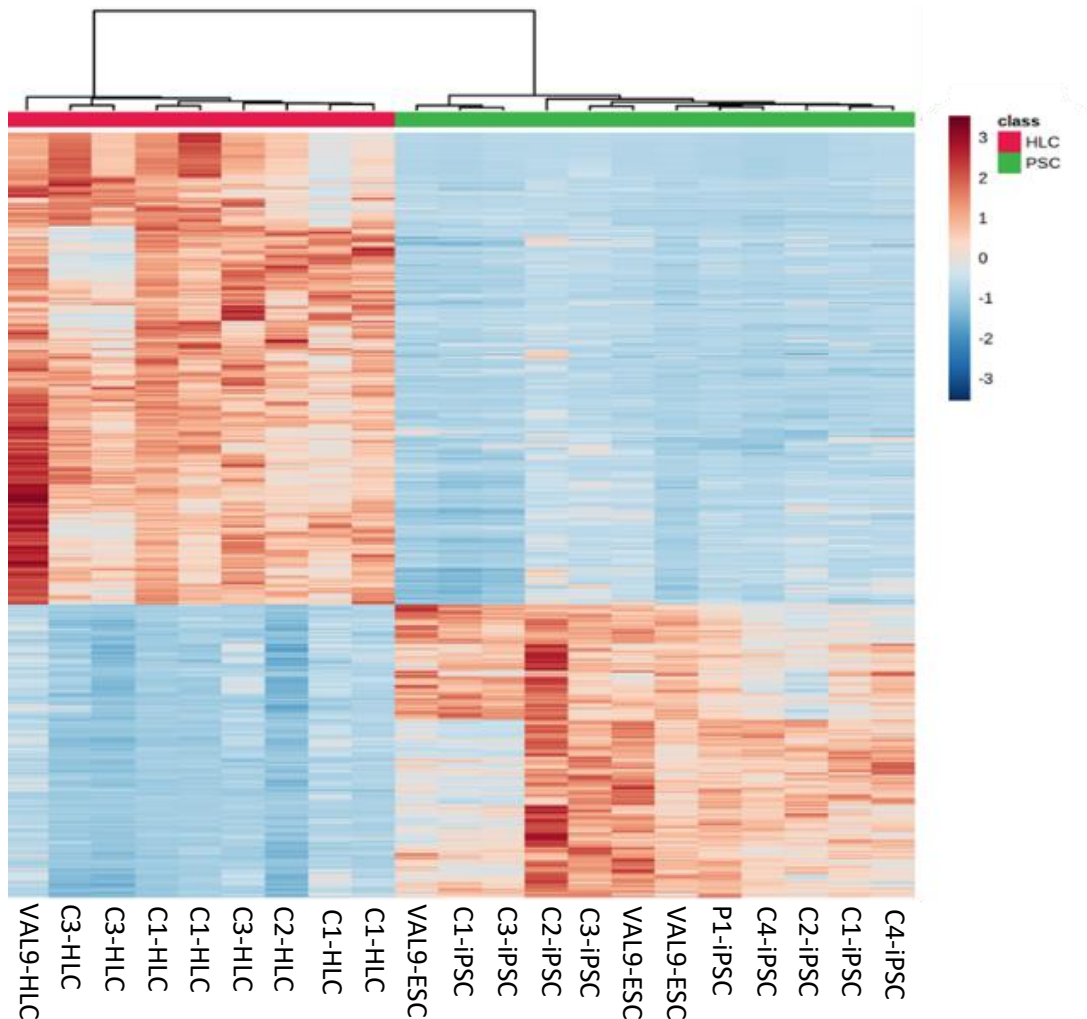


Figura 4.13. Heatmap de los DEG obtenidos a partir del análisis de RNAseq de distintas diferenciaciones de iPSC a HLC. En rojo se muestran los genes significativamente sobreexpresados y en azul los significativamente infraexpresados.

Posteriormente, se realizó un *Volcano plot* para identificar rápidamente los cambios significativos en los datos obtenidos en el RNAseq y, en concreto, determinar el número de genes regulados hacia arriba o hacia abajo cuando se comparaban los dos grupos experimentales (Figura 4.14).

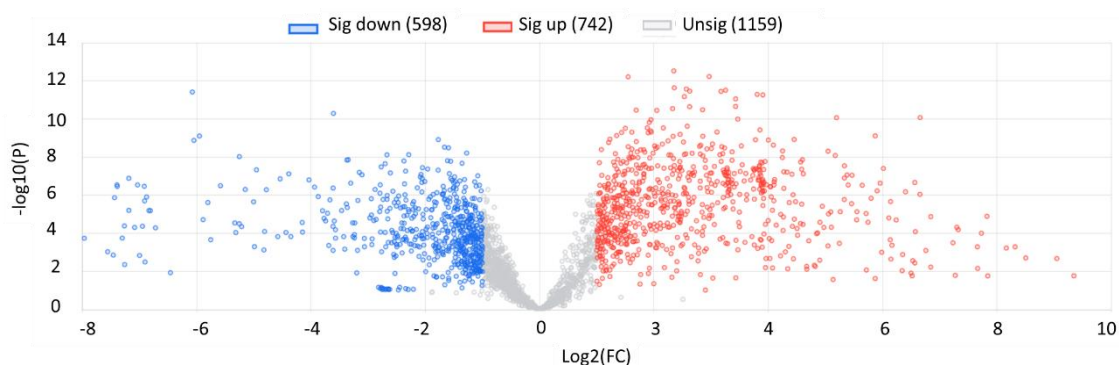


Figura 4.14. A) Volcano plot que muestra la distribución de los DEG cuando comparamos PSC con HLC. Los DEGs quedan representados como puntos rojos (genes sobreexpresados) y puntos azules (genes infraexpresados), mientras que los puntos grises representan genes no diferencialmente expresados. El eje X corresponde al \log_2 de la expresión relativa (fold change, FC) entre PSC y HLC y el eje Y corresponde al $-\log_{10}$ del P_valor.

Se identificaron un total de 2499 DEG de los cuales 598 estaban sobreexpresados y 742 infraexpresados de forma significativa en las HLC. El análisis de los genes sobre o infraexpresados en la comparativa de los dos grupos celulares permitió establecer rutas significativamente moduladas en el proceso de diferenciación a fenotipo hepático. En concreto, las vías moduladas están relacionadas con la interacción ECM-receptor celular, la adhesión celular y el ciclo celular, así como diferentes vías metabólicas, especialmente aquellas implicadas en la obtención de energía (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Análisis de enriquecimiento KEGG: vías celulares representativas moduladas en función de los genes diferencialmente expresados en PSC y HLC.

Nº	Vías celulares	Genes
1	Interacción receptor-ECM	<i>AGRN, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL4A6, COL5A1, COL5A2, COL6A3, FN1, HMMR, HSPG2, ITGA1, ITGA3, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB6, LAMA1, LAMA3, LAMA5, LAMB1, LAMB2, LAMC1, LAMC2, SDC2, SDC4, THBS1, TNC, VTN.</i>
2	Adhesión focal	<i>AKT1, ARHGAP5, CAPN2, CAV2, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL4A6, COL5A1, COL5A2, COL6A3, DIAPH1, EGFR, ERBB2, FLNB, FLNC, FN1, ITGA1, ITGA3, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB6, JUN, KDR, LAMA1, LAMA3, LAMA5, LAMB1, LAMB2, LAMC1, LAMC2, MYL12A, MYL12B, MYL2, MYL9, PAK1, PARVA, PPP1CC, SRC, THBS1, TLN1, TNC, VTN.</i>
3	Lisosoma	<i>AP1S2, ASAH1, ATP6AP1, CD164, CD63, CLTB, CTSB, CTSC, CTSH, CTSL, CTSZ, ENTPD4, GBA, GLB1, GNS, HEXB, HGSNAT, IGF2R, LAMP1, LAMP2, LAPTM4A, LAPTM4B, MANBA, NEU1, PPT1, SCARB2, SORT1, TPP1.</i>
4	Ciclo celular	<i>ANAPC1, BUB1, BUB1B, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CDC20, CDC25A, CDC6, CDK6, CDKN1A, CDKN2B, HDAC2, MAD2L2, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, PCNA, PLK1, PRKDC, PTTG1, SMAD3, TGFB1, TGFB2, TP53.</i>
5	Metabolismo de la galactosa	<i>AKR1B1, B4GALT1, GLB1, HK1, PFKP, UGP2.</i>
6	Vía de señalización Notch	<i>CTBP2, DVL3, HDAC2, JAG1, NCSTN, NOTCH1, NOTCH2, PSEN1, RBPJ.</i>
7	Metabolismo de la cisteína y la metionina	<i>ADI1, AHCY, CBS, DNMT1, DNMT3B, MAT2A, SRM</i>
8	Uniones adherentes	<i>EGFR, ERBB2, FGFR1, LMO7, NECTIN1, NECTIN2, PTPRF, PTPRM, SMAD3, SNAI2, SRC, TCF7L1.</i>
9	Metabolismo de amino y nucleótido azúcares	<i>CYB5R3, GFPT2, GPI, HEXB, HK1, PGM3, UGP2.</i>
10	Metabolismo de Alanina, aspartato y glutamato	<i>CAD, GFPT2, GLS, GLUD1, PPAT.</i>
11	Metabolismo del glutatión	<i>ANPEP, GSTA1, GSTA2, GSTO1, IDH2, ODC1, SRM.</i>
12	Regulación del citoesqueleto de actina	<i>ABI2, ARPC3, ARPC5, DIAPH1, EGFR, BFGF, FGFR1, FN1, GSN, ITGA1, ITGA3, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB6, MYH9, MYL12A, MYL12B, MYL2, MYL9, PAK1, PPP1CC, RDX, RRAS2.</i>
13	Vía de las pentosa-fosfato	<i>GPI, PFKP, PRPS1, TKT.</i>
14	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados	<i>ACAA1, ACOT7, HACD2.</i>
15	Metabolismo de glicina, serina y treonina	<i>CBS, PHGDH, PSAT1, SHMT2.</i>
16	Glicólisis/Gluconeogénesis	<i>ALDH7A1, ENO2, GPI, HK1, PFKP, PGAM1, TPI1.</i>
17	Metabolismo de la fructosa y manosa	<i>AKR1B1, HK1, PFKP, TPI1.</i>
18	Metabolismo del piruvato	<i>ACACA, AKR1B1, ALDH7A1, GLO1.</i>
19	Metabolismo de ácidos grasos	<i>ACAA1, ACADVL, ALDH7A1.</i>
20	Vía de señalización de la insulina	<i>ACACA, AKT1, CBL, EIF4EBP1, HK1, IRS1, PPP1CC, PTPRF, PYGB, SOCS2.</i>

Con el fin de determinar si las HLC, además de expresar marcadores hepáticos clásicos (*HNF4A*, *CK18*, *CK19*, *AFP*), eran capaces de expresar otros genes relacionados con vías metabólicas típicamente hepáticas, se evaluó la expresión de 21 genes implicados en el metabolismo de los lípidos, el nitrógeno, la glucosa y los ácidos biliares, en la detoxificación y en la defensa antioxidante. Los resultados mostraron que, a diferencia de las iPSC, las HLC de todos los donantes expresaban genes que intervienen en rutas metabólicas características del hígado (Figura 4.15). Se apreciaron ciertas diferencias entre donantes, con un perfil de expresión muy similar para los donantes C1 y C3. No obstante, para todos los donantes, es destacable la expresión de los genes *APOC3* y *APOB*, ambos implicados en el metabolismo lipídico, cuyos niveles resultaron ser de los más elevados del panel, sugiriendo que el metabolismo de las apolipoproteínas se encontraba activo en las HLC. Por otra parte, la expresión de *PPAR α* , implicado en el control de la β -oxidación lipídica, entre otros procesos, también se detectó en las HLC. Asimismo, se pudo observar la expresión del gen *OTC* implicado en el ciclo de la urea, lo que sugiere que la función de detoxificación del amonio mediante su conversión en urea, una función característica de los hepatocitos, que también debería estar presente en las HLC.

Las HLC también mostraron expresión de genes implicados en el transporte y metabolismo de AB (Figura 4.15), tales como *BSEP*, *BAAT* y *NTCP*, siendo este último el que presentaba mayor expresión. Si bien se advierte una diferencia en la expresión del gen *NTCP* entre los donantes, se puede percibir que aquellos donantes con una menor expresión de *NTCP* en las HLC (como C2 y P1), eran también las que mostraban una menor expresión en las iPSC de partida, de manera que el incremento podría ser similar para todos los donantes. Esto mismo también se observó para el gen que codifica el enzima de fase II *GSTA1*, el cual tiene un papel destacado en el proceso de detoxificación de fármacos y otros xenobióticos.

Con respecto a los genes que codifican para otras proteínas con una función relevante en la biotransformación de fármacos, como el transportador *MRP2* y los enzimas *CYP450*, las HLC mostraron niveles de expresión similares para todos los donantes, sugiriendo que las HLC podrían ser capaces de llevar a cabo la detoxificación de compuestos exógenos. Es notorio mencionar que el gen *GPX2*, codificante del enzima

glutati6n peroxidasa 2 espec6fico del tejido hep6tico, tambi6n posee niveles elevados de expresi6n g6nica en las HLC (Figura 4.15).

Finalmente, los marcadores de pluripotencia *OCT3/4* y *NANOG* mostraron menor expresi6n en las HLC que en las iPSC, tal y como ya se hab6a evidenciado durante la caracterizaci6n del proceso de diferenciaci6n.

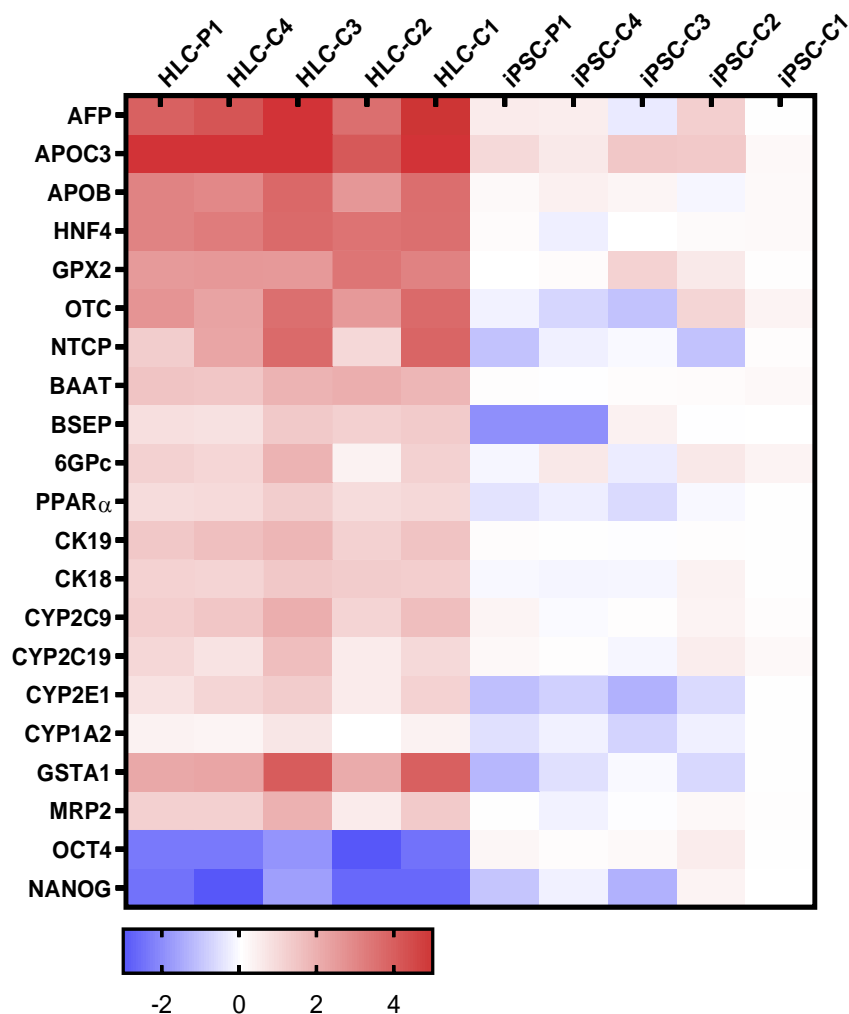


Figura 4.15. Heatmap de la expresi6n de genes implicados en rutas metab6licas hep6ticas en iPSC y sus respectivas HLC. Los datos se encuentran normalizados a iPSC del C1 y se expresan como log (expresi6n relativa); n=4.

4.3.2. Caracterizaci6n metabol6mica de las HLC

Para determinar el nivel de diferenciaci6n alcanzado, se analiz6 el metaboloma de las c6lulas pluripotentes en comparaci6n con las c6lulas diferenciadas a fenotipo hep6tico. Se analizaron diferentes diferenciaciones y donantes para comprobar la homogeneidad de los resultados. El an6lisis mediante PLS-DA permiti6 diferenciar y separar entre las PSC y las HLC, as6 como identificar el conjunto de metabolitos que presentaban mayores

diferencias entre ambos grupos experimentales, siendo el lactato el metabolito que mayor contribución aportaba a dicha diferencia (Figura 4.16).

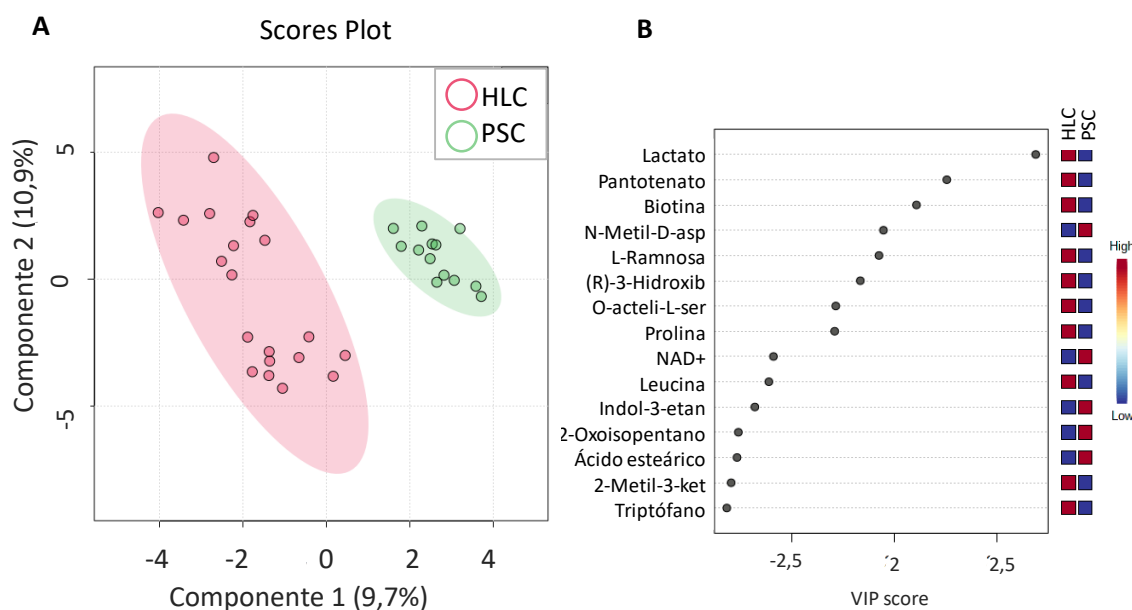


Figura 4.16. Estudio metabonómico en PSC y HLC. A) Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) los metabolitos de las PSC y las HLC para explicar la diferencia entre ambos tipos celulares debido al proceso de diferenciación. El componente 1 y 2 representan una combinación de metabolitos relevantes que proporcionan la mayor variación y permiten agrupar las PSC y las HLC en grupos diferentes. B) VIP score para los 15 metabolitos más importantes identificados en el PLS-DA que diferencian el grupo de PSC de las HLC. Los datos del VIP score se encuentran expresados como la concentración relativa de cada metabolito en cada grupo PSC o HLC en cuadros de colores indican las cantidades relativas de los metabolitos indicados (rojo-azul) siendo el color rojo, mayor cantidad y el azul, menor cantidad.

A partir de los metabolitos discriminantes detectados se determinaron las principales vías metabólicas diferenciales entre las PSC y las HLC y la interacción que existe entre ellas (Figura 4.17). Tal y como observamos en el análisis de enriquecimiento metabólico (Figura 4.17A), las tres vías metabólicas que mayor impacto tienen sobre el metabolismo celular son aquellas implicadas en el metabolismo energético de la glucosa (metabolismo del piruvato, glicólisis anaeróbica y gluconeogénesis). También son destacables otras vías de alto impacto en la red global metabólica como el ciclo del ácido cítrico, el metabolismo de los cuerpos cetónicos o la biosíntesis de ácidos grasos, todas ellas también implicadas en el metabolismo energético celular. La mayoría de estas vías además se encuentran conectadas entre sí (Figura 4.17B).

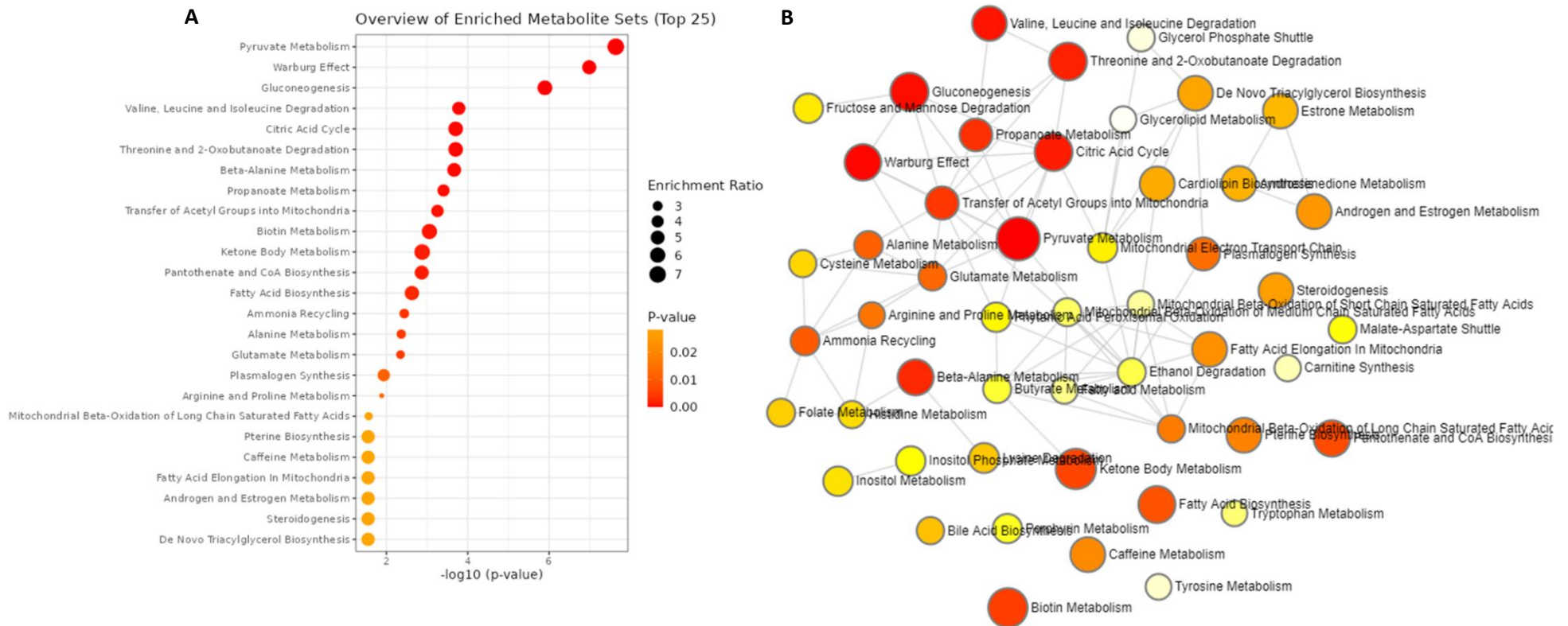


Figura 4.17. Análisis de enriquecimiento metabólico basado en los metabolitos más discriminantes entre las PSC y las HLC. A) En el eje vertical se indican las vías metabólicas implicadas según los metabolitos discriminantes, el p valor de la vía metabólica se representa en el eje horizontal en escala logarítmica y en escala de color amarillo-rojo, siendo el rojo el mayor valor de significancia. B) Red de interacciones de las vías metabólicas implicadas en la discriminación de PSC y HLC en base a los resultados del análisis de enriquecimiento. La interacción entre vías se muestra mediante líneas grises. En ambas representaciones el tamaño y el color de la esfera indica el ratio entre los metabolitos significativos de la vía metabólica sobre el total de metabolitos integrantes de la misma.

4.3.3. Caracterización funcional de las HLC.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el tejido hepático desempeña numerosas funciones bioquímicas de gran importancia para el correcto funcionamiento fisiológico del organismo. Para determinar si las HLC son capaces de recrear la capacidad metabólica de un hepatocito, se llevaron a cabo ensayos que permitieron evaluar algunas de las funciones hepáticas más características, como la síntesis de albúmina, la ureogénesis y el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno.

Se comprobó que las HLC son capaces de sintetizar y secretar albúmina y urea (Tabla 4.2). Se observaron diferencias en función del donante, reflejando la variabilidad interindividual, con valores que oscilaban entre 2,8 y 7,0 ng/h/ μ g RNA y entre 43,9 y 144,6 ng/h/ μ g RNA, para la producción de albúmina y urea, respectivamente.

Tabla 4.2. Producción y secreción de albúmina y urea en HLC.

Donante	Albúmina ^a (ng/h/ μ g RNA)	Urea ^a (ng/24h/ μ g RNA)
C1	2,8 \pm 0,3	52,4 \pm 23,7
C2	7,0 \pm 3,3	43,9 \pm 13,8
C3	5,6 \pm 2,0	49,7 \pm 8,7
C4	3,9 \pm 3,4	144,6 \pm 55,0
P1	5,1 \pm 0,5	72,7 \pm 16,7

^aLos datos se representan como la media \pm DS. n(albúmina)=4; n(urea)=3.

Asimismo, se observó que las HLC de todos los donantes son capaces de almacenar glucógeno, otras de las funciones típicamente hepáticas (Figura 4.18) y se comprobó que la acumulación de glucógeno por parte de las HLC respondía a la acción de las hormonas insulina y glucagón. A modo representativo, la figura 4.19 muestra el aumento de los depósitos de glucógeno en las HLC del donante C3 tras la exposición a insulina (10^{-6} M, 24 h), mientras que el tratamiento con glucagón (10^{-6} M, 24 h) provocó la disminución del glucógeno acumulado.

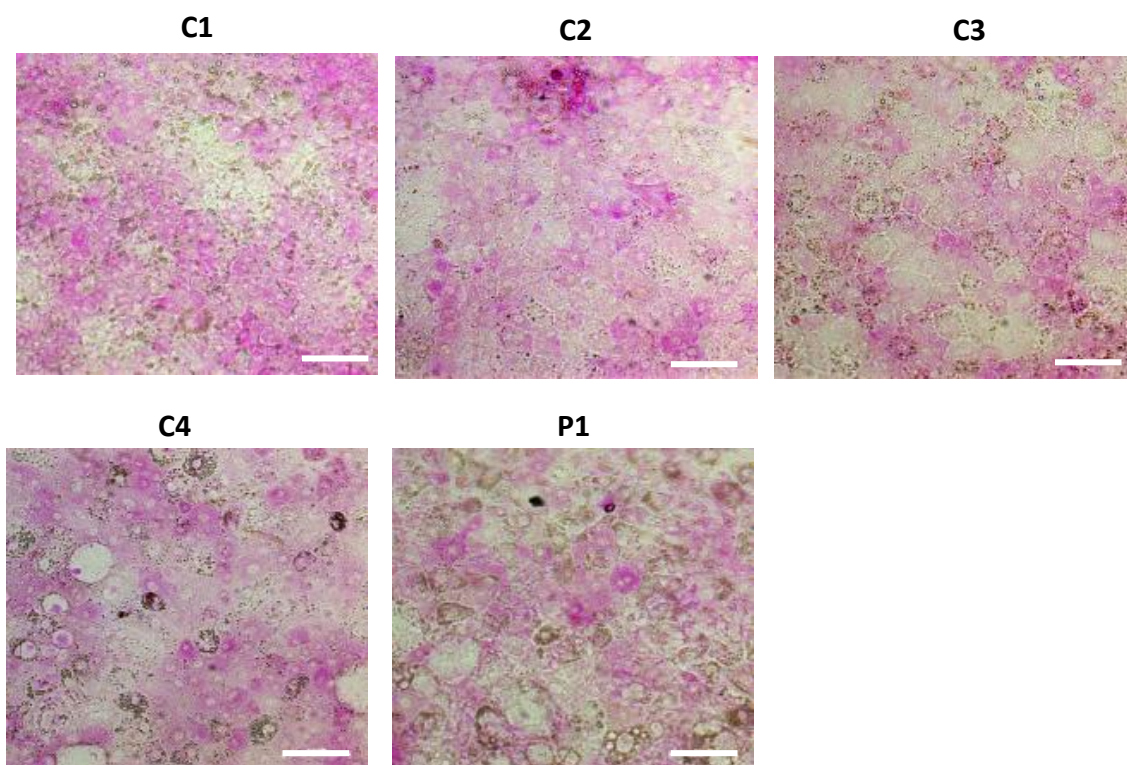


Figura 4.18. Acumulación de glucógeno en las HLC detectada mediante tinción (ácido peryódico-Schiff). Las HLC C1 a C4 y P1 son capaces de almacenar glucógeno (tinción magenta). Barra de escala = 100 μm (aplica a todas las imágenes).

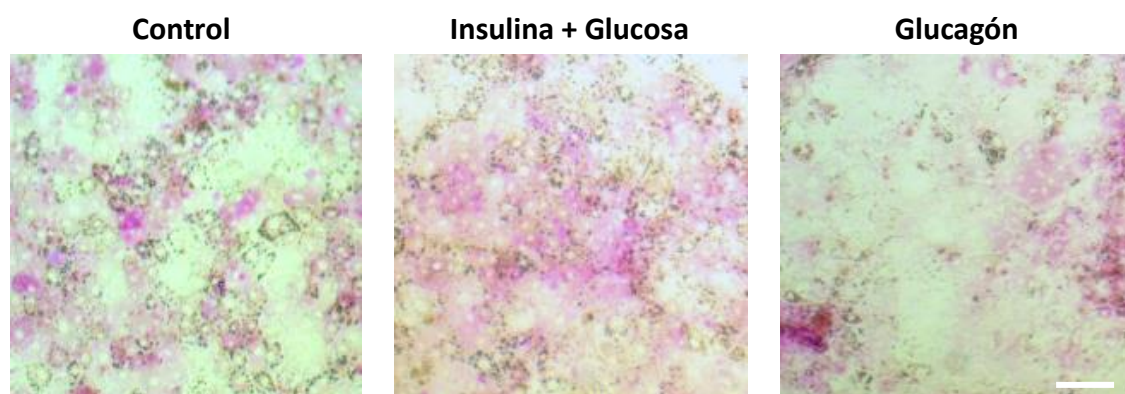


Figura 4.19. Ejemplo representativo del efecto de la insulina y el glucagón en la acumulación de glucógeno (tinción magenta) detectada mediante tinción (ácido peryódico-Schiff) en HLC del donante C3. La exposición durante 24 h a insulina 10^{-6} M en presencia de glucosa 30 mM induce un aumento en el glucógeno almacenado en las células, mientras que el tratamiento con glucagón 10^{-6} M el almacenamiento de glucógeno disminuye. Barra de escala = 100 μm (aplica a todas las imágenes).

4.3.4. Caracterización de la capacidad de metabolización de xenobióticos.

Para completar la caracterización funcional de las HLC se estudió también su capacidad biotransformadora, otra de las funciones más importantes del hígado y de especial relevancia en la eliminación y detoxificación de fármacos y otros xenobióticos.

En primer lugar, se analizó el perfil de actividades de los principales enzimas CYP450 implicados en el metabolismo de fármacos con el objetivo de comprobar si las HLC son capaces de reproducir el perfil metabólico del hígado. Para ello se cuantificaron las actividades CYP1A2, 2B6, 2C19, 2C9, 2D6, 2E1 y 3A4 tanto en las HLC de todos los donantes control como en los microsomas obtenidos a partir de muestras de tejido hepático de esos mismos donantes (Figura 4.20). Tal y como cabía esperar, los niveles de actividad en las HLC fueron más bajos que en tejido hepático. No obstante, cabe destacar que el valor relativo de cada una de las actividades respecto a la actividad total fue similar en las HLC y el tejido hepático de cada donante.

El análisis detallado del perfil metabólico de HLC y del hígado para el donante C1 mostró que los niveles de actividad más elevados correspondían a la actividad CYP2E1 (54,9% y 40,4% para HLC y tejido, respectivamente) seguida de la actividad CYP2C9 (34,7% y 35,6% para HLC y tejido, respectivamente). Con respecto a otras actividades minoritarias, se observó una mayor proporción en el tejido para CYP3A4 (3,3% en HLC y 11,6% en tejido) y CYP2B6 (2,5% en HLC y 6,5% en tejido) y niveles relativos similares (< 3%) para el resto de las actividades. Resultados similares se observaron para el donante C3, con CYP2E1 (46,3% en HLC y 35,6% en tejido) y CYP2C9 (36,6% en HLC y 41,6% en tejido) como los enzimas que presentaban los niveles relativos de actividad más elevados, seguidos en este caso de CYP3A4 (4,2% en HLC y 12,3% en tejido) y CYP1A2 (9,6% en HLC y 8,1 en tejido). Por su parte, el donante C2 mostró un perfil muy diferente al de los donantes anteriores, con una actividad relativa de CYP2C9 muy por encima (86% para HLC y 87,6% para el tejido hepático) del resto de actividades, seguida de CYP3A4 (5,8% en HLC y 7,5% en tejido) y CYP2E1 (4% en HLC y 2,7% en tejido) y niveles de actividad relativa inferiores al 2% para el resto de enzimas. Por último, el perfil metabólico del donante C4 fue similar al de C2, con niveles de actividad relativa de CYP2C9 (88,7% en HLC y 81,9% en tejido) muy por encima al de otros enzimas, seguido de la actividad CYP1A2 (4,0% en HLC y 7,40% en tejido).

En resumen, se pudo comprobar que las actividades relativas de los diferentes enzimas medidos en las HLC de cada uno de los donantes se correspondían con los niveles relativos medidos en el tejido de ese mismo donante. Se observó también que los donantes C1 y C3 mostraron un perfil metabólico muy similar entre sí, siendo las

actividades CYP2C9 y CYP2E1 las que presentaban mayor proporción de actividad, tanto en HLC como en tejido en ambos donantes; mientras que en los donantes C2 y C4 el enzima CYP2C9 presentaban una actividad relativa por encima del 80%, en HLC y tejido. Estos resultados sugieren que las HLC son capaces de reproducir la variabilidad interindividual que muestra la función biotransformadora del hígado.

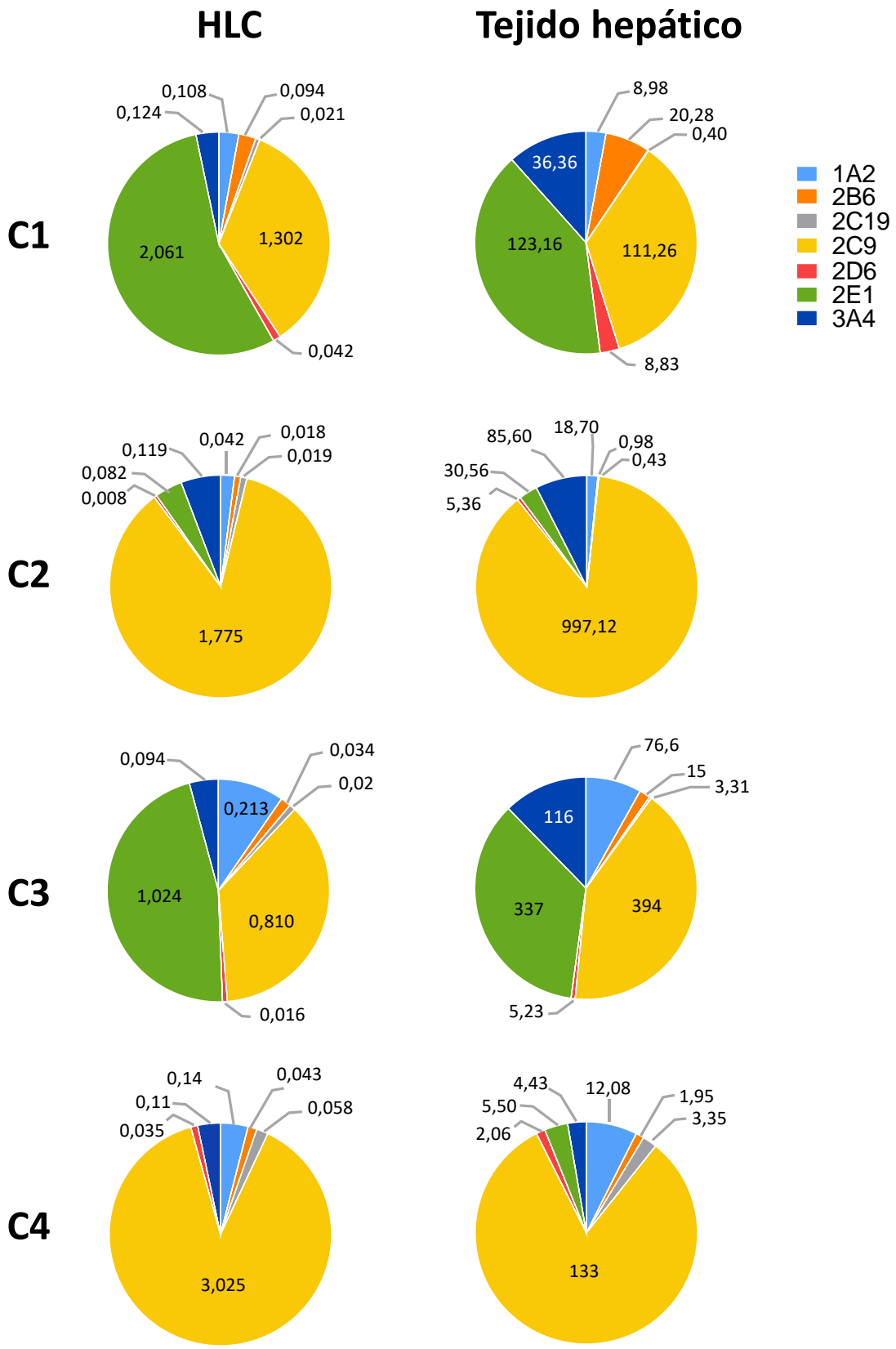


Figura 4.20. Diagrama de sectores de los perfiles metabólicos de los principales CYP450 en HLC y tejido hepático de los donantes C1 a C4. El valor de actividad se indica de forma numérica en cada uno de los sectores y se encuentra expresadas en pmol/h/μg de RNA en HLC y en pmol/min/mg proteína en el tejido hepático. El porcentaje de actividad corresponde a la actividad de cada isoforma del CYP450 con respecto al total de actividades medidas y queda representado en el tamaño de cada sector.

Adicionalmente, también se determinó el perfil de actividades CYP450 para las HLC del donante P1 (Figura 4.21). Los enzimas con actividades predominantes en este donante fueron CYP2E1 (69%) y CYP2C9 (20,6%) seguido de CYP1A2 (5,5%), CYP3A4 (3,4%), CYP2B6 (0,9%) y CYP2D6 (0,6%). No se obtuvieron niveles detectables de la actividad CYP2C19 que, sin embargo, sí había podido ser medida en las HLC de los donantes control.

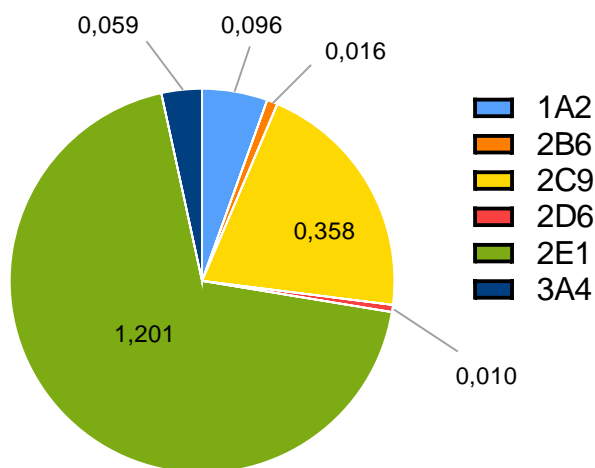


Figura 4.21. Diagrama de sectores del perfil metabólico de los principales CYP450 en HLC del donante P1. El valor de actividad se indica de forma numérica en cada uno de los sectores y se encuentra expresadas en pmol/h/μg de RNA. El porcentaje de actividad corresponde a la actividad de cada CYP450 sobre el total de la actividad detectada y queda representado en el tamaño de cada sector.

Una vez comprobada que las HLC presentaban capacidad biotransformadora, se estudió también su respuesta a inductores típicos de enzimas CYP450. Los resultados obtenidos mostraron que, tras la exposición de las HLC a 3-metilcolantreno, un inductor característico de los enzimas de CYP1A1 y 1A2, los niveles de actividad EROD (representativa de la actividad CYP1A1/2) experimentaron un aumento de entre 8,5 y 19,2 veces (según el donante) con respecto a la actividad medida en células no tratadas con el inductor (Figura 4.22). Además, se comprobó que el aumento de actividad iba acompañado del aumento de los niveles de mRNA de CYP1A1 (entre 20 y 45 veces según el donante) y CYP1A2 (entre 3,7 y 6,3 veces según el donante) (Figura 4.22).

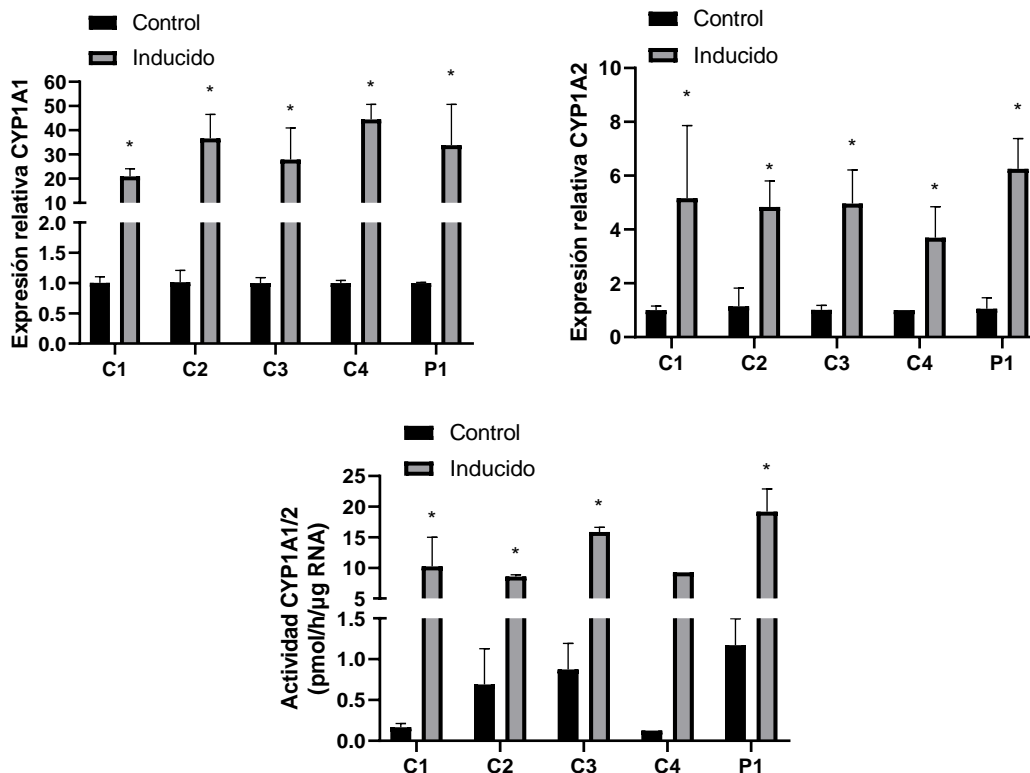


Figura 4.22. Inducción de CYP1A1 y CYP1A2 por 3-metilcolantreno. Tras el tratamiento de las HLC con 3-metilcolantreno 2 μ M se trataron durante 48 h, se midieron los niveles mRNA de CYP1A1 y CYP1A2 (superior) y la actividad CYP1A1/2 (medida como actividad EROD) (inferior). Los datos transcriptómicos de cada donante se encuentran relativizados a su respectivo control (células no expuestas al inductor) al que se asignó valor 1. Los datos se muestran como la media \pm DS (n=2). Prueba t-student, *p<0,05.

Asimismo, se comprobó que el tratamiento de HLC con fenobarbital se tradujo en un aumento significativo de la actividad CYP2B6, a excepción del donante C3 (Figura 4.23). En este último, si bien no se observan cambios significativos, se observó un aumento en la actividad CYP2B6 tras el tratamiento con el inductor.

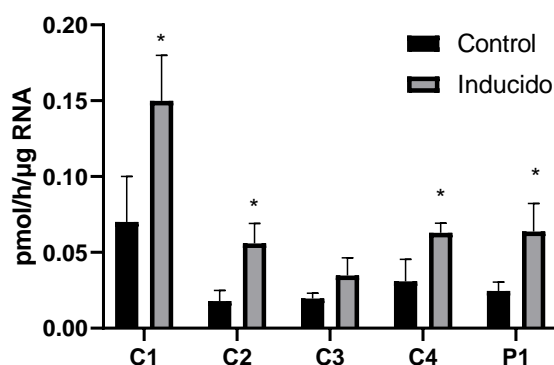


Figura 4.23. Inducción de CYP2B6 por fenobarbital. La actividad CYP2B6 se midió utilizando bupropión como sustrato en células HLC previamente tratadas con fenobarbital 1 mM durante 48 h y en células control (no expuestas al inductor). Los donantes C1, C2 y C4 muestran actividad inducible del enzima CYP2B6, mientras que no se observan cambios significativos en el donante C3. Los datos se representan como la media \pm DS; n=3. Prueba T-test, *p<0,05.

4.4. HLC como modelo *in vitro* para estudios de hepatotoxicidad.

Una vez completada la caracterización de las HLC y tras comprobar que son capaces de reproducir muchas de las funciones características del hepatocito, incluida la capacidad de biotransformación de xenobióticos, el siguiente paso fue determinar su idoneidad como modelo celular para estudios de hepatotoxicidad inducida por fármacos. Para ello, se evaluó su utilidad no solo para el cribado *in vitro* de fármacos con potencial hepatotóxico, sino también para la identificación del mecanismo de toxicidad implicado. Además, se analizó su potencial como modelo personalizado para el estudio de casos concretos de iDILI.

4.4.1. Estudio la hepatotoxicidad inducida por fármacos en HLC.

Las HLC de los donantes C1, C2, C3 y P1 se incubaron con diferentes concentraciones de amiodarona como fármaco hepatotóxico modelo y citrato como control negativo. Además, con el objetivo de determinar la especificidad de las HLC para identificar fenómenos hepatotóxicos, también se estudió la respuesta a dichos fármacos de tres líneas celulares: una de origen hepático ampliamente utilizada en estudios de hepatotoxicidad (HepG2) y dos líneas celulares no hepáticas (HeLa y A-549). Para la evaluación de la toxicidad se aplicó un ensayo multiparamétrico HCS que permite determinar diferentes mecanismos implicados en la hepatotoxicidad como el daño mitocondrial, la producción de ROS o el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, además de determinar efectos sobre la viabilidad celular (Figura 4.24).

En las células de origen no hepático tratadas con amiodarona no se observaron efectos significativos en ninguno de los parámetros analizados. Por el contrario, en las células HepG2 la amiodarona provocó un descenso de la viabilidad acompañado de una disminución del MMP y un incremento de los niveles de ROS y Ca^{2+} intracelular. De forma similar, en las HLC tratadas con amiodarona se observó un descenso en la viabilidad y el MMP y un aumento de ROS y Ca^{2+} intracelular. En general, las células HepG2 mostraron mayor sensibilidad a la toxicidad por amiodarona que las HLC. Como era esperable, el

citrato no produjo alteraciones significativas de los parámetros analizados en ninguno de los modelos celulares estudiados.

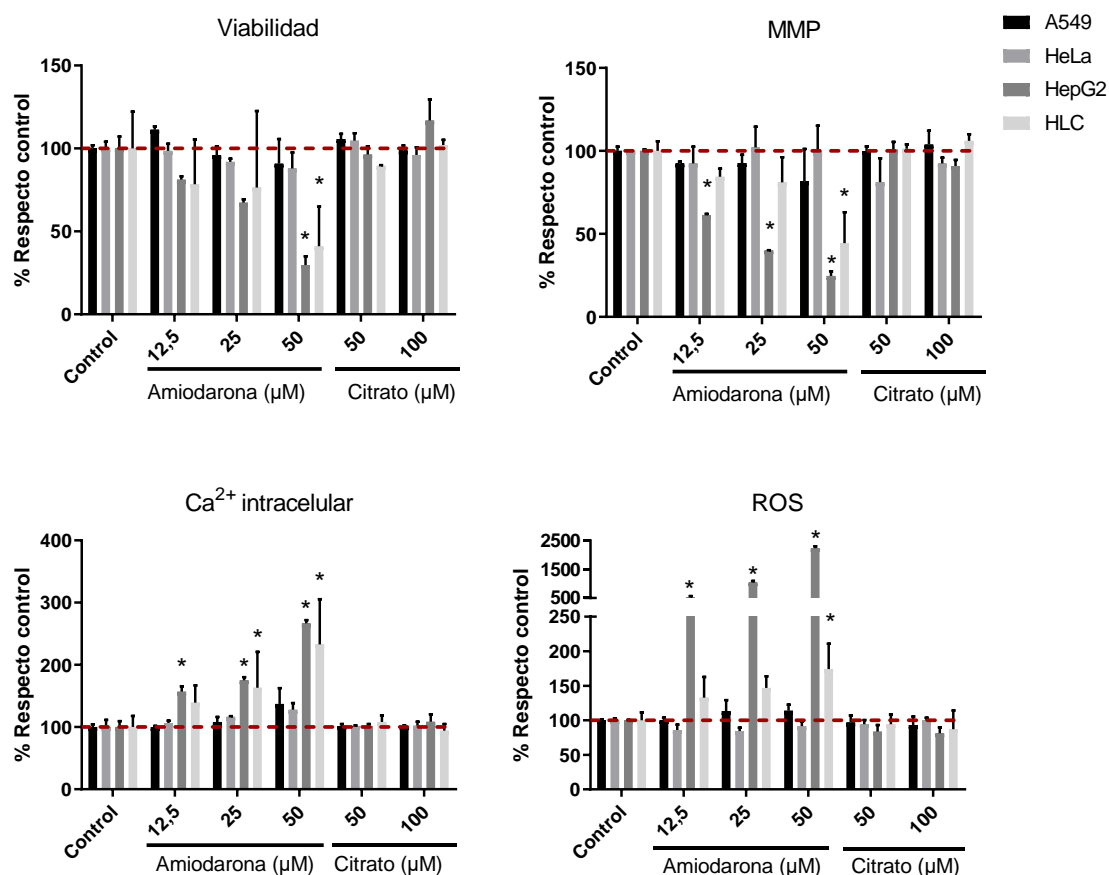


Figura 4.24. Ensayo multiparámetro de hepatotoxicidad para evaluar la respuesta de las líneas no hepáticas HeLa y A549, la línea hepática HepG2 y las HLC (donantes C1, C2, C3 y P1) a la exposición a concentraciones crecientes del fármaco hepatotóxico amiodarona. Los datos se muestran como la media \pm DS. $n(\text{líneas celulares})=2$; $n(\text{HLC})=4$ (1 experimento por donante, 3 réplicas biológicas). ANOVA de 2 factores con post-hoc Dunnet, * $p<0,05$ respecto al control (células no tratadas).

A diferencia del resto de líneas estudiadas (A549, HeLa y HepG2), las HLC proceden de diferentes donantes, lo que puede contribuir a la mayor variabilidad en los diferentes parámetros de toxicidad que presentaba este modelo celular. Esta variabilidad queda reflejada en la Figura 4.25 en la que se muestran de forma independiente los efectos de la amiodarona sobre las HLC de cada uno de los donantes. Las HLC de los donantes C1 y C2 resultaron más sensibles a la citotoxicidad por amiodarona, evidenciada por la disminución de la viabilidad y la alteración de otros parámetros a las concentraciones más bajas del fármaco (12,5 y 25 μM), mientras que las HLC del donante P1 sólo mostraron efectos citotóxicos tras la exposición a amiodarona 50 μM. No obstante, cabe destacar que, a pesar de estas diferencias de sensibilidad, las HLC de todos los donantes

mostraron alteraciones en los diferentes parámetros analizados tras la exposición a amiodarona.

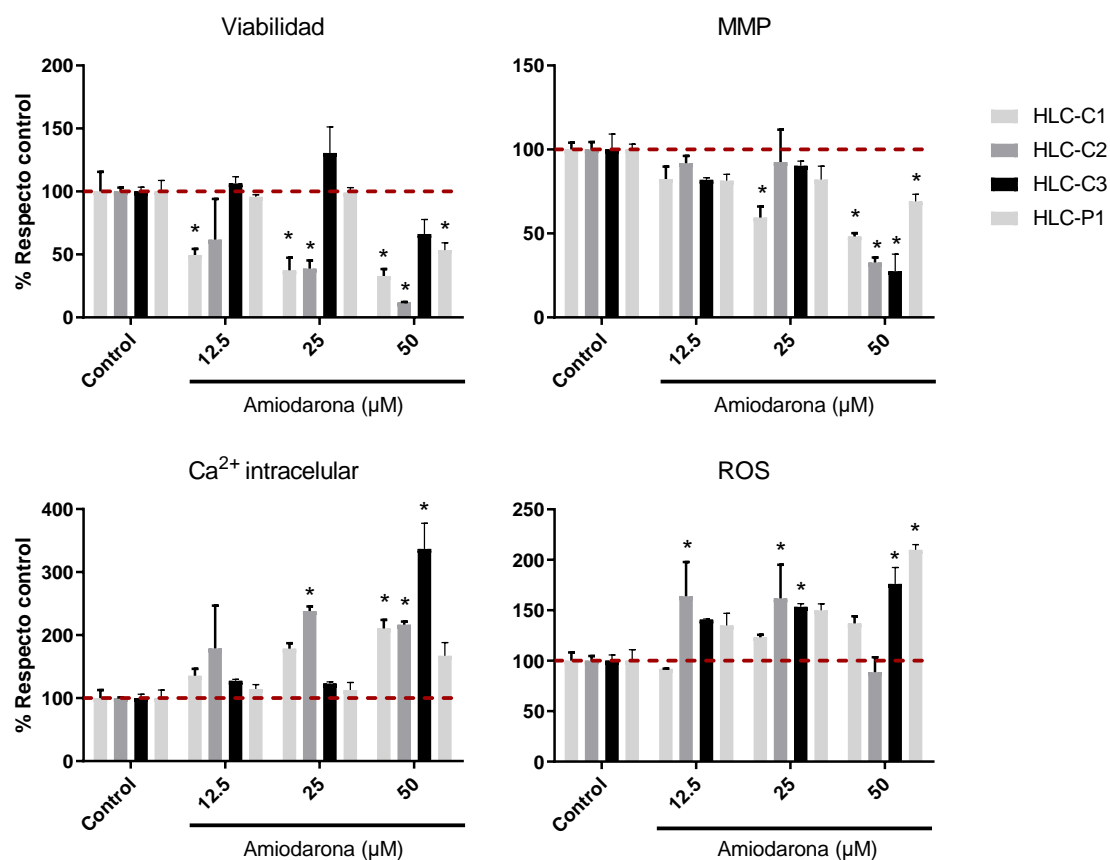


Figura 4.25. Cuantificación de la toxicidad producida por la amiodarona en las HLC de los diferentes donantes mediante el ensayo multiparamétrico. Los datos se muestran como la media ± DS. n=2. ANOVA de 2 factores con post-hoc Dunnet, *p<0,05 respecto al control.

La figura 4.26 muestra de forma representativa las imágenes que visualizan las alteraciones en las HLC del donante C3 tras la exposición a amiodarona. Se observa claramente que el tratamiento con amiodarona provoca una acumulación de Ca²⁺ intracelular y una disminución del MMP.

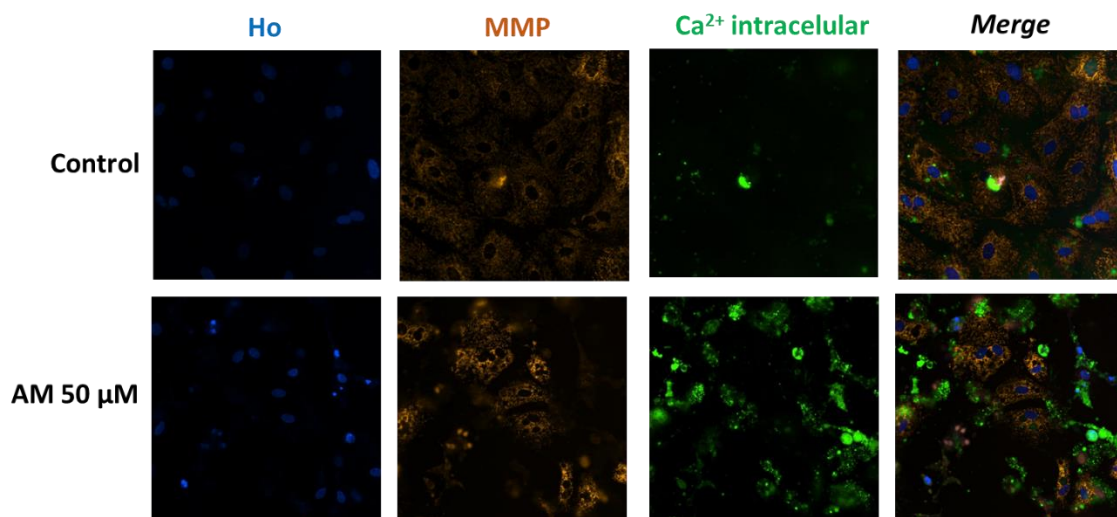


Figura 4.26. Imágenes representativas de la toxicidad producida por la amiodarona (AM) 50 μM en las HLC del donante C3. El MMP y el Ca^{2+} intracelular se detectaron mediante las sondas TMRM (naranja) y Fluo4 (verde), respectivamente. El Hoechst 33342 (Ho) se empleó en la tinción de los núcleos.

4.4.2. HLC para modelizar la esteatosis inducida por fármacos.

A continuación, se aplicó un ensayo dirigido a la identificación de esteatosis, uno de los mecanismos más frecuentes de hepatotoxicidad inducida por fármacos. Para este estudio se seleccionaron 3 fármacos cuyo perfil tóxico a nivel hepático ha sido ampliamente estudiado: valproato y tetraciclina, como inductores modelo de esteatosis y, amiodarona, como inductor modelo de esteatosis y de fosfolipidosis. Tras exponer las HLC a diferentes concentraciones de los fármacos durante 24 h, se cuantificó la acumulación de lípidos neutros y de fosfolípidos mediante el uso de sondas fluorescentes y el análisis de imagen de alto contenido HCS. La ventaja de multiplexar varias sondas fluorescentes es que proporciona una visión general de los mecanismos que se ven afectados.

En las imágenes de fluorescencia (Figura 4.27) se observa una mayor acumulación de lípidos neutros (indicativa de esteatosis) en las HLC expuestas a valproato o a amiodarona con respecto a las células no tratadas (control), mientras que solo se observa un incremento en el marcaje de fosfolípidos en las células tratadas con amiodarona.

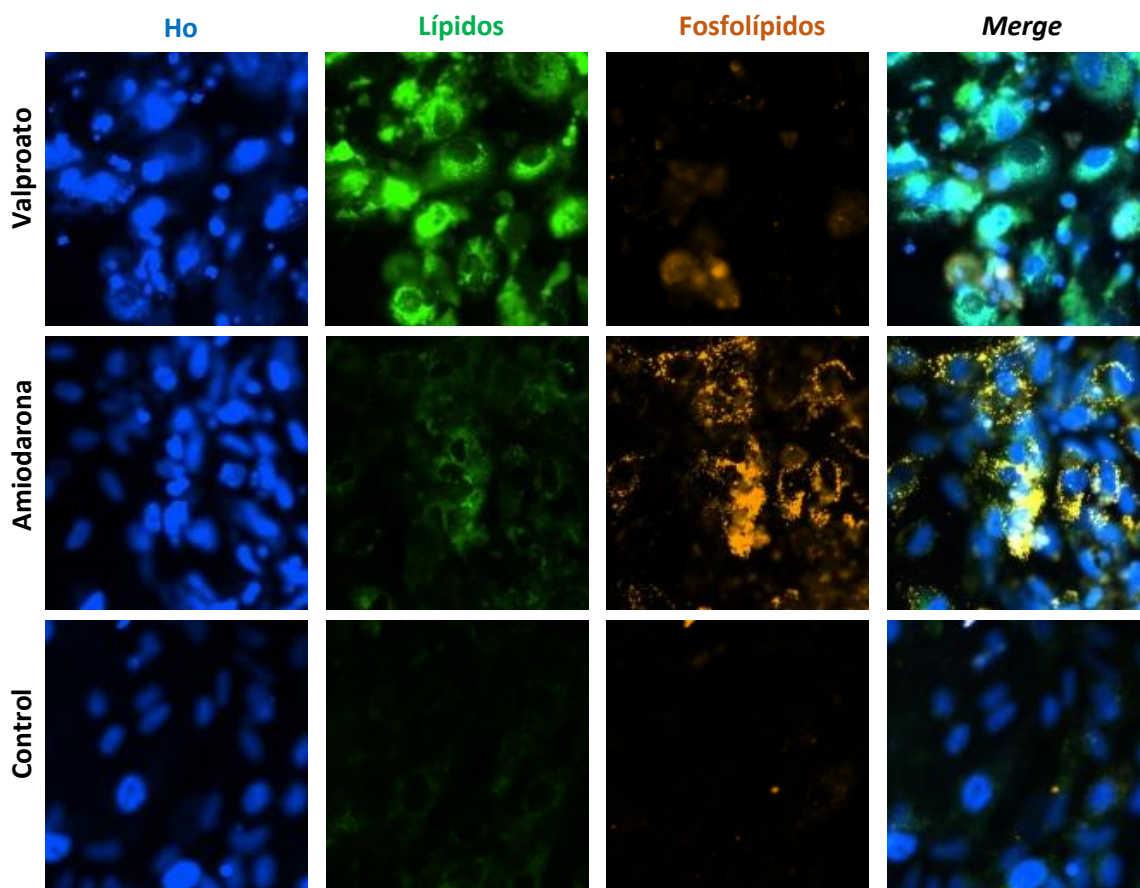


Figura 4.27. Imágenes representativas de la acumulación de lípidos neutros y fosfolípidos en HLC del donante C1 incubadas con valproato y amiodarona. Los lípidos neutros se detectaron y midieron mediante la sonda BODIPY 493/503; los fosfolípidos se detectaron y midieron mediante la sonda HCS LipidTOX. Ho = Hoechst.

Los resultados cuantitativos mostraron un aumento significativo de los niveles de lípidos neutros en las HLC de ambos donantes a las tres concentraciones de tetraciclina testadas (Figura 4.28). También se observó acumulación de lípidos neutros con una tendencia dosis-dependiente en las células expuestas a valproato, aunque el efecto solo fue significativo a la concentración 8 mM. Ninguna de las concentraciones de ambos fármacos provocó efectos sobre la acumulación de fosfolípidos o sobre la viabilidad celular (resultados no mostrados). Por otro lado, la amiodarona indujo un marcado aumento de los niveles de fosfolípidos en las HLC y también un aumento moderado de lípidos neutros, si bien este último efecto no fue significativo a las concentraciones estudiadas (Figura 4.28). En general, los fármacos testados tuvieron mayor efecto en el donante C3 que mostró mayor acumulación de lípidos, especialmente tras la exposición a tetraciclina, y mayor acumulación de fosfolípidos tras la exposición a amiodarona.

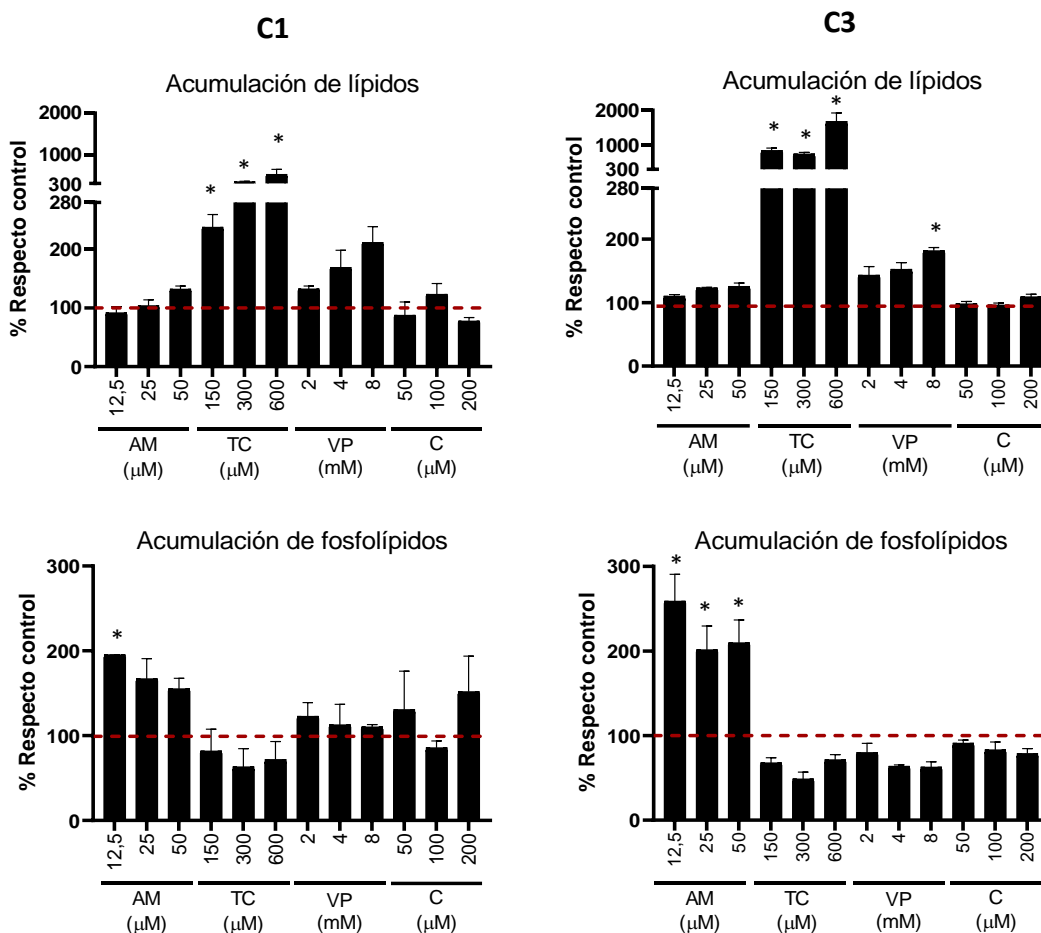
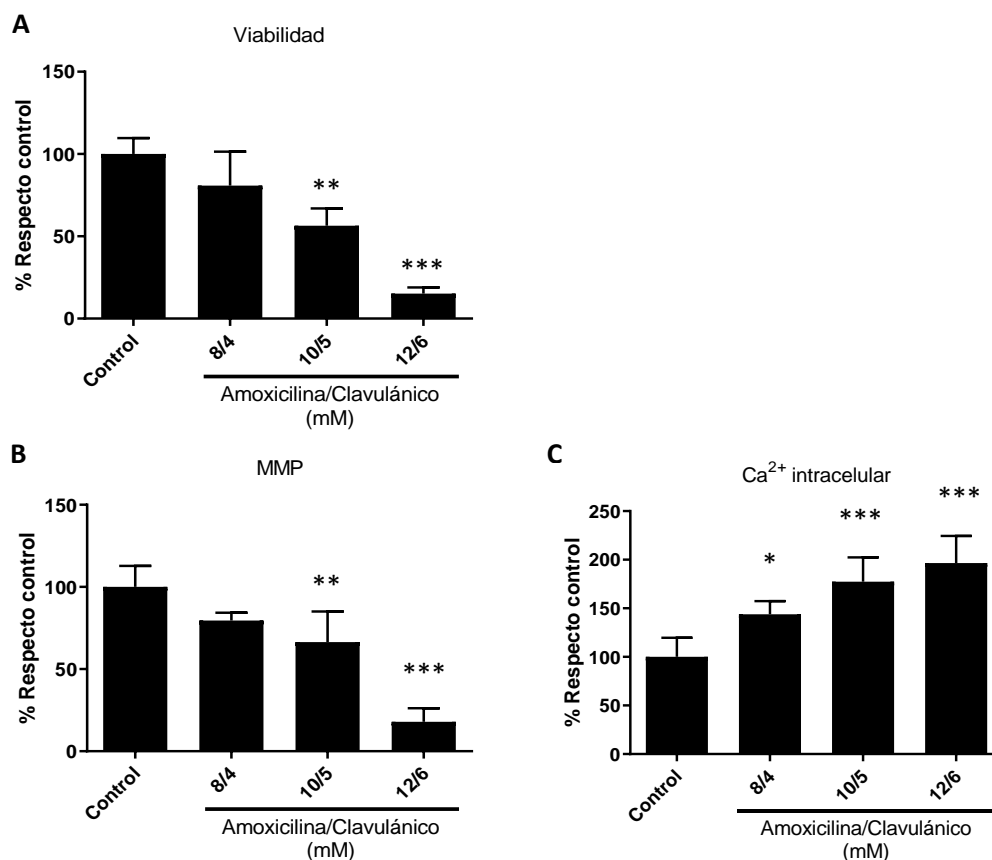


Figura 4.28. Cuantificación de la acumulación de lípidos neutros y fosfolípidos en HLC incubadas con fármacos modelo. Las HLC de los donantes I C1 y C3 se incubaron con diferentes concentraciones de amiodarona (AM), tetraciclina (TC), valproato (VP) citrato (C). La línea discontinua roja indica el valor control (HLC no tratadas). Se muestran los cambios en la acumulación de lípidos y fosfolípidos. Se representa la media ± SEM, n=2. Prueba t-student, *p<0,05 respecto al control.

4.4.3. HLC para la identificación del agente causal en iDILI: estudio mecanístico de la hepatotoxicidad inducida por amoxicilina-clavulánico.

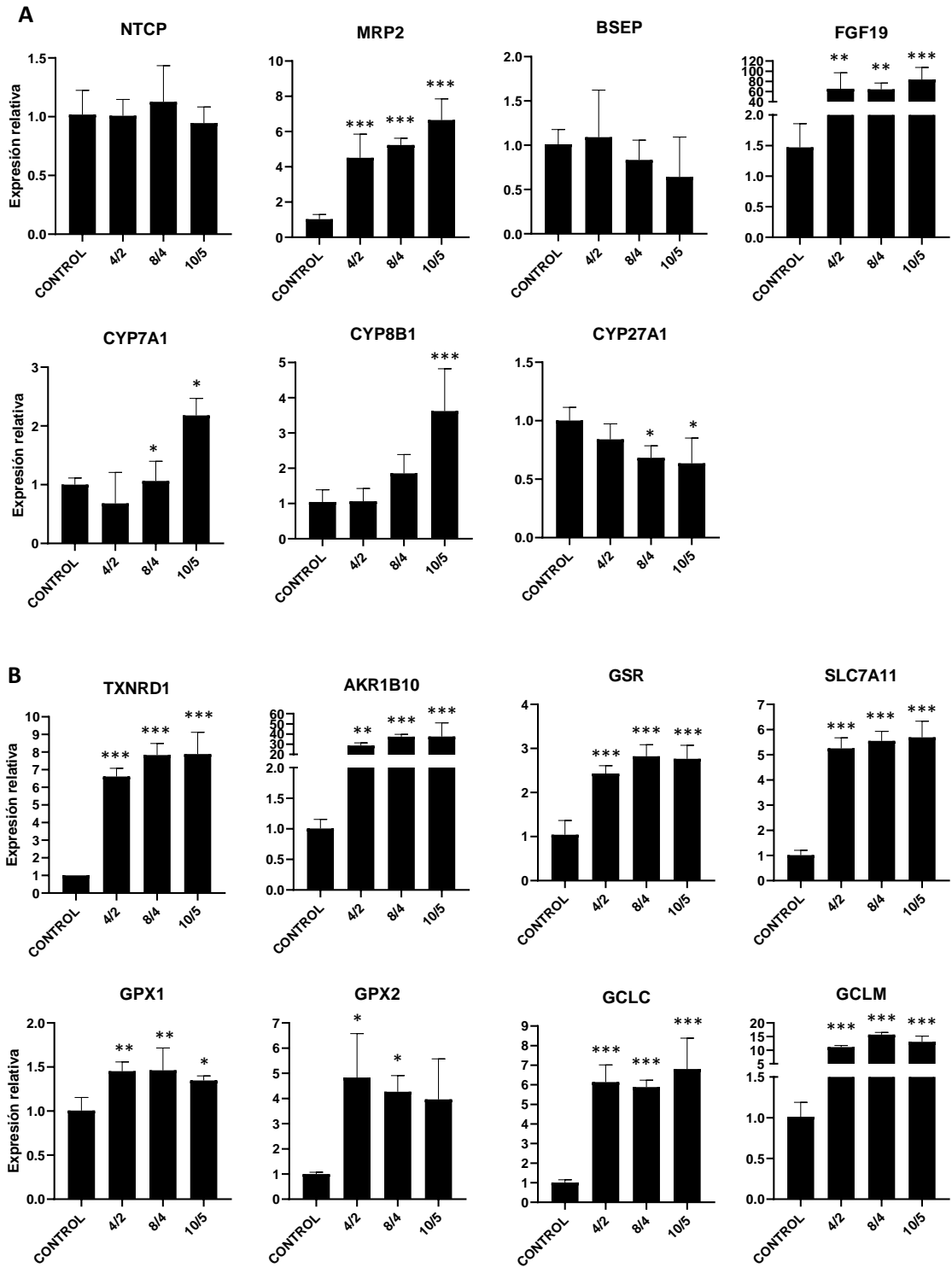
Las HLC generadas a partir de pacientes que han experimentado un episodio de iDILI pueden constituir un modelo celular idóneo para el estudio mecanístico de la toxicidad de naturaleza idiosincrática. Con este objetivo, las HLC del donante P1 fueron tratadas con A/C, la combinación de fármacos sospechosos de haber provocado el iDILI en este paciente. Se utilizaron diferentes concentraciones de A/C, comprendidas entre 4/2 y 12/6 mM, y se observó citotoxicidad a partir de la concentración 10/5 mM (Figura 4.29A). A modo representativo la figura 4.29B-C ilustra, además, el efecto sobre el MMP y el Ca²⁺ intracelular, observándose despolarización de la membrana mitocondrial a las

concentraciones 10/5 y 12/6 mM y un aumento de Ca²⁺ intracelular para todas las concentraciones estudiadas.



4.29. Efectos de la A/C en las HLC del paciente P1. Se muestra la cuantificación del ensayo multiparamétrico: viabilidad (A), potencial de membrana mitocondrial (B) y la concentración de Ca²⁺ intracelular (C) de las HLC procedentes del donante P1 tras la exposición a concentraciones crecientes de A/C (8/4, 10/5 y 12/6 mM). Los datos se muestran como la media ± DS, n=2. ANOVA de 1 factor con post-hoc Dunnet, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

A continuación, se realizó un estudio de expresión génica con la finalidad de determinar los posibles mecanismos moleculares implicados en la hepatotoxicidad por A/C. Dado que el patrón de daño hepático inducido por este fármaco en el donante P1 fue de naturaleza colestásica (ver sección 3.2), se incluyeron en el análisis los principales genes relacionados con el transporte (*BSEP*, *NTCP*, *MRP2*) y la síntesis (*CYP7A1*, *CYP8B1*, *FGF19*) de AB y que han sido asociados con la colestasis (Figura 4.30). Asimismo, se analizaron los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta antioxidante mediada por la vía NRF2 (*SLC7A11*, *TXNRD1*, *AKR1B10*, *GCLC*, *GCLM*, *GPX1*, *GPX2*, *GSR*) y que pudieran estar relacionados el estrés oxidativo inducido por el fármaco.



4.30. Estudio transcriptómico en HLC del donante P1 incubadas con A/C. A) Niveles de expresión génica de los principales transportadores de AB (BSEP, NTCP, MRP2), genes implicados en la síntesis de AB (CYP7A1, CYP8B1, CYP27A1) y un represor de la síntesis (FGF19). B) Niveles de expresión de genes asociados a la respuesta antioxidante mediada por NRF2. En ambos casos las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de A/C (4/2, 8/4 y 10/5 mM). Los datos se muestran como el promedio de la expresión génica relativizada al control (cuyo valor asignado es 1) y las barras de error corresponden a la DS (n=4). ANOVA de 1 factor con post-hoc Dunnet, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto al control.

Los resultados mostraron un aumento significativo de los niveles de expresión del gen del transportador *MRP2* para las tres concentraciones testadas (4/2, 8/4 y 10/5 mM), mientras que no se observaron cambios significativos en la expresión de *BSEP* y *NTCP*, aunque se advierte que *BSEP* tiende a disminuir su expresión (Figura 4.19A). Con respecto a los genes relacionados con la síntesis de AB, la expresión de *FGF19* aumentó considerablemente (entre 60 y 80 veces con respecto al control) tras el tratamiento con A/C. También se observaron aumentos significativos en los niveles de mRNA de *CYP7A1* y *CYP8B1* y una disminución en la expresión del gen *CYP27A1*.

En cuanto a los niveles de expresión de los genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, se observó un aumento significativo de todos ellos a todas las concentraciones testadas, a excepción de *GPX2*, para el que solo se observaron cambios significativos a las concentraciones 4/2 y 8/4 mM (Figura 4.19B). Los mayores incrementos se observan para *AKR1B10* (20 a 30 veces) y *GCLM* (10 a 15 veces), seguidos de *TXNRD1*, *SLC7A11* y *GCLC* (5 a 8 veces) y *GPX1*, *GPX2* y *GSR* (1,5 a 4 veces).

DISCUSIÓN

5.1. Las PBMC constituyen una fuente de células somáticas apta para la reprogramación celular.

Se ha descrito la generación de iPSC a partir de diferentes tipos celulares somáticos, incluyendo fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células sanguíneas, células del epitelio urinario o células madre adultas, con diferentes eficiencias de reprogramación dependiendo de la fuente celular usada (Raab et al., 2014; Ray et al., 2021). En nuestro caso, para poder obtener una batería de líneas de iPSC procedentes de diferentes donantes y con vistas a expandirlas en el futuro, la fuente de células somáticas debía ser accesible, poco invasiva y debía proporcionar una cantidad de células suficiente para poder llevar a cabo el proceso de reprogramación celular. La sangre periférica cumplía todos estos requisitos y, además, su extracción es reproducible y se encuentra altamente estandarizada (Betsou et al., 2019). Asimismo, el aislamiento de PBMC mediante distintas aproximaciones, incluyendo la separación en gradiente de densidad, también está ampliamente descrito (Betsou et al., 2019).

El número de células vivas obtenido en los aislamientos de PBMC estuvo acorde con los valores obtenidos en otros trabajos, no así la viabilidad, cuyo porcentaje ($41 \pm 10\%$) fue menor a lo anteriormente descrito (Corkum et al., 2015; Ye & Wang, 2018). Esto pudo ser debido a que el aislamiento de las PBMC no se realizó de forma inmediata tras la extracción de la muestra de sangre y que el tiempo necesario para el transporte de las muestras, así como la temperatura, pudo haber afectado a la viabilidad tal y como se ha descrito en trabajos anteriores (Golke et al., 2022; Jerram et al., 2021). Además, es sabido que mediante esta técnica de aislamiento, es posible arrastrar otros tipos celulares como pueden ser eritrocitos, células endoteliales o células epiteliales (Song et al., 2002; Urbich & Dimmeler, 2004) que pueden formar parte del cómputo total de células y distorsionar los valores de viabilidad.

En cuanto a la reprogramación celular, el uso de métodos no integrativos para generar iPSC se consideró la estrategia más adecuada para evitar posibles alteraciones genéticas debidas a la mutagénesis por inserción y así obtener células más próximas al estadio pluripotente completo (Hayes & Zavazava, 2013; Liu et al., 2012). De los distintos métodos no integrativos, SeV está descrito como un sistema eficaz para obtener iPSC

derivadas de PBMC mediante la expresión ectópica de los factores de Yamanaka OSKM (Okumura et al., 2019; Sharma et al., 2018; Vlahos et al., 2019; Ye & Wang, 2018; Zhou et al., 2015). Entre las ventajas que ofrece el uso de SeV sobre otros modelos no integrativos destacan su capacidad de infectar a una gran variedad de tipos celulares, incluyendo células proliferativas y quiescentes o su eliminación del citoplasma celular tras 10 pases después de la infección vírica (Ye & Wang, 2018).

Al igual que en el establecimiento de líneas de ESC, las células reprogramadas crecieron sobre un *feeder* de MEF formando pequeñas agrupaciones que dieron lugar a nuevas colonias de células pluripotentes (iPSC) con bordes bien definidos, las cuales pudieron ser transferidas y expandidas en condiciones *feeder-free* con Matrigel® tal y como se ha descrito en la literatura (Desai et al., 2015; Vlahos et al., 2019). El Matrigel® permite mantener un mayor número de colonias en estado pluripotente que otras matrices como el colágeno o la fibronectina (Xu et al., 2001) y proporciona una mayor expresión de marcadores de pluripotencia con respecto a matrices como la laminina (Lam & Longaker, 2012).

5.2. Las iPSC recapitulan la pluripotencia de las ESC.

Una vez obtenidas las nuevas líneas de iPSC fue imprescindible su caracterización con el fin de comprobar el carácter pluripotente y descartar posibles anomalías cromosómicas que podrían afectar al comportamiento de las células. En este sentido, se comprobó que todas las líneas iPSC generadas mostraban un cariotipo normal, sin presencia de aberraciones cromosómicas aparentes que hubieran podido ser introducidas durante el proceso de reprogramación.

Uno de los parámetros más relevantes indicativos del estado pluripotente del cultivo de iPSC es la morfología celular (Nagasaka et al., 2017). Así, las iPSC de todos los donantes presentaron un crecimiento en colonias de una célula de espesor (monocapa) al igual que las ESC, además de mostrar un núcleo prominente con un único nucléolo y un citoplasma reducido característico de células pluripotentes (Wakao et al., 2012).

No solo la morfología fue indicativa del carácter indiferenciado de las iPSC, sino que también el análisis de marcadores específicos de pluripotencia confirmó su similitud con

el perfil de la línea de ESC VAL9. Así, marcadores nucleares como OCT3/4, NANOG y marcadores de superficie como TRA1-60, ampliamente descritos en células pluripotentes (Bharathan et al., 2017), fueron detectados por IF. Del mismo modo, se detectó la expresión génica de *OCT3/4*, *NANOG* y otros marcadores adicionales como *SOX2* y *DNMT3B*, con niveles comparables a VAL9, sugiriendo que el carácter pluripotente de las cinco líneas de iPSC generadas. Se evidenciaron algunas diferencias en los niveles de expresión de génica de estos marcadores en las diferentes líneas, como por ejemplo la mayor expresión de *NANOG* en tres de las líneas iPSC (C1, C3 y C4) con respecto a la línea VAL9 y las iPSC de los otros donantes. No obstante, estas diferencias, que pueden ser debidas a la variabilidad intrínseca de las líneas obtenidas de diferentes donantes, han sido descritas también por otros autores para líneas iPSC derivadas tanto de individuos sanos como de pacientes con diversas patologías (Bharathan et al., 2017; Swaidan et al., 2020).

5.3. Las iPSC son capaces de diferenciarse a células con fenotipo hepático.

Al igual que la mayoría de los protocolos de diferenciación de células pluripotentes a HLC mediante factores solubles (Hannan et al., 2013; Hay et al., 2008a; Si-Tayeb et al., 2010b; Song et al., 2009; Touboul et al., 2010), el protocolo aplicado en nuestro laboratorio trató de conducir las células desde el estadio pluripotente hasta el fenotipo hepático en tres etapas que recrean las fases del desarrollo embrionario del hígado (endodermo, hepatoblasto y maduración hepática).

Inicialmente, se exploró la opción de añadir el factor WNT-3A al conjunto de factores utilizados en la inducción de la fase de endodermo para observar si se producían efectos sinérgicos, ya que es sabido que la vía de señalización de WNT y de la activina constituyen dos vías importantes en la formación del endodermo (Bertero et al., 2015; Payne et al., 2011; Perugorria et al., 2019) y se había empleado en otros protocolos de diferenciación con este fin (Agarwal et al., 2008; Hay et al., 2008b; Roelandt et al., 2010). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la detección y cuantificación de marcadores endodérmicos a día 3. Es posible que estos resultados se deban a que el protocolo seguido también usa la pequeña molécula CHIR 99021, la cual actúa inhibiendo la glucógeno sintasa quinasa 3 y, por tanto, mimetizando uno de los

efectos de la vía WNT activada (Cheng et al., 2017). Por ello, finalmente se desestimó el uso de este factor en nuestro protocolo.

De esta manera, se optó por continuar con el protocolo inicialmente planteado con el objetivo de generar HLC de diferentes donantes que recreasen a la variabilidad interindividual. Para monitorizar este proceso, se caracterizó cada etapa observando los cambios morfológicos de las células y detectando y/o cuantificando la expresión de marcadores específicos de cada fase mediante IF o análisis transcripcional. Además, se realizó un seguimiento de todos los marcadores durante el curso de la diferenciación para profundizar en los cambios transcripcionales a los que se ven sometidas las células.

Los resultados mostraron que en cada etapa, las células adoptaban la morfología adecuada y la presencia de los marcadores característicos, alcanzando, en la etapa final, células con morfología cuboide positivas para marcadores hepáticos como ALB, AFP, A1AT, CK18 y la apolipoproteína B (APOB), tal y como se ha descrito en la literatura (Asgari et al., 2013; Hannan et al., 2013; Si-Tayeb et al., 2010b; Tolosa et al., 2015c).

El seguimiento de la expresión génica de los distintos marcadores permitió comprobar que las células no solo eran positivas para marcadores específicos de cada etapa, sino que, el perfil transcripcional evolucionaba acorde con las fases del desarrollo del hígado (Hay et al., 2008a; Touboul et al., 2010), sugiriendo que el protocolo seguido fue adecuado para conducir las células hacia un fenotipo hepático. La pérdida progresiva de la pluripotencia en el proceso de diferenciación puso de manifiesto el estado unipotente de las células resultantes, coincidiendo con otros trabajos (Basma et al., 2009; Medine et al., 2011; Roelandt et al., 2010).

También fue posible apreciar en la línea P1 una progresión más rápida hacia las etapas sucesivas de la diferenciación que en la línea C1, con una caída rápida a día 9 de los marcadores de endodermo y la aparición más temprana de marcadores de hepatoblasto y maduración hepática, tales como *AFP* o *ALB*. Como ya se ha comentado, eran de esperar ciertas diferencias en la progresión de los marcadores de expresión génica analizados, dado que las células procedían de donantes diferentes; no obstante, cabe destacar que, pese a ello, el perfil de expresión de marcadores hepáticos mostrado por las HLC de ambos donantes fue muy similar.

En esta línea, la expresión de los marcadores hepáticos como *ALB* (la principal proteína sintetizada por el hígado), *HNF4* (regulador maestro del fenotipo hepático) y *CK18* (el principal filamento intermedio de los hepatocitos) (DeLaForest et al., 2011; Parviz et al., 2003; Schmelzer et al., 2006; Wells et al., 1997) a partir de día 25 indica que el proceso de diferenciación llevado a cabo permite obtener células con fenotipo hepático. No obstante, las HLC mostraron niveles de expresión génica de *AFP* elevados o incluso superiores a los niveles mostrados en el estadio de hepatoblasto en el caso del donante C1. Estos resultados son similares a los descritos en otros estudios (Graffmann et al., 2018; Roelandt et al., 2010) y sugieren que las HLC podrían encontrarse en un estadio inmaduro (Baxter et al., 2010). La proteína AFP es producida de forma importante por el hígado fetal y su síntesis y secreción decaen de forma significativa en el hígado adulto (Bader et al., 2004). Es por ello que la elevada expresión de AFP en las HLC parece indicar que no alcanzan el fenotipo característico del hepatocito adulto, sino que podrían estar más próximas al fetal o inmaduro.

El hecho de que las HLC obtenidas en cultivo en monocapa no alcancen la madurez completa ya se puso de manifiesto con anterioridad (Baxter et al., 2015; Hannan et al., 2013; Kajiwara et al., 2012; Si-Tayeb et al., 2010b; Touboul et al., 2010) de manera que serían necesarias nuevas aproximaciones para obtener HLC más maduras que se asemejasen al hepatocito adulto. Se han propuesto diferentes estrategias para incrementar la madurez de las HLC como la adición de moléculas pequeñas solubles (Shan et al., 2013; Siller et al., 2015), el aporte de oxígeno durante el proceso de diferenciación (Kimura et al., 2019; Spyrou et al., 2019; van Wenum et al., 2018), el uso de diferentes matrices (Cameron et al., 2015; Ghodsizadeh et al., 2014), la transducción viral (Nakamori et al., 2016) o el 3D (Mun et al., 2019; Ogawa et al., 2013; Toivonen et al., 2016; Wang et al., 2016). Los cultivos 3D mimetizan la disposición tridimensional de las células y favorecen las interacciones célula-célula y célula-ECM, y con ello alargan la viabilidad del cultivo y permiten recrear los gradientes de oxígeno y de nutrientes presentes en las condiciones fisiológicas (Jin et al., 2021). Estudios recientes de diferenciación en organoides 3D han posibilitado la obtención de HLC con una funcionalidad hepática incrementada y un fenotipo más maduro (Akbari et al., 2019; Pettinato et al., 2019; Wu et al., 2019). En este sentido, se ha demostrado que los

cultivos de organoides hepáticos presentan un sistema funcional de metabolización de fármacos, están polarizados y recapitulan diferentes poblaciones zonales de hepatocitos lo que permite recrear mejor lo que ocurre *in vivo* (Shinozawa et al., 2021). Por otro lado, también se está explorando la posibilidad de realizar co-cultivos en organoides de HLC y células no parenquimatosas del hígado para mejorar la simulación del tejido hepático e incluir el componente inflamatorio, con el objetivo de obtener células con mayor grado de madurez (Ouchi et al., 2019).

5.4. Las HLC poseen características hepáticas a nivel transcriptómico, metabolómico y funcional.

Las HLC obtenidas a partir de las líneas iPSC de los cinco donantes incluidos en nuestro estudio se caracterizaron de forma exhaustiva a nivel transcriptómico, metabolómico y funcional. El objetivo era no sólo corroborar que las HLC son capaces de expresar un fenotipo hepático, sino también comprobar si mantienen características propias del donante a partir del cual han sido generadas.

El análisis del perfil transcriptómico de las HLC en comparación con las iPSC de las que habían sido generadas permitió identificar cambios en diversos procesos o rutas metabólicas. Algunos genes relacionados con la adhesión celular y la ECM se identificaron entre los que presentaban mayor contribución a las diferencias de expresión entre las HLC y las iPSC. La expresión de diferentes miembros de la superfamilia de colágenos (colágeno I, II, III, IV, V y VI), de lamininas y de fibronectina por parte de las HLC es indicativa de su carácter hepático, dado que es sabido que estas proteínas son componentes fundamentales de la ECM del hígado, en cuya síntesis participan activamente los hepatocitos (Bedossa & Paradis, 2003). También se identificaron diferencias destacadas en la expresión de genes relacionados con las vías lisosomales. Los lisosomas tienen un papel fundamental en los procesos de autofagia en el hepatocito, de hecho, la mayor expresión de *LAMP2A* en las HLC indica la activación de la degradación lisosomal mediada por chaperonas, un proceso ampliamente caracterizado en el hígado (Schneider & Cuervo, 2014).

El ciclo celular y el metabolismo del piruvato se identificaron como elementos diferenciadores clave entre iPSC y HLC, en clara respuesta a sus diferencias en cuanto a la capacidad de proliferación y a los procesos que utilizan para la obtención de energía. Las iPSC son células proliferativas (Yamanaka, 2020) y con un metabolismo energético basado fundamentalmente en la glicólisis anaerobia (Teslaa & Teitell, 2015; Tsogtbaatar et al., 2020). Por el contrario, las HLC tienen una tasa de proliferación baja (Song et al., 2009) y, a pesar de que la madurez de sus mitocondrias es menor que las de hepatocitos adultos (Yu et al., 2012), su metabolismo energético es principalmente oxidativo, indicando el carácter somático de las células diferenciadas. Otros procesos diferencialmente expresados entre ambos tipos celulares incluyen los relacionados con algunas vías de señalización o con el metabolismo de glúcidos, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y glutatión (Gao et al., 2017).

A diferencia de las iPSC, todas las HLC presentan expresión de genes típicamente hepáticos implicados en el metabolismo de triglicéridos y otros lípidos, ciclo de la urea, metabolismo de la glucosa, metabolismo de AB, detoxificación de fármacos, defensa antioxidante o en el transporte de moléculas. No obstante, la baja expresión de genes de enzimas CYP450, en comparación con otros genes hepáticos, puede estar relacionada de nuevo con su carácter inmaduro (Baxter et al., 2015).

El estudio holístico de las HLC se completó mediante el análisis de su perfil metabolómico. El metaboloma hepático cambia durante el desarrollo del hígado (Wu et al., 2018) y su análisis se ha utilizado con anterioridad para caracterizar el proceso de diferenciación (Jellali et al., 2020). Por ello, se analizó comparativamente el metaboloma de las PSC y las HLC con el objetivo de entender la evolución del perfil metabólico e identificar eventos clave en la maduración de las PSC *in vitro*. Los cambios en el metaboloma revelaron las diferencias existentes en el metabolismo del piruvato, y otros procesos metabólicos relacionados como el efecto Walburg, la gluconeogénesis o el ciclo de ácido cítrico, corroborando así las diferencias en el metabolismo energético apuntadas por el análisis transcriptómico. Asimismo, otras vías metabólicas propias del hepatocito también se incluyen entre las más discriminatorias entre ambos tipos celulares, como por ejemplo la síntesis de cuerpos cetónicos, la degradación de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina), el metabolismo de la biotina o la

biosíntesis de ácidos grasos (Achanta & Rae, 2017; Fernandez-Mejia, 2005; Jensen-Urstad & Semenkovich, 2012; Longo & Mattson, 2014). No obstante, rutas que como el ciclo del ácido cítrico constituyen vías claramente discriminantes entre PSC y HLC, puede que se encuentren infrarrepresentadas en las HLC en comparación con los PHH tal y como se ha evidenciado recientemente (Moreno-Torres et al., 2022). No hay duda que la identificación de los cambios metabólicos que ocurren durante el proceso de diferenciación podría ayudar a mejorar los protocolos de maduración para lograr una mejor funcionalidad de las HLC.

Aunque muchos trabajos se centran en la caracterización a nivel morfológico y transcripcional de las HLC, para demostrar su utilidad como modelo *in vitro*, es necesario que las células sean funcionales. Por esta razón, se analizaron diversas funciones específicas de los hepatocitos. Hemos comprobado que las HLC no solo almacenan glucógeno, tal y como ya había sido previamente descrito (Agarwal et al., 2008; Asgari et al., 2013; Chen et al., 2012; Hay et al., 2008a; Pettinato et al., 2019), sino que también son capaces de modular dichos depósitos en respuesta a insulina o glucagón de forma similar a otros modelos celulares de origen hepático como las células HepG2 (Donato et al., 2015). Las HLC también muestran actividad ureogénica y de síntesis de albúmina, si bien las tasas de producción mostraron variabilidad entre donantes. Estos resultados, acordes con otros trabajos (Choudhury et al., 2017; Kajiwara et al., 2012), refuerzan la idea de que las HLC procedentes de distintos donantes podrían reflejar la variabilidad interindividual existente en estas funciones hepáticas. No obstante, los bajos niveles de producción de albúmina y urea con respecto a los PHH (dato no mostrado) se corresponderían con el estadio temprano de diferenciación y el fenotipo inmaduro que presentan las HLC.

Las HLC también presentan actividades de los principales enzimas CYP450 implicados en el metabolismo hepático de los fármacos y, además responden a agentes inductores. La inducción de CYP1A1/2 en HLC ya había sido demostrada previamente (Rambhatla et al., 2003; Tsuchiya et al., 2012), no así la inducción de CYP2B6 por fenobarbital. Este último resultado sugiere que las HLC podrían presentar un grado de madurez mayor que los hepatocitos fetales, dado que en humanos la actividad CYP2B6 es indetectable en el hígado fetal y su actividad solo es cuantificable a partir del nacimiento (Pearce et al.,

2016). A pesar de que las HLC presentan niveles de actividades CYP450 más bajos que el tejido hepático, son capaces de recrear el perfil de actividades propio del donante a partir del cual habían sido generadas. De este modo, la posibilidad de obtener HLC de diferentes donantes permitiría disponer de una batería de células representativa de la variabilidad interindividual del metabolismo hepático de fármacos en el ser humano. Además, el disponer de HLC de pacientes con polimorfismos genéticos singulares sería de gran valor para el estudio del metabolismo idiosincrásico de fármacos y su posible papel en los fenómenos de hepatotoxicidad. Por otro lado, la variación en el metabolismo de fármacos es a menudo responsable de las diferencias en la eficacia o toxicidad de los fármacos en distintos individuos (Fontana, 2014). El análisis comparativo del perfil metabólico de los principales enzimas CYP450 en HLC y sus microsomas hepáticos correspondientes, reveló diferentes perfiles en los donantes analizados. Ese análisis comparativo permitió comprobar que las HLC reflejan el fenotipo metabólico del paciente de origen, lo que apoya su uso como modelo que refleje la variabilidad poblacional y también como modelo personalizado para el diagnóstico o la modelización de enfermedades.

5.5. Las HLC son sensibles a fármacos hepatotóxicos y pueden ser un modelo celular adecuado para el estudio de los mecanismos del DILI.

En comparación con los PHH, las HLC ofrecen un suministro relativamente ilimitado y consistente de células con fenotipo estable, y en comparación con las líneas celulares de hepatoma, son de origen no tumoral y se pueden obtener de diferentes donantes, lo que permite la generación de HLC representativas de la variabilidad genotípica / fenotípica de la población humana. Otra de las ventajas de usar HLC reside en el hecho de que se podrían cultivar durante periodos más prolongados, permitiendo la evaluación de la hepatotoxicidad crónica (Holmgren et al., 2014; Shinozawa et al., 2021).

En los últimos años, las HLC se han propuesto como un nuevo modelo celular para el estudio *in vitro* de la hepatotoxicidad (Kim et al., 2017; Medine et al., 2013; Szkolnicka et al., 2014; Weber et al., 2021). No obstante, la mayoría de los estudios se han limitado a la evaluación de los efectos de compuestos modelo sobre la viabilidad celular, sin analizar los mecanismos implicados en la toxicidad. En el presente estudio hemos

comprobado que las HLC son susceptibles a la toxicidad inducida por fármacos hepatotóxicos y, además, al analizar los efectos sobre parámetros indicativos de mecanismos concretos de hepatotoxicidad, su respuesta es comparable a la de células de origen hepático. En este sentido, las HLC no solo son capaces de discriminar entre compuestos hepatotóxicos y no hepatotóxicos, sino que también permiten identificar mecanismos concretos implicados en la hepatotoxicidad como el daño mitocondrial y el estrés oxidativo inducido por la amiodarona (Begrache et al., 2011; Labbe et al., 2008), los efectos esteatósicos de la tetraciclina o el valproato (Donato & Gómez-Lechón, 2012a) o la fosfolipidosis inducida por la amiodarona (Donato & Gómez-Lechón, 2012a; Gómez-Lechón et al., 2010). Además, las concentraciones de los fármacos modelo a las que se detectan estos efectos sobre las HLC son comparables a las concentraciones efectivas sobre otros modelos celulares hepáticos (PHH, UHH®, HepG2, HepRG) (Tolosa et al., 2012, 2016a, 2016b, 2018), como muestra de la elevada sensibilidad de nuestro modelo celular. Las diferencias de sensibilidad observadas entre las HLC de diferentes donantes apuntan hacia su posible utilidad en el estudio de los factores genéticos o de otra naturaleza que pudieran influir en la susceptibilidad individual a la hepatotoxicidad. Por ejemplo, las HLC C1 se mostraron más sensibles a la amiodarona que las células de los otros donantes, mientras que las P1 fueron las menos sensibles. Estudios previos sugieren que la metabolización de la amiodarona por CYP3A4 forma un metabolito reactivo (N-desetil-amiodarona) que podría ser responsable de los efectos del fármaco a nivel mitocondrial (Fabre et al., 1993). Dado que la actividad CYP3A4 medida en las HLC C1 fue más elevada que en los otros donantes y, en concreto, fue aproximadamente el doble que en P1, estas diferencias podrían explicar, al menos en parte, la diferente susceptibilidad de las HLC a la toxicidad de la amiodarona. No obstante, resulta evidente que estos resultados deberían ser contrastados con una batería más amplia de HLC que incluyera células procedentes de un número mayor de donantes.

5.6. Las HLC procedentes de pacientes con sospecha de iDILI permiten el estudio de la toxicidad causada por el fármaco sospechoso.

Como ya se ha comentado, los episodios de hepatotoxicidad idiosincrásica, si bien poco frecuentes, son particularmente complicados dado que suelen estar asociados a los

casos más graves de DILI. La posibilidad de disponer de HLC de un paciente que había sufrido un episodio de iDILI nos brindó la oportunidad de estudiar directamente sobre células del paciente los efectos del fármaco A/C, sospechoso de haber desencadenado la toxicidad. El paciente P1 presentaba un cuadro de toxicidad hepática con un patrón de daño colestásico por lo que, además de analizar parámetros habituales indicativos de toxicidad celular (viabilidad, daño mitocondrial), también se analizaron los efectos del fármaco sobre la expresión de genes implicados en el transporte y el metabolismo de AB y en la respuesta frente al estrés oxidativo mediada por la vía NRF2 (Nguyen et al., 2009).

Los resultados multiparamétricos revelaron que la A/C produjo daño mitocondrial y un incremento del Ca^{2+} intracelular a concentraciones subcitotóxicas (sin cambios en la viabilidad celular) confirmando la sensibilidad del sistema para la predicción del DILI *in vitro*. El daño mitocondrial causado por A/C se ha evidenciado en hepatocitos de rata por la rotura de la membrana mitocondrial mediada por el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial que causa la salida del citocromo c (Oyebode et al., 2019) por lo que este efecto podría tenerse en cuenta en futuros estudios de toxicidad con A/C en HLC.

Por otro lado, con la exposición a la A/C, los genes implicados en el metabolismo de AB experimentaron algunos cambios significativos, especialmente en *FGF19*. Aunque en condiciones fisiológicas la expresión de *FGF19* recae fundamentalmente en los enterocitos, quienes secretan FGF19 para inhibir la síntesis de AB en los hepatocitos, diferentes estudios demuestran que la expresión de *FGF19* también puede presentarse en los hepatocitos tanto en colestasis intrahepática como extrahepática, de manera que nuestros resultados están acorde con lo descrito en la literatura (Schaap et al., 2009; Wunsch et al., 2015). No obstante, es bien conocido el papel inhibitorio de FGF19 sobre CYP7A1, uno de los principales CYP450 implicados en la vía clásica de síntesis de AB a partir de colesterol (Holt et al., 2003); sin embargo, nuestros resultados no reflejaron represión en la expresión de *CYP7A1* tras la exposición a A/C ni en la expresión de *CYP8B1*, que actúa aguas abajo en esta vía de señalización (Chiang & Ferrell, 2020). En cambio, sí se observó una inhibición en la expresión de *CYP27A1*, que participa en la vía clásica (catalizando la reacción de la cadena lateral esteroidea en una de las etapas finales

de esta ruta) e inicia la vía alternativa de síntesis de AB en la mitocondria (Riddick et al., 2004), siendo uno de los responsables de acumulación tóxica de precursores de AB primarios en el hepatocito (Chiang, 2004), como podría estar ocurriendo en nuestro modelo celular. Probablemente, el daño mitocondrial provocado por la A/C podría contribuir, además, a la alteración en el metabolismo de AB mediada por CYP27A1.

Asimismo, la exposición de las HLC a A/C indujo un aumento en la expresión del transportador canalicular *MRP2*, tal y como se ha descrito en UHH® cultivados en sándwich de colágeno (Petrov et al., 2021), pero no se evidenciaron cambios en la expresión del transportador canalicular *BSEP* y del transportador basolateral *NTCP*. Esto podría ser debido al formato de cultivo de las HLC, dado que el cultivo en monocapa no favorece la polarización de los hepatocitos, esencial para la formación de los canalículos biliares y la función de transporte (Ramli et al., 2020; Shinozawa et al., 2021). El aumento de *MRP2* observado podría ser debido a un mecanismo compensatorio para eliminar los AB acumulados a nivel intracelular (Fernández-Murga et al., 2018).

Finalmente, el aumento de la expresión de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo tras la exposición a A/C sugiere el potencial del fármaco para inducir estrés oxidativo (probablemente a través del daño mitocondrial) y activar la respuesta antioxidante mediada por NRF2 como sistema de adaptación al estrés oxidativo (Ma, 2013).

En base a lo expuesto, la figura 5.1 esquematiza el posible mecanismo que explicaría los efectos hepatotóxicos de la A/C detectados en nuestro modelo celular.

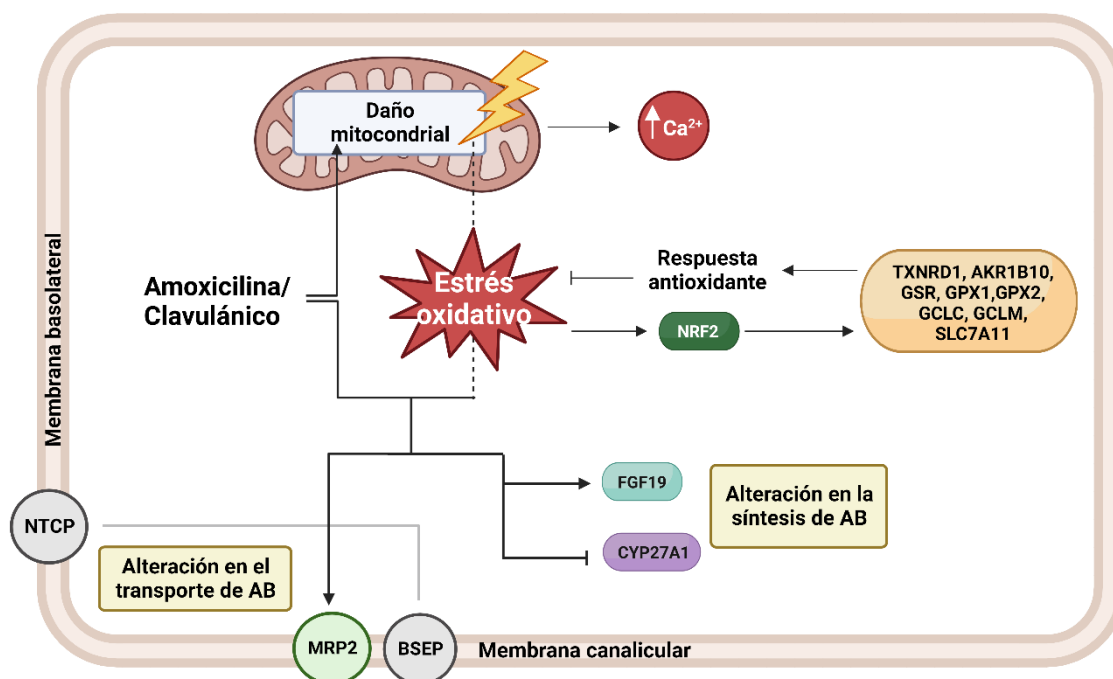


Figura 5.1. Mecanismos propuestos implicados en la hepatotoxicidad mediada por A/C. La A/C induciría daño mitocondrial y desencadenaría un aumento del Ca^{2+} intracelular y del estrés oxidativo que activaría la respuesta antioxidante mediada por NRF2. Este escenario podría ser el desencadenante de la alteración en la síntesis y transporte de AB relacionados con la aparición de un patrón colestásico. Es posible que la alteración en los transportadores NTCP y BSEP pudieran evidenciarse en un modelo de cultivo que favoreciese la polaridad celular (gris). Imagen realizada con Biorender®.

Perspectivas de futuro

Durante décadas se han usado los PHH o las líneas de hepatoma (HepG2, HepaRG) para el estudio del DILI *in vitro*. Sin embargo, estos modelos celulares presentan importantes limitaciones que han llevado a explorar otras alternativas para una mejor detección de los efectos hepatotóxicos de fármacos durante fases preclínicas del desarrollo. La presente Tesis Doctoral, junto con otros estudios, ponen en valor el potencial de las HLC como modelo celular para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos. La caracterización exhaustiva de las HLC generadas, ha permitido demostrar que se pueden obtener de manera reproducible. Además, pueden cultivarse en formato multipocillo (p.ej. 96 pocillos) y aplicar ensayos de HCS que han demostrado tener mayor capacidad de predicción del fenómeno hepatotóxico que los ensayos clásicos que solo miden la viabilidad celular.

La posibilidad de disponer HLC de diferentes donantes permitiría no solo evaluar los efectos tóxicos en células procedentes de diferentes sujetos, lo que otorgaría mayor relevancia a los resultados *in vitro* obtenidos, sino que además posibilitaría el análisis de la susceptibilidad de grupos concretos de población (edad, género, patologías, etc.) o de la influencia de factores individuales (polimorfismos genéticos). Una ventaja muy destacada de las HLC, frente a otros modelos celulares de origen hepático, es que permiten disponer de células de pacientes concretos sobre los que reproducir un episodio de hepatotoxicidad, lo que constituye una herramienta de gran valor para el estudio personalizado del DILI. No obstante, son necesarios nuevos esfuerzos que confirmen estas perspectivas tan prometedoras.

No obstante, no hay que pasar por alto las diferencias que existen entre las HLC y los PHH, lo que implica que hay un gran margen de mejora en los protocolos actuales de generación de HLC. Los esfuerzos para alcanzar la madurez óptima en las HLC se centran actualmente en dos aspectos. Por un lado, el descubrimiento de nuevas vías de señalización implicadas en la maduración hepática y su interacción con las ya conocidas para recrearlas en el proceso de diferenciación *in vitro*. Por otro lado, así como en el uso de cultivos 3D en combinación (o no) con células no parenquimales para conseguir un ambiente que favorezca la adquisición de la polaridad en las HLC y el intercambio de

gases, nutrientes y factores de crecimiento tal y como ocurriría en condiciones fisiológicas. Sin embargo, hay algunos obstáculos que hay que superar para que el cultivo 3D sea abordable como es la baja reproducibilidad o los costes económicos que supone generarlos y mantenerlos.

Finalmente, una vez mejorados los protocolos de diferenciación, resulta evidente la necesidad de extender los estudios con HLC a una cohorte mayor de donantes. De forma particular, sería necesario reclutar más casos de pacientes con sospecha de DILI que permitieran demostrar su utilidad como herramienta *in vitro* de confirmación del diagnóstico de hepatotoxicidad y el agente causal de forma retrospectiva, así como para identificar nuevos biomarcadores con posible utilidad en el diagnóstico clínico del DILI.

CONCLUSIONES

En base a los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis Doctoral podemos extraer las siguientes conclusiones:

- I. Las PBMC constituyen una fuente de células somáticas adecuada para llevar a cabo procesos de reprogramación celular con vistas a generar líneas de iPSC procedentes de diferentes donantes.
- II. El protocolo de diferenciación hacia HLC conduce las células pluripotentes por los diferentes estadios (endodermo, hepatoblasto y maduración hepática) descritos en la organogénesis del hígado. En cada estadio, las células adquieren la morfología adecuada y expresan los marcadores característicos hasta alcanzar el fenotipo hepático.
- III. Durante la diferenciación, se observa una expresión diferencial de marcadores entre las células de diferentes donantes que puede ser atribuida a la variabilidad interindividual. Las HLC de diferentes donantes, por tanto, recrean la variabilidad poblacional.
- IV. Las HLC muestran un fenotipo hepático caracterizado principalmente por su morfología poligonal y la presencia de marcadores hepáticos como AFP, ALB, HNF4 α y CK18. No obstante, el estado madurativo que alcanzan se asemeja más a un estadio fetal o temprano que a un hepatocito adulto.
- V. Las HLC poseen un perfil transcriptómico, metabolómico y funcional hepático, claramente diferente al de las iPSC y presentan actividades de metabolismo de fármacos, algunas de ellas inducibles.
- VI. Las HLC de diferentes donantes responden de manera diferencial a la exposición a fármacos hepatotóxicos y constituyen un modelo celular adecuado para el estudio de la idiosincrasia en la hepatotoxicidad inducida por fármacos y los mecanismos celulares implicados.

- VII. El estudio del mecanismo de toxicidad de A/C en las HLC de un paciente con sospecha de iDILI por este fármaco muestra modificaciones a nivel transcripcional en el metabolismo de ácidos biliares y la activación de la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante mediada por NRF2.

REFERENCIAS

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boué, S., & Belmonte, J. C. I. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1276–1284. <https://doi.org/10.1038/nbt.1503>
- Abdel-Misih, S. R. Z., & Bloomston, M. (2010). Liver Anatomy. *Surg Clin North Am*, 90(4), 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>.Liver
- Achanta, L. B., & Rae, C. D. (2017). β -Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms. *Neurochemical Research*, 42(1), 35–49. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2099-2>
- Agarwal, S., Holton, K. L., & Lanza, R. (2008). Efficient Differentiation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 26(5), 1117–1127. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1102>
- Ahmed, S., Zhou, Z., Zhou, J., & Chen, S. Q. (2016). Pharmacogenomics of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters: Relevance to Precision Medicine. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 14(5), 298–313. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.03.008>
- Aithal, G. P., Watkins, P. B., Andrade, R. J., Larrey, D., Molokhia, M., Takikawa, H., Hunt, C. M., Wilke, R. A., Avigan, M., Kaplowitz, N., Bjornsson, E., & Daly, A. K. (2011). Case Definition and Phenotype Standardization in Drug-Induced Liver Injury. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(6), 806–815. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.58>
- Akbari, S., Sevinç, G. G., Ersoy, N., Basak, O., Kaplan, K., Sevinç, K., Ozel, E., Sengun, B., Enustun, E., Ozcimen, B., Bagriyanik, A., Arslan, N., Önder, T. T., & Erdal, E. (2019). Robust, Long-Term Culture of Endoderm-Derived Hepatic Organoids for Disease Modeling. *Stem Cell Reports*, 13(4), 627–641. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.007>
- Al Abbar, A., Ngai, S. C., Nograles, N., Alhaji, S. Y., & Abdullah, S. (2020). Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *BioResearch Open Access*, 9(1), 121–136. <https://doi.org/10.1089/biores.2019.0046>
- Alberro, A., Osorio-Querejeta, I., Sepúlveda, L., Fernández-Eulate, G., Mateo-Abad, M., Muñoz-Culla, M., Carregal-Romero, S., Matheu, A., Vergara, I., de Munain, A. L., Sáenz-Cuesta, M., & Otaegui, D. (2019). T cells and immune functions of plasma extracellular vesicles are differentially modulated from adults to centenarians. *Aging*, 11(22), 10723–10741. <https://doi.org/10.18632/aging.102517>
- Alempijevic, T., Zec, S., & Milosavljevic, T. (2017). Drug-induced liver injury: Do we know everything? *World Journal of Hepatology*, 9(10), 491–502. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i10.491>
- Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease*, 21(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>
- Alves-Bezerra, M., & Cohen, D. E. (2018). Triglyceride metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 1–22. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- Andargie, A., Tadesse, F., & Shibbiru, T. (2016). Review on Cell Reprogramming: Methods and Applications. *An International Peer-Reviewed Journal*, 25(January).
- Anderson, N., & Borlak, J. (2006). Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Letters*, 580(23), 5533–5540.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.061>

- Andersson, T. B. (2017). Evolution of Novel 3D Culture Systems for Studies of Human Liver Function and Assessments of the Hepatotoxicity of Drugs and Drug Candidates. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 121(4), 234–238. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12804>
- Andrade, R. J., Lucena, M. I., Kaplowitz, N., García-Munoz, B., Borraz, Y., Pachkoria, K., García-Cortés, M., Fernández, M. C., Pelaez, G., Rodrigo, L., Durán, J. A., Costa, J., Planas, R., Barriocanal, A., Guarner, C., Romero-Gomez, M., Muñoz-Yagüe, T., Salmerón, J., & Hidalgo, R. (2006). Outcome of acute idiosyncratic drug-induced liver injury: Long-term follow-up in a hepatotoxicity registry. *Hepatology*, 44(6), 1581–1588. <https://doi.org/10.1002/hep.21424>
- Andrade, Raul J., Chalasani, N., Björnsson, E. S., Suzuki, A., Kullak-Ublick, G. A., Watkins, P. B., Devarbhavi, H., Merz, M., Lucena, M. I., Kaplowitz, N., & Aithal, G. P. (2019). Drug-induced liver injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0105-0>
- Andrade, Raúl J., Lucena, M. I., Fernández, M. C., Pelaez, G., Pachkoria, K., García-Ruiz, E., García-Muñoz, B., González-Grande, R., Pizarro, A., Durán, J. A., Jiménez, M., Rodrigo, L., Romero-Gomez, M., Navarro, J. M., Planas, R., Costa, J., Borrás, A., Soler, A., Salmerón, J., & Martín-Vivaldi, R. (2005). Drug-Induced Liver Injury: An Analysis of 461 Incidences Submitted to the Spanish Registry Over a 10-Year Period. *Gastroenterology*, 129(2), 512–521. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.006>
- Andrade, Raúl J., Robles, M., Ulzurrún, E., & Lucena, M. I. (2009). Drug-induced liver injury: Insights from genetic studies. *Pharmacogenomics*, 10(9), 1467–1487. <https://doi.org/10.2217/pgs.09.111>
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouët, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., & Guillouzo, A. (2006). EXPRESSION OF CYTOCHROMES P450, CONJUGATING ENZYMES AND NUCLEAR RECEPTORS IN HUMAN HEPATOMA HepaRG CELLS. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(1), 75–83. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.006759>
- Anton, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
- Asgari, S., Moslem, M., Bagheri-Lankarani, K., Pournasr, B., Miryounesi, M., & Baharvand, H. (2013). Differentiation and Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Hepatocyte-like Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(4), 493–504. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9330-y>
- Asplund, A., Pradip, A., van Giezen, M., Aspegren, A., Choukair, H., Rehnström, M., Jacobsson, S., Ghosheh, N., El Hajjam, D., Holmgren, S., Larsson, S., Benecke, J., Butron, M., Wigander, A., Noaksson, K., Sartipy, P., Björquist, P., Edsbacke, J., & Küppers-Munther, B. (2016). One Standardized Differentiation Procedure Robustly Generates Homogenous Hepatocyte Cultures Displaying Metabolic Diversity from a Large Panel of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(1), 90–104. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9621-9>
- Bader, D., Riskin, A., Vafsi, O., Tamir, A., Peskin, B., Israel, N., Merksamer, R., Dar, H., & David, M. (2004). Alpha-fetoprotein in the early neonatal period - A large study and review of the literature. *Clinica Chimica Acta*, 349(1–2), 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.06.020>
- Basharat, A., Rollison, H. E., Williams, D. P., & Ivanov, D. P. (2020). HepG2 (C3A) spheroids show higher sensitivity compared to HepaRG spheroids for drug-induced liver injury (DILI). *Toxicology and Applied Pharmacology*,

408(July), 115279. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115279>

- Basma, H., Soto-Gutiérrez, A., Yannam, G. R., Liu, L., Ito, R., Yamamoto, T., Ellis, E., Carson, S. D., Sato, S., Chen, Y., Muirhead, D., Navarro-Álvarez, N., Wong, R. J., Roy-Chowdhury, J., Platt, J. L., Mercer, D. F., Miller, J. D., Strom, S. C., Kobayashi, N., & Fox, I. J. (2009). Differentiation and Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Hepatocytes. *Gastroenterology*, *136*(3), 990-999.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.047>
- Baxter, M., Withey, S., Harrison, S., Segeritz, C. P., Zhang, F., Atkinson-Dell, R., Rowe, C., Gerrard, D. T., Sison-Young, R., Jenkins, R., Henry, J., Berry, A. A., Mohamet, L., Best, M., Fenwick, S. W., Malik, H., Kitteringham, N. R., Goldring, C. E., Piper Hanley, K., ... Hanley, N. A. (2015). Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *Journal of Hepatology*, *62*(3), 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.016>
- Baxter, Rowe, C., Alder, J., Harrison, S., Hanley, K. P., Park, B. K., Kitteringham, N. R., Goldring, C. E., & Hanley, N. A. (2010). Generating hepatic cell lineages from pluripotent stem cells for drug toxicity screening. *Stem Cell Research*, *5*(1), 4–22. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.02.002>
- Baze, A., Parmentier, C., Hendriks, D. F. G., Hurrell, T., Heyd, B., Bachellier, P., Schuster, C., Ingelman-Sundberg, M., & Richert, L. (2018). Three-Dimensional Spheroid Primary Human Hepatocytes in Monoculture and Coculture with Nonparenchymal Cells. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, *24*(9), 534–545. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2018.0134>
- Beath, S. V. (2003). Hepatic function and physiology in the newborn. *Seminars in Neonatology*, *8*(5), 337–346. [https://doi.org/10.1016/S1084-2756\(03\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S1084-2756(03)00066-6)
- Bedossa, P., & Paradis, V. (2003). Liver extracellular matrix in health and disease. *Journal of Pathology*, *200*(4), 504–515. <https://doi.org/10.1002/path.1397>
- Begrache, K., Massart, J., Robin, M. A., Borgne-Sanchez, A., & Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of Hepatology*, *54*(4), 773–794. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.006>
- Bell, C. C., Hendriks, D. F. G., Moro, S. M. L., Ellis, E., Walsh, J., Renblom, A., Fredriksson Puigvert, L., Dankers, A. C. A., Jacobs, F., Snoeys, J., Sison-Young, R. L., Jenkins, R. E., Nordling, Å., Mkrтчian, S., Park, B. K., Kitteringham, N. R., Goldring, C. E. P., Lauschke, V. M., & Ingelman-Sundberg, M. (2016). Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Scientific Reports*, *6*(October 2015), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep25187>
- Benichou, C., Danan, G., & Flahault, A. (1993). Causality assessment of adverse reactions to drugs-II. An original model for validation of drug causality assessment methods: Case reports with positive rechallenge. *Journal of Clinical Epidemiology*, *46*(11), 1331–1336. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(93\)90102-7](https://doi.org/10.1016/0895-4356(93)90102-7)
- Bertero, A., Madrigal, P., Galli, A., Hubner, N. C., Moreno, I., Burks, D., Brown, S., Pedersen, R. A., Gaffney, D., Mendjan, S., Pauklin, S., & Vallier, L. (2015). Activin/Nodal signaling and NANOG orchestrate human embryonic stem cell fate decisions by controlling the H3K4me3 chromatin mark. *Genes and Development*, *29*(7), 702–717. <https://doi.org/10.1101/gad.255984.114>
- Betsou, F., Gaignaux, A., Ammerlaan, W., Norris, P. J., & Stone, M. (2019). Biospecimen Science of Blood for Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Functional Applications. *Current Pathobiology Reports*, *7*(2), 17–

27. <https://doi.org/10.1007/s40139-019-00192-8>
- Bharathan, S. P., Manian, K. V., Aalam, S. M. M., Palani, D., Deshpande, P. A., Pratheesh, M. D., Srivastava, A., & Velayudhan, S. R. (2017). Systematic evaluation of markers used for the identification of human induced pluripotent stem cells. *Biology Open*, *6*(1), 100–108. <https://doi.org/10.1242/bio.022111>
- Bickle, M. (2010). The beautiful cell: High-content screening in drug discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *398*(1), 219–226. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3788-3>
- Björnsson, E. S. (2019). Global Epidemiology of Drug-Induced Liver Injury (DILI). *Current Hepatology Reports*, *18*(3), 274–279. <https://doi.org/10.1007/s11901-019-00475-z>
- Blaner, W. S., Li, Y., Brun, P. J., Yuen, J. J., Lee, S. A., & Clugston, R. D. (2016). Vitamin A absorption, storage and mobilization. In *Sub-Cellular Biochemistry* (Vol. 81). https://doi.org/10.1007/978-94-024-0945-1_4
- Bochkis, I. M., Schug, J., Ye, D. Z., Kurinna, S., Stratton, S. A., Barton, M. C., & Kaestner, K. H. (2012). *Genome-Wide Location Analysis Reveals Distinct Transcriptional Circuitry by Paralogous Regulators Foxa1 and Foxa2*. *8*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002770>
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z. D., Ziller, M., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Oakley, D. H., Gnirke, A., Eggan, K., & Meissner, A. (2011). Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines. *Cell*, *144*(3), 439–452. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.032>
- Borgohain, M. P., Haridhasapavalan, K. K., Dey, C., Adhikari, P., & Thummer, R. P. (2019). An Insight into DNA-free Reprogramming Approaches to Generate Integration-free Induced Pluripotent Stem Cells for Prospective Biomedical Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, *15*(2), 286–313. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9861-6>
- Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Barbera, J. P. M., & Zaret, K. S. (2006). Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Developmental Biology*, *290*(1), 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.11.006>
- Boyer, J. L. (2013). Bile Formation and Secretion. *Compr Physiol.*, *3*(3), 1035–1078. <https://doi.org/doi:10.1002/cphy.c120027>
- Brunton, L. L., Knollman, B., & Hilal-Dandan, R. (2017). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (13th ed.). McGraw Hill Professional.
- Buck, W. R., Waring, J. F., & Blomme, E. A. (2008). Use of traditional end points and gene dysregulation to understand mechanisms of toxicity: Toxicogenomics in mechanistic toxicology. *Methods in Molecular Biology*, *460*, 23–44. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-48-9_2
- Budingen, F. V., Gonzalez, D., Tucker, A. N., & Derendorf, H. (2014). Relevance of liver failure for anti-infective agents: From pharmacokinetic alterations to dosage adjustments. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, *2*(1), 17–42. <https://doi.org/10.1177/2049936113519089>
- Burkard, A., Dähn, C., Heinz, S., Zutavern, A., Sonntag-Buck, V., Maltman, D., Przyborski, S., Hewitt, N. J., & Braspenning, J. (2012). Generation of proliferating human hepatocytes using upcyte® technology: Characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica*, *42*(10), 939–956.

<https://doi.org/10.3109/00498254.2012.675093>

- Butcher, L. M., Ito, M., Brimpari, M., Morris, T. J., Soares, F. A. C., Ährlund-Richter, L., Carey, N., Vallier, L., Ferguson-Smith, A. C., & Beck, S. (2016). Non-CG DNA methylation is a biomarker for assessing endodermal differentiation capacity in pluripotent stem cells. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10458>
- Calmont, A., Wandzioch, E., Tremblay, K. D., Minowada, G., Kaestner, K. H., Martin, G. R., & Zaret, K. S. (2006). An FGF Response Pathway that Mediates Hepatic Gene Induction in Embryonic Endoderm Cells. *Developmental Cell*, 11(3), 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.06.015>
- Cameron, K., Tan, R., Schmidt-Heck, W., Campos, G., Lyall, M. J., Wang, Y., Lucendo-Villarín, B., Szkolnicka, D., Bates, N., Kimber, S. J., Hengstler, J. G., Godoy, P., Forbes, S. J., & Hay, D. C. (2015). Recombinant Laminins Drive the Differentiation and Self-Organization of hESC-Derived Hepatocytes. *Stem Cell Reports*, 5(6), 1250–1262. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.016>
- Chalasaní, N., Bonkovsky, H. L., Fontana, R., Lee, W., Stolz, A., Talwalkar, J., Reddy, K. R., Watkins, P. B., Navarro, V., Barnhart, H., Gu, J., Serrano, J., Ahmad, J., Bach, N., Bansal, M., Barnhart, H. X., Beavers, K., Bonkovsky, H., Calvo, F. O., ... Van Raaphorst, R. (2015). Features and Outcomes of 899 Patients With Drug-Induced Liver Injury: The DILIN Prospective Study. *Gastroenterology*, 148(7), 1340-1352.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.03.006>
- Chalasaní, N., Fontana, R. J., Bonkovsky, H. L., Watkins, P. B., Davern, T., Serrano, J., Yang, H., & Rochon, J. (2008). Causes, Clinical Features, and Outcomes From a Prospective Study of Drug-Induced Liver Injury in the United States. *Gastroenterology*, 135(6), 1924–1934. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.011>
- Chen, G., Cheung, R., & Tom, J. W. (2017). Hepatitis: Sedation and anesthesia implications. *Anesthesia Progress*, 64(2), 106–118. <https://doi.org/10.2344/anpr-64-02-13>
- Chen, M., Suzuki, A., Borlak, J., Andrade, R. J., & Lucena, M. I. (2015). Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *Journal of Hepatology*, 63(2), 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.04.016>
- Chen, Y. F., Tseng, C. Y., Wang, H. W., Kuo, H. C., Yang, V. W., & Lee, O. K. (2012). Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol. *Hepatology*, 55(4), 1193–1203. <https://doi.org/10.1002/hep.24790>
- Cheng, T., Zhai, K., Chang, Y., Yao, G., He, J., Wang, F., Kong, H., Xin, H., Wang, H., Jin, M., Gong, B., Gu, L., Yang, Z., Wu, Y., Ji, G., & Sun, Y. (2017). CHIR99021 combined with retinoic acid promotes the differentiation of primordial germ cells from human embryonic stem cells. *Oncotarget*, 8(5), 7814–7826. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13958>
- Chiang, J. Y. L. (2004). Regulation of bile acid synthesis: Pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *Journal of Hepatology*, 40(3), 539–551. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.11.006>
- Chiang, J. Y. L., & Ferrell, J. M. (2020). Up to date on cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1) in bile acid synthesis. *Liver Research*, 4(2), 47–63. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2020.05.001>
- Choudhury, Y., Toh, Y. C., Xing, J., Qu, Y., Poh, J., Li, H., Tan, H. S., Kanesvaran, R., Yu, H., & Tan, M.-H. (2017). Patient-specific hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells model pazopanib-

- mediated hepatotoxicity. *Scientific Reports*, 7(1), 41238. <https://doi.org/10.1038/srep41238>
- Corkum, C. P., Ings, D. P., Burgess, C., Karwowska, S., Kroll, W., & Michalak, T. I. (2015). Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunology*, 16(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0113-0>
- Crettol, S., Petrovicb, N., & Michael, M. (2010). Pharmacogenetics of Phase I and Phase II Drug Metabolism. *Current Pharmaceutical Design*, 204–219. <https://doi.org/10.2174/138161210790112674>.
- Cruvinel, E., Ogusuku, I., Cerioni, R., Rodrigues, S., Gonçalves, J., Góes, M. E., Alvim, J. M., Silva, A. C., Lino, V. de S., Boccardo, E., Goulart, E., Pereira, A., Dariolli, R., Valadares, M., & Biagi, D. (2020). Long-term single-cell passaging of human iPSC fully supports pluripotency and high-efficient trilineage differentiation capacity. *SAGE Open Medicine*, 8, 205031212096645. <https://doi.org/10.1177/2050312120966456>
- Daly, A. K., Donaldson, P. T., Bhatnagar, P., Shen, Y., Pe'Er, I., Floratos, A., Daly, M. J., Goldstein, D. B., John, S., Nelson, M. R., Graham, J., Park, B. K., Dillon, J. F., Bernal, W., Cordell, H. J., Pirmohamed, M., Aithal, G. P., & Day, C. P. (2009). HLA-B5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nature Genetics*, 41(7), 816–819. <https://doi.org/10.1038/ng.379>
- Dambach, D. M., Andrews, B. A., & Moulin, F. (2005). New Technologies and Screening Strategies for Hepatotoxicity: Use of In Vitro Models. *Toxicologic Pathology*, 33(1), 17–26. <https://doi.org/10.1080/01926230590522284>
- Dame, C., Sola, M. C., Lim, K.-C., Leach, K. M., Fandrey, J., Ma, Y., Knöpfle, G., Engel, J. D., & Bungert, J. (2004). Hepatic Erythropoietin Gene Regulation by GATA-4. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4), 2955–2961. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310404200>
- De Abajo, F. J., Montero, D., Madurga, M., & García Rodríguez, L. A. (2004). Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: A population case-control study. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 58(1), 71–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02133.x>
- DeLaForest, A., Nagaoka, M., Si-Tayeb, K., Noto, F. K., Konopka, G., Battle, M. A., & Duncan, S. A. (2011). HNF4A is essential for specification of hepatic progenitors from human pluripotent stem cells. *Development*, 138(19), 4143–4153. <https://doi.org/10.1242/dev.062547>
- deLemos, A. S., Ghabril, M., Rockey, D. C., Gu, J., Barnhart, H. X., Fontana, R. J., Kleiner, D. E., & Bonkovsky, H. L. (2016). Amoxicillin–Clavulanate-Induced Liver Injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(8), 2406–2416. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4121-6>
- Desai, N., Rambhia, P., & Gishto, A. (2015). Human embryonic stem cell cultivation: Historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0005-4>
- Dianat, N., Dubois-Pot-Schneider, H., Steichen, C., Desterke, C., Leclerc, P., Raveux, A., Combettes, L., Weber, A., Corlu, A., & Dubart-Kupperschmitt, A. (2014). Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells. *Hepatology*, 60(2), 700–714. <https://doi.org/10.1002/hep.27165>
- Dias, D. A., & Koal, T. (2016). Progress in Metabolomics Standardisation and its Significance in Future Clinical Laboratory Medicine. *EJIFCC*, 27(4), 331–343. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5282916/pdf/ejifcc-27-331.pdf>
- Donato M. T., Martínez-Romero, A., Jiménez, N., Negro, A., Herrera, G., Castell, J. V., O'Connor, J. E., & Gómez-

- Lechón, M. J. (2009). Cytometric analysis for drug-induced steatosis in HepG2 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 181(3), 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.07.019>
- Donato, M. T., & Gómez-Lechón. (2012a). Drug-induced Liver Steatosis and Phospholipidosis: Cell-Based Assays for Early Screening of Drug Candidates. *Current Drug Metabolism*, 13(8), 1160–1173. <https://doi.org/10.2174/138920012802850001>
- Donato, M. T., & Tolosa, L. (2019). Stem-cell derived hepatocyte-like cells for the assessment of drug-induced liver injury. *Differentiation*, 106(February), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.02.004>
- Donato, M. T., & Tolosa, L. (2021). High-content screening for the detection of drug-induced oxidative stress in liver cells. *Antioxidants*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antiox10010106>
- Donato, M. T., Gómez-Lechón, & Tolosa. (2017). Using high-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in preclinical studies. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(2), 201–211. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1271784>
- Donato, M. T., Gómez-Lechón, M. J., & Castell, J. V. (1993). A Microassay for Measuring Cytochrome P450IA1 and Cytochrome P450IIB1 Activities in Intact Human and Rat Hepatocytes Cultured on 96-Well Plates. *Analytical Biochemistry*, 213(1), 29–33. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1381>
- Donato, M. T., Jiménez, N., Pelechá, M., & Tolosa, L. (2022). Oxidative-stress and long-term hepatotoxicity: comparative study in Upcyte human hepatocytes and hepaRG cells. *Archives of Toxicology*, 96(4), 1021–1037. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03236-y>
- Donato, M. T., Jover, R., & Gómez-Lechón, M. J. (2013). Hepatic Cell Lines for Drug Hepatotoxicity Testing: Limitations and Strategies to Upgrade their Metabolic Competence by Gene Engineering. *Current Drug Metabolism*, 14(9), 946–968. <https://doi.org/10.2174/1389200211314090002>
- Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1250, pp. 77–93). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5
- Donato, M. T., Tolosa, L., Jiménez, N., Castell, J. V., & Gómez-Lechón, M. J. (2012b). High-content imaging technology for the evaluation of drug-induced steatosis using a multiparametric cell-based assay. *Journal of Biomolecular Screening*, 17(3), 394–400. <https://doi.org/10.1177/1087057111427586>
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, 12(4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
- Elaut, G., Henkens, T., Papeleu, P., Snykers, S., Vinken, M., Vanhaecke, T., & Rogiers, V. (2006). Molecular Mechanisms Underlying the Dedifferentiation Process of Isolated Hepatocytes and Their Cultures. *Current Drug Metabolism*, 7(6), 629–660. <https://doi.org/10.2174/138920006778017759>
- European Association for the Study of the Liver. (2019). EASL Clinical Practice Guidelines : Drug-induced liver injury q Clinical Practice Guidelines. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.014>
- Fabre, G., Julian, B., Saint-Aubert, B., Joyeux, H., & Berger, Y. (1993). Evidence for CYP3A-mediated N-deethylation of amiodarone in human liver microsomal fractions. *Drug Metabolism and Disposition*, 21(6), 978 LP – 985.

<http://dmd.aspetjournals.org/content/21/6/978.abstract>

- Fang, Y., & Eglén, R. M. (2017). Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discovery*, 22(5), 456–472. <https://doi.org/10.1177/1087057117696795>
- Felser, A., Blum, K., Lindinger, P. W., Bouitbir, J., & Krähenbühl, S. (2013). Mechanisms of hepatocellular toxicity associated with dronedarone - A comparison to amiodarone. *Toxicological Sciences*, 131(2), 480–490. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs298>
- Fernandez-Mejia, C. (2005). Pharmacological effects of biotin. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(7), 424–427. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.018>
- Fernández-Murga, M. L., Petrov, P. D., Conde, I., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., & Jover, R. (2018). Advances in drug-induced cholestasis: Clinical perspectives, potential mechanisms and in vitro systems. *Food and Chemical Toxicology*, 120(July), 196–212. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.017>
- Fisher, K., Vuppalanchi, R., & Saxena, R. (2015). Drug-induced liver injury. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 139(7), 876–887. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0214-RA>
- Fontana, R. J. (2014). Pathogenesis of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury and Clinical Perspectives. *Gastroenterology*, 146(4), 914–928. <https://doi.org/doi:10.1053/j.gastro.2013.12.032>
- Fontana, R. J., Seeff, L. B., Andrade, R. J., Björnsson, E., Day, C. P., Serrano, J., & Hoofnagle, J. H. (2010). Standardization of nomenclature and causality assessment in drug-induced liver injury: Summary of a clinical research workshop. *Hepatology*, 52(2), 730–742. <https://doi.org/10.1002/hep.23696>
- Fu, S., Wu, D., Jiang, W., Li, J., Long, J., Jia, C., & Zhou, T. (2020). Molecular Biomarkers in Drug-Induced Liver Injury: Challenges and Future Perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, 10(January), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01667>
- Funk, C., & Roth, A. (2017). Current limitations and future opportunities for prediction of DILI from in vitro. *Archives of Toxicology*, 91(1), 131–142. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1874-9>
- Gao, X., & Liu, Y. (2017). A transcriptomic study suggesting human iPSC-derived hepatocytes potentially offer a better in vitro model of hepatotoxicity than most hepatoma cell lines. *Cell Biology and Toxicology*, 33(4), 407–421. <https://doi.org/10.1007/s10565-017-9383-z>
- Gao, X., Li, R., Cahan, P., Zhao, Y., Yourick, J. J., & Sprando, R. L. (2020). Hepatocyte-like cells derived from human induced pluripotent stem cells using small molecules: Implications of a transcriptomic study. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01914-1>
- Gao, Y., Zhang, X., Zhang, L., Cen, J., Ni, X., Liao, X., Yang, C., Li, Y., Chen, X., Zhang, Z., Shu, Y., Cheng, X., Hay, D. C., Lai, D., Pan, G., Wei, G., & Hui, L. (2017). Distinct Gene Expression and Epigenetic Signatures in Hepatocyte-like Cells Produced by Different Strategies from the Same Donor. *Stem Cell Reports*, 9(6), 1813–1824. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.019>
- García-Cañaveras, J. C., Castell, J. V., Donato, M. T., & Lahoz, A. (2016). A metabolomics cell-based approach for anticipating and investigating drug-induced liver injury. *Scientific Reports*, 6(January), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep27239>

- García-Cañaveras, J. C., Lancho, O., Ducker, G. S., Ghergurovich, J. M., Xu, X., da Silva-Diz, V., Minuzzo, S., Indraccolo, S., Kim, H., Herranz, D., & Rabinowitz, J. D. (2021). SHMT inhibition is effective and synergizes with methotrexate in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *35*(2), 377–388. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0845-6>
- George, J., Singh, R., Mahmood, Z., & Shukla, Y. (2010). Toxicoproteomics: New paradigms in toxicology research. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *20*(7), 415–423. <https://doi.org/10.3109/15376511003667842>
- Ghodsizadeh, A., Hosseinkhani, H., Piryaei, A., Pournasr, B., Najarasl, M., Hiraoka, Y., & Baharvand, H. (2014). Galactosylated collagen matrix enhanced in vitro maturation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Biotechnology Letters*, *36*(5), 1095–1106. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1454-0>
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Bode, J. G., Bolleyn, J., Borner, C., Böttger, J., Braeuning, A., Budinsky, R. A., Burkhardt, B., Cameron, N. R., Camussi, G., Cho, C. S., Choi, Y. J., Craig Rowlands, J., Dahmen, U., ... Hengstler, J. G. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. In *Archives of Toxicology* (Vol. 87, Issue 8). <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>
- Golke, T., Mucher, P., Schmidt, P., Radakovics, A., Repl, M., Hofer, P., Perkmann, T., Fondi, M., Schmetterer, K. G., & Haslacher, H. (2022). Delays during PBMC isolation have a moderate effect on yield, but severely compromise cell viability. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *60*(5), 701–706. <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0003>
- Gómez-Lechón, M. J., & Tolosa, L. (2016). Human hepatocytes derived from pluripotent stem cells: a promising cell model for drug hepatotoxicity screening. *Archives of Toxicology*, *90*(9), 2049–2061. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1756-1>
- Gómez-Lechón, M. J., Tolosa, L., Castell, J. V., & Donato, M. T. (2010). Mechanism-based selection of compounds for the development of innovative in vitro approaches to hepatotoxicity studies in the LIINTOP project. *Toxicology in Vitro*, *24*(7), 1879–1889. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.07.018>
- Gómez-Lechón, M. J., Tolosa, L., Castell, J. V., & Donato, M. T. (2010). Mechanism-based selection of compounds for the development of innovative in vitro approaches to hepatotoxicity studies in the LIINTOP project. *Toxicology in Vitro*, *24*(7), 1879–1889. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.07.018>
- Gómez-Lechón, M. J., Tolosa, L., Conde, I., & Donato, M. T. (2014). Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, *10*(11), 1553–1568. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.967680>
- González, F., Boué, S., & Belmonte, J. C. I. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: Reprogramming à la carte. *Nature Reviews Genetics*, *12*(4), 231–242. <https://doi.org/10.1038/nrg2937>
- Gordillo, M., Evans, T., & Gouon-Evans, V. (2015). Orchestrating liver development. *Development (Cambridge)*, *142*(12), 2094–2108. <https://doi.org/10.1242/dev.114215>
- Gorzalczany, S. B., & Rodriguez Basso, A. G. (2021). Strategies to apply 3Rs in preclinical testing. *Pharmacology Research and Perspectives*, *9*(5), 1–9. <https://doi.org/10.1002/prp2.863>
- Graffmann, N., Ncube, A., Wruck, W., & Adjaye, J. (2018). Cell fate decisions of human iPSC-derived bipotential hepatoblasts depend on cell density. *PLoS ONE*, *13*(7), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200416>

- Grapin-Botton, A. (2008). Endoderm specification. *StemBook*. <https://doi.org/10.3824/stembook.1.30.1>
- Gu, X., & Manautou, J. E. (2012). Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *14*(e4), e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>
- Han, H. S., Kang, G., Kim, J. S., Choi, B. H., & Koo, S. H. (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental and Molecular Medicine*, *48*(3), e218-10. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>
- Hannan, N. R. F., Segeritz, C. P., Touboul, T., & Vallier, L. (2013). Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, *8*(2), 430–437. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.153>
- Hay, D. C., Fletcher, J., Payne, C., Terrace, J. D., Gallagher, R. C. J., Snoeys, J., Black, J. R., Wojtacha, D., Samuel, K., Hannoun, Z., Pryde, A., Filippi, C., Currie, I. S., Forbes, S. J., Ross, J. A., Newsome, P. N., & Iredale, J. P. (2008b). Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(34), 12301–12306. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806522105>
- Hay, D. C., Zhao, D., Fletcher, J., Hewitt, Z. A., McLean, D., Urruticoechea-Uriguen, A., Black, J. R., Elcombe, C., Ross, J. A., Wolf, R., & Cui, W. (2008a). Efficient Differentiation of Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells Exhibiting Markers Recapitulating Liver Development In Vivo. *Stem Cells*, *26*(4), 894–902. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0718>
- Hayes, M., & Zavazava, N. (2013). Strategies to generate induced pluripotent stem cells. *Methods in Molecular Biology*, *1029*, 77–92. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-478-4_6
- Heijne, W. H. M., Kienhuis, A. S., Van Ommen, B., Stierum, R. H., & Groten, J. P. (2005). Systems toxicology: Applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. *Expert Review of Proteomics*, *2*(5), 767–780. <https://doi.org/10.1586/14789450.2.5.767>
- Heimark, L. D., Wienkers, L., Kunze, K., Gibaldi, M., Eddy, A. C., Trager, W. F., O'Reilly, R. A., & Goulart, D. A. (1992). The mechanism of the interaction between amiodarone and warfarin in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *51*(4), 398–407. <https://doi.org/10.1038/clpt.1992.39>
- Hofmann, A. (2009). The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *1*(14), 2584–2598.
- Holmgren, G., Sjögren, A.-K., Barragan, I., Sabirsh, A., Sartipy, P., Synnergren, J., Björquist, P., Ingelman-Sundberg, M., Andersson, T. B., & Edsbacke, J. (2014). Long-Term Chronic Toxicity Testing Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, *42*(9), 1401–1406. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.059154>
- Holt, J. A., Luo, G., Billin, A. N., Bisi, J., McNeill, Y. Y., Kozarsky, K. F., Donahee, M., Wang, D. Y., Mansfield, T. A., Kliewer, S. A., Goodwin, B., & Jones, S. A. (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes and Development*, *17*(13), 1581–1591. <https://doi.org/10.1101/gad.1083503>
- Holtzinger, A., Streeter, P. R., Sarangi, F., Hillborn, S., Niapour, M., Ogawa, S., & Keller, G. (2015). New markers for tracking endoderm induction and hepatocyte differentiation from human pluripotent stem cells. *Development*, *142*(24), 4253–4265. <https://doi.org/10.1242/dev.121020>
- Hoofnagle, J. H., & Navarro, V. J. (2013). Drug-Induced Liver Injury: Icelandic Lessons. *Gastroenterology*, *144*(7),

1335–1336. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.026>

- Housset, C., Chrétien, Y., Debray, D., & Chignard, N. (2016). Functions of the Gallbladder. *Comprehensive Physiology*, 6(3), 1549–1577. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150050>
- Iyanagi, T. (2007). Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. *International Review of Cytology*, 260(06), 35–112. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)60002-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)60002-8)
- Jaafarpour, Z., Soleimani, M., Hosseinkhani, S., & Geramizadeh, B. (2019). Biologicals Overexpression of microRNA-375 and microRNA-122 promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *Biologicals*, November, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.005>
- Jancova, P., Anzenbacher, P., & Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers*, 154(2), 103–116. <https://doi.org/10.5507/bp.2010.017>
- Jellali, Lereau Bernier, M., Tauran, Y., Gilard, F., Danoy, M., Kido, T., Miyajima, A., Sakai, Y., & Leclerc, E. (2020). Metabolomic profiling during the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *Differentiation*, 112(October 2019), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.10.006>
- Jennen, D., Polman, J., Bessem, M., Coonen, M., van Delft, J., & Kleinjans, J. (2015). Drug-induced liver injury classification model based on in vitro human transcriptomics and in vivo rat clinical chemistry data. *Systems Biomedicine*, 2(4), 63–70. <https://doi.org/10.4161/sysb.29400>
- Jensen-Urstad, A. P. L., & Semenkovich, C. F. (2012). Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(5), 747–753. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.09.017>
- Jerram, A., Guy, T. V., Beutler, L., Gunasegaran, B., Sluyter, R., de St Groth, B. F., & McGuire, H. M. (2021). Effects of storage time and temperature on highly multiparametric flow analysis of peripheral blood samples; implications for clinical trial samples. *Bioscience Reports*, 41(2), 1–15. <https://doi.org/10.1042/BSR20203827>
- Jin, M., Yi, X., Liao, W., Chen, Q., Yang, W., Li, Y., Li, S., Gao, Y., & Peng, Q. (2021). *Advancements-in-stem-cell-derived-hepatocytelike-cell-models-for-hepatotoxicity-testingStem-Cell-Research-and-Therapy.pdf*. 1–13.
- Jones, J. G. (2016). Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia*, 59(6), 1098–1103. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3940-5>
- Joseph, P. (2017). Transcriptomics in toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 109(Pt 1), 650–662. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.031>
- Jossé, R., Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J., Fessard, V., Morel, F., Poul, J. M., Guguen-Guillouzo, C., & Guillouzo, A. (2008). Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(6), 1111–1118. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.019901>
- Kajiwara, M., Aoi, T., Okita, K., Takahashi, R., Inoue, H., Takayama, N., Endo, H., Eto, K., Toguchida, J., Uemoto, S., & Yamanaka, S. (2012). Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

109(31), 12538–12543. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209979109>

- Kanninen, L. K., Harjumäki, R., Peltoniemi, P., Bogacheva, M. S., Salmi, T., Porola, P., Niklander, J., Smutný, T., Urtti, A., Yliperttula, M. L., & Lou, Y. R. (2016). Laminin-511 and laminin-521-based matrices for efficient hepatic specification of human pluripotent stem cells. *Biomaterials*, *103*, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.054>
- Kaserman, J. E., & Wilson, A. A. (2017). Protocol for Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) to a Hepatic Lineage. In *Methods Mol Biol.* (pp. 151–160). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7163-3_15
- Katarey, D., & Verma, S. (2016). Drug-induced liver injury. *Clinical Medicine (London, England)*, *16*(Suppl 6), s104–s109. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-6-s104>
- Keller, A., Dzedzicka, D., Zambelli, F., Markouli, C., Sermon, K., Spits, C., & Geens, M. (2018). Genetic and epigenetic factors which modulate differentiation propensity in human pluripotent stem cells. *Human Reproduction Update*, *24*(2), 162–175. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx042>
- Khoury, T., Rmeileh, A. A., Yosha, L., Benson, A. A., Daher, S., & Mizrahi, M. (2015). Drug induced liver injury: Review with a focus on genetic factors, tissue diagnosis, and treatment options. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, *3*(2), 99–108. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2015.00007>
- Kierszenbaum, A. (2016). *Histología y biología celular*. Elsevier.
- Kim, J. W., Hattori, A., & Phongsamran, P. V. (2010). Drug-Induced Liver Disease. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, *22*(3), 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2010.02.002>
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H., Ehrlich, L. I. R., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K. C., Hongguang, H., Mckinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T. J., Irizarry, R. A., Jung, N., ... Daley, G. Q. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, *467*(7313), 285–290. <https://doi.org/10.1038/nature09342>
- Kimura, K., Horiguchi, I., Kido, T., Miyajima, A., & Sakai, Y. (2019). Enhanced Hepatic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Gas-Permeable Membrane. *Tissue Engineering - Part A*, *25*(5–6), 457–467. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0084>
- Kohonen, P., Parkkinen, J. A., Willighagen, E. L., Ceder, R., Wennerberg, K., Kaski, S., & Grafström, R. C. (2017). A transcriptomics data-driven gene space accurately predicts liver cytopathology and drug-induced liver injury. *Nature Communications*, *8*(July). <https://doi.org/10.1038/ncomms15932>
- Krause, P., Saghatolislam, F., Koenig, S., Unthan-Fechner, K., & Probst, I. (2009). Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, *45*(5–6), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9166-1>
- Kullak-Ublick, G. A., Andrade, R. J., Merz, M., End, P., Benesic, A., Gerbes, A. L., & Aithal, G. P. (2017). Drug-induced liver injury: Recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut*, *66*(6), 1154–1164. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313369>
- Kuna, L., Bozic, I., Kizivat, T., Bojanic, K., Mrso, M., Kralj, E., Smolic, R., Wu, G. Y., & Smolic, M. (2018). Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) – Current Issues and Future Perspectives. *Current Drug Metabolism*, *19*(10),

830–838. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180523095355>

- Labbe, G., Pessayre, D., & Fromenty, B. (2008). Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: Mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, *22*(4), 335–353. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00608.x>
- Lahoz, A., Donato, M., Castell, J., & Gomez-Lechon, M. (2008). Strategies to In Vitro Assessment of Major Human CYP Enzyme Activities by Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Current Drug Metabolism*, *9*(1), 12–19. <https://doi.org/10.2174/138920008783331112>
- Lam, M. T., & Longaker, M. T. (2012). Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *6*(S3), s80–s86. <https://doi.org/10.1002/term.1499>
- Lammert, C., Einarsson, S., Saha, C., Niklasson, A., Bjornsson, E., & Chalasani, N. (2008). Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: Search for signals. *Hepatology*, *47*(6), 2003–2009. <https://doi.org/10.1002/hep.22272>
- Langhans, S. A. (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9, Issue JAN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>
- Latarjet, M., & Liard, A. (2004). *Anatomía humana* (4th ed.).
- Lee, C. R., Goldstein, J. A., & Pieper, J. A. (2002). Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: A comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics*, *12*(3), 251–263. <https://doi.org/10.1097/00008571-200204000-00010>
- Li, Shuaizhang, & Xia, M. (2019). Review of high-content screening applications in toxicology. *Archives of Toxicology*, *93*(12), 3387–3396. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02593-5>
- Li, Shuang, Huang, S. Q., Zhao, Y. X., Ding, Y. J., Ma, D. J., & Ding, Q. R. (2019). Derivation and applications of human hepatocyte-like cells. *World Journal of Stem Cells*, *11*(8), 535–547. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i8.535>
- Licata, A. (2016). Adverse drug reactions and organ damage: The liver. *European Journal of Internal Medicine*, *28*, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2015.12.017>
- Liguori, M. J., Ditewig, A. C., Maddox, J. F., Luyendyk, J. P., Lehman-Mckeeman, L. D., Nelson, D. M., Bhaskaran, V. M., Waring, J. F., Ganey, P. E., Roth, R. A., & Blomme, E. A. G. (2010). Comparison of TNF α to lipopolysaccharide as an inflammagen to characterize the idiosyncratic hepatotoxicity potential of drugs: Trovafloxacin as an example. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(11), 4697–4714. <https://doi.org/10.3390/ijms11114697>
- Liu, Y., Cheng, D., Li, Z., Gao, X., & Wang, H. (2012). The gene expression profiles of induced pluripotent stem cells (iPSCs) generated by a non-integrating method are more similar to embryonic stem cells than those of iPSCs generated by an integrating method. *Genetics and Molecular Biology*, *35*(3), 693–700. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000050>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Loh, K. M., Ang, L. T., Zhang, J., Kumar, V., Ang, J., Auyeong, J. Q., Lee, K. L., Choo, S. H., Lim, C. Y. Y., Nichane, M., Tan, J., Noghabi, M. S., Azzola, L., Ng, E. S., Durruthy-Durruthy, J., Sebastiano, V., Poellinger, L., Elefanty, A. G., Stanley, E. G., ... Lim, B. (2014). Efficient Endoderm Induction from Human Pluripotent Stem Cells by Logically Directing Signals Controlling Lineage Bifurcations. *Cell Stem Cell*, 14(2), 237–252. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.007>
- Loh, K. M., Palaria, A., & Ang, L. T. (2019). Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into liver cells. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(148), 1–9. <https://doi.org/10.3791/58975>
- Longo, V. D., & Mattson, M. P. (2014). Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Cell Metabolism*, 19(2), 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.008>
- López-Chicharro, J., & López-Mojares, L. M. (2019). *Fisiología Clínica del Ejercicio* (3rd ed.). Ed. Médica Panamericana.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lu, J., Jones, A. D., Harkema, J. R., Roth, R. A., & Ganey, P. E. (2012). Amiodarone exposure during modest inflammation induces idiosyncrasy-like liver injury in rats: Role of tumor necrosis factor- α . *Toxicological Sciences*, 125(1), 126–133. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr266>
- Lucena, M. I., Andrade, R. J., Kaplowitz, N., García-Cortes, M., Fernández, M. C., Romero-Gomez, M., Bruguera, M., Hallal, H., Robles-Diaz, M., Rodriguez-González, J. F., Navarro, J. M., Salmeron, J., Martinez-Odrizola, P., Pérez-Alvarez, R., Borraz, Y., & Hidalgo, R. (2009). Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: The influence of age and sex. *Hepatology*, 49(6), 2001–2009. <https://doi.org/10.1002/hep.22895>
- Lucena, M. I., Molokhia, M., Shen, Y., Urban, T. J., Aithal, G. P., Andrade, R. J., Day, C. P., Ruizcabello, F., Donaldson, P. T., Stephens, C., Pirmohamed, M., Romerogomez, M., Navarro, J. M., Fontana, R. J., Miller, M., Groome, M., Bondonguitton, E., Conforti, A., Stricker, B. H. C., ... Daly, A. K. (2011). Susceptibility to amoxicillin-clavulanate-induced liver injury is influenced by multiple HLA class I and II alleles. *Gastroenterology*, 141(1), 338–347. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.001>
- Lynch, T., & Price, A. (2007). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American Family Physician*, 76(3), 391–396.
- Ma, Z., Wang, X., Yin, P., Wu, R., Zhou, L., Xu, G., & Niu, J. (2019). Serum metabolome and targeted bile acid profiling reveals potential novel biomarkers for drug-induced liver injury. *Medicine (United States)*, 98(31). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016717>
- Maherali, N., & Hochedlinger, K. (2008). Guidelines and Techniques for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 3(6), 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.008>
- Mak, A., & Uetrecht, J. (2015). Immunization with amodiaquine-modified hepatic proteins prevents amodiaquine-induced liver injury. *Journal of Immunotoxicology*, 12(4), 361–367. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2014.983660>
- Mandavilli, B. S., Aggeler, R. J., & Chambers, K. M. (2018). Tools to measure cell health and cytotoxicity using high

content imaging and analysis. *Methods in Molecular Biology*, 1683, 33–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7357-6_3

- Manterola, C., Sol, M. del, Ottone, N., & Otzen, T. (2017). Radiological and Surgical Anatomy of the Liver and Fundamentals of the Various Options Liver Resections. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1525–1540. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401525>
- Mathapati, S., Siller, R., Impellizzeri, A. A. R., Lycke, M., Vegheim, K., Almaas, R., & Sullivan, G. J. (2016). Small-molecule-directed hepatocyte-like cell differentiation of human pluripotent stem cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 2016, 1–18. <https://doi.org/10.1002/cpsc.13>
- Medine, C. N., Lucendo-Villarin, B., Zhou, W., West, C. C., & Hay, D. C. (2011). Robust generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cell populations. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 56, 2–9. <https://doi.org/10.3791/2969>
- Meunier, L., & Larrey, D. (2019). Drug-induced liver injury: Biomarkers, requirements, candidates, and validation. *Frontiers in Pharmacology*, 10(December), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01482>
- Monshi, M. M., Faulkner, L., Gibson, A., Jenkins, R. E., Farrell, J., Earnshaw, C. J., Alfirevic, A., Cederbrant, K., Daly, A. K., French, N., Pirmohamed, M., Park, B. K., & Naisbitt, D. J. (2013). Human leukocyte antigen (HLA)-B*57:01-restricted activation of drug-specific T cells provides the immunological basis for flucloxacillin-induced liver injury. *Hepatology*, 57(2), 727–739. <https://doi.org/10.1002/hep.26077>
- Moreno-Torres, M., Kumar, M., García-Llorens, G., Quintás, G., Tricot, T., Boon, R., Tolosa, L., Toprakhisar, B., Chesnais, F., Verfaillie, C., & Castell, J. V. (2022). A Novel UPLC-MS Metabolomic Analysis-Based Strategy to Monitor the Course and Extent of iPSC Differentiation to Hepatocytes. *Journal of Proteome Research*, 21(3), 702–712. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00779>
- Morgan, R. E., van Staden, C. J., Chen, Y., Kalyanaraman, N., Kalanzi, J., Dunn, R. T., Afshari, C. A., & Hamadeh, H. K. (2013). A multifactorial approach to hepatobiliary transporter assessment enables improved therapeutic compound development. *Toxicological Sciences*, 136(1), 216–241. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft176>
- Morita, M., Akai, S., Hosomi, H., Tsuneyama, K., Nakajima, M., & Yokoi, T. (2009). Drug-induced hepatotoxicity test using γ -glutamylcysteine synthetase knockdown rat. *Toxicology Letters*, 189(2), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.016>
- Mun, S. J., Ryu, J. S., Lee, M. O., Son, Y. S., Oh, S. J., Cho, H. S., Son, M. Y., Kim, D. S., Kim, S. J., Yoo, H. J., Lee, H. J., Kim, J., Jung, C. R., Chung, K. S., & Son, M. J. (2019). Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids. In *Journal of Hepatology* (Vol. 71, Issue 5). European Association for the Study of the Liver. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.030>
- Nagasaka, R., Matsumoto, M., Okada, M., Sasaki, H., Kanie, K., Kii, H., Uozumi, T., Kiyota, Y., Honda, H., & Kato, R. (2017). Visualization of morphological categories of colonies for monitoring of effect on induced pluripotent stem cell culture status. *Regenerative Therapy*, 6, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2016.12.003>
- Nakamori, D., Takayama, K., Nagamoto, Y., Mitani, S., Sakurai, F., Tachibana, M., & Mizuguchi, H. (2016). Hepatic maturation of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells by ATF5, c/EBP α , and PROX1 transduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(3), 424–429. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.007>
- Nakanishi, M., & Otsu, M. (2012). Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene

Therapy and Regenerative Medicine. *Current Gene Therapy*, 12(5), 410–416.
<https://doi.org/10.2174/156652312802762518>

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2012). Amoxicillin Clavulanate. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug Induced Liver Injury* (pp. 1–26).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2018). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (7th ed.). Ediciones Omega, S.A.

Netter, F. H. (2015). *Atlas de Anatomía Humana* (6a ed., Vol. 6). Elsevier-Masson.

Nguyen, T., Nioi, P., & Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13291–13295.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>

Nishizawa, M., Chonabayashi, K., Nomura, M., Tanaka, A., Nakamura, M., Inagaki, A., Nishikawa, M., Takei, I., Oishi, A., Tanabe, K., Ohnuki, M., Yokota, H., Koyanagi-Aoi, M., Okita, K., Watanabe, A., Takaori-Kondo, A., Yamanaka, S., & Yoshida, Y. (2016). Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell Stem Cell*, 19(3), 341–354.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.019>

O'Brien, P. J., Irwin, W., Diaz, D., Howard-Cofield, E., Krejsa, C. M., Slaughter, M. R., Gao, B., Kaludercic, N., Angeline, A., Bernardi, P., Brain, P., & Hougham, C. (2006). High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of Toxicology*, 80(9), 580–604. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0091-3>

Ober, E. A., & Lemaigre, F. P. (2018). Development of the liver: Insights into organ and tissue morphogenesis. *Journal of Hepatology*, 68(5), 1049–1062. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.005>

Ogawa, S., Surapisitchat, J., Virtanen, C., Ogawa, M., Niapour, M., Sugamori, K. S., Wang, S., Tamblyn, L., Guillemette, C., Hoffmann, E., Zhao, B., Strom, S., Laposa, R. R., Tyndale, R. F., Grant, D. M., & Keller, G. (2013). Three-dimensional culture and cAMP signaling promote the maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. *Development*, 140(15), 3285–3296. <https://doi.org/10.1242/dev.090266>

Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J. M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S. L., Manos, P. D., Rossi, D. J., Yu, J., Hebrok, M., Hochedlinger, K., Costello, J. F., Song, J. S., & Ramalho-Santos, M. (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nature Cell Biology*, 13(5), 541–549. <https://doi.org/10.1038/ncb2239>

Okumura, T., Horie, Y., Lai, C.-Y., Lin, H.-T., Shoda, H., Natsumoto, B., Fujio, K., Kumaki, E., Okano, T., Ono, S., Tanita, K., Morio, T., Kanegane, H., Hasegawa, H., Mizoguchi, F., Kawahata, K., Kohsaka, H., Moritake, H., Nunoi, H., ... Otsu, M. (2019). Robust and highly efficient hiPSC generation from patient non-mobilized peripheral blood-derived CD34+ cells using the auto-erasable Sendai virus vector. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 185. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1273-2>

Omari A. A., & Murry, D. J. (2007). Pharmacogenetics of the cytochrome P450 enzyme system: Review of current knowledge and clinical significance. *Journal of Pharmacy Practice*, 20(3), 206–218.
<https://doi.org/10.1177/0897190007304821>

Ortica, S., Tarantino, N., Aulner, N., Israël, A., & Gupta-Rossi, N. (2014). The 4 Notch receptors play distinct and antagonistic roles in the proliferation and hepatocytic differentiation of liver progenitors. *FASEB Journal*,

28(2), 603–614. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235903>

- Ouchi, R., Togo, S., Kimura, M., Shinozawa, T., Koido, M., Koike, H., Thompson, W., Karns, R. A., Mayhew, C. N., McGrath, P. S., McCauley, H. A., Zhang, R., Lewis, K., Hakozaiki, S., Ferguson, A., Saiki, N., Yoneyama, Y., Takeuchi, I., Mabuchi, Y., ... Takebe, T. (2019). Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Cell Metabolism*, 30(2), 374-384.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.007>
- Oyebode, O. T., Adebisi, O. R., & Olorunsogo, O. O. (2019). Toxicity of some broad-spectrum antibacterials in normal rat liver: the role of mitochondrial membrane permeability transition pore. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(2), 128–137. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1528651>
- Pan, G. (2019). Roles of Hepatic Drug Transporters in Drug Disposition and Liver Toxicity. In X. Liu & G. Pan (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1141, pp. 361–405). https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_9
- Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M., & Williams, D. P. (2005). The Role of Metabolic Activation in Drug-Induced Hepatotoxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 177–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.100058>
- Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., Kaestner, K. H., Rossi, J. M., Zaret, K. S., & Duncan, S. A. (2003). Hepatocyte nuclear factor 4 α controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nature Genetics*, 34(3), 292–296. <https://doi.org/10.1038/ng1175>
- Payne, C., King, J., & Hay, D. (2011). The Role of Activin / Nodal and Wnt Signaling in Endoderm Formation. In *Vitamins And Hormones: Activins and Inhibins* (1st ed., Vol. 85). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385961-7.00010-X>
- Pearce, R. E., Gaedigk, R., Twist, G. P., Dai, H., Riffel, A. K., Leeder, J. S., & Gaedigk, A. (2016). Developmental expression of CYP2B6: A comprehensive analysis of mRNA expression, protein content and bupropion hydroxylase activity and the impact of genetic variation. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(7), 948–958. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.067546>
- Pegoraro, G., & Misteli, T. (2017). High-Throughput Imaging for the Discovery of Cellular Mechanisms of Disease. *Trends in Genetics*, 33(9), 604–615. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.06.005>
- Perugorria, M. J., Olaizola, P., Labiano, I., Esparza-Baquer, A., Marzioni, M., Marin, J. J. G., Bujanda, L., & Banales, J. M. (2019). Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(2), 121–136. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0075-9>
- Petros, Z., Makonnen, E., & Aklillu, E. (2017). Genome-Wide Association Studies for Idiosyncratic Drug-Induced Hepatotoxicity: Looking Back-Looking Forward to Next-Generation Innovation. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 21(3), 123–131. <https://doi.org/10.1089/omi.2017.0006>
- Petrov, P. D., Soluyanova, P., Sánchez-Campos, S., Castell, J. V., & Jover, R. (2021). Molecular mechanisms of hepatotoxic cholestasis by clavulanic acid: Role of NRF2 and FXR pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112664>
- Pettinato, G., Lehoux, S., Ramanathan, R., Salem, M. M., He, L. X., Muse, O., Flaumenhaft, R., Thompson, M. T., Rouse, E. A., Cummings, R. D., Wen, X., & Fisher, R. A. (2019). Generation of fully functional hepatocyte-like organoids from human induced pluripotent stem cells mixed with Endothelial Cells. *Scientific Reports*, 9(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45514-3>

- Pfeiffer, E., Kegel, V., Zeilinger, K., Hengstler, J. G., Nüssler, A. K., Seehofer, D., & Damm, G. (2015). Featured Article: Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells. *Experimental Biology and Medicine*, 240(5), 645–656. <https://doi.org/10.1177/1535370214558025>
- Phillips, K. A., Veenstra, D. L., Oren, E., Lee, J. K., & Sadee, W. (2001). Potential Role of Pharmacogenomics A Systematic Review. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 286(18), 2270–2279.
- Piao, Y., Hung, S. S.-C., Lim, S. Y., Wong, R. C.-B., & Ko, M. S. H. (2014). Efficient Generation of Integration-Free Human Induced Pluripotent Stem Cells From Keratinocytes by Simple Transfection of Episomal Vectors. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(7), 787–791. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0036>
- Qu, X., Liu, T., Song, K., Li, X., & Ge, D. (2012). Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Human Adipose-Derived Stem Cells Using a Non-Viral Polycistronic Plasmid in Feeder-Free Conditions. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048161>
- Raab, S., Klingenstein, M., Liebau, S., & Linta, L. (2014). A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/768391>
- Rambhatla, L., Chiu, C. P., Kundu, P., Peng, Y., & Carpenter, M. K. (2003). Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplantation*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.3727/000000003783985179>
- Ramli, M. N. Bin, Lim, Y. S., Koe, C. T., Demircioglu, D., Tng, W., Gonzales, K. A. U., Tan, C. P., Szczerbinska, I., Liang, H., Soe, E. L., Lu, Z., Ariyachet, C., Yu, K. M., Koh, S. H., Yaw, L. P., Jumat, N. H. B., Lim, J. S. Y., Wright, G., Shabbir, A., ... Chan, Y. S. (2020). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids as Models of Liver Disease. *Gastroenterologyfile:///C:/Users/Maria/Desktop/Antioxidants/S41591-019-0660-7.Pdf*, 159(4), 1471–1486.e12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.010>
- Rao, M. S., Van Vleet, T. R., Ciurlionis, R., Buck, W. R., Mittelstadt, S. W., Blomme, E. A. G., & Liguori, M. J. (2019). Comparison of RNA-Seq and microarray gene expression platforms for the toxicogenomic evaluation of liver from short-term rat toxicity studies. *Frontiers in Genetics*, 10(JAN), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00636>
- Ray, A., Joshi, J. M., Sundaravadelu, P. K., Raina, K., Lenka, N., Kaveeshwar, V., & Thummer, R. P. (2021). An Overview on Promising Somatic Cell Sources Utilized for the Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 17(6), 1954–1974. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10200-3>
- Riddick, D. S., Lee, C., Bhatena, A., Timsit, Y. E., Cheng, P. Y., Morgan, E. T., Prough, R. A., Ripp, S. L., Miller, K. K. M., Jahan, A., & Chiang, J. Y. L. (2004). Transcriptional suppression of cytochrome P450 genes by endogenous and exogenous chemicals. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(4), 367–375. <https://doi.org/10.1124/dmd.32.4.367>
- Roberts, M., Magnusson, B., Burczynski, F., & Weiss, M. (2002). Enterohepatic Circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 41(10), 751–790. <https://doi.org/https://doi.org/10.2165/00003088-200241100-00005>
- Roelandt, P., Pauwelyn, K. A., Sancho-Bru, P., Subramanian, K., Bose, B., Ordovas, L., Vanuytsel, K., Geraerts, M., Firpo, M., de Vos, R., Fevery, J., Nevens, F., Hu, W. S., & Verfaillie, C. M. (2010). Human embryonic and rat adult stem cells with primitive endoderm-like phenotype can be fated to definitive endoderm, and finally hepatocyte-like cells. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012101>

- Rose, K. A., Holman, N. S., Green, A. M., Andersen, M. E., & LeCluyse, E. L. (2016). Co-culture of Hepatocytes and Kupffer Cells as an In Vitro Model of Inflammation and Drug-Induced Hepatotoxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *105*(2), 950–964. [https://doi.org/10.1016/S0022-3549\(15\)00192-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3549(15)00192-6)
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2015). Histología: Texto y Atlas. In *Histología: Texto y Atlas*. Médica Panamericana.
- Rossi, J. M., Dunn, N. R., Hogan, B. L. M., & Zaret, K. S. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum, transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes and Development*, *15*(15), 1998–2009. <https://doi.org/10.1101/gad.904601>
- Roth, A. D., & Lee, M. Y. (2017). Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury (IDILI): Potential Mechanisms and Predictive Assays. *BioMed Research International*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/9176937>
- Roth, R. A., & Ganey, P. E. (2020). What have we learned from animal models of idiosyncratic, drug-induced Liver Injury? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *0*(0), 1. <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1760246>
- Roth, R. A., Luyendyk, J. P., Maddox, J. F., & Ganey, P. E. (2003). Inflammation and drug idiosyncrasy - Is there a connection? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *307*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041624>
- Rowe, C., Gerrard, D. T., Jenkins, R., Berry, A., Durkin, K., Sundstrom, L., Goldring, C. E., Park, B. K., Kitteringham, N. R., Hanley, K. P., & Hanley, N. A. (2013). Proteome-wide analyses of human hepatocytes during differentiation and dedifferentiation. *Hepatology*, *58*(2), 799–809. <https://doi.org/10.1002/hep.26414>
- Saito, Y., Ikemoto, T., Morine, Y., & Shimada, M. (2020). Current status of hepatocyte-like cell therapy from stem cells. *Surgery Today*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s00595-020-02092-6>
- Schaap, F. G., van der Gaag, N. A., Gouma, D. J., & Jansen, P. L. M. (2009). High expression of the bile salt-homeostatic hormone fibroblast growth factor 19 in the liver of patients with extrahepatic cholestasis. *Hepatology*, *49*(4), 1228–1235. <https://doi.org/10.1002/hep.22771>
- Schmelzer, E., Wauthier, E., & Reid, L. M. (2006). The Phenotypes of Pluripotent Human Hepatic Progenitors. *Stem Cells*, *24*(8), 1852–1858. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0036>
- Schneider, J. L., & Cuervo, A. M. (2014). Liver autophagy: Much more than just taking out the trash. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *11*(3), 187–200. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.211>
- Sebode, M., Schulz, L., & Lohse, A. W. (2017). “Autoimmune(-like)” drug and herb induced liver injury: New insights into molecular pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091954>
- Sgro, C., Clinard, F., Ouazir, K., Chanay, H., Allard, C., Guilleminet, C., Lenoir, C., Lemoine, A., & Hillon, P. (2002). Incidence of drug-induced hepatic injuries: A French population-based study. *Hepatology*, *36*(2), 451–455. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.34857>
- Shan, J., Schwartz, R. E., Ross, N. T., Logan, D. J., Thomas, D., Duncan, S. A., North, T. E., Goessling, W., Carpenter, A. E., & Bhatia, S. N. (2013). Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and iPSC differentiation. *Nature Chemical Biology*, *9*(8), 514–520. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1270>
- Sharma, A., Mücke, M., & Seidman, C. E. (2018). Human Induced Pluripotent Stem Cell Production and Expansion

- from Blood using a Non-Integrating Viral Reprogramming Vector. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1), 1–20. <https://doi.org/10.1002/cpmb.58>
- Shaw, P. J., Hopfensperger, M. J., Ganey, P. E., & Roth, R. A. (2007). Lipopolysaccharide and trovafloxacin coexposure in mice causes idiosyncrasy-like liver injury dependent on tumor necrosis factor- α . *Toxicological Sciences*, 100(1), 259–266. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm218>
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(2), 115–130. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
- Shin, D., Pal, S., & Monga, S. (2013). Cellular and Molecular Basis of Liver Development Anteroposterior Endoderm Patterning. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 799–815. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120022>. Cellular
- Shinozawa, T., Kimura, M., Cai, Y., Saiki, N., Yoneyama, Y., Ouchi, R., Koike, H., Maezawa, M., Zhang, R.-R., Dunn, A., Ferguson, A., Togo, S., Lewis, K., Thompson, W. L., Asai, A., & Takebe, T. (2021). High-Fidelity Drug-Induced Liver Injury Screen Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Gastroenterology*, 160(3), 831–846.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.002>
- Sibulesky, L. (2013). Normal liver anatomy. *Clinical Liver Disease*, 2(SUPPL. 1), 2012–2014. <https://doi.org/10.1002/cld.124>
- Silva, M., Daheron, L., Hurley, H., Bure, K., Barker, R., Carr, A. J., Williams, D., Kim, H. W., French, A., Coffey, P. J., Cooper-White, J. J., Reeve, B., Rao, M., Snyder, E. Y., Ng, K. S., Mead, B. E., Smith, J. A., Karp, J. M., Brindley, D. A., & Wall, I. (2015). Generating iPSCs: Translating cell reprogramming science into scalable and robust biomanufacturing strategies. *Cell Stem Cell*, 16(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.12.013>
- Sineva, G. S., & Pospelov, V. A. (2010). Inhibition of GSK3 β enhances both adhesive and signalling activities of β -catenin in mouse embryonic stem cells. *Biology of the Cell*, 102(10), 549–564. <https://doi.org/10.1042/bc20100016>
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., & Duncan, S. A. (2010a). Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental Cell*, 18(2), 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>
- Si-Tayeb, K., Noto, F. K., Nagaoka, M., Li, J., Battle, M. A., Duris, C., North, P. E., Dalton, S., & Duncan, S. A. (2010b). Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*, 51(1), 297–305. <https://doi.org/10.1002/hep.23354>
- Song, S., Goodwin, J., Zhang, J., Babbitt, B., & Lathey, J. L. (2002). Effect of contaminating red blood cells on OKT3-mediated polyclonal activation of peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(3), 708–712. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.3.708-712.2002>
- Song, Z., Cai, J., Liu, Y., Zhao, D., Yong, J., Duo, S., Song, X., Guo, Y., Zhao, Y., Qin, H., Yin, X., Wu, C., Che, J., Lu, S., Ding, M., & Deng, H. (2009). Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Research*, 19(11), 1233–1242. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.107>
- Sousa, T., Castro, R. E., Coutinho, A., Rodrigues, C. M. P., Prieto, M., & Fernandes, F. (2019). *Experimental Cholestasis Research* (M. Vinken (ed.); Vol. 1981). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9420-5>
- Spyrou, J., Gardner, D. K., & Harvey, A. J. (2019). Metabolomic and Transcriptional Analyses Reveal Atmospheric

- Oxygen During Human Induced Pluripotent Stem Cell Generation Impairs Metabolic Reprogramming. *Stem Cells*, 37(8), 1042–1056. <https://doi.org/10.1002/stem.3029>
- Stephens, C., & Andrade, R. J. (2020). Genetic Predisposition to Drug-Induced Liver Injury. *Clinics in Liver Disease*, 24(1), 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2019.08.003>
- Sterneckert, J. L., Reinhardt, P., & Schöler, H. R. (2014). Investigating human disease using stem cell models. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 625–639. <https://doi.org/10.1038/nrg3764>
- Su, Y., Zhang, Y., Chen, M., Jiang, Z., Sun, L., Wang, T., & Zhang, L. (2014). Lipopolysaccharide exposure augments isoniazide-induced liver injury. *Journal of Applied Toxicology*, 34(12), 1436–1442. <https://doi.org/10.1002/jat.2979>
- Swaidan, N. T., Salloum-Asfar, S., Palangi, F., Errafii, K., Soliman, N. H., Aboughalia, A. T., Wali, A. H. S., Abdulla, S. A., & Emara, M. M. (2020). Identification of potential transcription factors that enhance human iPSC generation. *Scientific Reports*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78932-9>
- Tajiri, K., & Shimizu, Y. (2008). Practical guideline for diagnosis and early management of drug-induced liver. *World Journal of Gastroenterology*, 14(November). <https://doi.org/10.3748/wjg.14.6774>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takayama, K., Morisaki, Y., Kuno, S., Nagamoto, Y., Harada, K., & Furukawa, N. (2014). Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. 111(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.1413481111>
- Takayama, K., Nagamoto, Y., Mimura, N., Tashiro, K., Sakurai, F., Tachibana, M., Hayakawa, T., Kawabata, K., & Mizuguchi, H. (2013). Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human laminin 111-coated dishes. *Stem Cell Reports*, 1(4), 322–335. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.08.006>
- Tamaoki, N., Takahashi, K., Tanaka, T., Ichisaka, T., Aoki, H., Takeda-Kawaguchi, T., Iida, K., Kunisada, T., Shibata, T., Yamanaka, S., & Tezuka, K. (2010). Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *Journal of Dental Research*, 89(8), 773–778. <https://doi.org/10.1177/0022034510366846>
- Tanaka, M., Okabe, M., Suzuki, K., Kamiya, Y., Tsukahara, Y., Saito, S., & Miyajima, A. (2009). Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: Drastic change of EpCAM expression during liver development. *Mechanisms of Development*, 126(8–9), 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2009.06.939>
- Tasnim, F., Phan, D., Toh, Y. C., & Yu, H. (2015). Cost-effective differentiation of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells using small molecules. In *Biomaterials* (Vol. 70). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.002>
- Tejada, F. (2010). Hepatotoxicidad por farmacos. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 3(3), 177–191.

- Terrace, J. D., Currie, I. S., Hay, D. C., Masson, N. M., Anderson, R. A., Forbes, S. J., Parks, R. W., & Ross, J. A. (2007). Progenitor cell characterization and location in the developing human liver. *Stem Cells and Development*, *16*(5), 771–778. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0016>
- Teschke, R. (2018). Top-ranking drugs out of 3312 drug-induced liver injury cases evaluated by the Roussel Uclaf Causality Assessment Method. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, *14*(11), 1169–1187. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1539077>
- Teschke, R., & Danan, G. (2016). Diagnosis and Management of Drug-Induced Liver Injury (DILI) in Patients with Pre-Existing Liver Disease. *Drug Safety, Dili*. <https://doi.org/10.1007/s40264-016-0423-z>
- Teslaa, T., & Teitell, M. A. (2015). Pluripotent stem cell energy metabolism: an update. *The EMBO Journal*, *34*(2), 138–153. <https://doi.org/10.15252/embj.201490446>
- Toivonen, S., Malinen, M. M., Küblbeck, J., Petsalo, A., Urtti, A., Honkakoski, P., & Otonkoski, T. (2016). Regulation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatic Cell Phenotype by Three-Dimensional Hydrogel Models. *Tissue Engineering Part A*, *22*(13–14), 971–984. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0127>
- Tolosa, L., Carmona, A., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., & Donato, M. T. (2015b). High-content screening of drug-induced mitochondrial impairment in hepatic cells: effects of statins. *Archives of Toxicology*, *89*(10), 1847–1860. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1334-3>
- Tolosa, L., Caron, J., Hannoun, Z., Antoni, M., López, S., Burks, D., Castell, J. V., Weber, A., Gomez-Lechon, M.-J., & Dubart-Kupperschmitt, A. (2015c). Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Research & Therapy*, *6*(1), 246. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0227-6>
- Tolosa, L., Gómez-Lechón, M. J., & Donato, M. T. (2015a). High-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in cell models. *Archives of Toxicology*, *89*(7), 1007–1022. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1503-z>
- Tolosa, L., Gómez-Lechón, M. J., Jiménez, N., Hervás, D., Jover, R., & Donato, M. T. (2016a). Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *302*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.04.007>
- Tolosa, L., Gómez-Lechón, M. J., López, S., Guzmán, C., Castell, J. V., Donato, M. T., & Jover, R. (2016b). Human upcyte hepatocytes: Characterization of the hepatic phenotype and evaluation for acute and long-term hepatotoxicity routine testing. *Toxicological Sciences*, *152*(1), 214–229. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw078>
- Tolosa, L., Jiménez, N., Pérez, G., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., & Donato, M. T. (2018). Customised in vitro model to detect human metabolism-dependent idiosyncratic drug-induced liver injury. *Archives of Toxicology*, *92*(1), 383–399. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2036-4>
- Tolosa, L., Pinto, S., Donato, M. T., Lahoz, A., Castell, J. V., O'connor, J. E., & Gómez-Lechón, M. J. (2012). Development of a multiparametric cell-based protocol to screen and classify the hepatotoxicity potential of drugs. *Toxicological Sciences*, *127*(1), 187–198. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs083>
- Törnqvist, E., Annas, A., Granath, B., Jalkestén, E., Cotgreave, I., & Öberg, M. (2014). Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS ONE*, *9*(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101638>

- Touboul, T., Hannan, N. R. F., Corbineau, S., Martinez, A., Martinet, C., Branchereau, S., Mainot, S., Strick-Marchand, H., Pedersen, R., Di Santo, J., Weber, A., & Vallier, L. (2010). Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology*, *51*(5), 1754–1765. <https://doi.org/10.1002/hep.23506>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The Liver. *Curr Biol.*, *27*(21), R1147–R1151. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cub.2017.09.019>.
- Tsogtbaatar, E., Landin, C., Minter-Dykhouse, K., & Folmes, C. D. L. (2020). Energy Metabolism Regulates Stem Cell Pluripotency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00087>
- Tsogtbaatar, E., Landin, C., Minter-Dykhouse, K., & Folmes, C. D. L. (2020). Energy Metabolism Regulates Stem Cell Pluripotency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00087>
- Tsuchiya, H., Matsunaga, T., Aikawa, K., Kamada, N., Nakamura, K., Ichikawa, H., Sasaki, K., & Ohmori, S. (2012). Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *27*(6), 598–604. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-017>
- Uetrecht, J., & Naisbitt, D. J. (2013). Idiosyncratic Adverse Drug Reactions: Current Concepts. *Pharmacological Reviews*, *65*(2), 779–808. <https://doi.org/10.1124/pr.113.007450>
- Urbich, C., & Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. *Circulation Research*, *95*(4), 343–353. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000137877.89448.78>
- Van Summeren, A., Renes, J., Van Delft, J. H. M., Kleinjans, J. C. S., & Mariman, E. C. M. (2012). Proteomics in the search for mechanisms and biomarkers of drug-induced hepatotoxicity. *Toxicology in Vitro*, *26*(3), 373–385. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.012>
- Van Wenum, M., Adam, A. A. A., van der Mark, V. A., Chang, J. C., Wildenberg, M. E., Hendriks, E. J., Jongejan, A., Moerland, P. D., van Gulik, T. M., Oude Elferink, R. P., Chamuleau, R. A. F. M., & Hoekstra, R. (2018). Oxygen drives hepatocyte differentiation and phenotype stability in liver cell lines. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *12*(3), 575–588. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0456-4>
- Vanhove, J., Pistoni, M., Welters, M., Eggermont, K., Vanslembrouck, V., Helsen, N., Boon, R., Najimi, M., Sokal, E., Collas, P., Voncken, J. W., & Verfaillie, C. M. (2016). H3K27me3 Does Not Orchestrate the Expression of Lineage-Specific Markers in hESC-Derived Hepatocytes In Vitro. *Stem Cell Reports*, *7*(2), 192–206. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.06.013>
- Vlahos, K., Sourris, K., Mayberry, R., McDonald, P., Bruveris, F. F., Schiesser, J. V., Bozaoglu, K., Lockhart, P. J., Stanley, E. G., & Elefanty, A. G. (2019). Generation of iPSC lines from peripheral blood mononuclear cells from 5 healthy adults. *Stem Cell Research*, *34*(November 2018), 101380. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.101380>
- Vogt, A. C. S., Arsiwala, T., Mohsen, M., Vogel, M., Manolova, V., & Bachmann, M. F. (2021). On iron metabolism and its regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22094591>

- Wakao, S., Kitada, M., Kuroda, Y., Ogura, F., Murakami, T., Niwa, A., & Dezawa, M. (2012). Morphologic and Gene Expression Criteria for Identifying Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*, *7*(12), e48677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048677>
- Wang, B., & Zhou, S.-F. (2012). Synthetic and Natural Compounds that Interact with Human Cytochrome P450 1A2 and Implications in Drug Development. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(31), 4066–4218. <https://doi.org/10.2174/092986709789378198>
- Wang, B., Jakus, A. E., Baptista, P. M., Soker, S., Soto-Gutierrez, A., Abecassis, M. M., Shah, R. N., & Wertheim, J. A. (2016). Functional Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell Hepatocytes in Extracellular Matrix—A Comparative Analysis of Bioartificial Liver Microenvironments. *Stem Cells Translational Medicine*, *5*(9), 1257–1267. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0235>
- Wang, H., Ran, J., & Jiang, T. (2014). Urea. *Subcell Biochem.*, *73*, 7–29. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-017-9343-8_2
- Wang, J., Zhao, P., Wan, Z., Jin, X., Cheng, Y., Yan, T., Qing, S., Ding, N., & Xin, S. (2016). Differentiation of human foreskin fibroblast-derived induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *Cell Biochemistry and Function*, *34*(7), 475–482. <https://doi.org/10.1002/cbf.3210>
- Wang, Yimei, Liu, J., Tan, X., Li, G., Gao, Y., Liu, X., Zhang, L., & Li, Y. (2013). Induced Pluripotent Stem Cells from Human Hair Follicle Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, *9*(4), 451–460. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9420-5>
- Wang, Yu, Alhaque, S., Cameron, K., Meseguer-Ripolles, J., Lucendo-Villarín, B., Rashidi, H., & Hay, D. C. (2017). Defined and Scalable Generation of Hepatocyte-like Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments*, *121*, 1–8. <https://doi.org/10.3791/55355>
- Watanabe, M., Zemack, H., Johansson, H., Hagbard, L., Jorns, C., Li, M., & Ellis, E. (2016). Maintenance of hepatic functions in primary human hepatocytes cultured on xeno-free and chemical defined human recombinant Laminins. *PLoS ONE*, *11*(9), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161383>
- Wauthier, E., Schmelzer, E., Turner, W., Zhang, L., LeCluyse, E., Ruiz, J., Turner, R., Furth, M. E., Kubota, H., Lozoya, O., Barbier, C., McClelland, R., Yao, H. lei, Moss, N., Bruce, A., Ludlow, J., & Reid, L. M. (2008). Hepatic Stem Cells and Hepatoblasts: Identification, Isolation, and Ex Vivo Maintenance. *Methods in Cell Biology*, *86*(08), 137–225. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)00008-3](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)00008-3)
- Wells, M. J., Hatton, M. W. C., Hewlett, B., Podor, T. J., Sheffield, W. P., & Blajchman, M. A. (1997). Cytokeratin 18 is expressed on the hepatocyte plasma membrane surface and interacts with thrombin-antithrombin complexes. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(45), 28574–28581. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28574>
- Wills, L. R., & Rajagopalan, P. (2020). Advances in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes for Use in Toxicity Testing. *Annals of Biomedical Engineering*, *48*(3), 1045–1057. <https://doi.org/10.1007/s10439-019-02331-z>
- Wu, F., Wu, D., Ren, Y., Huang, Y., Feng, B., Zhao, N., Zhang, T., Chen, X., Chen, S., & Xu, A. (2019). Generation of hepatobiliary organoids from human induced pluripotent stem cells. *Journal of Hepatology*, *70*(6), 1145–1158. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.12.028>
- Wu, S., Liu, Y., Zhu, L., Han, D., Bodinga, M. B., & Yang, X. (2018). Hepatic metabolomic profiling changes along

- with postnatal liver maturation in breeder roosters. *Biology Open*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1242/bio.028944>
- Wuillemin, N., Terracciano, L., Beltraminelli, H., Schlapbach, C., Fontana, S., Krähenbühl, S., Pichler, W. J., & Yerly, D. (2014). T cells infiltrate the liver and kill hepatocytes in HLA-B *57:01-associated floxacillin-induced liver injury. *American Journal of Pathology*, 184(6), 1677–1682. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.018>
- Wunsch, E., Milkiewicz, M., Wasik, U., Trottier, J., Kempialsa-Podhorodecka, A., Elias, E., Barbier, O., & Milkiewicz, P. (2015). Expression of hepatic Fibroblast Growth Factor 19 is enhanced in Primary Biliary Cirrhosis and correlates with severity of the disease. *Scientific Reports*, 5(July), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep13462>
- Xie, Y., Yao, J., Jin, W., Ren, L., & Li, X. (2021). Induction and Maturation of Hepatocyte-Like Cells In Vitro: Focus on Technological Advances and Challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(November), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.765980>
- Xie, Z., Chen, E., Ouyang, X., Xu, X., Ma, S., Ji, F., Wu, D., Zhang, S., Zhao, Y., & Li, L. (2019). Metabolomics and Cytokine Analysis for Identification of Severe Drug-Induced Liver Injury. *Journal of Proteome Research*, 18(6), 2514–2524. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00047>
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., & Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(10), 971–974. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-971>
- Xu, J. J., Diaz, D., & O'Brien, P. J. (2004). Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chemico-Biological Interactions*, 150(1), 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.09.011>
- Yamanaka, S. (2020). Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*, 27(4), 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>
- Ye, H., & Wang, Q. (2018). Efficient Generation of Non-Integration and Feeder-Free Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral Blood Cells by Sendai Virus. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50(4), 1318–1331. <https://doi.org/10.1159/000494589>
- Yokoi, T., & Oda, S. (2020). Models of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61(1), 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030220-015007>
- Yu, Y., Liu, H., Ikeda, Y., Amiot, B. P., Rinaldo, P., Duncan, S. A., & Nyberg, S. L. (2012). Hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells: Relevance to cellular therapies. *Stem Cell Research*, 9(3), 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.06.004>
- Yu, Y., Mao, Y., Chen, C., Chen, J., Chen, J., Cong, W., Ding, Y., Duan, Z., Fu, Q., Guo, X., Hu, P., Hu, X., Jia, J., Lai, R., Li, D., Liu, Y., Lu, L., Ma, S., Ma, X., ... Zhuang, H. (2017). CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury. *Hepatology International*, 11(3), 221–241. <https://doi.org/10.1007/s12072-017-9793-2>
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>

- Zhang, W., Li, W., Liu, B., Wang, P., Li, W., & Zhang, H. (2012). Efficient generation of functional hepatocyte-like cells from human fetal hepatic progenitor cells in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, 227(5), 2051–2058. <https://doi.org/10.1002/jcp.22934>
- Zhao, R., & Duncan, S. A. (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology*, 41(5), 956–967. <https://doi.org/10.1002/hep.20691>
- Zhou, H., Martinez, H., Sun, B., Li, A., Zimmer, M., Katsanis, N., Davis, E. E., Kurtzberg, J., Lipnick, S., Noggle, S., Rao, M., & Chang, S. (2015). Rapid and efficient generation of transgene-free iPSC from a small volume of cryopreserved blood. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(4), 652–665. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9586-8>
- Zhou, T., Benda, C., Dunzinger, S., Huang, Y., Ho, J. C., Yang, J., Wang, Y., Zhang, Y., Zhuang, Q., Li, Y., Bao, X., Tse, H. F., Grillari, J., Grillari-Voglauer, R., Pei, D., & Esteban, M. A. (2012). Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nature Protocols*, 7(12), 2080–2089. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.115>
- Zong, Y., & Friedman, J. R. (2014). Liver development. In F. J. Suchy, R. J. Sokol, & W. F. Balistreri (Eds.), *Liver Disease in Children* (pp. 1–9). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139012102.002>
- Zong, Y., Panikkar, A., Xu, J., Antoniou, A., Raynaud, P., Lemaigre, F., & Stanger, B. Z. (2009). Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development*, 136(10), 1727–1739. <https://doi.org/10.1242/dev.029140>
- Zorn, A. M. (2008). Liver development. In *StemBook*. <https://doi.org/10.3824/stembook.1.25.1>
- Zorn, A. M., & Wells, J. M. (2007). Molecular Basis of Vertebrate Endoderm Development. In *International Review of Cytology* (Vol. 259, Issue 06, pp. 49–111). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)59002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)59002-3)

CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS

- Pelechá, M., Donato, M. T., & Tolosa, L. (2023). Donor-specific hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells for the assessment of drug-induced liver injury. **Manuscrito**.
- Donato, M. T., Jiménez, N., Pelechá, M., & Tolosa, L. (2022). Oxidative-stress and long-term hepatotoxicity: comparative study in Upcyte human hepatocytes and hepaRG cells. *Archives of Toxicology*, 96(4), 1021-1037. doi: 10.1007/s00204-022-03236-y.
- Pelechá, M., Villanueva-Bádenas, E., Timor-López, E., Donato, M. T., & Tolosa, L. (2021). Cell Models and Omics Techniques for the Study of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focusing on Stem Cell-Derived Cell Models. *Antioxidants*, 11(1), 86. doi: 10.3390/antiox11010086.
- Donato, M. T., Pelechá, M., & Tolosa, L. (2021). ISBN: 978-0-12-822229-4 eBook ISBN: 9780323851862.
- Donato, M. T., Bolonio, M., Cabezas, E., Pelechá, M., Pareja, E., Domènech, A., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., & Tolosa, L. (2020). Improved in vivo efficacy of clinical-grade cryopreserved human hepatocytes in mice with acute liver failure. *Cytotherapy*, 22(2), 114–121. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.12.005.
- Tolosa, L., Jiménez, N., Pelechá, M., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., & Donato, M. T. (2019). Long-term and mechanistic evaluation of drug-induced liver injury in Upcyte human hepatocytes. *Archives of toxicology*, 93(2), 519–532. doi: 10.1007/s00204-018-2349-y.

Comunicaciones a congresos

- Abril 2019. Póster. Pelechá, M., Jiménez, N., López-Andújar, R., Maupoey, J., Tolosa, L., Donato, MT. *Generation of hepatocyte-like cells derived from human induced pluripotent stem cells as a model for studying idiosyncratic drug-induced liver injury*. III Congreso Nacional Jóvenes Investigadores En Biomedicina. Valencia, Comunidad Valenciana, España.
- Septiembre 2018. Póster. Pelechá, M., Cabezas, E., Jimenez, N., Donato, M., Bolonio, M., Pareja, E., Gómez-Lechón, M., Tolosa, L. *Effectiveness of new cell sources for the treatment of acute liver failure*. 45th Annual ESAO Congress (European Society for Artificial Organs). Madrid. España.
- Marzo 2018. Póster. Cabezas, M., Pelechá, M., Jiménez, N., Donato, M. T., Santamaría, R., Bort., R., Pareja E., Gómez-Lechón, M. J., Tolosa., L. *Effectiveness of cell therapy using neonatal cells for the treatment of liver disease*. 9th Biennial congress of the Sociedad Española de Terapia Génica y Celular. Palma de Mallorca, España.

Nov. 2017. Póster. Pelechá, M., Jiménez, N., López-Andújar R., Maupoey J., Tolosa, L., Donato, M. T. *Human Hepatocytes Upcytes® as in vitro experimental model to study long-term drug-induced liver injury*. II Congreso Nacional Jóvenes Investigadores En Biomedicina, Valencia, Comunidad Valenciana, España.

