

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Nuevos abordajes para la caracterización del sistema inmune
y de las vesículas extracelulares derivadas de hepatocitos en
ratones reporteros de linaje celular con y sin daño hepático**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Blázquez López

Directores

**Javier Vaquero Martín
José Rafael Correa Rocha
Rafael Bañares Cañizares**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Nuevos abordajes para la caracterización del sistema inmune
y de las vesículas extracelulares derivadas de hepatocitos en
ratones reporteros de linaje celular con y sin daño hepático**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Elena Blázquez López

DIRECTORES

Javier Vaquero Martín
José Rafael Correa Rocha
Rafael Bañares Cañizares

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Nuevos abordajes para la caracterización del sistema inmune y de las vesículas extracelulares derivadas de hepatocitos en ratones reporteros de linaje celular con y sin daño hepático

PROGRAMA DE DOCTORADO

Investigación Biomédica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Elena Blázquez López

DIRECTORES

Javier Vaquero Martín
José Rafael Correa Rocha
Rafael Bañares Cañizares

*La investigación es como una senda aún por descubrir,
abriéndote paso a machetazos entre la maleza.
Cada paso te acerca a la verdad,
aunque no siempre encontrarás el camino,
tropezarás y chocarás con muros de piedra,
pero no debes desistir.
Y al final, quizá no halles el destino
pero podrás mirar atrás
y sentirte orgulloso de lo conseguido,
pues tus pasos servirán a los que vengan detrás de ti*

Agradecimientos

Me gustaría comenzar agradeciendo este trabajo a mis directores Javier Vaquero y Rafael Bañares, que me concedieron la responsabilidad de este proyecto para conseguir el título de doctora y hacerme ver, pese a las circunstancias, lo mucho que me apasiona la investigación.

Además, por permitirme conocer y trabajar junto a personas tan maravillosas como Elena Vázquez (Helen) y Johana Sierra (mi Joha). Ambas habéis sido esenciales para mí durante todo este proceso. Helen, gracias por compartir conmigo el poquito optimismo que te quedaba cuando todo se veía gris. Si tuviese que escoger algún recuerdo, me quedo con aquellos momentos en la sala de microcirugía donde se podía investigar y, por qué no, desahogarnos hablando de nuestras “cosas” y reírnos hasta llorar de la risa. Mi Joha, actuaste cual hermana mayor llena de sabiduría, siempre dispuesta a hacerme un hueco en tu apretada agenda repleta de tareas para escucharme y darme tus valiosos consejos. Gracias por soportar con paciencia a esta pesimista patológica en mi síndrome “pre-tésico”. Mi etapa predoctoral no habría sido lo mismo sin vosotras. Gracias por estar siempre ahí.

También agradecer a mi tercer director de tesis, Rafael Correa, por permitirme dar los primeros pasos en el mundo de la investigación en el Laboratorio de Inmuno-Regulación (LIR) y aprender una técnica que me encanta como es la citometría de flujo y conocer a gente excepcional tanto a nivel personal como profesional.

Esther, Vero (Lady) y Jacobo (Jacobs), mis comienzos no pudieron ser mejores teniendo a compañeros como vosotros a mi lado. Pese a nuestras diferencias, nos complementamos a la perfección y formamos un grupo maravilloso. No pude tener mejor suerte que coincidir con vosotros y que, aunque haya pasado el tiempo y cada uno haya seguido su camino, volvamos a quedar y parezca que el tiempo no hubiese pasado.

Jorge y Sergio, mis compañeros de “sitio”, compartimos profundas reflexiones, confidencias, y algún que otro vídeo chorra entre pistachos y chocolate de todo tipo (pero siempre negro). Marta (mi malagueña salsera), Rebeca y Roci, cada una con una personalidad diferente y arrolladora que me enamoró desde el primer día que os conocí. Gracias por escucharme cuando necesitaba desahogarme, por animarme y sacarme una sonrisa.

Agradecer también a Marjorie, siempre estuviste pendiente de mí tanto a nivel profesional como personal sin ser responsabilidad tuya e, incluso, sin formar parte de LIR. No pude trabajar mucho contigo, pero me habría encantado.

Además de ser compañera de gente maravillosa, trabajar en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental me ha permitido conocer a personas que me han aportado mucho durante estos años. Gracias a Maribel por siempre estar dispuesta a escuchar mis penas y animarme, a Rafa “Confocal” por nuestras conversaciones sobre ciencia y reggeaton, y por tener en cuenta mi opinión (de ambos temas), a Nieves que me consolaste aquellas tardes solitarias en los escritorios.

Gracias a las chicas (por aquel entonces) de Sondas, Ana, Desiré y Virginia; con vosotras compartí mis frustraciones por las constantes averías de la ultracentrífuga y el NTA, gracias por adoptarme en los congresos de exosomas,

Por otro lado, esta tesis ha estado marcada por la pandemia de la COVID-19, una época extraña y de aislamiento, y no podría olvidarme de las “chicas del animalario”, Lidia, Alicia y Paula; gracias por reclutarme en vuestra hora del café cuando iba sola al laboratorio, era el único momento del día en el que podía relacionarme con gente diferente, hicisteis más llevadera esa etapa. También te pude conocer a ti, Marcos, gracias por todo ese tiempo que estuviste a mi lado.

Tampoco puedo olvidarme de Yolanda, Toñi y, sobre todo, María, aunque siempre estuve incordiándoos a última hora del día siempre tuvisteis unas palabras amables, una sonrisa y unas calzas para que no os pisase lo fregado. Gracias por preocuparos por mí.

Y sí, Miguel, no te libras, a ti también te tengo que agradecer nuestras conversaciones, de ciencia y no tan de ciencia, por escucharme y aconsejarme (aunque no te hiciese mucho caso). Gracias por estar dispuesto siempre a un “pique de los nuestros” y a escucharme cuando estaba llegando a mi límite.

Esta tesis también me ha permitido conocer a personas externas al laboratorio que ahora puedo considerar amigas, en especial a una y me refiero a ti, Isma. Lo que empezó siendo una relación especialista-cliente acabó convirtiéndose en una gran amistad. Gracias por estar ahí siempre (y este siempre es casi absoluto) ya fuese para poner a punto paneles de anticuerpos en un tiempo récord, para arreglar el citómetro a las 20h de la noche porque me faltaban muestras por pasar, para resolverme dudas existenciales o para escucharme

con paciencia (la cual escasa y, por tanto, tiene doble mérito) cuando mi pesimismo era aún peor de lo que suele ser.

Agradecer también a aquellos que lleváis en mi vida desde antes de comenzar esta etapa y, después de todo, aún seguís. Pablo y Sam, conformando el “trío tortitas” desde la carrera, y mi Lau y Adri, desde la carrera no (y mira que fuimos compañeras), pero el máster nos acabó de unir. La vida nos ha puesto en distintas situaciones y hemos continuado por diferentes caminos, y aún así, hacéis el esfuerzo por cuadrar un hueco, aunque sea mínimo, para poder quedar y ponernos al día. Gracias por hacer que parezca que el tiempo no ha pasado, gracias por seguir ahí.

También debo darle unas gracias “extra” a Laura por permitirme conocerte a ti, Sergio (Sergiuuus), mi heavy-salsero. Nos unió la salsa y la rueda cubana hace 7 años de la forma más aleatoria y con el tiempo se ha convertido en una de las amistades más bonitas que tengo. Gracias por ejercer de ese hermano mayor que nunca he tenido, por aconsejarme, por cuidarme y por hacerme reír hasta llorar. Estoy orgullosa de poder considerarme tu amiga.

Y ya, en la última parte de este camino, la más extraña y difícil, he podido conocer a personas que, en el poquito tiempo que llevan en mi vida, me han dado fuerzas y me han animado para dar ese “empujón final”. Gracias a mis “steperos”, Dafne, María y David; compartir con vosotros la afición por el aeróbic y el step, las cenas en grupo, las tartas de Dafne... me permitieron desconectar de la ansiedad que me generó este período.

Agradecer también a Lorena Cussó que me dio la oportunidad de volver de nuevo a un laboratorio y permitirme compaginar mi jornada con la escritura de mi tesis. Y, sobre todo, las personas tan “geniales a la par que peculiares” que he podido conocer: los Adris, Nat, Reichel, Leyre, Elena, Mario (mi gaditano), Liliana... Gracias por esas sobremesas hablando sobre temas profundos (según como se vea), por las risas infinitas, por los detalles, por vuestro tiempo... Me habéis dado mucha energía en un momento de mi vida que estaba bajo mínimos. Espero que esto sea el comienzo de algo que dure por muchos años más.

También agradecerte a ti, Julio, la última incorporación a mi vida. Apareciste por el fallo del algoritmo de una conocida aplicación y creo que fue el mejor error que he tenido en mucho tiempo. Me has demostrado más en estos meses que otras personas en años, gracias por tu paciencia, por ser mi hombro en el que llorar, por las risas, por las bromas...

Ya lo decíamos Helen, Joha y yo: “pon un Julio en tu vida”. Gracias por compartir tu tiempo conmigo.

No puedo olvidarme tampoco de Celia, por ser esa persona de confianza con quien hablar de cualquier tema y que me ha mostrado una visión diferente de la vida. Gracias por escucharme y aconsejarme desde que era una “mocosa”.

At last, but not least, agradecer a las personas más importantes, ya no sólo durante esta etapa, si no de mi vida: la “mejor elección” y la “mejor suerte”

Cierto es que el factor suerte influyó al ponerte en mi camino, pero Carol, tú has sido, eres y serás la mejor elección que he hecho en mi vida. Llevas en mi vida desde hace más de 20 años, hemos crecido, caído y levantado juntas. Eres un ejemplo a seguir para mí y me siento orgullosa de poder llamarme tu amiga. Gracias por escucharme, por animarme, por todos los momentos juntas, por las “risas tontas”, por nuestra tradición de quedar los viernes (jueves si no se podía) para “gordear” juntas y hablar de nuestras cosas... En definitiva, gracias por estar y gracias por ser tú.

Y finalmente, a la suerte de mi vida que sois vosotros, mis padres, Pilar y Salva. Definitivamente esta tesis no se habría materializado sin vuestro apoyo. Quiero aprovechar este párrafo para no sólo agradeceros, también para pedir os perdón. Habéis sufrido de primera mano los episodios de estrés y ansiedad, mi mal humor y mi pesimismo... siento mucho haber sido una preocupación, no lo merecéis. Me habéis escuchado y apoyado en todo momento, me habéis dado la fuerza que necesitaba para seguir adelante cuando lo veía todo negro, hasta habéis aprendido palabras extrañas como “citómetro de flujo” o “exosoma” ... No puedo compararos con otros padres, pero me siento la persona más afortunada por nacer donde nací, por criarme con vuestros valores y por teneros en mi vida. GRACIAS.

Índice de contenido

Abreviaturas.....	1
Resumen	5
Summary.....	9
INTRODUCCIÓN.....	13
Insuficiencia hepática aguda (<i>Acute Liver Failure</i> , ALF).....	15
Daño hepático inducido por fármacos: paracetamol (APAP).....	15
Metabolismo y mecanismo de hepatotoxicidad del APAP	16
Síntomas y cuadro clínico	17
Diagnóstico de DILI por APAP	19
Tratamiento	19
Búsqueda de nuevos biomarcadores en enfermedad hepática.....	21
Perfil inmunológico	21
Sistema inmune: respuesta innata y adaptativa	21
Estudio del perfil inmunológico en clínica	25
Perfil inmunológico en la enfermedad hepática.....	26
Vesículas extracelulares (VEs).....	30
¿Qué son las vesículas extracelulares?.....	30
Exosomas: biogénesis, composición y función.....	32
Las VEs y el hígado	34
Limitaciones en el estudio de las VEs.....	39
JUSTIFICACIÓN.....	51
HIPÓTESIS	53
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1. Animales.....	59
2. Modelos de daño hepático agudo	61

2.1. Administración de fármacos	61
<i>JO-2</i>	61
<i>Paracetamol (APAP)</i>	61
2.2. Recogida de muestras	62
<i>Sangre del plexo venoso retroorbitario</i>	62
<i>Sangre ventricular y necropsia</i>	62
3. Análisis de las muestras biológicas	63
3.1. Análisis multiparamétrico del sistema inmunológico por citometría de flujo.....	63
3.2. Determinación de parámetros bioquímicos de daño hepático inducido por APAP	64
3.3. Análisis histológico del grado de necrosis del hígado inducido por APAP	65
3.4. Disgregación de tejidos y análisis por citometría de flujo.....	66
4. Ensayos <i>in vitro</i> con hepatocitos primarios.....	67
4.1. Aislamiento de hepatocitos primarios.....	67
4.2. Análisis por citometría de flujo de hepatocitos primarios	69
4.3. Cultivo de hepatocitos primarios	69
4.4. Inducción de daño por APAP <i>in vitro</i>	69
4.5. Ensayo de citotoxicidad: prueba de lactato deshidrogenasa (LDH).....	70
5. Aislamiento de VEs presentes en medio de cultivo y plasma.....	71
5.1. Condicionamiento de las muestras	71
Medio de cultivo.....	71
Plasma	71
5.2. Aislamiento de VEs por Ultracentrifugación.....	71
5.3. Purificación de VEs por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	73
5.4. Aislamiento de VEs por selección inmuno-magnética.	73
5.5. Purificación de VEs EGFP+ a partir de muestras de plasma.....	74
6. Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas.	74

6.1. Análisis por Citometría de flujo.....	74
6.2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....	75
6.3. Western Blot	76
6.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	76
7. Análisis estadístico	77
RESULTADOS	79
1. Generación de paneles de citometría de flujo multiparamétrica para la evaluación exhaustiva del sistema inmune celular murino.....	81
1.a. Diseño de paneles de anticuerpos para analizar el perfil inmunológico murino en sangre periférica.....	81
1.b. Validación en ratones salvajes C57BL/6 y ratones deficientes en <i>Il10</i> de paneles de anticuerpos para analizar el sistema inmunológico murino.	88
2. Utilidad del ratón reportero de Cre recombinasa mT/mG para la trazabilidad del tipo celular de origen de las VEs.....	97
2.a. Determinación en VEs del marcaje fluorescente endógeno en ratones reporteros mT/mG – Estudio <i>in vitro</i>	97
2.a.1. Aislamiento y caracterización de hepatocitos primarios.	97
2.a.2. Aislamiento y caracterización por citometría de flujo de las VEs presentes en medio de cultivo de hepatocitos primarios.....	98
2.a.3. Análisis del tamaño y la concentración de las VEs derivadas de hepatocitos primarios.....	102
2.a.4. Caracterización de las VEs derivadas de hepatocitos mediante microscopía electrónica de transmisión y Western Blot.....	103
2.b. Evaluación de VEs circulantes derivadas de hepatocitos en ratones reporteros mT/mG - Estudio <i>in vivo</i>	104
2.c. Evaluación de métodos de aislamiento de VEs marcadas con EGFP, específicas de tipo celular.....	107
3. Efecto del daño hepático agudo por paracetamol sobre el perfil inmunológico y las VEs procedentes de hepatocitos en ratones.	111

3.a. Caracterización histológica y bioquímica del modelo de daño agudo por paracetamol (APAP) en ratones AlbCre x mT/mG.	111
3.b. Efecto del daño hepático agudo por APAP sobre el perfil inmunológico celular sanguíneo en ratones AlbCre x mT/mG.	115
3.c. Efecto del daño por APAP sobre las VEs procedentes de hepatocitos primarios de ratón – Estudio <i>in vitro</i>	125
3.d. Efecto del daño hepático agudo inducido por APAP sobre las VEs circulantes procedentes de hepatocitos en ratones – Estudio <i>in vivo</i>	127
3.e. Análisis de la biodistribución de las VEs derivadas de hepatocitos en ratones sanos o con daño hepático por APAP.	129
DISCUSIÓN	131
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA	153
Índice de figuras	189
Índice de tablas	195

Abreviaturas

Act	Activadas
ALT	Alanina Aminotransferasa
AM	Medio Attachment
AnnV	Anexina V
APAP	Acetaminofeno (paracetamol)
APO	Apolipoproteína
ARNm	ARN mensajero
AST	Aspartato Aminotransferasa
BSA	Albúmina de suero bovino
CHC	Carcinoma hepatocelular
CK	Células de Kupffer
CM	Medio condicionado
CMem	Memoria central
CT	Sin tratamiento
CYP	Citocromo P450
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DC	Célula Dendrítica
DILI	<i>Drug-induced liver injury</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Desviación estándar
EH	Encefalopatía hepática
EMem	Memoria efectora
ESCRT	Complejos de clasificación endosomal requeridos para transporte
EXO-free	Libre de exosomas
EXOKIT	<i>Exosome Isolation Pan Kit</i>

FBS	Suero fetal bovino
GSH	Glutación
GST	Glutación S-transferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IL-10 KO	Cepa de ratón con deficiencia de IL-10
ILV	Vesículas intraluminales
ISEV	<i>International Society of Extracellular Vesicles</i>
IQR	Rango intercuartílico
JNK	Quinasa c-Jun-N-terminal
LDH	Lactato deshidrogenasa
LE	Liberación espontánea
LIN-	CD3- CD4- CD19- NK1.1-
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo de histocompatibilidad
MHC	Moléculas de histocompatibilidad
MISEV	<i>Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles</i>
ML	Máxima liberación
Mo	Monocitos
MVB	Cuerpos multivesiculares
NAC	N-acetilcisteína
NAFLD	<i>Non-alcoholic Fatty Liver Disease</i> , hígado graso no alcohólico
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona imina
NASH	<i>Non-alcoholic Steatohepatitis</i> , esteatohepatitis no alcohólica
NK	<i>Natural killer</i>

NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógeno
PBS_F	Tampón fosfato salino estéril filtrado
PCA	Análisis no supervisado de componentes principales
PE	Ficoeritrina
PI	Yoduro de propidio
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAL	Suero salino
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
SOD	Superóxido dismutasa
T_c	Célula T citotóxica CD8
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Th	Célula T <i>helper</i> o auxiliar CD4
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Célula T reguladoras
UC	Ultracentrifugación
ucARN	ARN ultraconservado
UGT	UDP-glucuroniltransferasa
VE	Vesícula extracelular
VEH	Vehículo
VST	Volumen de sangre total
WB	Western Blot
WT	Cepa <i>wild type</i> C57BL/6

Resumen

Nuevos abordajes para la caracterización del sistema inmune y de las vesículas extracelulares derivadas de hepatocitos en ratones reporteros de linaje celular con y sin daño hepático

Introducción

La **insuficiencia hepática aguda (ALF)** consiste en el rápido deterioro de la función hepática en ausencia de enfermedad hepática crónica subyacente. Entre sus posibles etiologías, el **daño inducido por fármacos (*Drug-Induced Liver Injury, DILI*)**, y más concretamente por el **paracetamol (APAP, del inglés *acetaminophen*)**, es la causa más prevalente en los países desarrollados. Desgraciadamente, no existen biomarcadores predictivos o de diagnóstico temprano que permitan predecir de forma precisa el desarrollo de los síntomas más graves o implementar tratamientos de forma precoz. El **perfil inmunológico** y las **vesículas extracelulares (VEs)** representan posibles fuentes de biomarcadores obtenibles de forma rápida y no invasiva para el paciente. La investigación de ambas fuentes en modelos experimentales murinos, sin embargo, está dificultada por limitaciones relevantes, como la ausencia de protocolos que permitan un estudio amplio y repetido en el tiempo en el caso de las células inmunes circulantes o, en el caso de las VEs, la existencia de problemas relacionados con la estandarización de los protocolos de aislamiento, la determinación del tipo celular de origen en organismos vivos, o el estudio de la biodistribución de las VEs de tipos celulares concretos.

Los **objetivos** generales del presente trabajo fueron:

1. Diseñar y validar una estrategia basada en la citometría de flujo multiparamétrica que permita la evaluación exhaustiva y el seguimiento en el tiempo del sistema inmune celular murino.
2. Desarrollar una herramienta que permita el aislamiento y la trazabilidad de VEs específicas de hepatocitos, en un organismo completo, basada en el empleo de la cepa de ratón reportera de linaje celular de doble fluorescencia (mT/mG).
3. Caracterizar las alteraciones inducidas por el daño hepático agudo por APAP sobre el perfil inmunológico y las VEs circulantes totales y derivadas de hepatocitos en ratones.

Materiales y métodos

En el presente trabajo utilizamos ratones **C57BL/6**, ratones con deficiencia constitutiva de interleuquina 10 (**IL-10 KO**), ratones **mT/mG** reporteros de linaje celular, y ratones **AlbCre x mT/mG** con expresión de EGFP en la membrana plasmática de los hepatocitos y de la proteína TdTomato en el resto de tipos celulares, generados mediante el cruce de los ratones **mT/mG** con ratones transgénicos con expresión de la Cre-recombinasa bajo el promotor de la albúmina (**AlbCre**). En diversos experimentos, los ratones fueron tratados con Jo-2 (0,6 µg/g i.p.) o APAP (300 mg/kg i.p.), o con su correspondiente vehículo, con el fin de causar daño hepático agudo por apoptosis o por necrosis, respectivamente. Para evaluar un amplio número de poblaciones inmunes utilizando una muestra mínima de sangre periférica, diseñamos una estrategia basada en la citometría de flujo multiparamétrica. En cuanto al análisis de las VEs, comparamos diferentes métodos de aislamiento individuales o en combinación, incluyendo la ultracentrifugación (UC), la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y la selección inmuno-magnética frente a las tetraspaninas (EXOKIT) o frente a GFP, tanto en medio de cultivo de hepatocitos primarios como en muestras de plasma de ratón tratados con Jo2 o con APAP. Las diferentes fracciones obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo, *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y Western Blot (WB).

Resultados

Objetivo 1: Para definir el perfil inmunológico sanguíneo murino mediante citometría de flujo multiparamétrica, desarrollamos 2 paneles de 14 anticuerpos capaces de evaluar hasta 35 fenotipos de la respuesta inmune innata y adaptativa. En comparación con los ratones C57/BL6 (WT), los ratones IL-10 KO mostraron un descenso de linfocitos circulantes a expensas de los linfocitos B, en particular de los linfocitos B transicionales tipo 1, mientras que en los linfocitos T observamos una elevación de los fenotipos CD4+ y CD8+ activados y de fenotipos proinflamatorios (Th17). Estas alteraciones en los ratones IL-10 KO también se acompañaron de una mayor proporción de poblaciones mieloides, en concreto de neutrófilos.

Objetivo 2: Los ensayos *in vitro* en hepatocitos primarios mostraron que las VEs mantienen la expresión de las proteínas fluorescentes correspondiente a la cepa de la que proceden los hepatocitos. En este contexto, la UC aisló un mayor número de VEs (eventos

FM4-64+), mientras que la proporción de exosomas (FM4-64+ CD81+) aislada fue mayor con la SEC que con la UC. En los ensayos *in vivo*, los ratones tratados con JO-2 presentaron una mayor proporción de VEs EGFP+ en plasma que el grupo control. La UC fue la técnica más efectiva en la purificación de VEs en plasma, con un mayor enriquecimiento de exosomas y menor contaminación de cuerpos apoptóticos (FM4-64+ AnnV+), tanto de forma individual como en combinación con las microesferas anti-GFP para el aislamiento de VEs EGFP+.

Objetivo 3: Los ratones reporteros AlbCre x mT/mG que recibieron APAP desarrollaron necrosis hepatocelular, confirmada mediante análisis histológico y serológico. Las muestras de sangre de los ratones AlbCre x mT/mG que recibieron vehículo (suero salino) o APAP se procesaron por citometría de flujo tras realizar una adaptación de los paneles de anticuerpos, ya que estos ratones presentan fluorescencia TdTomato endógena en todas sus células sanguíneas. En comparación con los ratones controles, los ratones que recibieron APAP presentaron una importante disminución de linfocitos circulantes, debida principalmente a los linfocitos B, con un aumento de las poblaciones granulocíticas, en especial de los neutrófilos. Pese al descenso de linfocitos totales, las células T de los ratones con daño hepático por APAP presentaron un aumento de los fenotipos CD4+ y CD8+ activados y proinflamatorios (Th17).

El efecto del APAP sobre las VEs derivadas de hepatocitos lo evaluamos tanto *in vitro* como *in vivo*. El APAP aumentó la concentración de VEs en comparación con las condiciones control tanto en las muestras aisladas por UC del medio de cultivo de hepatocitos como en las muestras de plasma. En plasma, confirmamos que este aumento se produjo particularmente a expensas de VEs EGFP+. Finalmente, la señal doble positiva EGFP+ tdTomato+ aumentó en las células del pulmón de los ratones AlbCre x mT/mG con daño hepático por APAP, mientras que no se detectaron cambios relevantes en el resto de los órganos (bazo, corazón, riñón).

Conclusiones

1. La estrategia de citometría de flujo multiparamétrica desarrollada permite el estudio de una amplia variedad de fenotipos inmunes murinos empleando un volumen mínimo de sangre con supervivencia del animal.
2. Los ratones deficientes en IL-10 presentan en sangre una marcada linfopenia a expensas de linfocitos B, una desregulación de subpoblaciones de linfocitos T hacia

fenotipos proinflamatorios activados, y un aumento de las células mieloides, en especial, neutrófilos y células dendríticas maduras.

3. Las VE derivadas de las células del ratón mT/mG reportero de Cre recombinasa conservan la fluorescencia de la célula de origen demostrando la validez de esta herramienta para evaluar VEs de un tipo celular específico en un organismo completo.
4. La combinación de ultracentrifugación y la separación inmuno-magnética frente a GFP consiguió el mejor balance entre cantidad y pureza para el aislamiento de exosomas EGFP+ del plasma en el modelo experimental murino.
5. El daño hepático agudo por paracetamol en ratones produjo alteraciones en diversas poblaciones inmunes detectadas en sangre periférica, así como el aumento de las VEs circulantes procedentes de hepatocitos.
6. El estudio de biodistribución apoya que el pulmón es el principal órgano de destino de las VEs derivadas de hepatocitos en el contexto de daño hepático agudo por paracetamol.
7. El empleo de la cepa mT/mG reportera de Cre recombinasa para el estudio de las VEs derivadas de un tipo celular específico, así como de su biodistribución en un organismo vivo, representa una estrategia de gran interés para superar dos de las principales limitaciones existentes en este campo de investigación.

Summary

Novel approaches for the characterization of the immune system and extracellular vesicles derived from hepatocytes in lineage reporter mice with and without liver damage

Introduction

The syndrome of **acute liver failure (ALF)** consists of the rapid deterioration of liver function in the absence of underlying chronic liver disease. Among its possible etiologies, **drug-induced liver injury (DILI)**, particularly the one due to **acetaminophen (APAP)**, is the most prevalent cause in developed countries. Unfortunately, there are no predictive or early diagnostic biomarkers that allow us to accurately predict the development of the most severe symptoms or to implement early treatments. The **immune profile** and the **extracellular vesicles (EVs)** represent possible sources of biomarkers that can be obtained quickly and non-invasively from the patient. The investigation of both sources in murine experimental models, however, is hindered by relevant limitations, such as the absence of protocols that allow a broad and repeated study over time in the case of circulating immune cells or, in the case of Evs, the existence of problems related to the standardization of isolation protocols, the determination of the cell type of origin in living organisms, or the study of the biodistribution of Evs from specific cell types.

The **aims** of the present work were:

1. To design and validate a strategy based on multiparametric flow cytometry that allows exhaustive evaluation and monitoring over time of the murine cellular immune system.
2. To develop a tool that allows the isolation and traceability of specific EVs of a cell type, in particular hepatocytes, in a complete organism, based on using a double fluorescence Cre reporter mouse strain (mT/mG).
3. To characterize the alterations induced by acute liver injury caused by APAP on the immune profile and on total and hepatocyte-derived circulating EVs in mice.

Materials and methods

In the present work, we used **C57Bl6** mice, mice with constitutive deficiency of interleukin 10 (**IL-10 KO**), Cre reporter **mT/mG** mice, and **AlbCre x mT/mG** mice with expression of EGFP in the plasma membrane of hepatocytes and of the TdTomato protein

in the rest of the cell types, generated by crossing the **mT/mG** mice with transgenic mice with expression of Cre-recombinase under the albumin promoter (**AlbCre**). In various experiments, mice were treated with Jo-2 (0.6 $\mu\text{g/g}$ i.p.) or APAP (300 mg/kg i.p.) or with its corresponding vehicle to cause acute liver damage by apoptosis or necrosis, respectively. To evaluate many immune populations using a minimal peripheral blood sample, we designed a strategy based on multiparametric flow cytometry. Regarding the analysis of EVs, we compared different isolation methods individually or in combination, including ultracentrifugation (UC), size exclusion chromatography (SEC), and immunomagnetic selection against tetraspanins (EXOKIT) or against GFP, both in primary hepatocyte culture medium and in mouse plasma samples treated with Jo2 or APAP. The different fractions obtained were analyzed by flow cytometry, *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), transmission electron microscopy (TEM), and Western Blot (WB).

Results

Aim 1: To define the murine blood immune profile using multiparametric flow cytometry, we developed 2 panels of 14 antibodies capable of evaluating up to 35 phenotypes of the innate and adaptive immune response. Compared with C57/BL6 (WT) mice, IL-10 KO mice showed a decrease in circulating lymphocytes at the expense of B lymphocytes, particularly type 1 transitional B lymphocytes, whereas in T lymphocytes we observed an elevation of activated CD4⁺ and CD8⁺ phenotypes and proinflammatory phenotypes (Th17). These alterations in IL-10 KO mice were also accompanied by a higher proportion of myeloid populations, specifically neutrophils.

Aim 2: The *in vitro* essays in primary hepatocytes showed that EVs maintain the expression of fluorescent proteins corresponding to the strain from which the hepatocytes were isolated. In this context, UC isolated a greater number of EVs (FM4-64⁺ events), whereas the proportion of exosomes (FM4-64⁺ CD81⁺) isolated was higher with SEC than with UC. In the *in vivo* trials, mice treated with JO-2 presented a higher proportion of EGFP⁺ EVs in plasma than the control group. UC was the most effective technique in the purification of EVs in plasma, with a greater enrichment of exosomes and less contamination of apoptotic bodies (FM4-64⁺ AnnV⁺), both individually and in combination with anti-GFP microspheres for the isolation of EGFP⁺ EVs.

Aim 3: AlbCre x mT/mG reporter mice receiving APAP developed hepatocellular necrosis, confirmed by histological and serological analyses. Blood samples from AlbCre

x mT/mG mice that received vehicle (saline) or APAP were processed by flow cytometry after adapting the antibody panels since these mice present endogenous TdTomato fluorescence in all their blood cells. Compared to control mice, mice that received APAP showed a significant decrease in circulating lymphocytes, mainly due to B lymphocytes, with an increase in granulocyte populations, especially neutrophils. Despite the decrease in total lymphocytes, T cells from mice with liver damage due to APAP presented an increase in activated and pro-inflammatory CD4⁺ and CD8⁺ phenotypes (Th17).

We evaluated the effect of APAP on hepatocyte-derived EVs both *in vitro* and *in vivo*. APAP increased the concentration of EVs compared to control conditions both in the samples isolated by UC from the hepatocyte culture medium and in the plasma samples. In plasma, we confirmed that this increase occurred mainly at the expense of EGFP⁺ EVs. Finally, the EGFP⁺ tdTomato⁺ double positive signal increased in the lung cells of AlbCre x mT/mG mice with liver damage by APAP, whereas no relevant changes were detected in the rest of the organs (spleen, heart, kidney).

Conclusions

1. The multiparametric flow cytometry strategy developed in the present work allows the evaluation of a wide variety of murine immune phenotypes using a minimal amount of blood with animal survival.
2. IL-10-deficient mice present marked lymphopenia at the expense of B lymphocytes, a deregulation of subpopulations of T lymphocytes towards activated pro-inflammatory phenotypes, and an expansion of the innate immune system at the expense of granulocytes, neutrophils, and mature dendritic cells.
3. EVs derived from cells of Cre-reporter mT/mG mice retain the fluorescence of the cell of origin and can be specifically isolated by combining EV separation techniques, demonstrating the validity of this tool for evaluating EVs of specific cell types in an entire organism.
4. The combination of ultracentrifugation and immunomagnetic separation achieved the best balance between quantity and purity for isolating EGFP⁺ exosomes from plasma in this murine experimental model.

5. Acute liver damage by APAP in mice resulted in alterations in various immune populations detected in peripheral blood, as well as increased circulating EVs from hepatocytes.
6. The biodistribution study supports that the lung is the main target organ for EVs derived from hepatocytes in the context of acute liver damage induced by APAP.
7. The use of the Cre-reporter mT/mG mouse strain for studying EVs derived from a specific cell type, as well as their biodistribution in a living organism, represents an interesting strategy to overcome two of the major limitations in this research field.

INTRODUCCIÓN

Insuficiencia hepática aguda (*Acute Liver Failure, ALF*)

La insuficiencia hepática aguda (ALF) consiste en el rápido deterioro de la función hepática normal en ausencia de enfermedad hepática crónica subyacente. Se trata de un síndrome raro con una incidencia de 1 a 6 casos por millón de habitantes en los países desarrollados. Esta patología cursa con ictericia, coagulopatía y encefalopatía hepática (EH), pudiendo desembocar en un fallo multiorgánico y la muerte. Su pronóstico varía en función de la etiología desde la recuperación espontánea hasta la necesidad de trasplante de hígado (Dong et al., 2020).

La etiología de esta patología es diversa, siendo el daño inducido por fármacos (*Drug-Induced Liver Injury, DILI*), más concretamente por el paracetamol (APAP, del inglés *acetaminophen*), la causa más prevalente en los países desarrollados, mientras que las hepatitis víricas son las responsables de la mayoría de los casos de ALF en los países en vías de desarrollo. Otras causas menos comunes de ALF son la hepatitis autoinmune, la isquemia hepática, la enfermedad de Wilson, ALF asociada al embarazo y etiología indeterminada (Stravitz & Lee, 2019).

En base al tiempo transcurrido entre la detección de los primeros síntomas (ictericia u otros) y la aparición de la EH, el ALF se clasifica en: **i**) hiper-agudo, EH en los primeros 7 días e ictericia casi imperceptible, como son el DILI por APAP o las hepatitis víricas; **ii**) agudo, EH entre la primera semana y la cuarta, **iii**) sub-agudo, EH entre la semana 4 y la 26 (Bernal & Wendon, 2013). Hasta la fecha, los casos hiper- y sub-agudos son los más complejos de diagnosticar dado que la ictericia es mínima en el primero y pueden ser confundidos con una enfermedad hepática crónica en el segundo.

Daño hepático inducido por fármacos: paracetamol (APAP)

Como se indicaba en el apartado anterior, el daño hepático inducido por medicamentos (DILI) puede ser causa de ALF y es producido por una reacción adversa tóxica a un fármaco que produce una lesión hepática (Chayanupatkul & Schiano, 2020).

Los estudios epidemiológicos indican que DILI es una patología de baja incidencia, siendo en España de 1,4 casos por millón de habitantes al año. Pese a ello, DILI se trata de la causa más común de ALF en Occidente (Tujios & Lee, 2018), además de presentar

un pronóstico desfavorable sin tratamiento o trasplante de hígado, con una tasa de mortalidad del 80%.

Los casos de DILI se pueden clasificar en intrínsecos o idiosincráticos. El DILI intrínseco es dependiente de la dosis y tiene lugar cuando se excede el umbral definido para un medicamento. El DILI idiosincrático, aunque necesita una dosis umbral, se considera no dependiente de dosis por desarrollarse indistintamente de la naturaleza tóxica del fármaco que desencadena la reacción (di Zeo-Sánchez et al., 2022). Entre los casos de DILI intrínseco, se encuentra el ALF inducido por paracetamol (APAP). Debido a su uso generalizado en la sociedad actual, la intoxicación por APAP se ha convertido en la causa más frecuente de DILI, representando el 50% de casos de ALF en Europa y el 40% en EE. UU (Fernandez-Checa et al., 2021; Bunchorntavakul & Reddy, 2013).

Metabolismo y mecanismo de hepatotoxicidad del APAP

El APAP es un fármaco antipirético y analgésico, seguro y efectivo a dosis terapéuticas (1-4 g/día), que se consume de forma global desde 1955. Sin embargo, el número de casos de ALF inducido por dosis superiores a 15 g de APAP ha aumentado gravemente en las últimas décadas, causando graves daños hepáticos y siendo mortal en el 25% de los casos (Bunchorntavakul & Reddy, 2018). Administrado en dosis terapéuticas, el APAP es metabolizado de forma segura por las UDP-glucuroniltransferasas (UGT) y sulfottransferasas en compuestos no tóxicos que se excretan por la orina junto con un mínimo porcentaje de APAP sin metabolizar. El APAP restante (5-9%) es metabolizado por la enzima citocromo P450 (CYP), particularmente por CYP2E1, en N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) (McGill & Jaeschke, 2013), el cual es rápidamente eliminado al conjugarse con el glutatión (GSH). Sin embargo, dosis elevadas de APAP provocan un exceso de NAPQI que conduce al agotamiento del GSH, causando estrés oxidativo mitocondrial, estrés del retículo y disfunción celular (Jaeschke et al., 2012), tal y como refleja la **Figura 1**.

NAPQI interfiere en el complejo I/II de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, favoreciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que promueven la activación de la quinasa c-Jun-N-terminal (JNK) a su forma fosforilada (p-JNK), la cual se transloca a la mitocondria aumentando la liberación de ROS y, con ello, induciendo la muerte celular (Hanawa et al., 2008). Por otro lado, p-JNK desencadena la

apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) favoreciendo la liberación de proteínas mitocondriales intermembrana, entre las que se encuentran la endonucleasa G y el factor inductor de apoptosis (*Apoptosis inducing factor*, AIF), que se translocan al núcleo causando la fragmentación del ADN y, finalmente, la muerte celular (Bajt et al., 2006). Por otro lado, el exceso de NAPQI se une a proteínas citoplasmáticas formando los denominados aductos de proteínas-APAP que la célula intenta eliminar junto con las mitocondrias dañadas por medio de la autofagocitosis (Yan et al., 2018).

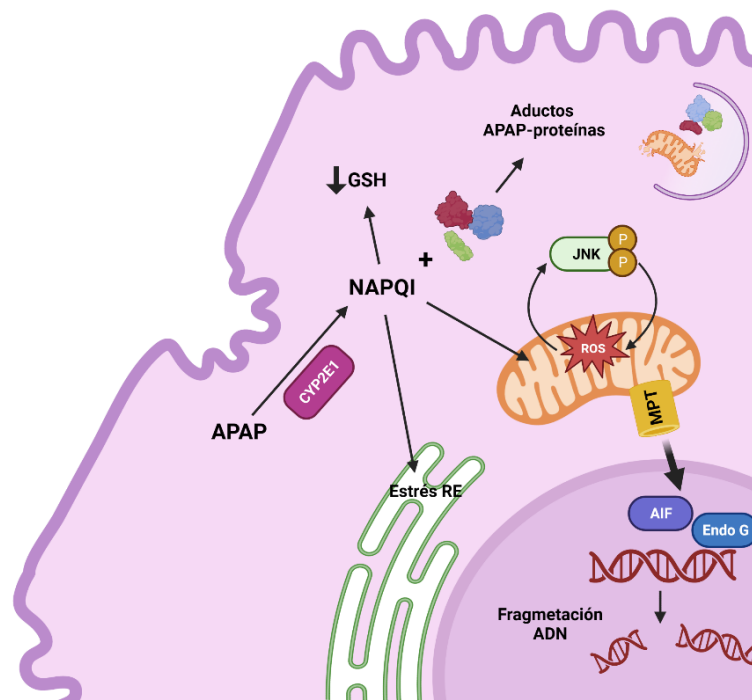


Figura 1. Mecanismos de hepatotoxicidad inducida por sobredosis de paracetamol (APAP). Ruta metabólica del APAP en el hepatocito. Adaptación con Biorender de Yan et al., 2018.

Síntomas y cuadro clínico

Los primeros informes de hepatotoxicidad debida al APAP datan de 1966, por Boyd & Berezky en ratas tratadas con dosis agudas de APAP, y por Davidson & Eastham en un par de individuos tras sufrir una sobredosis que terminaron falleciendo (Boyd & Berezky, 1966; Davidson & Eastham, 1966). Llevaron a cabo un análisis histológico al microscopio y observaron en el hígado un gran nivel de necrosis y picnosis en las zonas centrolobulares que se extendía por las áreas mediozonales hasta las periportales, así como infiltración leucocítica polimorfonuclear.

El cuadro clínico del efecto hepatotóxico del APAP (**Tabla 1**) se detalló por primera vez en 1971 y se caracteriza por la aparición de náuseas y vómitos pasadas 2-3 horas de la sobredosis, seguidos de dolor abdominal en el cuadrante superior derecho, síntomas que no predicen de manera fiable la hepatotoxicidad posterior (Boyer & Rouff, 1971). La hepatotoxicidad por sobredosis de APAP se puede clasificar en 4 fases, aunque el curso puede variar por diversos factores como la dosis, la formulación del APAP o la existencia de enfermedad hepática previa.

Fases	Cuadro clínico
Fase I (primeras 24 h)	<ul style="list-style-type: none"> - Náuseas, vómitos, malestar general, letargo, diaforesis / asintomático. - AST/ALT dentro de los parámetros normales.
Fase II (24 – 72 h)	<ul style="list-style-type: none"> - Período latente: mejora o resolución de los síntomas de la fase I. - Elevación subclínica de AST/ALT. - Casos severos: dolor en el cuadrante superior derecho, hepatomegalia, ictericia. - Nefrotoxicidad: oliguria y creatina elevada.
Fase III (72 – 96 h)	<ul style="list-style-type: none"> - Reaparecen los síntomas sistémicos del estadio I. - Elevación de AST/ALT (>3.000 UI/L). - Síntomas y signos probables: ictericia, encefalopatía, tiempo de protombina prolongado y acidosis láctica. - Daño agudo de riñón y páncreas (10% – 25%; >50% si ALF) y pancreatitis aguda (0,3% – 5%). - Muerte: generalmente por fallo multiorgánico.
Fase IV (96 h – 2 semanas)	<ul style="list-style-type: none"> - Los sobrevivientes de la fase III pasan a fase de recuperación: 1 – 2 semanas. - La recuperación histológica ocurre más lentamente: 3 meses. - Cuando ocurre la recuperación, es completa; no ha sido reportada la evolución a hepatitis crónica.

Tabla 1. Cuadro clínico de las diferentes fases de progresión del daño hepático agudo inducido por fármacos (DILI). Tabla adaptada de Bunchorntavakul & Reddy, 2018.

El análisis bioquímico sérico se caracteriza por elevados niveles de las transaminasas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), detectables entre las 24 y 36 horas post-sobredosis (Singer et al., 1995), así como de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), del tiempo de protrombina y por hiperbilirrubinemia leve (Prescott et al., 1971). La disfunción hepática es latente a las 24 horas alcanzando su grado más crítico sobre el cuarto día con presentación de ictericia, coagulopatía y encefalopatía (Hodgman & Garrard, 2012).

Diagnóstico de DILI por APAP

Uno de los principales biomarcadores que reflejan daño hepático inducido por APAP son los aductos de APAP unidos covalentemente a proteínas. Se han realizado análisis inmunohistoquímicos de los aductos proteína-APAP en secciones de hígado de ratones y se observó que la unión a proteínas sólo se daba en hepatocitos necróticos centrolobulillares, los cuales presentaban altos niveles de CYP2E1, relacionando la formación de estos aductos proteína-APAP con la toxicidad hepática (Hart, 1995). Estudios posteriores donde se analiza el daño hepático inducido por APAP en modelos de ratón a diferentes tiempos tanto a nivel hepático como en suero demuestran que los aductos proteínas-APAP se producen en el tejido hepático entre las 0 y 2 horas post-administración, y transcurridas 4 horas comienzan a ser detectables en suero junto con las ALT y AST debido a la lisis de los hepatocitos (McGill et al., 2013). Dado el potencial de estos aductos de proteínas-APAP como biomarcadores de intoxicación hepática por APAP, se desarrolló una técnica para cuantificar estos aductos basada en la cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) y la separación del conjugado APAP-3-cisteína. Este método ha resultado ser eficiente en la detección de los aductos proteínas-APAP en muestras de pacientes (James et al., 2009). Por ello, la medición de los valores séricos de aductos de proteína-APAP ayuda a diagnosticar la lesión hepática grave debida a una sobredosis de APAP (McGill & Hinson, 2020).

Sin embargo, hasta la fecha, no existen biomarcadores predictivos o de diagnóstico temprano que permitan evitar el desarrollo de los síntomas más graves como la EH o la necesidad de trasplante hepático, así como biomarcadores de pronóstico que permitan predecir la evolución de la enfermedad.

Tratamiento

El único fármaco clínicamente aceptado para tratar la hepatotoxicidad debida a una sobredosis por APAP es la N-acetilcisteína (NAC), pese a perder eficacia transcurridas 10 horas tras la intoxicación (Larson, 2007). NAC se trata de un precursor de la síntesis de GSH, facilitando así la eliminación del NAPQI producido durante el metabolismo del APAP y previniendo la formación de aductos proteicos (Saito et al., 2010). Muy raramente, la NAC puede producir efectos secundarios como reacciones anafilácticas.

Dado los posibles efectos adversos de NAC y su baja reactividad ante dosis elevadas de APAP o pasadas 8 horas tras la intoxicación, actualmente se están investigando tratamientos alternativos o complementarios.

El 4-metilpirazol (4MP) ha resultado ser efectivo en casos de intoxicación por APAP, ya que se ha descrito como inhibidor competitivo de la actividad de la JNK encajando en su sitio de unión a ATP (J. Y. Akakpo et al., 2019). De esta manera, previene la formación de NAPQI reduciéndose el estrés oxidativo de la mitocondria. Los resultados sobre su eficacia frente a la sobredosis por APAP junto con la ausencia de efectos adversos, sugieren que el 4MP es ligeramente mejor que NAC por prevenir la formación de NAPQI en lugar de eliminarlo (Kang et al., 2020).

Estudios mecanicistas sobre el proceso de hepatotoxicidad por APAP a nivel celular demostraron la formación de superóxido y peroxinitrito en las mitocondrias, por lo que la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) tiene un efecto protector frente al estrés oxidativo y nitrosativo mitocondrial. Por ello, se ha pensado en el mangafodipir como posible tratamiento de la intoxicación por APAP dado que, aunque se emplea como agente de contraste en resonancia magnética, presenta actividades miméticas de SOD (Cover et al., 2005). Puesto que la acción SOD es dependiente de Mn^{2+} , se desarrolló el calmangafodipir que establece una unión más estable a la molécula (Karlsson et al., 2015). Recientemente, ha sido utilizado el calmangafodipir junto con NAC en un estudio con 6 pacientes y se observó que los biomarcadores de lesión celular citoqueratina-18 y miR-122 se reducían respecto a los tratados exclusivamente con NAC (Morrison et al., 2019). Sin embargo, faltan estudios pre-clínicos que confirmen el mecanismo de acción de estos compuestos previniendo la formación de peroxinitrito en las mitocondrias en un contexto de intoxicación por APAP (Jaeschke et al., 2020)

Búsqueda de nuevos biomarcadores en enfermedad hepática

Perfil inmunológico

Sistema inmune: respuesta innata y adaptativa

El sistema inmunológico cumple la esencial función de proteger al organismo frente a agentes patógenos, así como eliminar células propias tumorales o elementos potencialmente perjudiciales, y tolerar aquello que es propio o inocuo. Para ello, cuenta con tipos celulares que articulan 2 tipos de respuesta: innata y adaptativa (**Figura 2**).

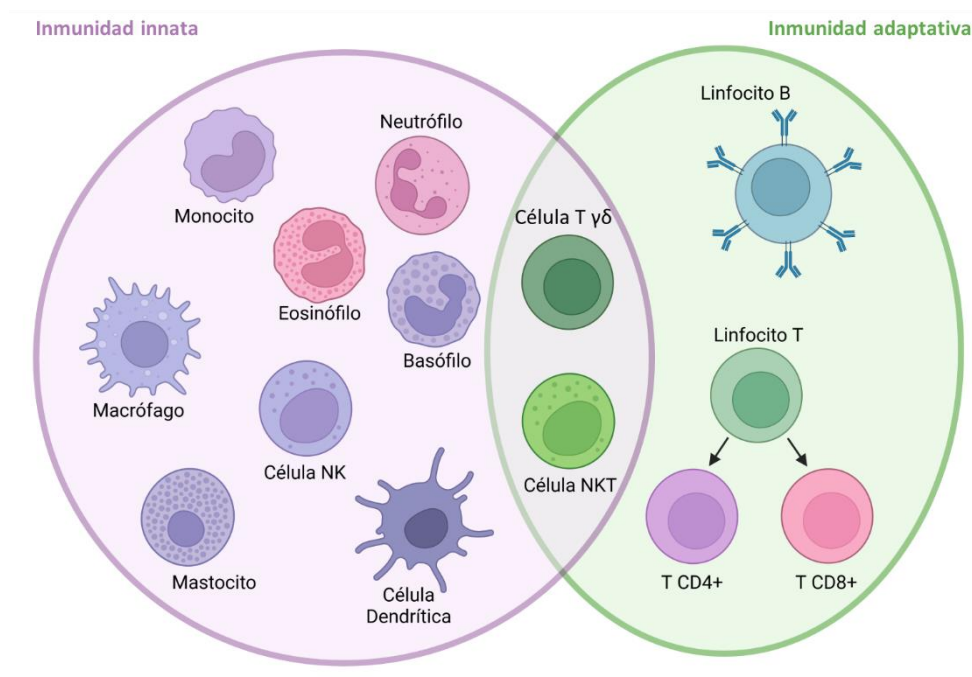


Figura 2. Diagrama de las poblaciones celulares responsables de la respuesta inmune innata y adaptativa. Adaptación con Biorender de Dranoff G, 2004

Respuesta innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa y la respuesta inmunológica más conservada en la naturaleza. Ésta incluye barreras físicas como la piel, las capas de células epiteliales o la mucosa, químicas, microbiológicas y elementos del sistema inmune (leucocitos, complemento, citoquinas, quimioquinas), estos últimos los principales responsables de la defensa inmediata del huésped frente a una agresión (Parkin & Cohen, 2001).

Las células inmunológicas protagonistas de la respuesta innata son:

Monocitos

Los monocitos (Mo) conforman una población de células que se origina en la médula ósea a partir de un progenitor mieloide y que se encuentran principalmente en circulación o en el bazo. Tienen una vida media corta y contribuyen a la renovación de macrófagos y células dendríticas (DC) a nivel tisular (Geissmann et al., 2010). Intervienen en la respuesta inflamatoria mediante su activación vía *Toll-like receptor* (TLR) liberando citoquinas proinflamatorias como TNF- α , interleuquina (IL)-1 β , IL-8 o IL-6 así como quimioquinas. Por otro lado, actúan como células presentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cells*) debido a su capacidad fagocítica y a las moléculas co-estimuladoras que presentan en superficie como CD80, CD86 y MHC-II (Strauss-Ayali et al., 2007).

Macrófagos

Los macrófagos proceden de las células madre hematopoyéticas (HSC, *haematopoietic stem cells*) y derivan de monocitos circulantes o pueden ser residentes directamente en el tejido (Yona et al., 2013). Esta población celular participa en la inmunidad innata eliminando tanto microorganismos como moléculas tóxicas o células dañadas o muertas, mediante fagocitosis, secreción de enzimas o citoquinas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*). Al igual que los Mo, también participan en la inmunidad adaptativa actuando como APC a los linfocitos T tanto en contexto MHC-I como MHC-II (Italiani & Boraschi, 2014).

Células dendríticas

Las células dendríticas (DC) pueden derivar de las HSC o de los Mo y pueden encontrarse tanto en circulación como en los órganos linfoides o en tejidos. Son células clasificadas dentro de la respuesta inmune innata por reconocer y responder a patrones moleculares asociados a daño (DAMP) o patógenos (PAMP), y actuar como APCs a las células T (Collin & Bigley, 2018), pudiendo inducir tanto inmunidad como tolerancia.

Granulocitos

Se trata de una población de estirpe mieloide que deriva de las HSC y que se caracteriza por presentar gránulos en su citoplasma y una morfología nuclear específica (Gabrilovich et al., 2012). Dentro de los granulocitos se encuentran:

- **Neutrófilos:** son células que se caracterizan por presentar un núcleo multilobulado. Se encuentran en circulación y son reclutados hacia la zona donde tiene lugar la inflamación para llevar a cabo una función esencial en la defensa del huésped fagocitando y eliminando microorganismos gracias al contenido de sus gránulos (Singh et al., 2021).
- **Eosinófilos:** implicados en procesos inflamatorios relacionados con infecciones por parásitos o helmintos y en reacciones alérgicas, y se identifican por tinciones con colorantes ácidos. Su modo de acción se basa en la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-2, IL-4, IL-5, etc.), quimioquinas y otros mediadores como el factor activador de plaquetas o el leucotrieno C4 (Rothenberg & Hogan, 2006).
- **Basófilos:** se identifican mediante colorantes básicos y se caracterizan por su actuación en reacciones alérgicas mediante la liberación de histamina y quimioquinas contenidas en sus gránulos, así como por la secreción de citoquinas IL-4 e IL-13 (Stone et al., 2010).

Células Natural Killer (NK) y NKT

Las **células Natural Killer (NK)** son células inmunes responsables de la respuesta más inmediata frente a células infectadas por virus o a tumores, y las principales productoras de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), GM-CSF e interferón (IFN- γ), además de presentar gránulos que contienen perforina y granzima A que emplean para eliminar dichas células.

Las **células NKT** expresan el receptor de linfocitos T (TCR) en superficie además de los marcadores característicos de las NK, y reconocen antígenos hidrofóbicos, como lípidos o glicolípidos, presentados en moléculas semejantes al MHC-I, CD1d (Ahmadi et al., 2022). Dichas características sitúan a las NKT entre la inmunidad innata y adaptativa.

Mastocitos

Son células inmunitarias semejantes a los basófilos cuyos precursores se encuentran en circulación y maduran una vez localizadas en tejido. Los mastocitos responden a señales tanto de la inmunidad innata como adaptativa liberando mediadores inflamatorios en procesos alérgicos o de anafilaxis, como histamina, serotonina, proteasas y peptidasas, que contienen en sus gránulos citoplasmáticos (Gilfillan & Rivera, 2009).

Respuesta adaptativa

Se trata de la respuesta inmune antígeno-específica mediada por los linfocitos T y B, y que permite generar memoria frente a estímulos nocivos similares en el futuro. De forma simplificada, la respuesta inmune adaptativa se basa en tres señales: (i) activación de las células T por el reconocimiento antigénico mediado por una APC, (ii) co-estimulación de los linfocitos T proporcionada por una APC, y (iii) inducción de la activación de los linfocitos debida a las citoquinas liberadas por las células protagonistas de la respuesta innata. Por otro lado, los linfocitos B, activados por el antígeno a través de mecanismos dependientes o no de las células T, son los responsables de la respuesta humoral (Deets & Vance, 2021).

Linfocitos T

Los linfocitos T son células protagonistas de la respuesta inmune adaptativa que maduran en el timo, migran a los órganos inmunes y tejidos dañados a través de la linfa o de la sangre, y pueden ser encontrados tanto en circulación como residentes en tejidos (Khan & Ghazanfar, 2018). Existen dos subpoblaciones principales:

- **Linfocitos T citotóxicos CD8+ (Tc):** son células efectoras citolíticas que contribuyen a la eliminación de infecciones intracelulares y células tumorales mediante la secreción de citoquinas y la muerte directa de las células dañadas, además de proporcionar inmunidad protectora a largo plazo frente a reinfecciones (Reina-Campos et al., 2021).
- **Linfocitos T auxiliares CD4+ (Thelper, Th):** cumplen una función esencial en la respuesta inmune adaptativa mediante la secreción de citoquinas específicas. Estas células, en base a la señalización y ambiente de citoquinas, se polarizan hacia subtipos más específicos, pudiendo diferenciar los subtipos Th1, Th2, Th17,

Th foliculares, Th22, Th9 y T reguladoras (Treg), éstas últimas responsables del mantenimiento de la tolerancia inmunológica (Luckheeram et al., 2012).

Dentro de las células T se encuentra otra subpoblación menos representada en circulación denominadas células T $\gamma\delta$. Estas células poseen un potencial citotóxico semejante al de las células NKT, puesto que reconocen glicolípidos presentados en moléculas CD1d (Zarobkiewicz & Bojarska-Junak, 2022).

Linfocitos B

Son las células inmunes responsables de la producción de anticuerpos antígeno-específicos. Los linfocitos B se generan en la médula ósea y salen a circulación como células B inmaduras o transicionales que presentan la inmunoglobulina (Ig) D en superficie. Éstas se dirigen a los folículos linfoides del bazo y los ganglios linfáticos donde pasan a ser células B precursoras que expresan IgM. En los órganos linfoides es donde tiene lugar la activación y diferenciación de las células B inducida por antígenos. Los linfocitos B productores de anticuerpos de alta afinidad se denominan células plasmáticas que migran a la médula ósea donde permanecen como células B memoria (LeBien & Tedder, 2008).

Estudio del perfil inmunológico en clínica

Una de las pruebas de rutina realizadas en clínica para diagnosticar cualquier patología es el hemograma, que recoge información sobre los diferentes componentes de la sangre, incluidas las principales células del sistema inmune. Sin embargo, los datos aportados por este análisis se limitan a recuentos muy generales, sin distinguir fenotipo o estado funcional, y no permiten determinar la etiología de la enfermedad. En los últimos años, el estudio de las poblaciones inmunes por citometría de flujo multiparamétrica se está intentando implementar en clínica para llevar a cabo un análisis más exhaustivo de los diversos fenotipos así como de marcadores funcionales que participan en la respuesta inmunológica.

Puesto que la inmunidad se ve implicada en la patogenia de diversas enfermedades, el análisis por citometría de flujo no sólo se está utilizando en el diagnóstico de enfermedades debidas a respuestas anómalas o en las que se ve afectado el sistema inmune como alergias (Bernaldo de Quiros et al., 2018), enfermedades autoinmunes

(Zecevic et al., 2018), mieloma múltiple (N. Wang et al., 2019), linfomas y leucemias (Keeney et al., 2017; Simoes et al., 2023), rechazo de trasplantes (López-Abente et al., 2021) o enfermedad de injerto contra huésped (Ni et al., 2019), sino también en la caracterización, diagnóstico y pronóstico de tumores de diferente etiología (Del Bianco et al., 2022; Salvador-Coloma et al., 2020; X. Ye et al., 2020) o en patologías que afectan a otros sistemas: enfermedades neurológicas como demencia (Busse et al., 2021), respiratorias como la reciente pandemia por la infección del virus SARS-CoV-2 (Gil-Manso et al., 2023), o incluso en enfermedad renal crónica (Wu et al., 2023).

La implementación en clínica del análisis del perfil inmunológico por citometría de flujo partiendo de una muestra de sangre es una realidad, ya que se trata de una técnica rápida y mínimamente invasiva, y que proporciona información precisa y específica sobre la respuesta inmune de una determinada patología.

Perfil inmunológico en la enfermedad hepática

El hígado es un órgano que cumple diversas funciones entre las cuales se halla la inmunológica debido a las poblaciones pertenecientes al sistema inmune residentes en él, como las células de Kupffer y algunos tipos de linfocitos innatos (Kubes & Jenne, 2018), que representan el 10-20% del total de las células hepáticas (L. Li & Zeng, 2020). Asimismo, se ha descrito que el hígado cumple una función sistémica clave en respuestas inflamatorias extrahepáticas mediante la producción de proteínas séricas como la albúmina, factores de coagulación, proteínas del complemento, y otras, implicadas en la regulación de la presión osmótica sanguínea o que actúan como precursores de mediadores inmunes innatos. Asimismo, diversos estudios demuestran que los hepatocitos son capaces de detectar las citoquinas producidas por las células inmunes periféricas y de iniciar la respuesta sistémica de fase aguda aumentando la producción de estas proteínas y de IL-6 (Robinson et al., 2016).

Estas evidencias apoyan el papel del hígado como órgano inmunológico cuya respuesta a un contexto inflamatorio, tanto local como extrahepático, tiene repercusiones a nivel sistémico. Sin embargo, pocos artículos científicos han definido con detalle la respuesta inmunológica de diversos procesos patológicos hepáticos, como el ALF inducido por APAP (**Figura 3**).

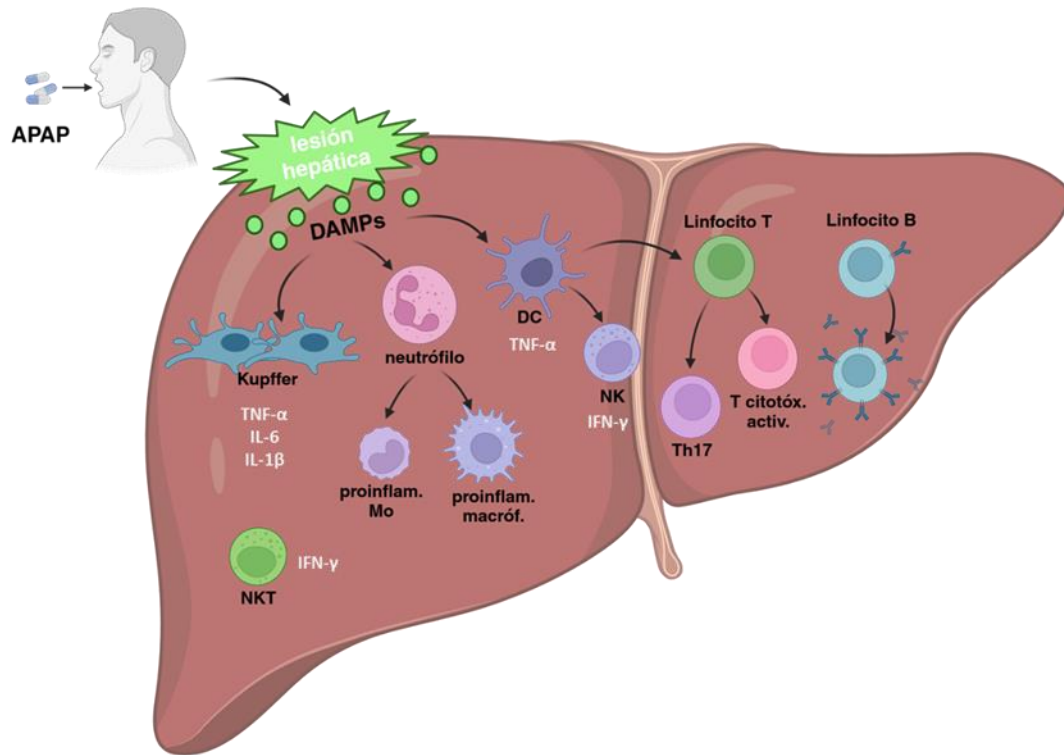


Figura 3. Diagrama de la respuesta inmunológica que tiene lugar en el hígado característica de la hepatotoxicidad inducida por APAP. Las flechas representan la inducción de activación.

Poblaciones de la inmunidad innata en DILI inducido por APAP

Células de Kupffer

Las células de Kupffer son los macrófagos residentes en el hígado, conforman el 35% de las células no parenquimatosas del hígado y cumplen una función esencial en la defensa sistémica y local (Mackay, 2002). En un contexto de daño hepático inducido por APAP, la necrosis de los hepatocitos induce la liberación de DAMPs que son reconocidos por las células de Kupffer, las cuales se activan y secretan citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Martin-Murphy et al., 2010). El resultado es la atracción de neutrófilos y macrófagos derivados de monocitos a la zona donde se está produciendo el proceso inflamatorio (Hendriks et al., 2022). Por otro lado, se ha demostrado el papel de las células de Kupffer en procesos de reparación hepática, presentando un perfil tipo M2, mediante la liberación de citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10, o IL-13. Por tanto, las células de Kupffer podrían promover en un primer momento la respuesta inflamatoria y hepatotoxicidad, y tras ello, ayudar en la regulación de la inmunidad y en la reparación del tejido (L. Ye et al., 2020).

Neutrófilos

Los DAMPs liberados en condiciones de hepatotoxicidad por APAP también modulan la activación y reclutamiento de los neutrófilos al área donde está teniendo lugar la inflamación (H. Guo et al., 2021). Algunos estudios describen que la liberación de ADN procedente de los hepatocitos dañados por una sobredosis de APAP favorece la activación de los neutrófilos mediada por el receptor de tipo Toll 9 (TLR9) (Marques et al., 2015). Sin embargo, otros estudios sugieren que los neutrófilos no participan en la fase temprana de la hepatotoxicidad por APAP afirmando que solo participan en la eliminación de células necróticas (Lawson, 2000). Incluso se ha descrito que los neutrófilos cumplen un papel en la reparación y regeneración de lesiones hepáticas inducidas por APAP polarizando a los monocitos/macrófagos de un fenotipo proinflamatorio hacia uno reparador (Yang et al., 2019).

Células natural killer (NK) y NKT

Las células NK suponen el 30-50% de los linfocitos residentes hepáticos en humanos (Harmon et al., 2016), contribuyen a la respuesta citotóxica mediada por células y a la exocitosis de gránulos citotóxicos, y se encuentran involucradas tanto en procesos infecciosos como en lesiones tisulares (Chin et al., 2022). Las células NKT representan otra población linfoide residente en el tejido hepático y cumplen una función tanto inmunomoduladora como citotóxica (H. Sun et al., 2019). Ambas poblaciones se han visto implicadas en la progresión de la hepatotoxicidad inducida por APAP dado que el IFN- γ secretado por éstas promueve la liberación de quimiocinas y citoquinas que favorecen la infiltración del hígado por células inmunes, lo que conduce a la apoptosis de los hepatocitos (Ishida et al., 2002). Sin embargo, estudios más recientes difieren del posible papel de las células NK y NKT en la enfermedad, pues el medio de disolución del APAP (generalmente solución salina o dimetilsulfóxido (DMSO)) influye en la activación de estas células (Masson et al., 2008), e incluso se ha comunicado una función protectora en la hepatotoxicidad por APAP (Martin-Murphy et al., 2013).

Células Dendríticas

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígenos que contribuyen a la inmunidad innata y a la respuesta inmune adaptativa induciendo la diferenciación de los linfocitos T (Cabeza-Cabrerizo et al., 2021). Aunque la sobredosis de APAP genera la

hepatotoxicidad inicial, el sistema inmune innato del hígado agrava el daño hepático de manera secundaria (Liu et al., 2004). Por otro lado, se ha demostrado el papel inmunomodulador de las DC a través de la producción de TNF- α en la fibrosis hepática crónica (Connolly et al., 2010). Otros estudios observan que el agotamiento de las DC se relaciona con un aumento de la necrosis hepática debida a APAP (Connolly et al., 2011). Por tanto, el papel de las DC en el desarrollo del ALF debido a APAP no está completamente definido.

Poblaciones de la Inmunidad adaptativa en DILI inducido por APAP

Linfocitos T

Se ha demostrado que el balance de citoquinas Th1/Th2 es esencial en la progresión de ALF inducido por APAP. Tras una inyección intraperitoneal de APAP, Masubuchi et al. observaron que los ratones de la cepa C57BL/6, que presentan una respuesta predominante tipo Th1, experimentaron un daño hepático más grave que los ratones de la cepa BALB/c, que tienen una respuesta predominante tipo Th2 (Masubuchi et al., 2009). Por otro lado, se ha definido a las Th17 como principales implicadas en la patogénesis de ALF inducido por APAP, liberando IL-17 que promueve la secreción de factores proinflamatorios y citoquinas para reclutar neutrófilos (Zhu & Uetrecht, 2013). Asimismo, se ha descrito otro tipo de células T residentes en el hígado llamadas células T $\gamma\delta$ capaces de producir IL-17 en un contexto de hepatotoxicidad por APAP estimulando la infiltración de los neutrófilos al tejido y agravando la lesión hepática (X. Wang et al., 2013). Por otro lado, respecto a los linfocitos Tc se ha descrito que se infiltran en el área donde está teniendo lugar la respuesta inflamatoria del tejido hepático durante un ALF (Foureau et al., 2015) y que su concentración aumenta en comparación con una condición normal (Shi et al., 2022).

Linfocitos B

Hasta el momento, no hay estudios centrados en el papel de los linfocitos B en la hepatotoxicidad inducida por APAP que hayan sido publicados. En relación con la hepatotoxicidad producida por isoniazida, sin embargo, sí se ha descrito la detección de anticuerpos anti-CYP450 y anti-isoniazida (Metushi et al., 2014).

En definitiva, el conocimiento sobre la respuesta inmune en un contexto de ALF inducido por APAP es relativamente limitado hasta la fecha, restringiéndose al análisis de un reducido número de poblaciones inmunológicas en el propio tejido hepático. Tratándose el hígado de un órgano con funciones inmunes que tienen efecto a nivel sistémico, el estudio en profundidad del perfil inmunológico en la periferia podría aportar información útil, obtenida de manera no invasiva, sobre el estado del hígado.

Vesículas extracelulares (VEs)

¿Qué son las vesículas extracelulares?

El término vesícula extracelular (VE) engloba a toda vesícula delimitada por una bicapa lipídica que contiene parte del citosol de su célula de origen y es secretada al medio extracelular. Las VEs conforman un grupo muy heterogéneo de vesículas, con diferentes tamaños, orígenes y funcionalidades. La capacidad de secretar VEs es un mecanismo conservado a lo largo de la evolución desde los procariotas hasta eucariotas superiores y plantas (Yáñez-Mó et al., 2015).

En 1985 se publicó por primera vez un artículo en el cual se observaba el mecanismo de exocitosis de partículas con aspecto vesicular y de un tamaño de 50 nm de diámetro (Pan et al., 1985). Dicho estudio analizaba por microscopía electrónica el desprendimiento de los receptores de transferrina en la superficie de estas vesículas durante la maduración de los reticulocitos en muestras de sangre de oveja, describiendo por primera vez el proceso de liberación de los posteriormente denominados “exosomas” mediante la fusión de la membrana de los cuerpos multivesiculares (MVB, *multivesicular bodies*) con la membrana plasmática de la célula y la secreción al exterior de las vesículas intraluminales (ILV, *intraluminal vesicles*). Posteriormente, el grupo de Johnstone et al., fue el primero en conseguir aislar estas VEs por medio de ultracentrifugación, definiéndolas como un mecanismo de la célula para deshacerse de compuestos innecesarios (Johnstone et al., 1987).

Conforme la investigación en este campo ha ido avanzando, se ha descubierto que las VEs no sólo cumplen esa función de desecho de compuestos. Raposo et al. demostró la participación de las VEs derivadas de linfocitos B en la presentación antigénica al

presentar en su superficie la molécula de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II) (Raposo et al., 1996), convirtiéndose en un mecanismo esencial de comunicación célula a célula.

Pese a las evidencias sobre las diversas funciones de las VEs debido a las proteínas que presentan en su membrana, no fue hasta el 2007 cuando se describió el contenido en material genético procedente de la célula de origen que portan las vesículas en su interior. El estudio demostró mediante microarrays la presencia de ARN mensajero (ARNm) y de microARN, resultando ser funcionales en la célula receptora (Valadi et al., 2007).

Estos hallazgos apoyan la idea de que las VEs son un mecanismo biológico de comunicación intercelular esencial, ya sea intercambiando su contenido (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos) entre células o actuando como vehículos señalizadores tanto en procesos celulares homeostáticos normales como en contextos patológicos (van Niel et al., 2018).

Existen diversos criterios de clasificación de las vesículas extracelulares (tamaño, origen, función...). Según su biogénesis, se pueden clasificar en (**Figura 4**):

- **Exosomas:** vesículas de 30-150 nm de diámetro originadas por la maduración del sistema endosomal en MVB, cuyas ILVs son liberadas al medio extracelular como resultado de la fusión del MVB con la membrana plasmática de la célula.
- **Microvesículas:** también conocidas como ectosomas, son vesículas que pueden alcanzar un tamaño mayor que los exosomas, de 100-1000 nm de diámetro, secretadas al medio por evaginación de la membrana plasmática.
- **Cuerpos apoptóticos:** poseen un diámetro de entre 100 a 5000 nm y se encuentran involucradas en el proceso de muerte celular programada, procediendo de células apoptóticas o muertas vía *blebbing* de la membrana plasmática.

	Exosomas	Microvesículas	Cuerpos Apoptóticos
Tamaño	30-150 nm	100-1000 nm	100-1500 nm
Origen	MBV: vía fusión de membrana y exocitosis	Evaginación de la membrana plasmática	<i>Blebbing</i> de células apoptóticas y muertas
Forma	Esférica	Esférica	Heterogénea

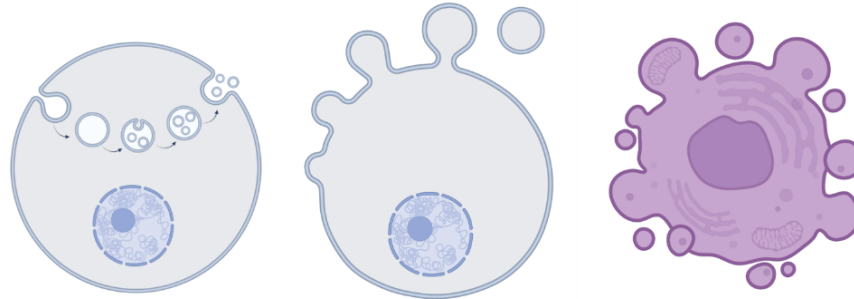


Figura 4. Clasificación de las vesículas extracelulares en base a su biogénesis. Adaptación por Biorender de Hadizadeh et al., 2022.

Exosomas: biogénesis, composición y función

Los exosomas proceden del sistema endosomal, más concretamente de los MVBs, los cuales se originan a partir de la invaginación de la membrana celular formándose así el endosoma temprano. Este endosoma temprano, tras sufrir una serie de modificaciones como la acidificación y variaciones en el perfil de proteínas contenidas, deriva en endosoma tardío (Zhang et al., 2016). La membrana del endosoma tardío sufre invaginaciones hacia el espacio luminal obteniéndose unas vesículas conocidas como vesículas intraluminales (ILV). Una vez formado el MVB puede tener dos destinos: degradarse al combinarse con un lisosoma o fusionarse con la membrana plasmática liberando las ILVs al medio extracelular (Hadizadeh et al., 2022). Por tanto, los exosomas se corresponden con las ILVs contenidas en el interior de los MVBs que son exocitadas por medio de la fusión de la membrana de los MVBs con la membrana plasmática (Lakkaraju & Rodriguez-Boulan, 2008).

A nivel estructural, las vesículas extracelulares están compuestas por un “núcleo fluido” encerrado en una bicapa de fosfolípidos, esfingomielinas y gangliósidos en su mayoría, tal y como se refleja en la **Figura 5**. Dicho núcleo es semejante al citosol de su célula de origen y, por tanto, enriquecido en proteínas concretas, algunas de las cuales determinan la funcionalidad de las VEs (Shah et al., 2018). Además de proteínas, las VEs portan una amplia variedad de ácidos nucleicos: ARN mensajero, ARN no codificante, microARN y pequeñas secuencias de ADN (van Niel et al., 2018).

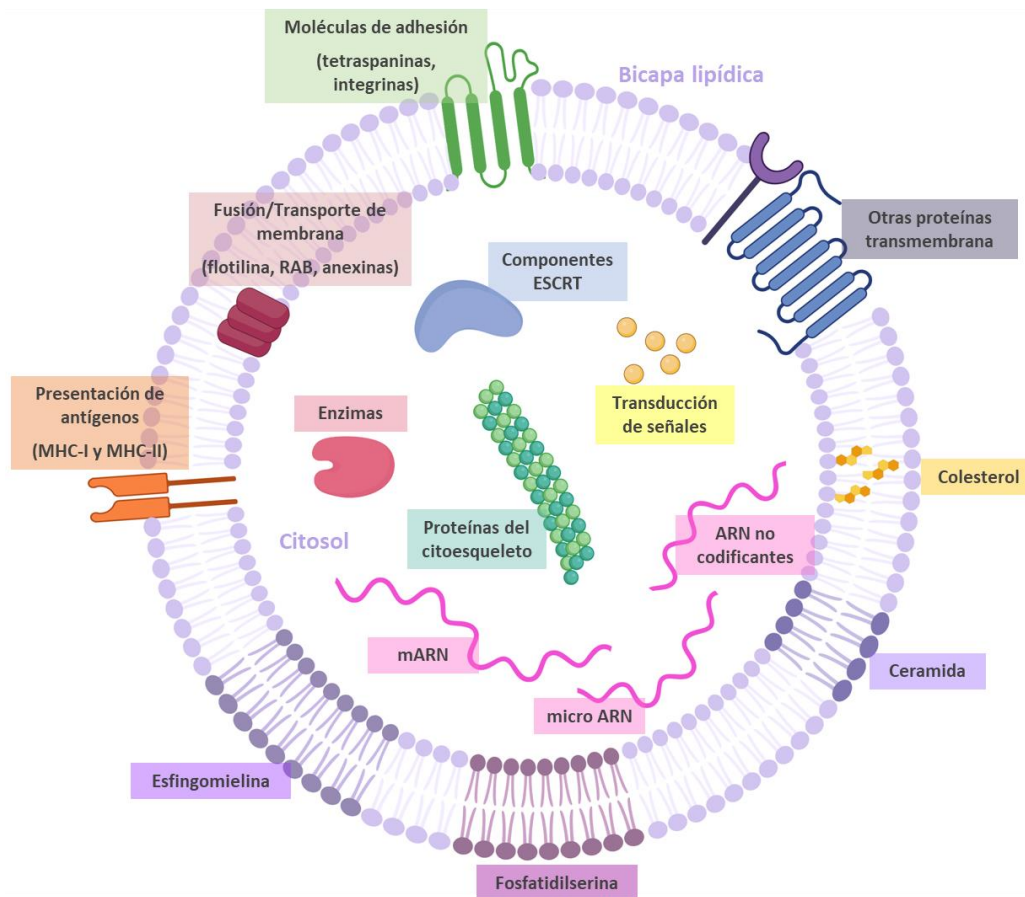


Figura 5. Composición general de las vesículas extracelulares: representación esquemática de la estructura de una VEs y de su contenido en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Adaptación por Biorender de Théry C. et al., 2014

Lípidos

Diversos análisis de la composición en lípidos que presentan las VEs demuestran que se encuentran enriquecidas en esfingomiolina, fosfatidilserina, colesterol y ceramidas o sus derivados (Llorente et al., 2013). Diversos estudios, como el de Carayon et al., demuestran que los mecanismos de biogénesis de los exosomas por parte de los reticulocitos varían conforme estos maduran en glóbulos rojos, resultando en vesículas con una composición lipídica diferente (Carayon et al., 2011). Estas observaciones sugieren que el estado fisiológico de la célula influye en el perfil lipídico de las VEs.

Proteínas

Los primeros estudios proteómicos de los exosomas demostraron que presentan dos conjuntos de proteínas: unas específicas del origen celular y otras independientes de la célula de origen y comunes a la mayoría de exosomas. Dentro de este último grupo, se

encuentran las proteínas del endosoma, la membrana plasmática y el citosol, quedando exentas o poco representadas proteínas propias del núcleo, la mitocondria, el retículo endoplasmático y el aparato del Golgi (Colombo et al., 2014).

Debido a su origen endosomal, los exosomas presentan, independientemente del tipo celular que los haya secretado, proteínas involucradas en transporte y fusión de membranas (Rab GTPasas, Flotilina), en la generación de los MVBs (Alix, TSG101, proteínas de los complejos de clasificación endosómica requeridos para el transporte (ESCRT)), proteínas de choque térmico (HSC 70 y 90), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 y CD82) e integrinas (Simons & Raposo, 2009).

Ácidos Nucleicos

La primera vez que se determinó la presencia de ácidos nucleicos en exosomas fue en exosomas derivados de mastocitos (Valadi et al., 2007), y desde entonces se han realizado diversos estudios analizando el contenido genético de las VEs. Se ha demostrado que el material genético de VEs purificadas se compone mayormente de ARN pequeño, ARN mensajeros (mARN) y micro ARN (microARN), mientras que los ARN ribosómicos se encuentran a niveles casi indetectables y se utilizan como marcadores de contaminación por cuerpos apoptóticos (Miranda et al., 2010).

Numerosos estudios han demostrado que los ácidos nucleicos transportados por las VEs pueden influir en la célula diana, promoviendo distintos procesos biológicos como su activación, migración o incluso su apoptosis (Mittelbrunn & Sánchez-Madrid, 2012).

Las VEs y el hígado

El hígado es un órgano que lleva a cabo un amplio rango de funciones: metabolismo de macronutrientes, detoxificación, digestión, apoyo al sistema inmunológico, síntesis de los componentes sanguíneos, y otras (Trefts et al., 2017). Para realizarlas de manera eficiente, el tejido hepático requiere de una gran coordinación entre las poblaciones celulares que lo componen: hepatocitos, células de Kupffer y el resto de las células no parenquimatosas (estrelladas, endoteliales, etc). Entre los mecanismos de coordinación intercelular se encuentran las VEs, involucradas tanto en el contexto fisiológico normal del hígado como en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas.

VEs en la fisiología normal del hígado

Las VEs son secretadas por las células tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. De acuerdo con el concepto de que las VEs suponen un mecanismo relevante en la comunicación intercelular, diversos estudios han demostrado la implicación de las VEs en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos del hígado. Por ejemplo, se ha demostrado que la capacidad proliferativa y regenerativa de los hepatocitos se debe en parte a la señalización de pequeñas moléculas y al contenido de las VEs derivadas de hepatocitos en ceramidas y esfingosina quinasa 2, la cual promueve la síntesis de la esfingosina-1-fosfato en la célula diana (Nojima et al., 2016). Asimismo, estas VEs son capaces de transferir su contenido en enzimas metabolizadoras de fármacos, como el citocromo P450 (CYP), UDP-glucuroniltransferasa (UGT) o glutatión S-transferasa (GST), a células extrahepáticas que adquieren esa habilidad (Cai et al., 2017).

Estas observaciones apoyan el papel esencial de las VEs en la correcta actividad del hígado, tanto a nivel del propio tejido como en coordinación con el resto de los órganos.

VEs en la enfermedad hepática

Hasta el momento, un considerable número de enfermedades hepáticas se diagnostican de forma definitiva en base al examen histológico de biopsias del hígado: una práctica invasiva de una precisión diagnóstica sub-óptima y que puede incluso poner en riesgo la vida del paciente (Ratziu et al., 2005). Las VEs se han convertido en una alternativa potencialmente ideal para encontrar biomarcadores no invasivos, ya que por un lado su composición depende del estado de su célula de origen y, por otro lado, son fácilmente accesibles por su pequeño tamaño (nanoescala) y localización extracelular en fluidos biológico (Bala et al., 2012).

En contextos de inflamación, las VEs pueden jugar un papel proinflamatorio, sirviendo como vehículos presentadores de antígenos (Théry et al., 2002), o inmunosupresor, en el caso de células tumorales favoreciendo un ambiente antiinflamatorio (Sadallah et al., 2010). Diversos estudios, comentados a continuación, han investigado el papel patogénico y diagnóstico/pronóstico de las VEs en varias enfermedades hepáticas.

Enfermedad hepática alcohólica

Esta patología se debe al metabolismo del alcohol por acción de tres enzimas hepáticas (alcohol deshidrogenasa, catalasa y citocromo CYP2E1) en acetaldehído, el cual promueve la formación de aductos que conducen a alteraciones de proteínas y daño del ADN favoreciendo la mutagénesis (Setshedi et al., 2010).

Diversos estudios corroboran que la inducción de daño hepático por alcohol aumenta el número de VEs circulantes en plasma, tanto en modelos animales (Saha et al., 2018) como en pacientes. Respecto al contenido de las vesículas, se ha demostrado la presencia de diversas enzimas CYP, como la CYP2E1, en condiciones de daño por alcohol. Dichos estudios han permitido establecer una relación directamente proporcional entre la concentración de vesículas portadoras de CYP con la magnitud de la lesión debida al alcohol (Cho et al., 2017). Por otro lado, se ha demostrado que las VEs liberadas en condiciones de lesión por alcohol se encuentran enriquecidas en proteínas que promueven la activación de la respuesta inmune, así como en las enzimas alcohol deshidrogenasa y ácido graso sintasa, o en Hsp90 que induce la polarización de los macrófagos a su perfil inflamatorio (Saha et al., 2018). Verma et al. demostró la expresión de CD40L, proteína implicada en la activación de los macrófagos, en la membrana de VEs producidas tras la administración de alcohol, y observó que dichas VEs inducían la expresión de citoquinas proinflamatorias por parte de la línea celular de monocitos THP-1 (Verma et al., 2016). Estos datos sugieren que las VEs derivadas del daño hepático por alcohol representan un mecanismo de comunicación intercelular entre hepatocitos y el sistema inmune (Umbaugh & Jaeschke, 2021).

Cirrosis hepática

La cirrosis es el resultado de una inflamación sostenida en el tiempo que consiste en el reemplazo del parénquima hepático sano por tejido fibrótico y nódulos regenerativos, conduciendo al desarrollo de hipertensión portal, mecanismo fisiopatológico esencial de esta enfermedad. La cirrosis es la consecuencia de diferentes tipos de lesión hepática: hígado graso, consumo de alcohol, infecciones por hepatitis B o C, y otras, y evoluciona desde una fase compensada o asintomática a una descompensada o sintomática, la cual conlleva la hospitalización y el deterioro de la calidad de vida del paciente (Ginès et al., 2021).

Varios estudios han demostrado un aumento de la concentración de microvesículas en la circulación, tanto en muestras de pacientes como en modelos animales, y que dicho aumento se correlaciona con una mayor mortalidad en pacientes con enfermedad hepática crónica avanzada (Payancé et al., 2018). Además, se ha demostrado que las VEs derivadas de hepatocitos durante un proceso de lipotoxicidad favorecen la fibrosis hepática promoviendo la activación de las células estrelladas del hígado y la expresión de marcadores fibróticos gracias a la transferencia del miR-128-3p (Povero et al., 2015) o del miARN 192 (Y.-S. Lee et al., 2017) que portan. Las vesículas son capaces de estimular la respuesta fibrótica de las células estrelladas de forma paracrina debido a que las VEs cirróticas presentan el receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas, promoviendo que las células estrelladas liberen un mayor número de VEs fibrogénicas (Kostallari et al., 2018).

Carcinoma hepatocelular

Actualmente, la búsqueda de biomarcadores que ayuden a predecir el riesgo de desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC) entre pacientes con enfermedades hepáticas crónicas es una de las necesidades no satisfechas en la clínica (Thietart & Rautou, 2020).

Diversos estudios apoyan la implicación de las VEs en el desarrollo y la capacidad de metástasis del CHC. Se ha demostrado que las VEs circulantes portan ARNs que favorecen la proliferación de las células tumorales y la metástasis como el miR-21 (Cao et al., 2019), la angiogénesis como circRNA-100338 (Huang et al., 2020), o circRNA-SORE que impide la degradación de la oncoproteína YBX1 (Xu et al., 2020). También, se ha demostrado que son capaces de transferir regiones ultraconservadas de ARN (ucARN), de los cuales el más expresado en CHC es TUC339, involucrado en la modulación del crecimiento, adhesión y diseminación de células tumorales

Por otro lado, estudios proteómicos de VEs derivadas de células de CHC muestran una alta expresión de la proteína nidogen 1 (Mao et al., 2020) y de receptores de inmunoglobulina polimérica (Tey et al., 2022) que se han relacionado con incentivación de la tumorigénesis y la metástasis extrahepática. Al igual que influyen en el desarrollo del tumor, las vesículas derivadas de CHC modulan la respuesta inmunológica promoviendo la polarización de los macrófagos asociados a tumores hacia un fenotipo M2, produciendo una disfunción de las células NK (Xue & Yam, 2022) y/o reduciendo la actividad antitumoral de los linfocitos T infiltrantes del tumor (X. Wang et al., 2018).

Daño hepático inducido por fármacos.

El diagnóstico del fracaso hepático agudo se realiza mediante un protocolo sencillo basado en datos clínicos obtenidos de rutina. Sin embargo, la detección temprana o predicción de la lesión hepática inducida por fármacos (Drug-Induced Liver Injury, DILI), antes del desarrollo de ALF, sigue siendo una necesidad insatisfecha en la actualidad. Dentro de las causas de DILI, la sobredosis por APAP es la más común (Clemens et al., 2019).

Las VEs derivadas de hepatocitos primarios tratados con APAP contienen elevados niveles de CYP2E1, la principal enzima responsable del metabolismo del APAP en NAPQI y responsable de la activación del mecanismo de la muerte celular (McGill & Jaeschke, 2013), y son capaces de transmitir este contenido a otras células (Royo et al., 2013). Asimismo, el contenido en CYP se ha demostrado en VEs circulantes de modelos de rata tratados con APAP (Palomo et al., 2018), así como el efecto de dichas VEs en cultivos de hepatocitos primarios promoviendo la fosforilación de la quinasa c-Jun-N-terminal (JNK), enzima involucrada en la ruta de muerte celular (Cho et al., 2018). Otros estudios que analizaron el perfil proteómico de las VEs inducidas por el APAP revelaron elevados niveles de aminopeptidasa N, metaloreductasa STEAP4, así como antígenos de superficie CD14 y CD45, y proteínas de la familia de las anexinas, comparado con el perfil de VEs procedentes de un hígado normal (Šrajer Gajdošik et al., 2022). Respecto al contenido en material genético, se ha descrito que las VEs derivadas de APAP presentan mRNA de albúmina y miR-122 en proporciones elevadas, ambos identificados como biomarcadores de daño hepático en estudios previos (Holman et al., 2016).

Por otro lado, el tetracloruro de carbono (CCl₄) se utiliza como modelo de DILI y hepatotoxicidad (McGill & Jaeschke, 2019) pese a que no es un fármaco, dado que el metabolismo del CCl₄ por parte de la acción del CYP450 en el radical triclorometilo reacciona con proteínas, lípidos y DNA, conduciendo a la disfunción celular y, por consiguiente, a la necrosis del hígado (Weber et al., 2003). Se ha descrito que las VEs procedentes tanto de ratones tratados con CCl₄ como de pacientes con fibrosis/cirrosis contienen unos valores elevados del miR-132, el cual induce SIRT1 y genes inflamatorios, y se ha visto relacionado con genes fibrogénicos, con desarrollo de carcinoma hepatocelular y con un pronóstico desfavorable (Momen-Heravi et al., 2021).

En definitiva, las VEs derivadas de condiciones en presencia de APAP presentan un perfil transcriptómico diferente al de las vesículas hepáticas sin daño, convirtiéndolas en excelentes candidatos para servir como biomarcadores.

Limitaciones en el estudio de las VEs

Existen todavía limitaciones importantes en la investigación de las VEs que incluyen la estandarización de los protocolos de aislamiento, la determinación del tipo celular de origen en organismos vivos o el estudio de la biodistribución de las VEs de tipos celulares concretos.

Protocolos de aislamiento de las VEs

Dado que se ha demostrado la presencia de VEs en fluidos biológicos de diferente naturaleza (plasma, orina, lavado broncoalveolar, leche materna...), se han establecido recomendaciones en la recolección, almacenamiento y manejo de dichas muestras con el fin de minimizar la variabilidad en el aislamiento y análisis posterior (Gandham et al., 2020).

Actualmente hay publicadas diversas guías donde se indican los diferentes protocolos de obtención y almacenamiento de las muestras de partida en función del origen de éstas. Por ejemplo, en el caso de muestras de sangre se aconseja la recolección utilizando tubos con EDTA como anticoagulante, ya que minimiza la agregación de VEs, evita la contaminación por derivados de plaquetas y no interfiere en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) como la heparina (Coumans et al., 2017). Asimismo, la mayoría de publicaciones indican que el mejor método para almacenar las muestras preservando su contenido en VEs es a -80°C minimizando los ciclos de congelación-descongelación con el fin de evitar la agregación y lisis de las vesículas que podría afectar a la caracterización posterior de éstas (Kusuma et al., 2018).

Sin embargo, existe bastante discrepancia respecto a la elección del protocolo de purificación, pues son muchas las técnicas que permiten el aislamiento de VEs. Existen diversos métodos con ventajas e inconvenientes que deben tenerse en cuenta en función de los ensayos “aguas abajo” que quieran realizarse (**Tabla 2**).

Método	Principio	Ventaja	Desventaja
UC	Aislamiento por centrifugación diferencial en base a la densidad	Baja contaminación por proteínas	Bajo rendimiento, contaminación por partículas de densidad similar, daño potencial a las VEs
SEC	Separa por volumen hidrodinámico	Contaminación reducida con proteínas, poco agresivo con las VEs	Baja resolución, VEs muy diluidas, contaminación por partículas de tamaño similar
Gradiente de densidad	Separa VEs por densidad a partir de muestras enriquecidas en vesículas por otras técnicas	Gran pureza	Bajo rendimiento y productividad
Filtración	Aislamiento en base a membranas con tamaños de poro específicos	Simple, eficiente en tiempo y poco agresivo con las VEs	Baja recuperación de muestras y reducida reproducibilidad
Reactivos comerciales	Precipitan VEs empleando polímeros	Protocolo sencillo y de alto rendimiento	Alta contaminación proteica, compatibilidad variable con algunas técnicas de caracterización
Estrategias de aislamiento basadas en la inmunofinidad	Captura de VEs usando anticuerpos	Mayor eficiencia de purificación, permite aislamiento de poblaciones específicas	Costoso, posibilidad de uniones inespecíficas, captura de subpoblaciones
Microfluídica	Basado en propiedades físicas, mecánicas y/o químicas de superficie	Bajo volumen de muestra, coste reducido, bajo consumo, alto rendimiento, alta selectividad de tamaño	Propenso a la obstrucción, baja reproducibilidad
AF4	Flujo laminar	Aislamiento de las subpoblaciones de VEs, poco agresivo	Baja resolución, baja reproducibilidad
Nano-FCM	Basado en citometría de flujo	Clasificación de alta fidelidad	Detección simultánea de múltiples VEs, evaluación inadecuada del tamaño

Tabla 2. Métodos de aislamiento de vesículas extracelulares (VEs): descripción, ventajas y desventajas. Adaptada de Gandham et al., 2020.

Ultracentrifugación diferencial (UC)

Fue el primer método de aislamiento de VEs utilizado y se trata del *gold standard* entre los protocolos hasta la fecha. Esta técnica permite la separación y concentración de VEs del resto de constituyentes de la muestra en base a su densidad. Dado que la densidad media de las VEs se encuentra en torno al 1,15-1,19 g/ml (Théry et al., 2006), el protocolo se divide en 2 fases:

1. Eliminación de restos celulares y debris, decantando los mismos mediante centrifugaciones.
2. Aislamiento de las vesículas presentes en el sobrenadante mediante centrifugaciones seriadas a velocidades superiores o iguales a 100.000 x g.

La UC permite obtener una muestra de VEs con una relativamente baja contaminación por proteínas. Sin embargo, también se pueden aislar junto con las vesículas otras micropartículas de tamaño y composición semejantes como virus o lipoproteínas (Mueller et al., 2018). Además, se requieren equipos caros y el proceso puede dañar la membrana de las vesículas o causar agregaciones (Linares et al., 2015).

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Esta técnica se basa en el empleo de una columna de fase estacionaria compuesta por un polímero de sefarosa CL-B2, agarosa o similar, que permite la separación de las partículas de una muestra en función de su volumen hidrodinámico en fracciones que eluyen con ayuda de PBS (Böing et al., 2014). La SEC permite aislar VEs con gran pureza pues consigue eliminar contaminación por parte de proteínas que se encuentran en gran proporción en fluidos biológicos. Además, es un método sencillo, no resulta agresivo para las vesículas y no requiere de equipos caros (Takov et al., 2019). Por otro lado, presenta una serie de inconvenientes como obtener aislados de VEs muy diluidos y con posible contaminación por lipoproteínas, partículas virales o complejos proteicos de matrices celulares de tamaño similar a las VEs (Sódar et al., 2016).

Gradiente de densidad

Se trata de un método semejante a la UC, pero se utilizan tubos que contienen una solución de diferente densidad. Esto permite aislar de manera secuencial las nanopartículas de una muestra en distintas fracciones en base a la densidad de éstas (Carnino et al., 2021). Así, tras depositar la muestra, se aplica una fuerza centrífuga

que hace que las partículas atraviesen el gradiente que aumenta en densidad de arriba abajo. Las VEs pueden recuperarse por recolección de fracciones sabiendo que las VEs se encuentran en un rango de densidad de 1,15-1,19 g/ml (M. Zhang et al., 2018). Al igual que la UC, la centrifugación en gradiente de densidad es efectiva para separar las VEs de agregados proteicos y restos no membranosos, pero su rendimiento es bastante bajo. Esta técnica se realiza con frecuencia como paso adicional a la UC, puesto que ha demostrado mejorar la pureza y la calidad de los exosomas purificados (Doyle & Wang, 2019).

Reactivos comerciales basados en la precipitación

Existen en el mercado diversos kits comerciales con la capacidad de aislar VEs basados en polímeros de precipitación como ExoQuick (Systems Bioscience) o miRCURY (Exiqon). Se trata de una técnica sencilla que no requiere de equipos especializados, pero algunos kits emplean protocolos de larga duración y suponen un gasto económico considerable. Dos problemas importantes que presentan estos métodos es que la pureza en VEs de las muestras post-aislamiento es baja, ya que se ha demostrado que hay una alta contaminación por proteínas, y que la formulación de los polímeros podría afectar a experimentos posteriores (Helwa et al., 2017).

Ultrafiltración

Esta técnica se basa en el uso de filtros con un rango de exclusión de tamaño o masa molecular definido. El protocolo consiste en una filtración inicial seguida de una ultrafiltración con el fin de eliminar todas las partículas por debajo de un tamaño determinado y concentrar la muestra en VEs (Lobb et al., 2015). Se trata de un método económico y sencillo que permite el aislamiento de VEs de manera efectiva. Sin embargo, la eficiencia del aislamiento depende de la calidad de los filtros empleados. Problemas asociados a este método incluyen que se pueden dar obstrucciones con facilidad, que el proceso puede alterar la integridad estructural de las vesículas debido al efecto de extrusión, y que la tasa de recuperación es reducida (Taylor & Shah, 2015).

Estrategias de aislamiento basadas en la inmunofinidad

Existen estrategias de purificación basadas en interacciones antígeno-anticuerpo frente a marcadores específicos de VEs. Estas estrategias permiten la disminución de

contaminación por parte de otras vesículas o nanopartículas que por sus características físicas pueden ser co-aisladas mediante los métodos explicados anteriormente. Estos anticuerpos se encuentran generalmente conjugados con microesferas magnéticas o en columnas de cromatografía. Estas técnicas permiten obtener aislados de VEs con una alta pureza, pero pueden darse uniones inespecíficas y eventos de reactividad cruzada.

Microfluídica

Una de las estrategias de aislamiento de VEs que ha surgido recientemente es la técnica microfluídica, que puede emplear la captura por inmunoafinidad y la captura en base a las características físicas o mecánicas de las vesículas (tamaño, densidad, viscoelasticidad, etc). Los métodos de separación basados en propiedades físicas se llevan a cabo mediante presión o electroforesis, siendo este último el que ocasiona menos obstrucción de los poros. Por otro lado, dentro de las técnicas de captura por inmunoafinidad se encuentra ExoChip, constituido por una superficie de polidimetilsiloxano recubierta por anticuerpos frente a los principales marcadores de VEs, como CD63, para así retener las VEs (S. Guo et al., 2018). Estos métodos representan una gran perspectiva de futuro dado que no son necesarios volúmenes de muestra grandes, son de bajo coste, y tienen alto rendimiento. Sin embargo, la reproducibilidad de estas técnicas es baja.

Fraccionamiento asimétrico de campo de flujo (AF4)

Este método permite un aislamiento poco agresivo para las VEs mediante un flujo laminar a modo de película submilimétrica confinado en una cámara estrecha donde se aplica un campo fuerza perpendicular al flujo laminar. La mayor ventaja frente a la SEC es que la intensidad del flujo puede programarse para lograr un aislamiento mucho más eficiente, así como la posibilidad de separar diferentes subpoblaciones de VEs (Zhang et al., 2018). No obstante, al igual que en la estrategia anterior, la reproducibilidad y la resolución son bajas.

Citometría de nanoflujo (Nano-FCM)

Esta técnica parte del desarrollo de la citometría de flujo de alta resolución como forma de separar VEs realizando un análisis sistemático tomando como referencia el ruido de fondo del equipo. La principal desventaja de esta estrategia es el conocido

como efecto enjambre (“*swarm effect*”), consistente en la detección de 2 o más nanopartículas de forma simultánea produciendo una señal mucho más intensa y la sobreestimación del tamaño de las partículas de la muestra (Kormelink et al., 2016).

En resumen, existen diversos métodos de aislamiento de las VEs cuyo objetivo es, por un lado, separar las vesículas de interés del resto de componentes del medio donde se encuentran, y por otro, concentrarlas, es decir, aumentar el número de vesículas por unidad de volumen. No todas las técnicas consiguen la misma eficiencia en purificación y concentración, por lo que no existe un único enfoque para aislar VEs y el protocolo de aislamiento a emplear debe adaptarse en función de las condiciones de partida y del uso final que se vaya a hacer de las VEs (Théry et al., 2018).

Determinación del tipo celular de origen de las VEs en organismos vivos

Determinar el tipo celular de origen de las VEs aisladas de un organismo completo o *in vivo* continúa siendo un reto no conseguido. El estudio de VEs específicas de un tipo celular se ha llevado a cabo partiendo de cultivos celulares de cuyos sobrenadantes se realiza el aislamiento y caracterización de las VEs liberadas (Charoenviriyakul et al., 2017). Estos ensayos *in vitro* presentan el inconveniente de no representar la complejidad de un organismo completo, siendo cuestionable si el contenido de las VEs es el mismo que en este.

Los estudios dedicados al análisis de VEs derivadas de tipos celulares células específicas generalmente emplean la citometría de flujo y anticuerpos fluorescentes frente a marcadores propios de las células de origen expresados en membrana. Dado que las poblaciones del sistema inmunológico presentan marcadores específicos en membrana plasmática bien definidos para cada tipo celular, diversos estudios han caracterizado las VEs liberadas por linfocitos, monocitos y neutrófilos en contextos patológicos como la insuficiencia cardíaca crónica (Vilella-Figuerola et al., 2022) o la enfermedad de injerto contra huésped (Nagasawa et al., 2021). De forma similar, se ha logrado analizar las VEs procedentes de los astrocitos en un modelo de encefalopatía autoinmune, gracias a la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en su membrana (Willis et al., 2017). Este abordaje, sin embargo, dista de ser óptimo porque los marcadores utilizados no son completamente específicos. Por ejemplo, la GFAP se expresa en otros tipos celulares, como las células estrelladas hepáticas (Geerts et al., 1998). Por otro lado, la presencia de

esos marcadores no garantiza al 100 % que hayan sido originados en el tipo celular señalado, ya que podrían haber sido incorporados posteriormente al pasar las VEs por diferentes barreras u otras células receptoras (Abels & Breakefield, 2016). Finalmente, existen múltiples tipos celulares para los que no existen marcadores específicos fiables que se puedan utilizar. Así, el estudio *in vivo* del tipo celular de origen de las VEs, como es el caso de las derivadas de los hepatocitos, es particularmente difícil. Actualmente, no existe un método para analizar *in vivo* las VEs secretadas por los hepatocitos, por lo que la mayoría de los trabajos utilizan paradigmas *in vitro* con cultivos de líneas hepatocelulares o de hepatocitos primarios (Nojima et al., 2016; Royo et al., 2017).

Biodistribución y trazabilidad de las VEs *in vivo*

Las VEs han ganado gran relevancia en la investigación clínica no sólo por su potencial como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de diversas enfermedades, sino también como posibles vehículos de medicamentos y agentes terapéuticos. Por ello, su biodistribución y farmacocinética están siendo estudiados cuidadosamente (Raposo & Stoorvogel, 2013). Las técnicas que se utilizan actualmente para monitorizar la biodistribución de las VEs *in vivo* son:

Imagen de bioluminiscencia

Es considerado el método más sensible para la detección de vesículas *in vivo* por presentar una gran ventaja: los tejidos de mamíferos no poseen luciferasas ni emiten luz, es decir, la relación señal-ruido es muy alta (Aimaletdinov & Gomzikova, 2022). La bioluminiscencia es fruto de la oxidación de d-luciferina catalizada por la luciferasa en presencia de adenosina trifosfato (ATP), Mg^{2+} y O_2 , generando una luz del espectro visible amarillo-verde ($\lambda_{max} = 560 \text{ nm}$) (Saito-Moriya et al., 2021).

La técnica precisa de una modificación genética de las células del donante a partir de una construcción reportera para cargar las VEs con luciferasa, seguido de la inyección intraperitoneal o intravenosa de luciferina en el organismo del animal. La luciferina es el sustrato que la enzima luciferasa utiliza para generar luz, permitiendo determinar de esta manera la localización de las vesículas *in vivo* (Chuo et al., 2018). Este método tenía el inconveniente de emitir una señal bioluminiscente muy débil debido al pequeño tamaño de las vesículas, por lo que se diseñaron otras estrategias basadas en un sistema reportero empleando la proteína híbrida gLuc (luciferasa)-lactadherina (proteína unida a la

membrana presente en las VEs). Diversos estudios han utilizado la bioluminiscencia como método para monitorizar VEs derivadas de células murinas, como células de melanoma (Imai et al., 2015; Takahashi et al., 2013), macrófagos o fibroblastos (Charoenviriyakul et al., 2017) tanto *in vivo* como *ex vivo*, y la mayoría coinciden en que los órganos donde se detecta más señal de VEs administradas exógenamente son el hígado, el bazo y los pulmones.

Este abordaje presenta los inconvenientes de la complejidad derivada de la necesidad de modificar genéticamente las células donantes de VEs, de la administración de sustratos como la luciferasa, y de su baja resolución espacial y temporal (Aimaletdinov & Gomzikova, 2022).

Imagen con tinción orgánica lipofílica

Otra de las estrategias más empleadas para llevar a cabo la trazabilidad de las VEs es el marcaje con tinciones orgánicas fluorescentes como PKH2 o PKH26 o las basadas en diaquil carbocianina como DiD, Dil, DiO y DiR. Ambos tipos de tinciones son lipofílicas, de forma que se integran en las membranas compuestas por bicapa lipídica, y emiten en el espectro del rojo lejano, característica que les hace ideales para realizar imagen *in vivo* puesto que la mayoría de los tejidos no emiten autofluorescencia en este rango de longitud de onda (Grange et al., 2014).

Para incorporar la tinción en las VEs se pueden seguir dos estrategias:

- Tinción de las células donantes: se puede lavar fácilmente el exceso de colorante, pero se reduce la señal en las VEs.
- Tinción directa de las VEs purificadas: se obtiene una señal más intensa, pero en los lavados se pierden VEs.

Wen et al. estudiaron la biodistribución de VEs procedentes de células mesenquimales (MSC) marcadas con DiD e inyectadas vía intraperitoneal, y observaron una mayor acumulación en hígado y bazo (Wen et al., 2019). Al igual que en el estudio anterior, Shi et al. emplearon VEs derivadas de MSC marcadas con DiR pero administradas vía inhalada usando un nebulizador, y observaron la mayor captación de estas vesículas en los pulmones (Shi et al., 2021).

Además de la vía de administración, la fuente celular de las VEs también puede determinar el destino final de estas. En este sentido, un estudio analizó la biodistribución de VEs teñidas con DiR procedentes de células musculares C2C12, de células de melanoma B16F10 y de células dendríticas, encontrando que se localizaron mayoritariamente en hígado, tracto gastrointestinal y bazo, respectivamente (Wiklander et al., 2015).

Varios estudios que han utilizado esta técnica de imagen, por tanto, apoyan que la biodistribución de las VEs depende de la vía de administración y del tipo celular de origen. Además de los inconvenientes derivados del lavado tras la incubación de las VEs con las tinciones, este abordaje presenta también el problema de la formación de micelas debido a la naturaleza lipofílica de los colorantes (Shinoda et al., 2018). Diferenciar las micelas de las VEs es una tarea compleja y puede dar lugar a resultados imprecisos del perfil de biodistribución.

Marcaje con proteínas fluorescentes

Esta estrategia se basa en la conjugación del gen de una proteína fluorescente, generalmente *Green Fluorescent Protein* (GFP), *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) o *Red Fluorescent Protein* (RFP), con la secuencia génica de un marcador de VEs, como las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 (Aimaletdinov & Gomzikova, 2022).

En este abordaje, tanto el nivel de expresión de la proteína conjugada como la potencia de la fuente de luz pueden influir en la monitorización de las VEs. Asimismo, la modificación genética de las proteínas de superficie de las VEs también puede afectar al contenido de las vesículas y a su captación por parte de las células debido a alteraciones estéricas. Esta estrategia requiere, por tanto, de más estudios y consideraciones antes de su uso (Chuo et al., 2018).

Marcaje con radioisótopos

La imagen nuclear se basa en la administración de isótopos que al desintegrarse emiten positrones o radiación gamma, dando lugar a uno o dos fotones de alta energía que son detectados mediante tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). Ambos equipos poseen una gran sensibilidad y un buen campo de visión (Ollinger & Fessler, 1997).

Las estrategias para marcar radiactivamente una VE incluyen tanto la unión del radioisótopo a la membrana como la encapsulación en su interior. Isótopos como ^{123}I o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se unen covalentemente a la superficie de las VEs, y complejos lipofílicos como ^{111}In -oxin o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO son capaces de atravesar la membrana y acumularse en las vesículas (Almeida et al., 2020).

Aunque esta técnica se ha empleado en varios estudios, presenta una serie de desventajas como la baja resolución espacial de ambas tecnologías, debido a que el pequeño tamaño de las VEs dificulta la identificación de la fuente de radiación en el tejido (Yi et al., 2020). Por otro lado, otros inconvenientes son el peligro que supone el uso de radioisótopos tanto para los sujetos de estudio como para los investigadores, y la necesidad de equipos especializados (Y.-J. Li et al., 2020).

Tomografía computarizada y resonancia magnética

La tomografía es una técnica no invasiva con una alta resolución espacio-temporal, pero que requiere equipos caros de tomografía computarizada o de resonancia magnética. Para estudiar la biodistribución de las VEs por este método, éstas son generalmente cargadas con nanopartículas superparamagnéticas (óxido de hierro o hierro y oro) por electroporación (Hu et al., 2015). Un inconveniente relevante de esta técnica es la dificultad para obtener y cuantificar imágenes de cuerpo entero (Yi et al., 2020).

Por otro lado, la resonancia magnética presenta ventajas respecto a la tomografía computarizada por no requerir de radiación involucrada, así como por conseguir un mejor contraste de tejidos blandos. Sin embargo, pueden darse artefactos debidos al movimiento o hemorragia tisular que deforman la imagen. Además, se ha demostrado que la conjugación de VE con los agentes de contraste comúnmente utilizados en clínica modifica la morfología y tamaño de éstas, pudiendo afectar a sus características fisicoquímicas (Arifin et al., 2022).

Pese a las estrategias descritas, el análisis de la biodistribución de las VEs tanto endógenas como administradas exógenamente sigue resultando un desafío debido a su origen celular, su pequeño tamaño y su corta vida media (Vella et al., 2008). Asimismo, se ha demostrado que tanto la fuente celular como la vía de administración de las VEs influye en la biodistribución de las mismas en el organismo del animal (Wiklander et al., 2015). Por otra parte, la mayor parte de las técnicas descritas en este apartado tienen una

característica común: parten de cultivos celulares de los cuales se aíslan las VEs secretadas al medio y que posteriormente son marcadas y administradas al modelo animal.

En definitiva, en los actuales estudios de biodistribución de VEs *in vivo*, tanto el origen de las VEs como la manipulación, así como la administración de estas representan un proceso que se aleja de lo fisiológico.

JUSTIFICACIÓN

Numerosas evidencias en la literatura científica sugieren papeles relevantes del sistema inmunológico y de las vesículas extracelulares (VEs) tanto en la fisiología normal de los mamíferos como en la fisiopatología de múltiples enfermedades, incluyendo las enfermedades hepáticas. Sin embargo, la investigación de ambas áreas presenta algunas limitaciones importantes.

Respecto al sistema inmunológico, su estudio supone un reto en modelos murinos, impidiendo la obtención de información valiosa de éstos y del uso de animales transgénicos. Por ejemplo, el ratón *knockout* en IL-10, modelo espontáneo de enfermedad inflamatoria intestinal, se caracteriza por una alteración de la respuesta inmune debida a la falta de esta citoquina antiinflamatoria (Park et al., 2015), pero el conocimiento sobre el perfil inflamatorio de este modelo se limita a estudios histológicos del intestino o de los niveles de citoquinas en sangre llevando al animal a término (Scheinin et al., 2003). El pequeño tamaño de los ratones dificulta realizar un estudio exhaustivo de las diferentes poblaciones y fenotipos celulares inmunes dado que el volumen de sangre que se puede extraer en supervivencia es mínimo.

En cuanto a las VEs, la incapacidad de identificar con certeza en organismos vivos las VEs procedentes de poblaciones celulares concretas representa una importante laguna de conocimiento, siendo este un aspecto crucial para inferir la factibilidad de los efectos atribuidos a las mismas observados en paradigmas más sencillos o *in vitro*. Una cepa de ratones reporteros de Cre recombinasa, como la cepa mT/mG en combinación con el sistema Cre/LoxP, podría ser una herramienta potencialmente útil por la expresión de sondas fluorescentes endógenas específicas de estirpe celular.

Tanto el **perfil inmunológico** como las **vesículas extracelulares (VEs)** representan fuentes de biomarcadores, obtenibles de forma rápida y no invasiva para el paciente, que pueden aportar información relevante sobre diversas enfermedades.

HIPÓTESIS

En este trabajo se contrastaron las siguientes **hipótesis**:

1. En los modelos murinos se pueden llevar a cabo estudios inmunológicos exhaustivos mediante el uso de la citometría multiparamétrica sin necesidad de sacrificar al animal, permitiendo:
 - a. Obtener recuentos de las distintas poblaciones inmunes, así como información funcional y fenotípica para establecer el perfil inmunológico del individuo.
 - b. Caracterizar las alteraciones inmunes del daño hepático agudo en un modelo experimental murino.
2. La utilización de la cepa de ratón mT/mG y el sistema Cre/LoxP permite:
 - a. Identificar y aislar, a partir de fluidos del ratón, VEs procedentes de tipos celulares concretos gracias al mantenimiento en las VEs de la fluorescencia de su célula de origen.
 - b. Evaluar alteraciones de VEs circulantes procedentes específicamente de hepatocitos en ratones con daño hepático agudo por APAP.

OBJETIVOS

Con el fin de contrastar las hipótesis propuestas, el **objetivo general** del presente trabajo fue desarrollar nuevos abordajes que permitan realizar una profunda caracterización del sistema inmune murino y de las vesículas extracelulares (VEs) derivadas de los hepatocitos en un contexto de daño hepático agudo. Para ello, se definieron los siguientes **objetivos y subobjetivos específicos**:

1. **Diseñar y validar** una estrategia basada en la citometría de flujo multiparamétrica que permita la **evaluación exhaustiva y el seguimiento en el tiempo del sistema inmune celular murino**:
 - a. Diseño y desarrollo de paneles de anticuerpos.
 - b. Validación en ratones salvajes (C57BL6/J) y ratones deficientes en Interleuquina-10 (IL-10 KO).

2. Desarrollar una herramienta que permita el **aislamiento y la trazabilidad de VEs de un tipo celular específico en un organismo completo**, basada en el empleo de la cepa de ratón reportera de Cre recombinasa de doble fluorescencia (mT/mG). En particular, para las VEs originadas en hepatocitos abordamos los siguientes subobjetivos utilizando ratones AlbCre x mT/mG:
 - a. Determinar si las VEs conservan la fluorescencia de la célula de origen, mediante estudios *in vitro* (cultivo de hepatocitos primarios).
 - b. Evaluar las VEs circulantes derivadas de hepatocitos (EGFP+) en ratones sanos y con daño hepático agudo a partir de muestras de plasma sanguíneo.
 - c. Optimizar los métodos de aislamiento de VEs circulantes derivadas de hepatocitos (EGFP+), y evaluar la posibilidad de contaminación con cuerpos apoptóticos.

3. Caracterizar las **alteraciones inducidas por el daño hepático agudo por paracetamol (APAP) sobre el perfil inmunológico y sobre las VEs circulantes totales y derivadas de hepatocitos** en ratones. Utilizando ratones AlbCre x mT/mG, abordamos los siguientes subobjetivos:
- a. Optimizar los paneles de citometría multiparamétrica para determinar el perfil inmunológico a nivel periférico en ratones con fluorescencia endógena.
 - b. Determinar el efecto del daño por APAP sobre la liberación de VEs *in vitro*, usando hepatocitos primarios de ratón.
 - c. Determinar el efecto del daño por APAP sobre las VEs circulantes totales y producidas por hepatocitos *in vivo* en muestras de plasma de ratones.
 - d. Identificar los principales órganos de destino de las partículas y VEs derivadas de hepatocitos tanto en condiciones fisiológicas como de daño hepático agudo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Los animales utilizados en experimentación fueron machos de edades comprendidas entre las 12-14 semanas de edad (22-26 gr de peso), que fueron estabulados y utilizados en el BIOTERIO (Nº registro: ES280790000087) Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón- Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IiSGM). Los ratones fueron estabulados en racks ventilados y se mantuvieron a una temperatura y humedad constantes, con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad. Los ratones tuvieron acceso *ad libitum* a agua de bebida y, salvo la noche previa al tratamiento, a pienso estándar. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la legislación de la Unión Europea (Directriz 2010/63/EU) y al Real Decreto RD53/2013, y fueron aprobados por el Comité de Ética y Órgano Habilitado en Experimentación Animal del IiSGM (Madrid, España) y por la autoridad competente (D. G. de Agricultura, Ganadería y Alimentación de la Comunidad de Madrid) (PROEX # 242/17, 085/2018, 056.2/21, 200.1/21, y 233.1/21).

En el presente proyecto se emplearon ratones de las cepas:

- **C57BL/6** (The Jackson Laboratory, cepa 000664)
- **IL-10^{-/-}** (**IL-10 KO**, B6.129P2-Il10tm1Cgn/J, The Jackson Laboratory, cepa 002251)
- **mT/mG** [B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J, The Jackson Laboratory, cepa 007676]
- **Albumin-Cre**, [**AlbCre**, B6.Cg-Speer6-ps1Tg(Alb-cre)21Mgn/J, cepa 003574].
- **Cepa reportera de linaje de doble fluorescencia AlbCre x mT/mG (Figura 6).**

El sistema de recombinación Cre-loxP se trata de una poderosa herramienta de edición génica que en la actualidad supone uno de los pilares principales en el campo de la investigación en genética y biología celular. Sternberg y Hamilton (1981) fueron los primeros en descubrir la recombinasa aislada del bacteriófago P1 y dieron nombre a este sistema: el nombre de la enzima Cre por causar recombinación y sus sitios de unión loxP por Locus of Crossing over y P1 del virus (McLellan et al., 2017).

El sistema Cre-loxP se emplea con frecuencia para la generación de ratones *knock out* (KO) condicionales para un gen específico. La Cre recombinasa, expresada por un tejido específico y/o regulada temporalmente por un promotor, es capaz de escindir genes flanqueados por regiones loxP a través de la recombinación intracromosomal dando lugar a KO condicionales. La cepa de ratón reportero de linaje de doble fluorescencia que utilizamos en el presente trabajo es fruto del cruce entre un ratón mT/mG, el cual porta un constructo dirigido a membrana formado por la secuencia génica tdTomato y un codon STOP flanqueados por dos regiones loxP seguido del gen EGFP insertado en la región N-terminal de la segunda región loxP (Muzumdar et al., 2007), con otro ratón que expresa la Cre recombinasa bajo un promotor específico de estirpe celular. La descendencia de este cruce permite la visualización y distinción *in vivo* de las células recombinadas, ya que la expresión de Cre recombinasa en estas células escinde el gen tdTomato y pasan a expresar EGFP, y de las células no recombinadas, que continúan expresando tdTomato. Los genes de la proteína tdTomato y de la EGFP de los ratones mT/mG utilizados en el presente trabajo contienen una secuencia que dirige estas proteínas a la membrana plasmática, motivo por el cual el nombre de la cepa se refiere a la proteína tdTomato como mT y a la proteína EFGP como mG.

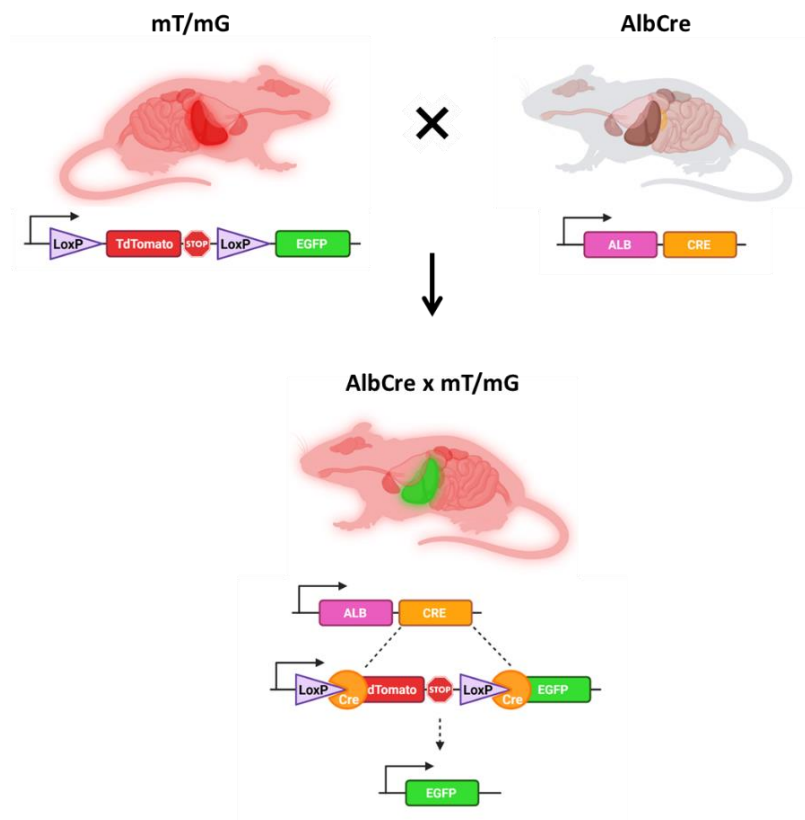


Figura 6. Generación de la cepa de ratón reportero de linaje doble fluorescente AlbCre x mT/mG.

La cepa reportera de linaje de doble fluorescencia empleada en el presente proyecto fue la **AlbCre x mT/mG**, ratón reportero de hepatocito, fruto del cruce de la cepa mT/mG con la AlbCre. La cepa AlbCre posee el gen de la Cre recombinasa bajo el promotor del gen de la albúmina, específico de hepatocitos, por lo que sólo dichas células expresan la proteína fluorescente verde EGFP mientras que el resto mantienen la expresión de la proteína fluorescente roja TdTomato.

2. Modelos de daño hepático agudo

2.1. Administración de fármacos

JO-2

Ratones de la cepa AlbCre x mT/mG, fueron tratados vía intraperitoneal con *Purified NA/LE Hamster Anti-Mouse CD95 (FasL)*, clon Jo2 (JO-2, BD Bioscience, 554254) a una concentración de 0,6 µg/g de ratón (dilución 1:20 del stock en suero salino) con el objetivo de producir apoptosis a nivel hepático. La administración de las dosis se realizó en una sala de procedimientos previamente atemperada a 26°C para prevenir el desarrollo de hipotermia y se les mantuvo en esas condiciones a los ratones durante 6 horas post-inyección. Transcurrido el tiempo se procedió a sacrificio y necropsia.

Paracetamol (APAP)

Ratones de las cepas C57BL/6, mT/mG y AlbCre x mT/mG, tras 16 h de ayuno, fueron tratados vía intraperitoneal con APAP (300 mg/kg, Sigma Aldrich, A5000) con el objetivo de causar un daño hepático agudo, o con suero salino (SAL) para el grupo control. La administración de las dosis se realizó en una sala de procedimientos previamente atemperada a 30-32°C para evitar la hipotermia asociada a la hepatotoxicidad por APAP, y se les mantuvo en esas condiciones a los ratones durante 4 horas post-inyección, tras las cuales se les puso de nuevo pienso y se dejó que la temperatura de la sala volviese a valores normales. Transcurridas 24 horas post-administración del tratamiento, se llevó a cabo el sacrificio en cámara de CO₂ y la toma de muestras.

2.2. Recogida de muestras

Sangre del plexo venoso retroorbitario

Previamente al sacrificio, los ratones tratados o no con paracetamol (APAP) fueron anestesiados con sevoflurano inhalado, introduciendo al ratón en una cámara transparente donde se vaporizó una mezcla de sevoflurano al 3% en oxígeno. Una vez dormido y comprobados los reflejos, se dispuso al ratón ante una boquilla que siguió vaporizando el anestésico mientras procedimos a la extracción de sangre del plexo retroorbitario, para lo cual empleamos pipetas Pasteur de vidrio (Proquionorte, LABPIP-150-250) empapadas en EDTA 0,17mM. El volumen de sangre extraído fue de aproximadamente 100-150 μ l y recogido en microtubos K₃ EDTA 500 μ l (Vacutest Kima, 813010).

Sangre ventricular y necropsia

La eutanasia de los ratones se realizó mediante una cámara de CO₂ e inmediatamente después realizamos la extracción de sangre ventricular mediante punción cardíaca. Del volumen total obtenido, 100 μ l de muestra se recogieron en tubos sin anticoagulante BD Microtainer (Becton Dickinson, 365951) y la sangre restante se recogió en microtubos K₃ EDTA, los cuales se mantuvieron en hielo hasta proceder al aislamiento de suero y plasma, respectivamente.

La necropsia la realizamos mediante una incisión longitudinal en el área abdominal para extraer hígado, bazo y riñones. Tras ello, accedimos a la zona torácica para extirpar pulmones y corazón. El hígado fue dividido en lóbulos, que se destinaron a diferentes técnicas:

- Lóbulo izquierdo y medio: fueron incluidos en casetes histológicos y fijados en formalina al 10% para posteriormente ser embebidos en bloques de parafina.
- Lóbulos derecho y caudado: se cortaron en pequeños fragmentos que fueron guardados en crioviales y congelados en nitrógeno líquido y, posteriormente, almacenados a -80°C.

Por otra parte, los órganos restantes se mantuvieron en Falcon de 50 ml con 5 ml de PBS en hielo antes de ser disgregados.

3. Análisis de las muestras biológicas

3.1. Análisis multiparamétrico del sistema inmunológico por citometría de flujo

Para poder estudiar en profundidad el perfil inmunológico en el tiempo sin sacrificar al animal se requería desarrollar un protocolo que consiguiera obtener la máxima información de los marcadores que definen los subtipos celulares y su fenotipo empleando la mínima cantidad posible de sangre periférica. Tras realizar una búsqueda bibliográfica para definir el fenotipo de las poblaciones y subpoblaciones inmunológicas que se pudiesen estudiar a nivel sistémico en el ratón, decidimos emplear los anticuerpos reflejados en la **Tabla 3**, con el fin de diseñar dos paneles multiparamétricos para analizar dichos fenotipos.

Se tomaron dos alícuotas de 50 μ l de las muestras de sangre obtenidas mediante sangrado retroorbitario de ratones de las siguientes cepas:

- C57BL6 e IL-10 $-/-$ (IL-10 KO): para la puesta a punto de los dos paneles de anticuerpos a desarrollar.
- AlbCre x mT/mG tratados con suero salino o con APAP: para determinar el perfil inmunológico de ratones sin o con daño hepático por APAP.

Las muestras sanguíneas fueron incubadas con las mezclas de los anticuerpos de cada panel durante 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras ello, realizamos la lisis de los eritrocitos utilizando el reactivo Red Blood Cell Lysis Solution 10 \times (Miltenyi, 130-094-183) a una dilución 1:20 y añadimos 1 μ l de yoduro de propidio (PI, Miltenyi, 130-093-233) justo antes de adquirir las muestras por el citómetro MACSQuant 16 Analyzer (Miltenyi). Los archivos generados fueron analizados utilizando el software Kaluza (Beckman Coulter)

Diana	Fluoróforo	Clon	Empresa
CD3ε	VioBlue	17A2	Miltenyi
CD4	VioGreen	REA604	Miltenyi
B220	Brilliant Violet 570™	RA3-6B2	BioLegend
CCR6	Brilliant Violet 605™	29-2L17	BioLegend
CD21/CD35	BD Horizon™ BV650	7G6	BD Bioscience
CD25	FITC	REA568	Miltenyi
CCR4	PE	2G12	BioLegend
CD62L	PE/Cyanine5	MEL-14	BioLegend
TNF-RII	PerCP-Vio 700	REA228	Miltenyi
CD138	PE-Vio 770	REA104	Miltenyi
IL-23R	APC	12B2B64	BioLegend
CD44	Alexa Fluor® 700	IM7	BioLegend
CXCR3	APC/Fire™ 750	CXCR3-173	BioLegend
MHC-II	VioGreen	REA813	Miltenyi
CD19	Brilliant Violet 570™	6D5	BioLegend
Ly6G	Brilliant Violet 605™	1A8	BioLegend
NK1.1	BD Horizon™ BV650	PK136	BD Bioscience
F4/80	FITC	REA126	Miltenyi
Siglec-F	PE	REA798	Miltenyi
Ly6C	PerCP	HK1.4	BioLegend
CD11b	PerCP-Vio 700	REA592	Miltenyi
CCR2	PE-Vio 770	REA538	Miltenyi
CD49b	APC	REA541	Miltenyi
B220	Alexa Fluor® 700	RA3-6B2	BioLegend
CD11c	APC-Vio 770	REA754	Miltenyi

Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados en el diseño de los dos paneles de citometría multiparamétrica para analizar el sistema inmunológico murino a nivel sistémico.

3.2. Determinación de parámetros bioquímicos de daño hepático inducido por APAP

Las muestras de sangre de ratones SAL y APAP recogidas en tubos sin anticoagulante fueron centrifugadas a 6.000 g por 10 min a 4°C para obtener el suero, a partir del cual se midieron parámetros bioquímicos para determinar el daño hepático, incluyendo las transaminasas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), y la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), además de los niveles de albúmina como indicador de función hepática.

Se realizaron diluciones 1:3 de las muestras de suero en agua estéril y se midieron dichos parámetros en el analizador automático del Departamento de Bioquímica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

3.3. Análisis histológico del grado de necrosis del hígado inducido por APAP

Con el objetivo de determinar el nivel de necrosis hepatocelular del hígado de los ratones tratados o no con APAP, teñimos las secciones de hígado con hematoxilina-eosina. Para ello, realizamos cortes de los lóbulos de hígado embebidos en bloques de parafina con ayuda de un microtomo en secciones de 0,5 μm de grosor, las cuales fueron teñidas siguiendo el protocolo que refleja la **Figura 7**. Esta tinción permite la visualización de los núcleos celulares en tonos azules-púrpuras por acción de la hematoxilina (reactivo básico) y de las estructuras citoplasmáticas en tonos rosados por la eosina (ácida).

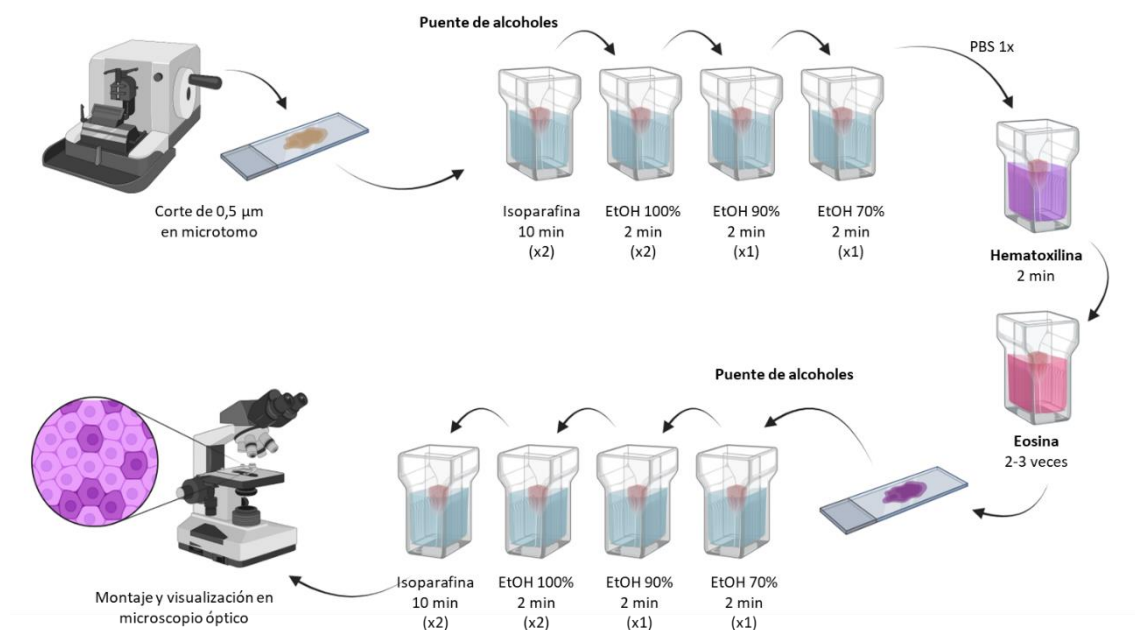


Figura 7. Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina de cortes histológicos del hígado de ratones.

Una vez teñidos los cortes histológicos, se observaron mediante un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 y se tomaron imágenes representativas empleando una cámara fotográfica acoplada Nikon Dxm1200F.

Para evaluar el grado de necrosis hepatocelular, se estableció una puntuación histológica semicuantitativa del daño hepático otorgando una valoración de 0 a 5 en función de la gravedad de la necrosis (**Tabla 4**).

Los criterios establecidos para determinar la aparición de necrosis fueron la presencia de vacuolización, edema y disrupción celular, la pérdida de la arquitectura normal, la picnosis, y el infiltrado inflamatorio, entre otros parámetros (Thoolen et al., 2010).

Grado	Criterios
0	Histología normal
1	Alteraciones sugestivas de necrosis en la última hilera de hepatocitos pericentrales
2	Alteraciones sugestivas de necrosis en el área centrolobular (zona III) con pérdida del contorno celular
3	Áreas de necrosis en zonas III y II
4	Áreas de necrosis conectadas por puentes entre zonas pericentrales
5	Áreas de necrosis confluyentes y regiones de hemorragia entre zonas pericentral y centrolobular

Tabla 4. Índice de necrosis hepatocelular. Puntuación histológica semicuantitativa del daño hepático otorgando una valoración de 0 a 5 en función de la gravedad de la necrosis.

Se llevó a cabo una evaluación en ciego de todas las secciones por parte de dos investigadores y la media entre ambas valoraciones constituyó el índice de necrosis definitivo de cada ratón.

3.4. Disgregación de tejidos y análisis por citometría de flujo

Los diversos órganos extraídos (bazo, riñones, corazón y pulmones) procedentes de los ratones AlbCre x mT/mG tratados con solución salina o con APAP fueron disgregados con el fin de obtener una suspensión de células analizable por citometría de flujo. El protocolo de disgregación se basó en una digestión enzimática por acción de la colagenasa procedente de *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich, C5138). Brevemente, se cortaron los órganos en trozos más pequeños y se introdujeron en un Falcon de 50 ml con 5 ml de solución balanceada HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) sin rojo fenol, calcio, ni magnesio (Cultek, H3BE10-547F) + colagenasa [2 mg/ml] y se mantuvieron en

agitación 40 min a 37°C. Tras ello, se filtraron los tejidos disgregados por un cell strainer de 70 µm de poro sobre un Falcon con 10 ml de DMEM + 5% FBS y se centrifugó a 500 g por 5 min a 4°C para lavar las células de la solución HBSS + colagenasa. Posteriormente, se lisaron los eritrocitos con la solución Red Blood Cell Lysis 10X siguiendo las indicaciones del fabricante y se volvieron a centrifugar a 500 g por 5 min a 4°C. Por último, descartamos el sobrenadante, resuspendimos el pellet de células en PBS y procedimos a la adquisición por el MACSQuant 16 (Figura 8). Los archivos generados se analizaron con el software Kaluza.

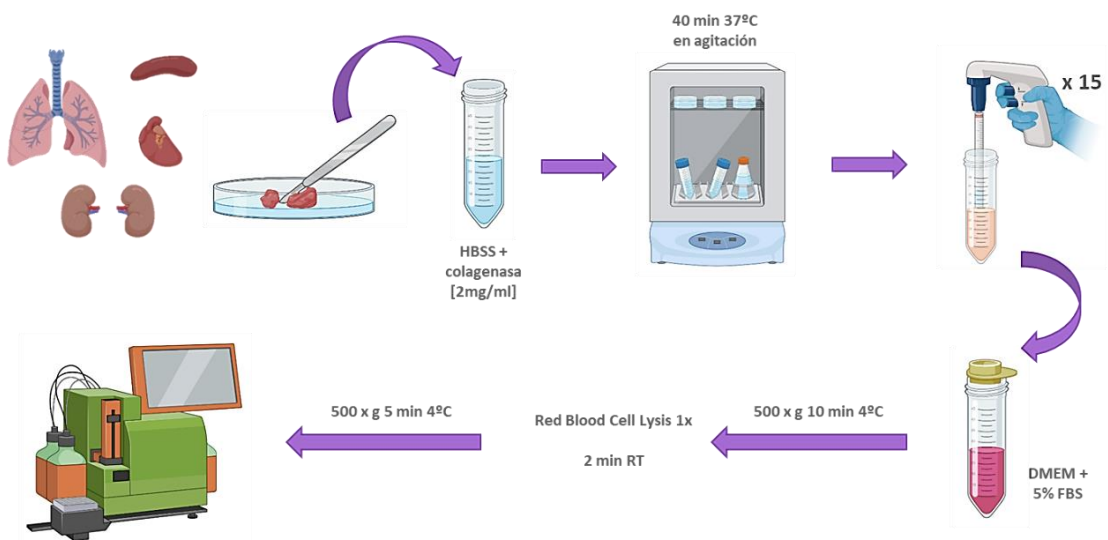


Figura 8. Protocolo de disgregación de tejidos basado en la digestión enzimática por la acción de la colagenasa

4. Ensayos *in vitro* con hepatocitos primarios

4.1. Aislamiento de hepatocitos primarios

Realizamos la perfusión hepática de ratones de las cepas C57BL/6, mT/mG y AlbCre x mT/mG. Estos animales fueron previamente anestesiados vía intraperitoneal con Avertin 1X en suero salino (500 µl/ 25 gr peso del animal) [solución 40X a base de 2, 2,2-tribromoetanol (Sigma-Aldrich T48402-5G) diluido en 2-metil-2-butanol (Sigma-Aldrich M3148-100ML)].

Se dispuso al ratón en posición decúbito supino con el objetivo de abrir las paredes abdominal y torácica, y así exponer el hígado y las venas cava superior e inferior, en las cuales se marcan dos ligaduras. La perfusión se realizó a través de la vena cava superior

accediendo con una cánula flexible a través de la aurícula derecha. En dicho proceso se utilizaron dos soluciones atemperadas a 40°:

- Solución de perfusión: 500 ml HBSS w/o Ca²⁺/Mg²⁺/Phenol red 1X (Gibco #14175) + 5 ml HEPES pH 7.4 1M (Thermo Fisher, 10648593) + 38 mg EGTA (Sigma Aldrich, E3889-10G). En el momento de la perfusión, añadimos heparina Hospira a una concentración de 1.000U/ml para evitar la formación de coágulos.
- Solución de colagenasa: 500 ml Williams E Media (Gibco #22551) + 5 ml HEPES pH 7.4 1M + 0,4 mg/ml Colagenasa (Sigma-Aldrich, C5138).

Una vez comprobado que la cánula estaba bien introducida, anudamos las ligaduras marcadas en las venas cavas superior (para sujetar la cánula) e inferior (para promover la distribución de los líquidos por todo el hígado). Realizamos la perfusión de 25 ml de cada solución por ratón a una velocidad de 1,5 ml/min, pasando primero la solución de perfusión y después la solución de colagenasa, que digiere la matriz extracelular favoreciendo la disgregación del tejido.

Una vez realizada la perfusión, extrajimos el hígado con unas pinzas y lo transferimos a una placa Petri P100 con 25 ml de *Exosome-free Attachment media* (Exo-free AM, **Tabla 5**), donde lo disgregamos con ayuda de dos puntas sin filtro de pipeta p1000. La suspensión celular resultante la filtramos con ayuda de un filtro de células estéril de 100 µm (Thermo Fisher, 11517532).

Reactivo	Compañía	Nº stock	Ci
DMEM/F-12	Thermo Fisher	11320-074	
Piruvato sódico	Thermo Fisher	11360-070	100 mM
L-Glutamina	Proquionorte	GBC25030032	200 mM
NaH₂CO₃	Sigma-Aldrich	S5761	7.5 %
HEPES	Thermo Fisher	10648593	1M
Penicilina-Estreptomicina	Sigma-Aldrich	P4333-100ML	100X
Glucosa	Sigma-Aldrich	G-7021	20 %
*Exo-free Inactive FBS	Cultek	16V5V30-160B	100 %
BSA	Sigma-Aldrich	A3294-100G	

* Dado que el suero fetal bovino contiene VEs al tratarse de un fluido biológico, realizamos un proceso previo de ultracentrifugación a 100.000 x g, 16 horas a 4°C para eliminarlas.

Tabla 5. Lista de reactivos que conforman el Exosome-free Attachment media

Para aislar los hepatocitos, utilizamos un protocolo basado en una solución de Percoll [20 ml Percoll (GE Healthcare, 17-0891-01) + 2.5 ml HBSS 10X with Ca^{2+} and Mg^{2+} (Gibco, 14060-040) + 2.5 ml NaCl 1.5 M (Fisher, S/3160/60)] con el propósito de eliminar células muertas o apoptóticas, y dos centrifugaciones seriadas a 50 g por 5 minutos a 4 °C para lavar los hepatocitos con el medio de cultivo (*Exo-free AM*) y separarlos del resto de células.

4.2. Análisis por citometría de flujo de hepatocitos primarios

Una vez aislados los hepatocitos del hígado del ratón, realizamos su recuento en cámara de Neubauer para determinar la concentración de la suspensión de células obtenida.

Para comprobar la fluorescencia endógena de los hepatocitos en el caso de las cepas fluorescentes mT/mG y AlbCre x mT/mG, reservamos 500.000 células en un volumen final de 1 ml de PBS para ser medidas por citometría de flujo. Los archivos generados se analizaron con el software Kaluza (Beckman Coulter).

4.3. Cultivo de hepatocitos primarios

Los hepatocitos aislados se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células/ml en placas P12 previamente colagenizadas con una solución de colágeno tipo I (Sigma Aldrich, C3867, dilución 1:80) y se mantuvieron a 37°C y 5% de CO_2 en un incubador de CO_2 Forma series II *water jacketed* (Thermo Fisher). A las 4 horas de cultivo, realizamos un cambio de medio Exo-free AM con el fin de eliminar hepatocitos muertos, no adheridos, o restos de contaminación por otros tipos celulares.

4.4. Inducción de daño por APAP *in vitro*

Transcurridas 24 horas de cultivo, realizamos un nuevo cambio de medio Exo-free AM al que añadimos el tratamiento con paracetamol (APAP) 10 mM para inducir un daño a los hepatocitos o sólo con suero salino vehículo (VEH) en el caso de las condiciones control. Los hepatocitos fueron incubados con dicho medio durante 24 horas, tras las cuales retiramos el sobrenadante de las placas con el fin de purificar las VEs.

4.5. Ensayo de citotoxicidad: prueba de lactato deshidrogenasa (LDH)

Con objeto de determinar la viabilidad de las células pre- y 24 horas postratamiento con APAP, se utilizó el kit CytoScan™ LDH Cytotoxicity Assay (G-Bioscience, 786-324) para medir la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), la cual es liberada al medio por células muertas o severamente dañadas, aportando así información sobre la citotoxicidad del cultivo celular (Parhamifar et al., 2019) .

En una placa P96 se cultivaron 20.000 células por pocillo en un volumen de 100 µl realizando triplicados por ratón y condición (APAP o VEH), además de los triplicados de los controles de liberación espontánea (LE, añadiendo agua estéril), y máxima liberación (ML, añadiendo el buffer de lisis), y un pocillo con una alícuota del medio Exo-free AM junto al suero salino o el APAP.

Se añadieron 10 µl de agua y buffer de lisis a los correspondientes pocillos control, se dejó incubando la placa P96 durante 45 minutos a 37°C y 5% CO₂. Tras ello, se transfirieron 50 µl del sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa P96 junto con 50 µl del reactivo LDH y se dejó incubando 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Por último, se midió la absorbancia en un lector de microplacas Model 680 XR (Bio-Rad) a 450-655 nm.

Al valor de absorbancia obtenido en el pocillo ML (máxima actividad de la LDH) se le asignó un porcentaje de mortalidad del 100% de las células, calculando la mortalidad del resto de muestras como la proporción de la absorbancia obtenida en cada una de las condiciones (VEH o APAP) y tiempos (0h y 24h) respecto al pocillo ML. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad, calculado mediante la fórmula = $100 - \% \text{ de mortalidad}$ en cada condición.

5. Aislamiento de VEs presentes en medio de cultivo y plasma

5.1. Condicionamiento de las muestras

Medio de cultivo

Tras incubar los hepatocitos por 24 horas, recuperamos el sobrenadante de cada pocillo con el fin de purificar las VEs liberadas por los hepatocitos al medio empleando tres estrategias diferentes de aislamiento.

Previamente a comenzar con cada una de las estrategias, realizamos dos centrifugaciones consecutivas a 300 g por 10 min y a 16.500 g por 30 min a 4°C, con el fin de descartar los pellets que contienen los hepatocitos muertos y el debris presente en el medio, y de recuperar el sobrenadante que contiene las VEs. Puesto que las vesículas de interés tienen un tamaño inferior a 200 nm, los sobrenadantes fueron filtrados con un diámetro de poro de 0,22 µm, obteniendo el llamado *medio condicionado* (CM).

Plasma

Transcurridas 6 horas tras la administración de JO-2 (CD95, FasL) y 24 horas en el caso del tratamiento con paracetamol (APAP) o suero salino (SAL), llevamos a cabo la eutanasia y la punción cardiaca de los ratones. Las muestras de sangre recogidas en tubos EDTA fueron centrifugadas a 1.800 g 20 min a 4°C para aislar el plasma. Con el fin de eliminar posible contaminación por eritrocitos y *debris*, las muestras de plasma se centrifugaron a 10.000 g por 45 min a 4°C. Dado que las vesículas de interés tienen un tamaño inferior a 200 nm, los sobrenadantes fueron filtrados con un diámetro de poro de 0,22 µm, obteniendo el *plasma condicionado* (CP).

5.2. Aislamiento de VEs por Ultracentrifugación

Para aislar las VEs, utilizamos un protocolo de ultracentrifugación basado en el descrito en el artículo *Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids* (Théry et al., 2006) con ligeras modificaciones.

Con el objetivo de decantar las VEs de los **medios condicionados** (CM), realizamos dos centrifugaciones seriadas a 100.000 g por 75 min a 4°C en las cuales descartamos el sobrenadante y conservamos el pellet. Para comprobar que el protocolo era correcto, el sobrenadante resultante de la primera centrifugación a 100.000 g (SB100K) se centrifugó una vez más (**Figura 9**).

Todas las centrifugaciones se realizaron empleando la centrífuga de alta velocidad Avanti J-301 (Beckman Coulter). Los pellets resultantes de las ultracentrifugaciones se resuspendieron en PBS estéril (Cultek, BE17516F) filtrado por 0,22 µm. Una alícuota del sobrenadante SB16.5K o medio condicionado (CM) y los pellets P100K y P100.2K se almacenaron a -80°C.

En el caso de las muestras de **plasma condicionado** se siguió el mismo protocolo basado en las dos centrifugaciones seriadas a 100.000 g por 75 min a 4°C, partiendo de 500 µl de plasma condicionado (CP). Las muestras fueron procesadas en la ultracentrífuga Thermo Scientific™ centrífugas de suelo Sorvall™ WX Ultra (Thermo Scientific, 46902). Los pellets resultantes de las centrifugaciones se resuspendieron en PBS estéril filtrado (PBS_F). Una alícuota del plasma condicionado (CP) y el P100K se almacenaron a -80°C.

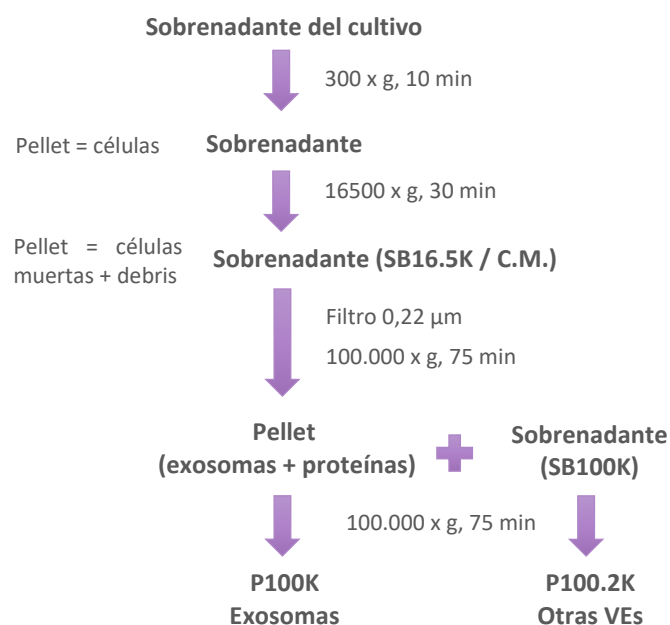


Figura 9. Protocolo de Ultracentrifugación (UC) para aislar vesículas extracelulares (VEs) liberadas por hepatocitos al medio de cultivo.

5.3. Purificación de VEs por cromatografía de exclusión por tamaño

(SEC)

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es una técnica que permite la separación de las partículas presentes en una solución en función de su tamaño. Se trata de un polímero a través del cual pasa la muestra de interés. Las partículas más pequeñas quedan retenidas al introducirse en el polímero y tendrán mayor recorrido que hacer, mientras que las de gran tamaño no se introducen en los pequeños poros, por lo que serán las primeras en atravesar la columna y, por tanto, las primeras en ser recogidas (Sidhom et al., 2020).

Se tomaron alícuotas de 500 μ l, tanto de **medios de cultivo (CM)** como de **plasmas (CP) condicionados**, las cuales se cargaron en columnas qEVOoriginal / 35nm Legacy (IZON, SP5). Recogimos un total de 30 fracciones de 500 μ l de volumen siguiendo el protocolo del fabricante. Para eluir la muestra a través de la columna empleamos PBS_F.

Se agruparon las fracciones de tres en tres y se almacenaron a -80°C en crioviales, siendo la fracción de mayor interés la F7-9 puesto que es la más enriquecida en VEs, y, por tanto, la que se empleó en la caracterización de las vesículas.

5.4. Aislamiento de VEs por selección inmuno-magnética.

Se llevó a cabo el aislamiento de exosomas presentes en los **medios condicionados (CM)** empleando el kit de selección inmuno-magnética *Exosome Isolation Kit Pan, mouse* (Miltenyi, 130-117-039), el cual se compone de microesferas magnéticas conjugadas con anticuerpos que reconocen los principales marcadores de exosomas, las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81.

Para ello, se añaden 50 μ l de *Exosome Isolation Microbeads* a las muestras de CM y se mantienen en incubación durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente, se carga la mezcla en una μ Column (Miltenyi, 130-042-701) situada en un imán. En la columna queda retenida toda partícula reconocida por los anticuerpos conjugados con las microesferas, en este caso la fracción de exosomas o positiva (EXO+), mientras que eluye todo aquello no unido, es decir, la fracción negativa (EXO-). Una vez

se recoge la fracción EXO-, se saca la columna del soporte magnético y con ayuda de un émbolo se recupera la fracción EXO+.

Una alícuota de la fracción EXO- y toda la fracción EXO+ de cada aislamiento se almacenaron en crioviales a -80°C para su posterior estudio.

5.5. Purificación de VEs EGFP+ a partir de muestras de plasma

Dado que en los ratones AlbCre x mT/mG la expresión de la proteína fluorescente EGFP determina el origen hepatocitario de las VEs, probamos diferentes estrategias para aislar aquellas VEs EGFP+ teniendo como punto común la selección inmuno-magnética de GFP.

Para ello, alícuotas de las muestras de plasma condicionado (CP), de los P100K procedentes de ultracentrifugación y de las F 7-9 obtenidas tras la SEC, se incubaron con 50 µl Anti-GFP *MicroBeads* (Miltenyi, 130-091-125), microesferas conjugadas con anticuerpos frente a GFP, durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Seguidamente, llevamos a cabo el mismo protocolo que con el *Exosome Isolation Kit Pan*, cargando la mezcla en una µColumn situada en un imán para retener todas las partículas GFP+ y eluir todo lo GFP-.

Tanto la fracción CP/UC/SEC-GFP+ como una alícuota de la fracción GFP- de cada aislamiento se almacenaron en crioviales a -80°C para su posterior estudio.

6. Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas.

6.1. Análisis por Citometría de flujo

Con el objetivo de caracterizar el contenido en VEs tanto de las muestras originales (medio de cultivo y plasma condicionados) como de las fracciones de VEs obtenidas por las diferentes estrategias llevadas a cabo, utilizamos la citometría de flujo.

Para ello, alícuotas de 5 µl de CP y 50 µl de CM y fracciones de VEs purificadas, se diluyeron en PBS_F para un volumen final de 100 µl. Sobre este volumen, añadimos 5 µl

de anticuerpo anti- CD81 VioBlue (Miltenyi, 130-103-144) e incubamos las muestras durante 45 min en oscuridad a 4°C.

Posteriormente, añadimos 400 µl de tampón de unión de anexina (5x) a 1x (ThermoFisher, V13246) y 2,5 µl de Anexina V conjugado con Alexa Fluor 647 (AnnV, ThermoFisher, 10297152), la cual tiene una gran afinidad por la fosfatidilserina. La fosfatidilserina es un fosfolípido que se expone en la monocapa exterior de la membrana plasmática en condiciones de apoptosis temprana. Además, se añadió 1 µl de sonda FM4-64 [N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-(dietilamino) fenilo) hexatrienilo) piridinio dibromuro), Invitrogen, T13320] a una concentración de 10 µg/ml, el cual es un tinte lipofílico fluorescente que se une selectivamente a bicapas lipídicas. Ambos marcajes se incubaron 10 min en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras se adquirieron por el citómetro de flujo MACSQuant 16 y se analizaron los archivos con el software Kaluza.

6.2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Con el objetivo de definir la concentración y el tamaño de las VEs aisladas, llevamos a cabo el *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) por medio de la tecnología NanoSight 300 (NS300, Malvern). El NTA determina la distribución del diámetro de las (nano)partículas en una solución basándose en su movimiento browniano. El equipo NS300 dispone de una cámara que detecta la luz dispersada por las nanopartículas al ser excitadas por un láser y mediante la ecuación *Stokes-Einstein* se calcula el tamaño de cada una de ellas. Además, dado que realiza el recuento de las nanopartículas, en relación con el volumen de muestra medida, permite obtener datos sobre la concentración de la muestra (Bachurski et al., 2019). La evaluación de las muestras se basó en el análisis de 5 vídeos de 60 segundos de duración a una velocidad de infusión (*infusion rate*) de 40 (unidades arbitrarias). Los archivos generados muestran el perfil de nanopartículas de cada vídeo y se expresan la media y la moda tanto de la concentración en partículas/ml como del tamaño en nm.

6.3. Western Blot

Para comprobar la expresión en las VEs de la proteína fluorescente EGFP y de CD81, marcador característico de exosomas, analizamos por Western Blot las muestras de CM y de VEs aisladas por UC tanto de ratones C57BL/6 como AlbCre x mT/mG. Brevemente, alícuotas de las muestras CM y P100K UC se diluyeron en Laemmli 4x y se incubaron en el termobloque a 95°C durante 5 min. Se cargaron 40 µl de cada muestra en geles 10% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ (Bio-Rad Laboratories, 4568034). La electroforesis se realizó a un voltaje de 200 eV a 4 °C. La transferencia de las proteínas del gel a la membrana se realizó a una potencia de 100 eV/membrana durante 2 horas a 4 °C.

Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios indicados en la **Tabla 6** durante la noche en agitación a 4°C. Transcurrido el tiempo, realizamos 3 lavados de las membranas con TBS-Tween con el objetivo de eliminar el exceso de anticuerpo primario, y procedimos a la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo (Jackson Immunoresearch, 711-035-152) preparado a una dilución 1:5.000 en TBS-Tween + 0,5% Milk durante una hora a temperatura ambiente.

	Peso molecular	Clon	Fuente/ Isotipo	Dilución en TBS-T + 0,5%	Ref	Compañía
GFP	27 kDa	D5.1	Conejo IgG	1:1000	2956S	Cell Signaling
CD81	22 KDa	D5O2Q	Conejo IgG	1:1000	10037S	Cell Signaling

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados en el Western Blot.

Por último, realizamos tres nuevos lavados de las membranas con TBS-Tween para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y revelamos la señal empleando el kit Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents (Sigma Aldrich, RPN2232) en un revelador Alliance 4.7.

6.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Con el objetivo de visualizar las VEs aisladas por UC, fijamos y marcamos las muestras de VEs sobre rejillas de cobre cubiertas de formvar/carbon de 200 mesh (Agar Scientific, AGS162), y obtuvimos imágenes mediante microscopía electrónica de transferencia.

Brevemente, depositamos 5 µl de las muestras de VEs UC sobre las rejillas y las dejamos secar durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente, fijamos las muestras disponiendo las rejillas en gotas de glutaraldehído al 2% durante otros 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, realizamos 5-6 lavados de 3 min transfiriendo las rejillas a gotas de agua destilada y llevamos a cabo el contraste negativo poniendo las rejillas sobre gotas de acetato de uranilo al 4% en oscuridad durante 15-20 min. Por último, retiramos el excedente sobre un papel de filtro y dejamos secar las rejillas 10 min antes de almacenarlas.

Las muestras de vesículas se visualizaron a 80 kV de voltaje de aceleración y se tomaron las imágenes con el microscopio electrónico de transmisión JEOL Jem1010 del servicio del Centro Nacional de Microscopía Electrónica asociado a la Universidad Complutense de Madrid.

7. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron como mediana y rango intercuartílico (IQR) y las variables cualitativas como porcentajes (%). Para analizar las diferencias entre dos grupos, se aplicó el test U de Mann-Whitney o, en el caso de medidas repetidas, el test de Wilcoxon. Para comparar 2 o más grupos con medidas pareadas, empleamos un test One-way ANOVA para medidas repetidas aplicando un análisis post-hoc mediante el test de Tukey. Para comparar 2 o más grupos con medidas pareadas en comparaciones involucrando 2 factores, empleamos un test Two-way ANOVA para medidas repetidas o, en el caso de que faltase alguna medida pareada, un modelo de efectos mixtos para medidas repetidas, seguido en ambos casos de Uncorrected Fisher's LSD post-hoc. En aquellos casos en que estaba indicado, no se asumió esfericidad en el test Two-way ANOVA y se utilizó la corrección de Geisser-Greenhouse. Para analizar la correlación entre la ALT sérica y el grado de necrosis hepatocelular, empleamos el test de correlación de Pearson. Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0,05$. El análisis de componentes principales, los heat-map, y el análisis de clústeres se realizó con el programa Orange Data Mining v3.35.0. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism v8.0.2 para Windows (San Diego California US, www.graphpad.com).

RESULTADOS

1. Generación de paneles de citometría de flujo multiparamétrica para la evaluación exhaustiva del sistema inmune celular murino.

1.a. Diseño de paneles de anticuerpos para analizar el perfil inmunológico murino en sangre periférica.

Con el fin de estudiar exhaustivamente el sistema inmune celular murino, se diseñaron dos paneles de anticuerpos capaces de discriminar un gran número de poblaciones inmunitarias a nivel sistémico empleando un volumen mínimo de sangre (50 μ l por panel), permitiendo así la supervivencia del ratón y su evaluación repetida a lo largo del tiempo.

Para definir los anticuerpos que conforman los paneles, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica sobre los fenotipos que caracterizan las diferentes poblaciones inmunes que pueden ser medidas en sangre de ratón y el nivel de expresión de dichos marcadores en las células. Una vez seleccionadas las proteínas (marcadores) diana, para aquellas con un menor nivel de expresión en la superficie de las células se seleccionaron los anticuerpos conjugados con fluoróforos que emiten una longitud de onda menor, es decir, más intensos, y viceversa. Asimismo, los anticuerpos primarios conjugados fueron elegidos y organizados en dos paneles según su adaptación a las características técnicas del citómetro de flujo MACSQuant 16 Analyser, el cual puede analizar 16 parámetros de forma simultánea en una misma muestra: 14 detectores de fluorescencia + tamaño/complejidad (**Tabla 7**).

Uno de los paneles fue diseñado para analizar las poblaciones celulares responsables de la **respuesta inmunológica innata**, incluyendo los diferentes fenotipos de maduración de las células mieloides – granulocitos, monocitos (Mo), células dendríticas (DC) – así como las células *natural killer* (NK) y células T *natural killer* (NKT). El segundo panel se estructuró para estudiar las células implicadas en la **inmunidad adaptativa**: los linfocitos T y B, y sus subpoblaciones. La **Tabla 8** muestra los marcadores utilizados para definir cada fenotipo del sistema inmunológico murino mediante los paneles de anticuerpos diseñados.

Panel Sistema Inmune Innato		Panel Sistema Inmune Adaptativo	
Canal	Anticuerpos	Canal	Anticuerpos
V1 – VioBlue	CD3	V1 – VioBlue	CD3
V2 – VioGreen	MHCII	V2 – VioGreen	CD4
V3 - BV570	CD19	V3 - BV570	B220
V4 - BV605	Ly6G	V4 - BV605	CCR6 (CD196)
V5 - BV650	NK1.1	V5 - BV650	CD21/CD35
B1 – FITC	F4/80	B1 – FITC	CD25
B2 – PE	Siglec-F	B2 – PE	CCR4 (CD194)
B3 - PE-Vio615	PI	B3 - PE-Vio615	PI
B4 - PerCP/PC5	Ly6C	B4 - PerCP/PC5	CD62L
B5 - PC5.5	CD11b	B5 - PC5.5	TNF-R II
B6 - PC7	CCR2	B6 - PC7	CD138
R1 – APC	CD49b	R1 – APC	IL-23R
R2 - APC5	B220	R2 - APC5	CD44
R3 - APC7	CD11c	R3 - APC7	CXCR3 (CD183)

Tabla 7. Paneles de anticuerpos para analizar las poblaciones del sistema inmunológico murino por citometría multiparamétrica.

Puesto que en el protocolo establecido se emplea un volumen de tan solo 50 μ l de sangre, con el fin de conseguir la supervivencia del animal, se tomó la decisión de no realizar lavados por dos motivos: reducir la pérdida de células y obtener valores fisiológicos. Los lavados en una muestra biológica permitirían analizar las proporciones (frecuencia relativa) de las distintas poblaciones asumiendo que los lavados afectan a todas las células por igual. Sin embargo, no permitiría obtener valores absolutos de células por microlitro de sangre, que es una información altamente valiosa para valorar el perfil inmunológico. Por tanto, fue necesario realizar la titulación de cada uno de los anticuerpos de forma individual probando 3 diluciones diferentes: el recomendado por la casa comercial, uno por encima y otro por debajo.

Una vez seleccionadas las diluciones adecuadas, se llevó a cabo el ajuste del voltaje para cada uno de los fluoróforos en función del láser que lo excitara, así como el marcaje completo para evaluar cómo interaccionaban todos los anticuerpos y determinar la matriz de compensación de cada panel. Por otro lado, se realizaron controles FMO

(*Fluorescence Minus One*) para cada uno de los anticuerpos, que consiste en el marcaje con todos los anticuerpos que conforman el panel menos uno para determinar la señal negativa del fluoróforo con el que está conjugado.

Una vez diseñados los paneles y realizadas las comprobaciones pertinentes, se definió una estrategia de selección de poblaciones (**Figura 10, Figura 11 y Figura 12**) para cada uno de ellos que permitió analizar un total de 35 fenotipos celulares de la respuesta inmune innata y de la adaptativa.

Poblaciones linfoides

	Linfocitos T				Linfocitos B				Células NK	Células NKT	
	naïve	CMem	EMem	act	naïve	CMem	EMem	act			T1
	CD4+				CD8+						
CD3			+				+				
CD4			+				-				
NK1.1											+
CD19											
B220											low/-
CD44		+					+				low/-
CD62-L		+					+				
CD25				+							
CD21/CD35											
CD138											+

Poblaciones mieloides: CD11b+ LIN- (CD3- B220- NK1.1- CD19-)

	Granulocitos			Monocitos			Células Dendríticas		
	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Proinflam. inmaduros	Proinflam. maduros	Proinflam. maduros	Inmaduras	Maduras	
F4/80									
Ly6C									
Ly6G									
Siglec-F		+							
CD49b			+						
MHC-II									
CCR2									
CD11c									

Tabla 8. Tabla de fenotipos del sistema inmunológico de ratón y marcadores utilizados para definir cada fenotipo mediante los paneles de anticuerpos diseñados.

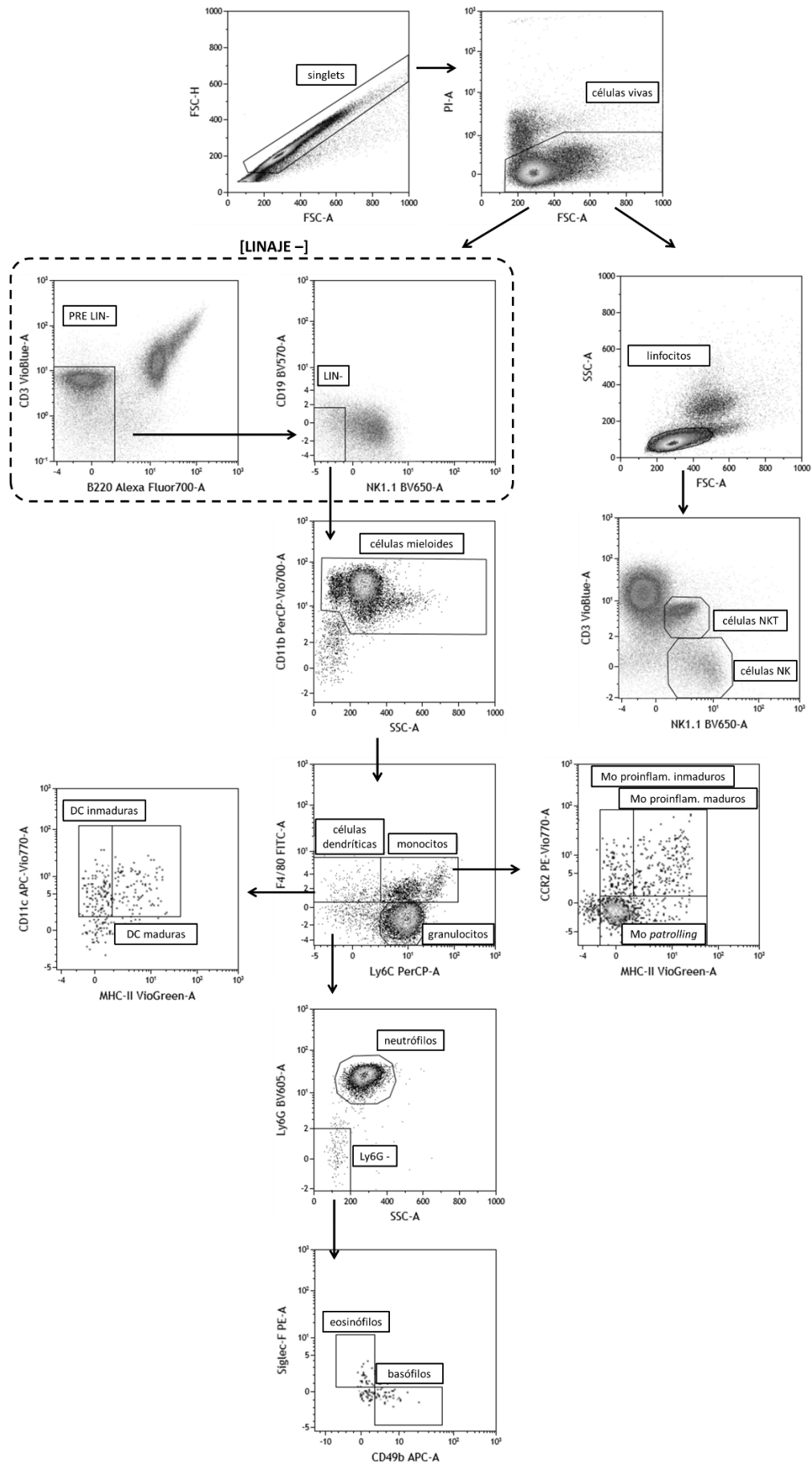


Figura 10. Estrategia de selección de poblaciones del panel Sistema Inmune Innato.

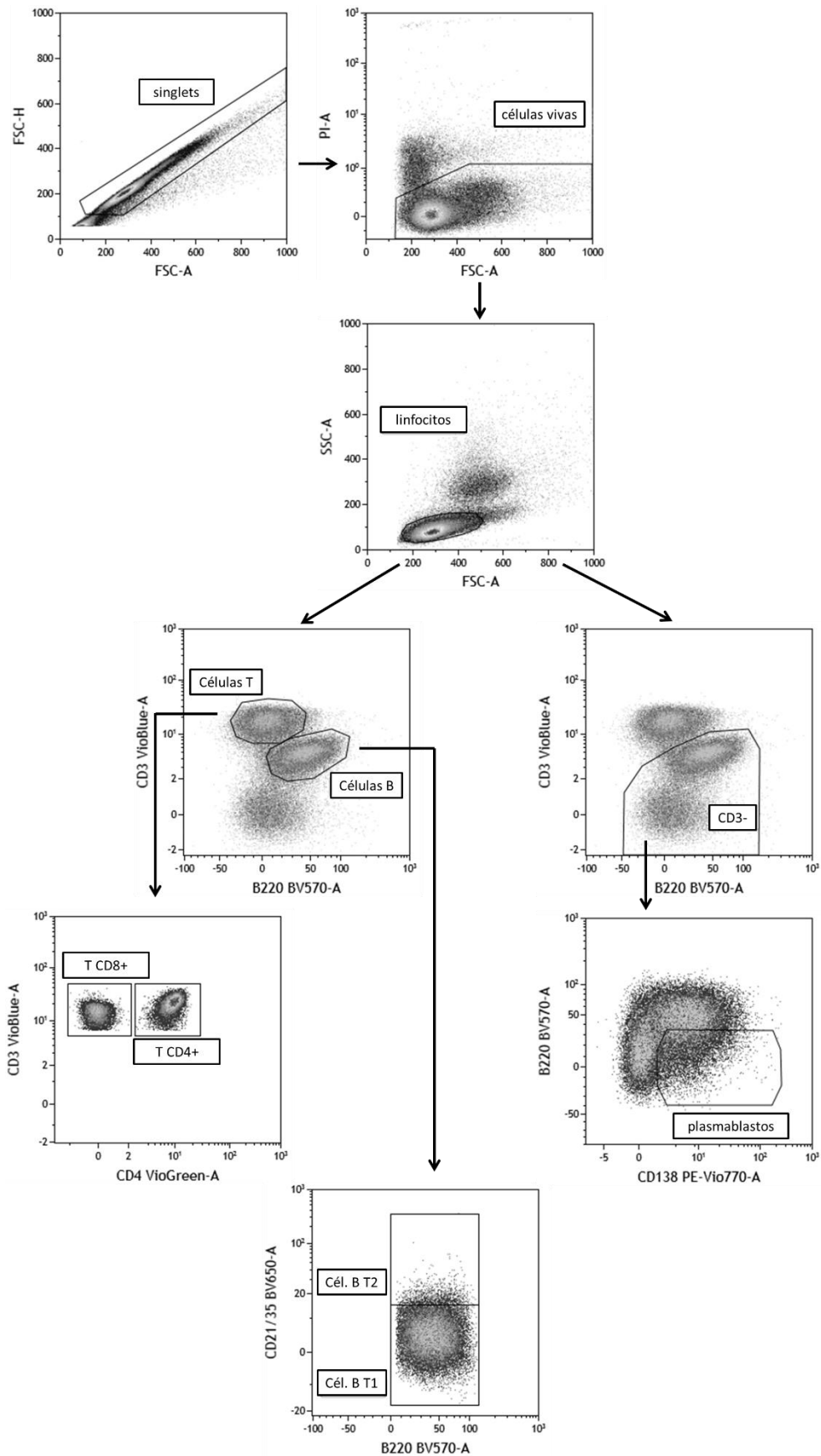


Figura 11. Estrategia de selección de poblaciones del panel Sistema Inmune Adaptativo parte I.

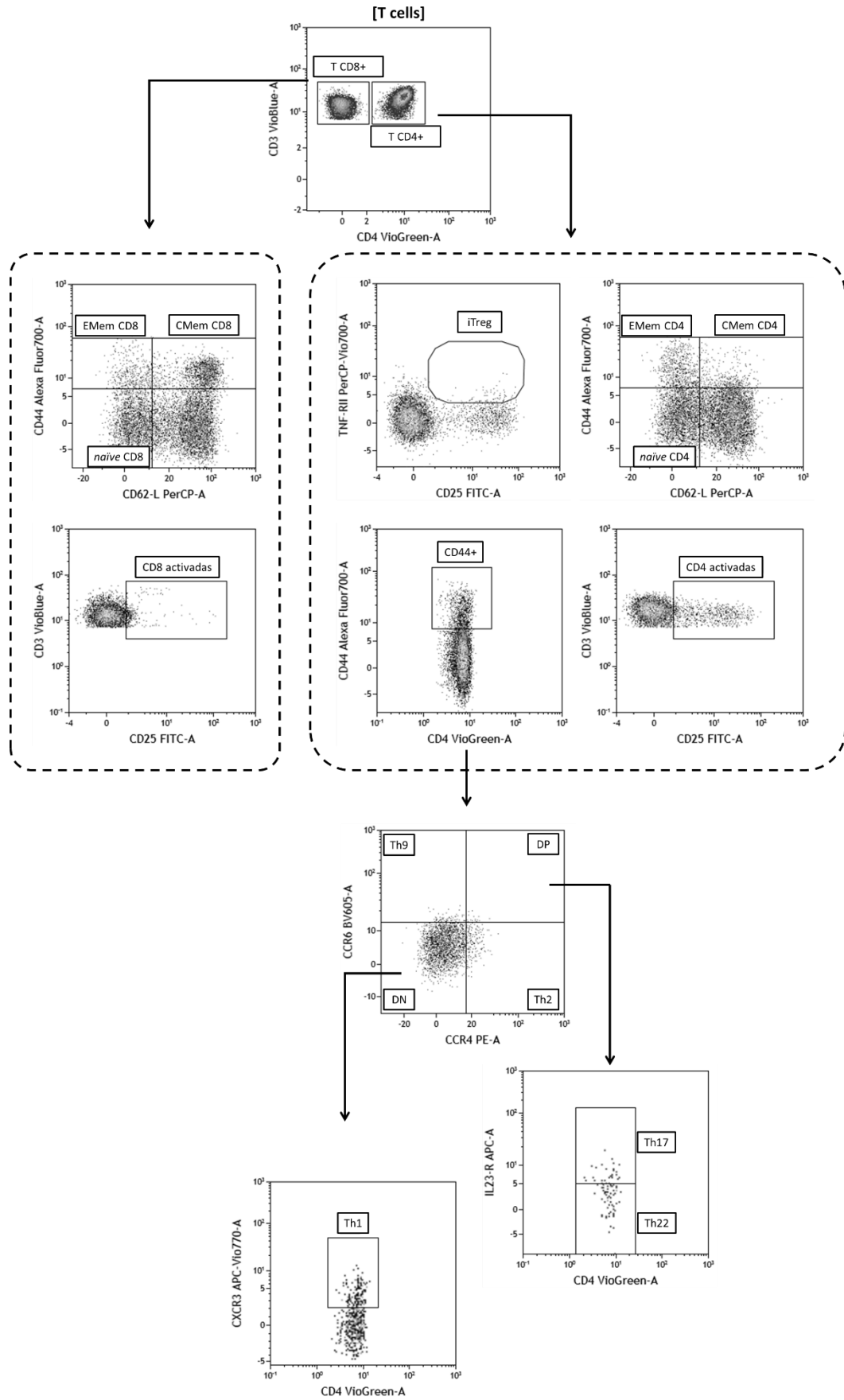


Figura 12. Estrategia de selección de poblaciones del panel Sistema Inmune Adaptativo parte II.

1.b. Validación en ratones salvajes C57BL/6 y ratones deficientes en IL10 de paneles de anticuerpos para analizar el sistema inmunológico murino.

Para validar la estrategia desarrollada de análisis del sistema inmunológico murino, muestras de sangre de ratones de la cepa salvaje C57BL/6 (WT) y de una cepa deficiente en la citoquina antiinflamatoria IL-10 (IL-10 KO) se incubó con los paneles de anticuerpos reflejados en el apartado anterior. La **Tabla 9** y la **Tabla 10** muestran los valores en porcentaje y concentración absoluta (células/ μ l), respectivamente, de todas las poblaciones evaluadas en ambas cepas de ratón.

En el análisis de las poblaciones que participan en la inmunidad innata, las **células mieloides** fueron definidas como LIN- (linaje-: CD3-/CD19-/B220-/NK1.1-) CD11b+. Comparado con los ratones WT, los IL-10 KO mostraron un aumento de la proporción de células mieloides ($p = 0,040$) y tendieron a presentar también un aumento de su concentración ($p = 0,114$) (**Figura 13**).

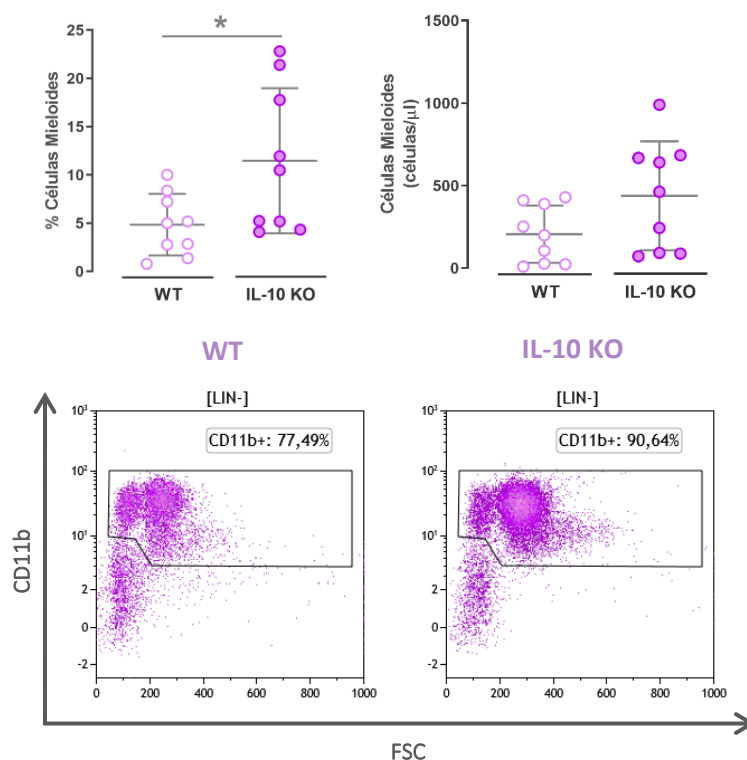


Figura 13. Proporción (%) de células mieloides (LIN- CD11b+) respecto a las células totales (panel superior izquierdo) y concentración absoluta de células mieloides (células/ μ l, panel superior derecho), evaluadas por citometría de flujo en sangre de ratones WT e IL-10 KO. Dot plots representativos del análisis de las células mieloides de un ratón WT (abajo izquierda) y de un ratón IL-10 KO (abajo derecha). Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

Fenotipos	WT			IL-10 KO			P valor
	Mediana	Q1	Q3	Mediana	Q1	Q3	
Linfocitos	84,74	83,05	86,45	79,21	76,99	80,46	0,0012
Linfocitos T	12,27	11,25	14,02	15,89	14,69	19,49	0,0012
T CD4+	55,58	51,5	56,59	58,43	55,69	60,3	0,0188
naïve CD4+	76,58	51,5	80,35	77,52	57,36	81,51	0,7304
CMem CD4+	3,85	2,625	5,385	4,03	2,74	5,25	0,9314
EMem CD4+	5,49	4,075	7,14	5,21	3,945	10,52	0,9314
act CD4+	7,86	6,195	9,5	9,17	8,72	11,69	0,04
Th1	24,14	18,32	29,37	15,7	14,46	17,35	0,0028
Th2	6,68	3,995	8,175	21,12	17,3	28,43	<0,0001
Th17	0,26	0,11	0,335	2,28	0,925	3,57	<0,0001
Th22	0,34	0,1	1,085	0,98	0,795	1,755	0,0656
Th9	4,63	3,41	6,305	3,19	2,475	7,37	0,4363
Treg	0,83	0,475	0,96	1,43	0,745	1,705	0,04
T CD8+	43,71	42,47	48,3	41,55	38,86	44,13	0,0474
naïve CD8+	78,99	58,77	87,09	84,04	51,16	85,3	0,6048
CMem CD8+	5,62	4,4	11,9	5,45	4,025	14,31	0,9314
EMem CD8+	4,19	3,86	5,615	5,21	3,945	7,135	0,6048
act CD8+	2,63	2,21	3,875	5,47	4,24	7,935	0,0005
Linfocitos B	63,62	59,18	68,47	57,65	53,68	60,62	0,0188
Células B T1	96,28	91,83	97,39	94,12	89,37	96,83	0,4363
Células B T2	3,71	2,61	8,17	5,88	3,175	10,64	0,4363
Plasmablastos	3,89	3,8	4,84	3,94	3,485	4,72	0,7304

Fenotipos	WT			IL-10 KO			P valor
	Mediana	Q1	Q3	Mediana	Q1	Q3	
Células Mieloides	5	2,07	7,8	10,49	4,75	19,57	0,04
Granulocitos	63,54	39,43	69,24	77,95	64,96	79,6	0,0142
Neutrófilos	90,98	83,74	96,09	96,09	95,36	97,66	0,0142
Eosinófilos	0,48	0,06	1,445	0,37	0,115	0,44	0,5306
Basófilos	0,71	0,11	2,54	0,32	0,04	0,475	0,2213
Monocitos	21,15	13,15	27,49	12,04	7,28	12,66	0,0106
<i>patrolling Mo</i>	86,36	64,82	93,68	79,64	77,35	84,42	0,6665
Mo proinfl. inmat.	6,06	3,415	23,87	6,12	2,875	9,84	0,3865
Mo proinfl. mat.	6	3,19	10,14	11,05	5,59	12,4	0,1359
Células Dendríticas	3,33	1,455	11,28	2,35	0,885	4,02	0,3401
DC inmaduras	31,71	17,75	55,62	22,5	9,31	48,25	0,3865
DC maduras	16,67	13,39	21,53	30,43	21,9	40,28	0,0019
NK	6,07	4,8	7,705	8,3	6,335	8,79	0,0625
NKT	7,21	4,165	8,28	9,75	5,075	15,25	0,0939

Tabla 9. Proporción (mediana, Q1= 1^{er} cuartil y Q3= 3^{er} cuartil) de cada tipo celular inmune en sangre de ratones C57BL/6 (WT) e IL-10 KO, determinada mediante citometría de flujo. Cada proporción se refiere al fenotipo de categoría superior. Test U de Mann-Whitney.

Fenotipos	WT			IL-10 KO			P valor
	Mediana	Q1	Q3	Mediana	Q1	Q3	
Linfocitos	5126	4819	5855	3778	3575	4515	0,0005
Linfocitos T	666,7	569,1	753,7	655,3	583,3	742,8	0,9314
T CD4+	343,7	299,4	424,9	398,3	355,2	410,1	0,4894
naïve CD4+	246,6	191,3	265,9	283,5	178,6	315	0,2973
CMem CD4+	13,72	10,15	18,9	16,07	11,16	20,02	0,7304
EMem CD4+	19,6	13,89	31,06	18,95	14,16	46,27	0,7304
act CD4+	29,12	21,54	34,63	35,42	31,82	47,72	0,0473
Th1	7,79	6,94	12,11	5,55	4,595	9,205	0,04
Th2	2,19	1,45	2,8	6,77	5,58	14,65	<0,0001
Th17	0,09	0,05	0,14	0,69	0,51	1,54	<0,0001
Th22	0,14	0,05	0,375	0,47	0,305	0,56	0,0112
Th9	1,59	1,12	2,38	1,54	0,68	2,05	0,5596
Treg	2,66	1,66	3,525	5,23	2,705	6,46	0,0244
T CD8+	281,9	262,7	334,1	265,3	241,1	330,8	0,4363
naïve CD8+	206,5	184	266,2	195,4	124	235,4	0,4363
CMem CD8+	27,35	21,42	49,24	27,72	16,19	47,14	0,6048
EMem CD8+	9,85	2,965	16,69	6,17	5,6	23,5	0,4363
act CD8+	7,79	6,345	11,69	13,67	10,7	27,05	0,0188
Linfocitos B	3452	2904	3691	2178	1921	2837	0,0005
Células B T1	3224	2767	3586	2069	1806	2641	0,0005
Células B T2	144	83,44	270,2	118,7	77	261,1	0,7962
Plasmablastos	178,2	160,7	350	114,2	101	180,6	0,077

Fenotipos	WT			IL-10 KO			P valor
	Mediana	Q1	Q3	Mediana	Q1	Q3	
Células Mieloides	200	25,88	399,9	463,5	90,44	676,4	0,1135
Granulocitos	149,8	7,585	251,1	365	80,46	534,2	0,0625
Neutrófilos	143,5	6,24	221,4	350,8	73,72	520,2	0,077
Eosinófilos	0,19	0,045	2,29	0,65	0,235	2,01	0,4229
Basófilos	0,33	0,09	3,59	0,51	0,165	2,17	0,8116
Monocitos	17,36	5,385	100,5	28,89	8,87	90,7	0,7962
<i>patrolling Mo</i>	16,15	4,02	65,1	24,13	7,28	73,6	0,6222
Mo proinfl. inmat.	0,75	0,44	23,1	1,68	0,395	8,05	0,7785
Mo proinfl. mat.	0,65	0,275	12,25	1,91	0,75	9,055	0,5042
Células Dendríticas	6,52	2,1	7,7	3,22	1,59	16,73	0,8147
DC inmaduras	2,05	0,375	3,895	0,7	0,21	8,005	0,9831
DC maduras	0,79	0,445	1,24	0,98	0,515	4,925	0,3073
NK	261,7	104,1	306,8	186,5	127	333,1	>0,9999
NKT	244	99,49	336,4	260,4	147,1	427,1	0,4363

Tabla 10. Concentración (mediana, Q1= 1^{er} cuartil y Q3= 3^{er} cuartil) de cada tipo celular inmune en sangre de ratones C57BL/6 (WT) e IL-10 KO, determinada mediante citometría de flujo. Cada proporción se refiere al fenotipo de categoría superior. Test U de Mann-Whitney.

Respecto a las subpoblaciones de células mieloides (granulocitos, monocitos, células dendríticas), los ratones IL-10 KO presentaron un incremento significativo de la proporción de **granulocitos** en comparación con los ratones WT ($p=0,014$, **Figura 14A**). Dicho aumento se debió al aumento de los neutrófilos ($p=0,014$, **Tabla 10**), mientras que los basófilos y los eosinófilos se mantuvieron en valores similares en ambos grupos (**Figura 14A**).

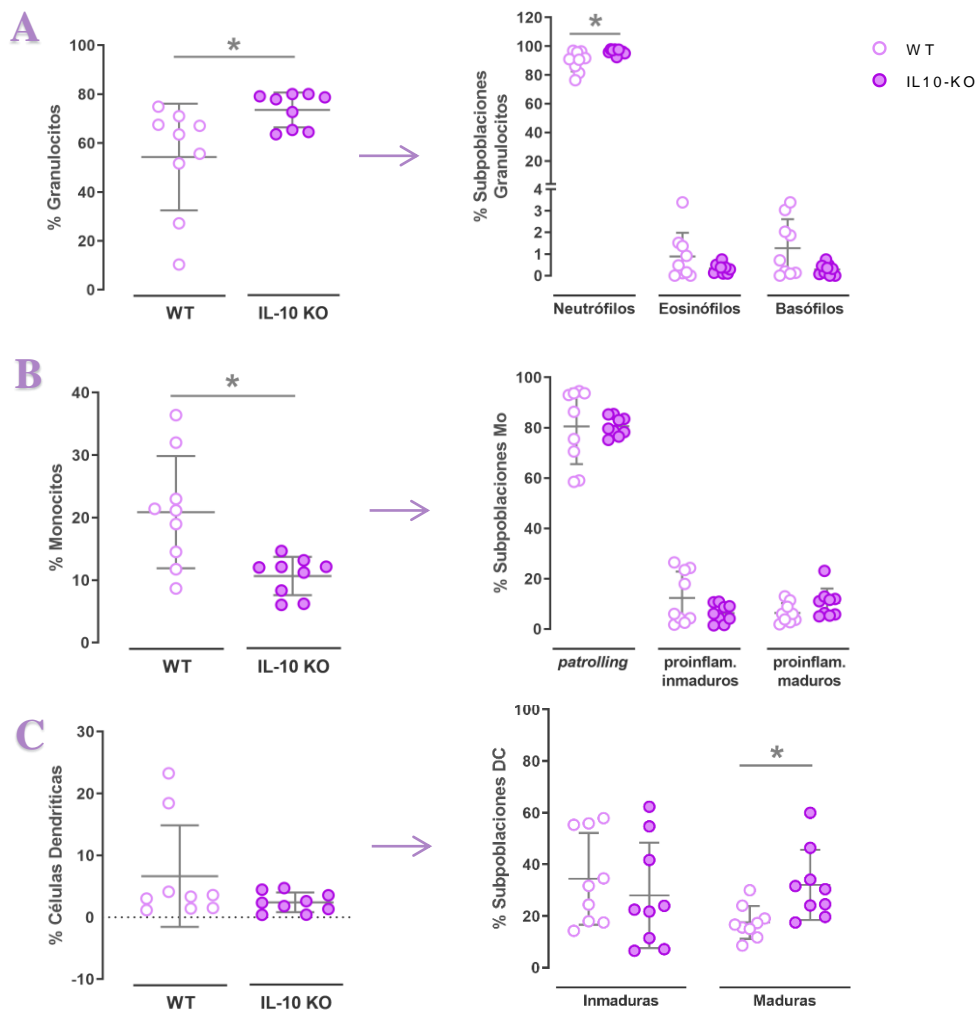


Figura 14. Proporción de **A**) granulocitos, **B**) monocitos (Mo) y **C**) células dendríticas (DC) respecto al total de células mieloides sanguíneas circulantes, junto a sus subpoblaciones (paneles a la izquierda), en ratones C57BL/6 (WT) y ratones IL-10 KO medidas mediante citometría de flujo. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

En comparación con los ratones WT, los ratones IL-10 KO presentaron una disminución de la proporción de **monocitos (Mo)** respecto al total de células mieloides circulantes (**Figura 14B**, $p=0,011$), mientras que la concentración de Mo fue similar en ambos grupos ($p=0,796$, **Tabla 10**). La proporción de cada subpoblación de Mo (*patrolling*, proinflamatorio inmaduro, y proinflamatorio maduro) fue también similar en ambos grupos, salvo por un ligero aumento del fenotipo proinflamatorio maduro en los ratones

IL-10 KO respecto a los WT ($p=0,1359$, **Figura 14B**). Sin embargo, al calcular la ratio entre los Mo proinflamatorios maduros e inmaduros, la cepa IL-10 KO mostró una ratio mayor, tanto en porcentajes ($p=0,0106$) como en concentración ($p=0,0244$) (**Figura 15A y B**, respectivamente), en comparación con los ratones WT.

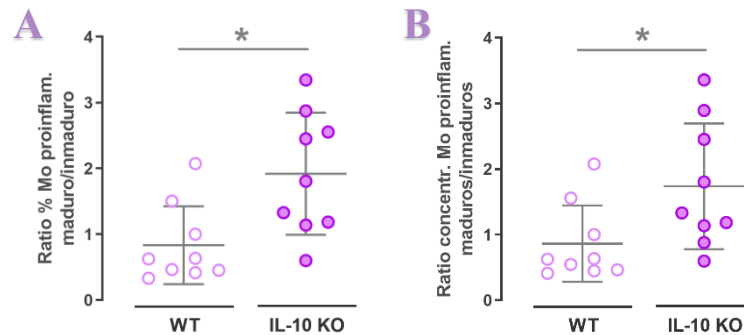


Figura 15. Ratio Maduro/inmaduro del A) porcentaje y B) la concentración de los monocitos proinflamatorios en ratones WT e IL-10 KO. Los porcentajes utilizados en A) son los calculados sobre la gate de monocitos. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

Finalmente, respecto a las **células dendríticas**, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de ratones ($p=0,340$). En consonancia con la existencia de un ambiente proinflamatorio en ratones IL-10 KO, sin embargo, el porcentaje de células dendríticas con fenotipo maduro fue mayor en el grupo IL-10 KO que en los ratones WT ($p=0,002$, **Figura 14C**).

Comparado con los ratones WT, los ratones IL-10 KO presentaron ligeras elevaciones de la proporción relativa de **células NK** y de **células NKT** respecto al total de linfocitos (células NK, $p=0,0625$, **Figura 16A**; células NKT, $p=0,0939$, **Figura 16B y Tabla 9**), aunque la concentración absoluta de ambas poblaciones fue similar en ambas cepas (**Tabla 10**).

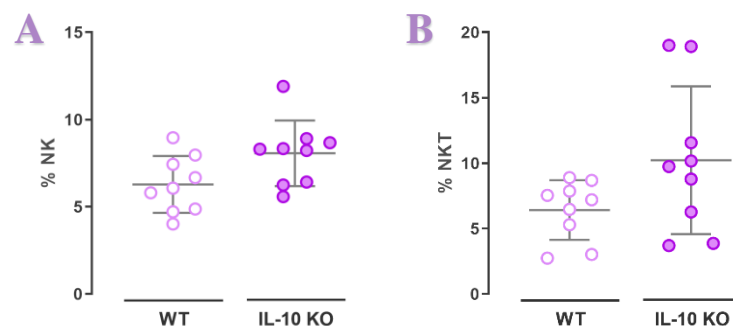


Figura 16. Proporción (%) de células A) NK y B) NKT respecto al total de linfocitos definidos por tamaño y complejidad en sangre de ratones WT e IL-10 KO. Test U de Mann-Whitney.

Por otro lado, la deficiencia de IL-10 tuvo un impacto mucho mayor sobre la inmunidad adaptativa que sobre la innata. Así, los ratones IL-10 KO presentaron una importante disminución tanto en concentración absoluta ($p=0,0005$, **Tabla 10**) como en proporción ($p=0,0012$) de **linfocitos totales** respecto al total de células circulantes (**Figura 17A** y **Tabla 10**).

Estos cambios se debieron principalmente a la disminución de la concentración de linfocitos B ($p=0,0005$, **Tabla 10**), resultando en la disminución de su proporción relativa ($p=0,019$, **Figura 17B** y **Tabla 9**) y en el aumento de la proporción relativa (pero no de la concentración) de linfocitos T ($p=0,0012$, **Figura 17C** y **Tabla 10**).

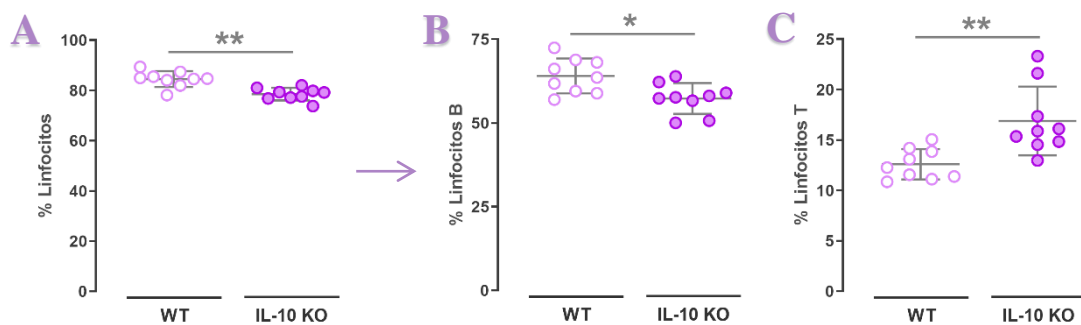


Figura 17. Proporción de **A**) linfocitos totales respecto al total de células circulantes, y de **B**) linfocitos B y **C**) linfocitos T partiendo del *gate* linfocitos, en sangre de ratones WT e IL-10 KO. Las líneas representan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Entre los diversos fenotipos de maduración de los **linfocitos B**, la disminución de estas células en ratones IL-10 KO se debió principalmente a la reducción del fenotipo transicional 1 (T1, $p=0,0005$) y, en menor medida, a los plasmablastos ($p=0,077$, **Tabla 10**), mientras que los linfocitos B transicionales 2 (T2) no presentaron cambios significativos ($p=0,796$) (**Figura 18** y **Tabla 10**). La deficiencia de IL-10, sin embargo, no alteró la proporción relativa de estos tres fenotipos de maduración de los linfocitos B (T1, T2 y plasmablastos), que fue similar a la encontrada en ratones WT (**Tabla 9**).

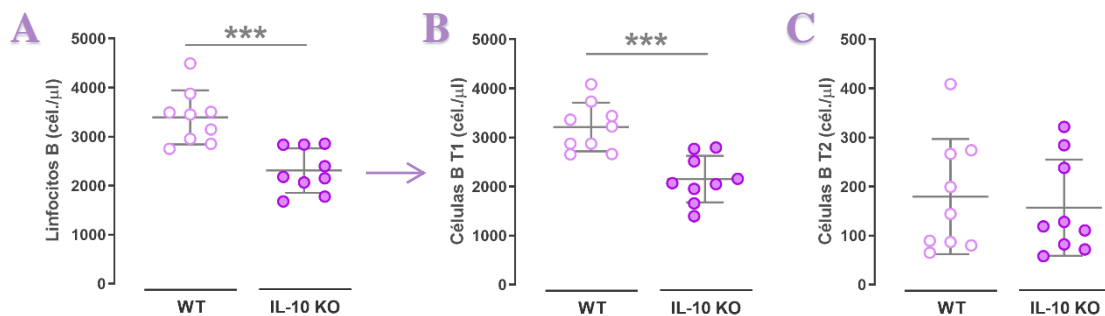


Figura 18. Concentración (células/ μ l) de **A**) linfocitos B y de las subpoblaciones de **B**) linfocitos B T1 y **C**) linfocitos B T2 en sangre de ratones WT e IL-10 KO. Las líneas representan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. *** $p \leq 0,001$.

Pese a que la concentración total de **linfocitos T** fue similar en ambos grupos de estudio, se observaron desequilibrios en la concentración y proporción de diversas subpoblaciones de estas células en el grupo IL-10 KO respecto al WT. En comparación con los ratones WT, los IL-10 KO mostraron ligeros, pero significativos cambios en las dos principales subpoblaciones de linfocitos T, aumentando la proporción de linfocitos T CD4+ ($p=0,019$) y disminuyendo la proporción de linfocitos T CD8+ ($p=0,047$) (**Figura 19A y B**). Respecto a los diferentes fenotipos madurativos de los linfocitos T CD4+ y CD8+ (*naïve*, memoria central (CMem), memoria efectora (EMem), y activados), no se observaron diferencias significativas entre las dos cepas de ratones, a excepción del aumento de la concentración y proporción de los fenotipos activados tanto de linfocitos T CD4+ como de CD8+ en los ratones IL-10 KO (**Figura 19A y B, Tabla 10**).

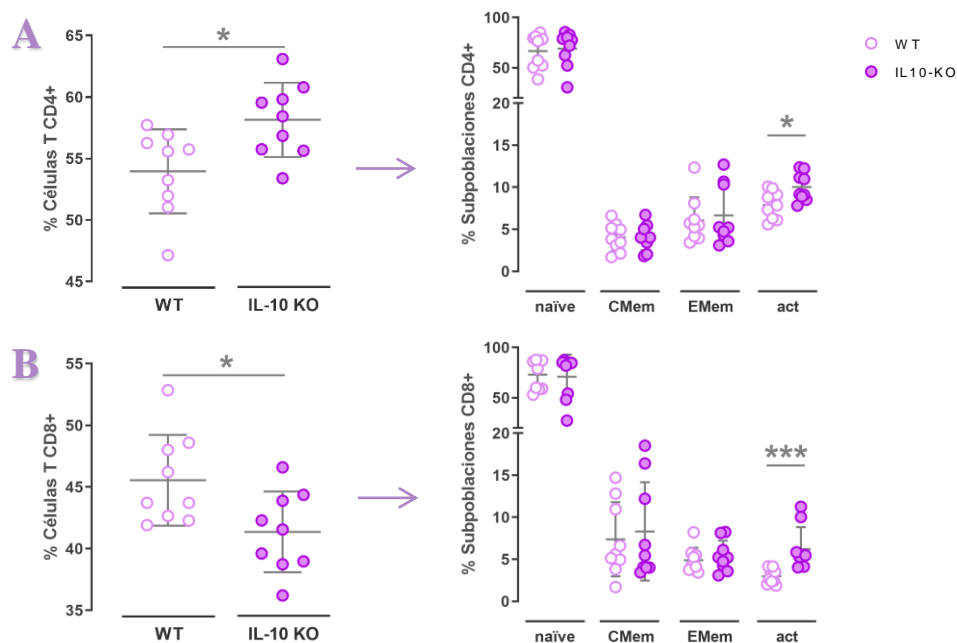


Figura 19. Proporción (%) de las subpoblaciones de linfocitos T **A)** CD4+ y **B)** CD8+ respecto al total de las células T y, en los paneles derechos, sus diferentes fenotipos de maduración (*naïve*, CMem, EMem y activadas) en ratones WT e IL-10 KO. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

El análisis multiparamétrico del panel dedicado al estudio de las células inmunitarias adaptativas también reveló importantes alteraciones en los diferentes fenotipos de la subpoblación de linfocitos T CD4+ *helper* (Th): Th1, Th2, Th9, Th17, Th22.

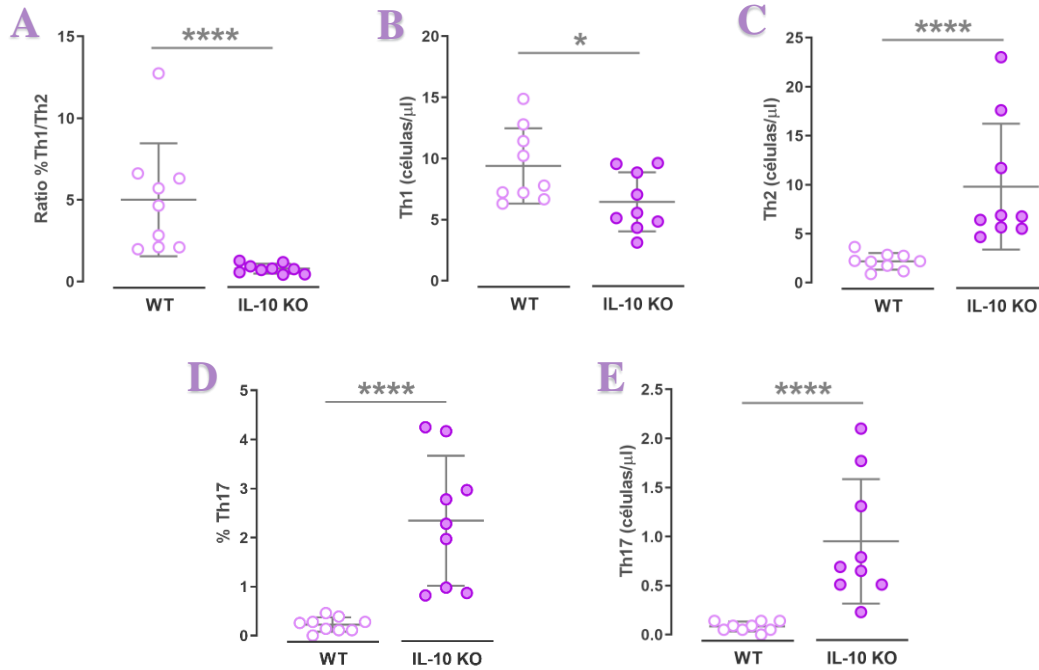


Figura 20. Evaluación de las subpoblaciones T CD4+ *Thelper* en muestras de sangre de ratones WT e IL-10 KO: **A)** ratio del porcentaje (%) Th1/Th2 respecto a los linfocitos T CD4+, concentración de linfocitos **B)** Th1 y **C)** Th2, **D)** proporción de linfocitos Th17 respecto a las células T CD4+ y **E)** concentración de linfocitos Th17. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,0001$.

Los ratones IL-10 KO mostraron una disminución de la concentración y porcentaje de las células Th1 y un importante aumento de las poblaciones Th2, resultando en una disminución de la relación Th1/Th2 (WT: 4,657 [2,104 - 6,471] vs. IL-10 KO: 0,7685 [0,5173 - 1,061], $p = <0,0001$), **Figura 20A, B y C; Tabla 9**Tabla 10). Asimismo, también presentaron aumento de la concentración y porcentaje de las células Th17 (**Figura 20D y E**) y de las células T reguladoras (Treg, **Figura 21**) en comparación con los ratones WT.

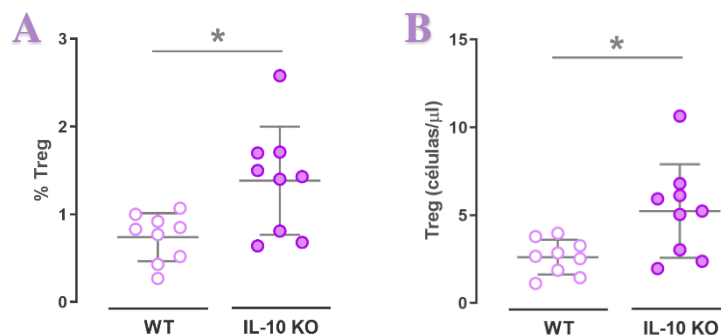


Figura 21. **A)** Porcentaje respecto al total de linfocitos T CD4+ y **B)** concentración de los linfocitos Treg, medidas por citometría de flujo en sangre de ratones WT e IL-10 KO. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

2. Utilidad del ratón reportero de Cre recombinasa mT/mG para la trazabilidad del tipo celular de origen de las VE.

2.a. Determinación en VEs del marcaje fluorescente endógeno en ratones reporteros mT/mG – Estudio in vitro.

2.a.1. Aislamiento y caracterización de hepatocitos primarios.

Para determinar si las VEs de los ratones reporteros mT/mG conservaban el marcaje fluorescente endógeno de las células de origen, evaluamos hepatocitos primarios aislados de las cepas de ratones C57BL/6 (como control de hepatocitos sin fluorescencia), mT/mG (hepatocitos con fluorescencia TdTomato), y AlbCre x mT/mG (hepatocitos con fluorescencia EGFP). Para ello, llevamos a cabo la perfusión del hígado con una solución de colagenasa seguida de un protocolo de aislamiento de hepatocitos primarios basado en centrifugaciones a baja velocidad y gradiente de Percoll.

La viabilidad de las células obtenidas se determinó mediante la medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de células recién purificadas (tiempo 0h) y una vez transcurridas 24 horas de cultivo (tiempo 24h). Como se observa en la **Figura 22**, la viabilidad de los hepatocitos fue excelente en ambos tiempos (tiempo 0h: 95,34% [93,76 – 97,95] vs. tiempo 24h: 93,02 % [87,31 – 95,05], $p=0,2500$).

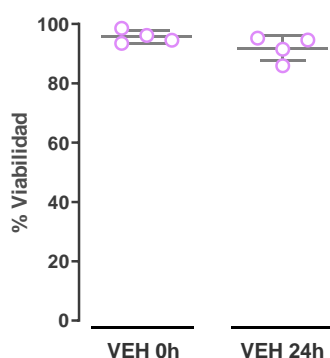


Figura 22. Viabilidad (%) de los hepatocitos primarios en condiciones basales (0h) y tras 24 h de cultivo. Test para medidas pareadas Wilcoxon. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Las células aisladas fueron analizadas mediante citometría de flujo con el fin de comprobar la expresión de la proteína fluorescente de manera endógena. Así, confirmamos la ausencia de fluorescencia en hepatocitos aislados de ratones C57BL/6, la expresión de fluorescencia TdTomato en los hepatocitos aislados de ratones mT/mG, y la fluorescencia EGFP en hepatocitos de ratones AlbCre x mT/mG (**Figura 23**).

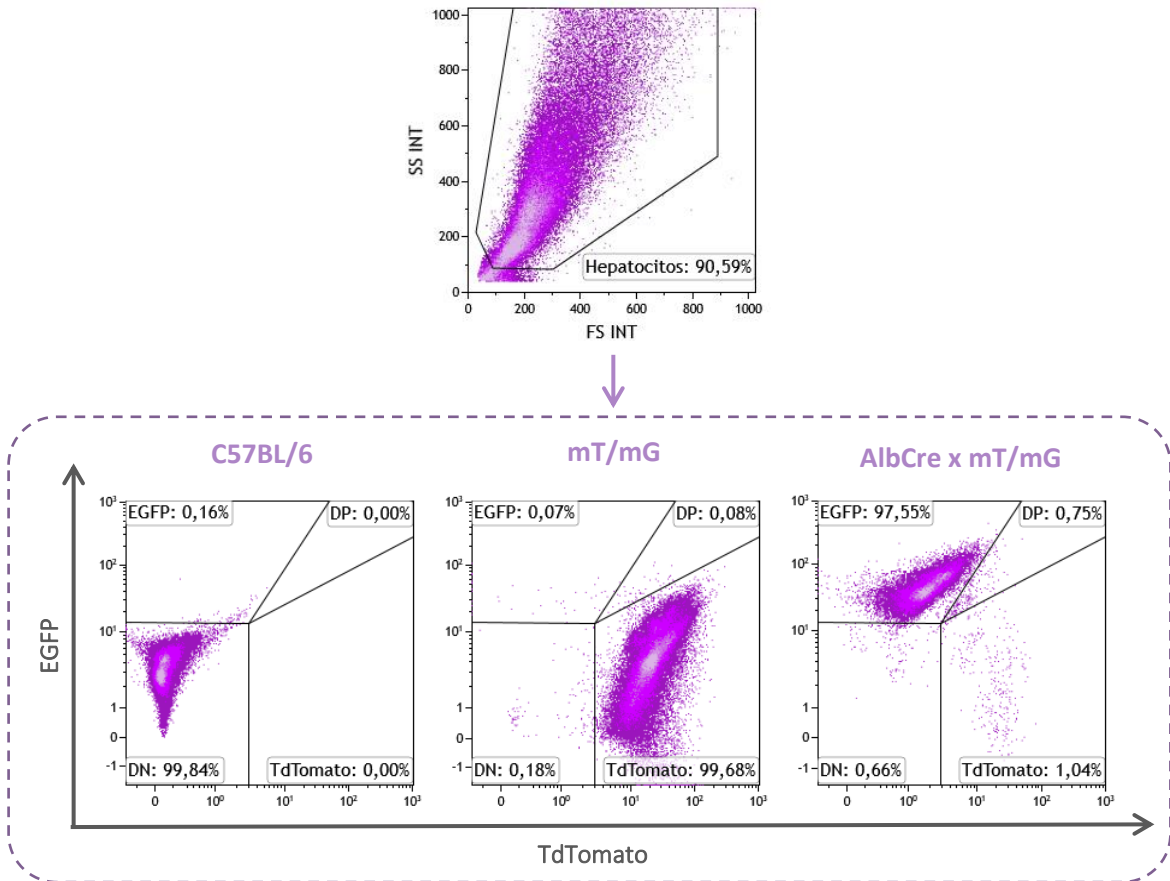


Figura 23. Dot plots representativos del análisis por citometría de flujo de la fluorescencia de los hepatocitos obtenidos de ratones C57BL/6, mT/mG, y AlbCre x mT/mG.

2.a.2. Aislamiento y caracterización por citometría de flujo de las VEs presentes en medio de cultivo de hepatocitos primarios.

Transcurridas 24 horas de cultivo, llevamos a cabo el aislamiento de las VEs secretadas al medio de cultivo por los hepatocitos primarios procedentes de las cepas de ratón C57BL/6, mT/mG y AlbCre x mT/mG mediante 3 técnicas distintas: ultracentrifugación (UC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y selección inmuno-magnética empleando el kit comercial *Exosome Isolation Pan Kit* (EXOKIT). Seguidamente, analizamos por citometría de flujo las VEs presentes tanto en el medio de cultivo

condicionado (CM) como en las fracciones purificadas por cada uno de los métodos utilizados, siguiendo la estrategia de reflejada en la **Figura 24**. Partiendo de la ventana de nanopartículas establecida por tamaño (FSC) y complejidad (SSC), las VEs se definieron como eventos positivos para FM4-64, sonda que marca bicapa lipídica. El análisis se realizó con amplificación hiper logarítmica, que permite visualizar las partículas de menor tamaño y el ruido electrónico del propio equipo.

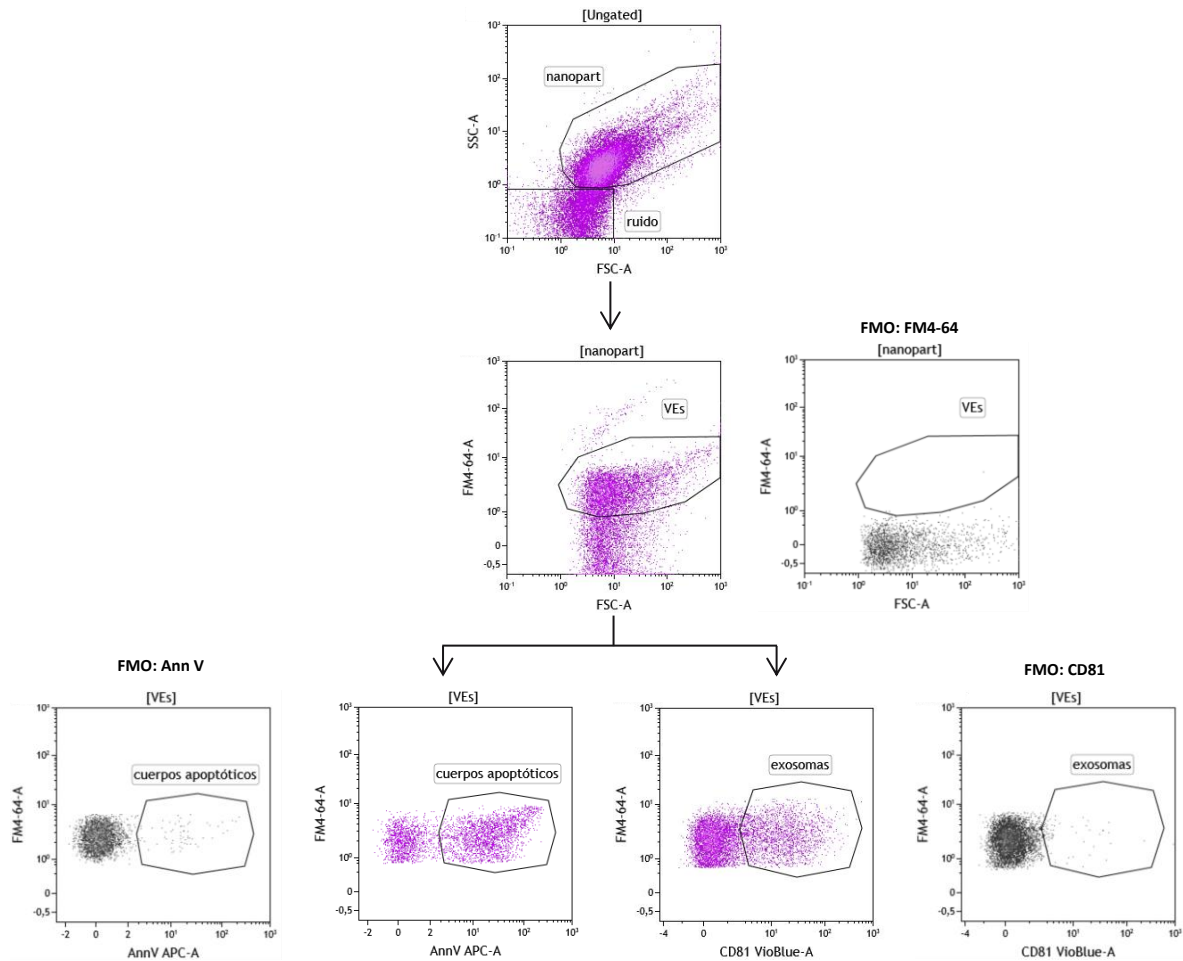


Figura 24. Estrategia de *gating* utilizada para analizar las vesículas extracelulares (VEs) presentes en los medios de cultivo y plasmas condicionados, así como en las fracciones de VEs purificadas por los diferentes métodos. Se muestran también los correspondientes controles FMO (*fluorescence minus one*, en gris) realizados para la puesta punto de FM4-64: marcador de VEs, Anexina V (AnnV): marcador de cuerpos apoptóticos, y CD81: marcador de exosomas.

Las técnicas de UC y la SEC obtuvieron porcentajes más elevados de VEs respecto al total de nanopartículas que el EXOKIT, sugiriendo un mayor enriquecimiento en VEs frente a otro tipo de nanopartículas (**Figura 25A**). La presencia de *microbeads* magnéticas (de 50 nm de diámetro), utilizadas en exceso en el método EXOKIT, podría explicar parcialmente el menor enriquecimiento en VEs con este método. Por otro lado, al analizar

la concentración de VEs se observó que la técnica de UC fue la única de las evaluadas que permitió aumentar la concentración de VEs de manera significativa (**Figura 25B**).

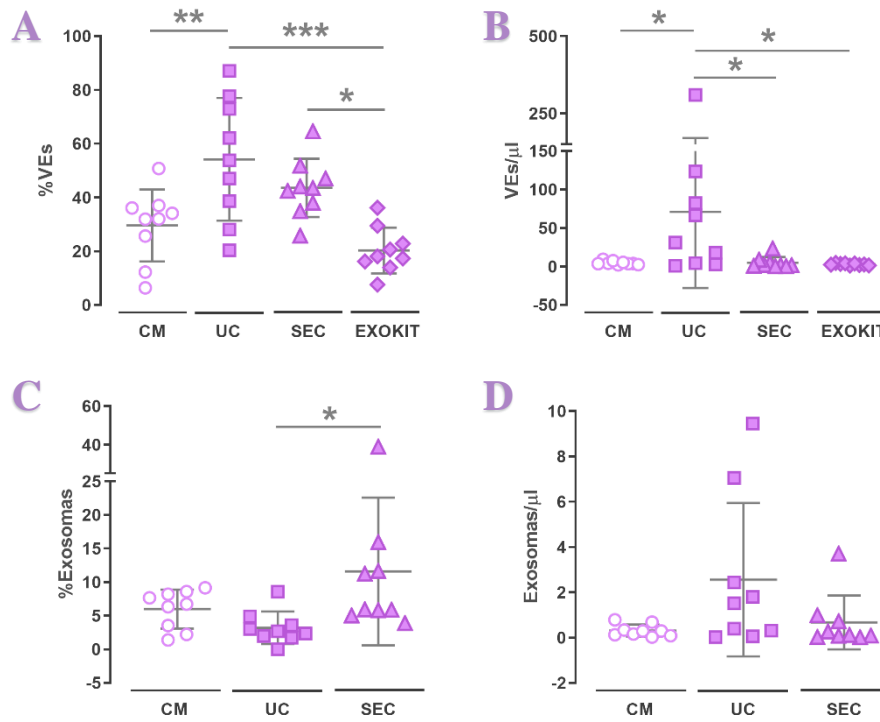


Figura 25. A) Porcentaje y **B)** concentración de VEs (eventos FM4-64+), y **C)** Porcentaje y **D)** concentración de exosomas (eventos FM4-64+ CD81+) evaluadas por citometría de flujo en medio condicionado (CM) de cultivo de hepatocitos primarios de ratón y tras su aislamiento por ultracentrifugación (UC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o selección inmuno-magnética (EXOKIT). One-way ANOVA para medidas repetidas con Tukey post-hoc. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Para caracterizar en profundidad las VEs aisladas, evaluamos el contenido en exosomas mediante el análisis de la expresión del marcador CD81. Las fracciones obtenidas con el EXOKIT no fueron evaluadas dado que las *microbeads* conjugadas con anticuerpos frente a las tetraspaninas CD81, CD63 y CD9, ocupan el epítipo de CD81 impidiendo, por tanto, el reconocimiento por parte del anticuerpo anti-CD81 conjugado con fluoróforo. La proporción de exosomas (FM4-64+ CD81+) respecto al total de nanopartículas fue superior en las fracciones SEC que en las obtenidas mediante la UC (**Figura 25C**). Sin embargo, la concentración de exosomas tendió a ser mayor en las fracciones obtenidas por UC ($p = 0,0851$ vs. CM, **Figura 25D**), probablemente debido a que el número de VEs/μl de partida era superior.

La técnica de citometría de flujo permitió evaluar si las VEs aisladas mediante los distintos métodos conservaban las proteínas fluorescentes correspondientes a sus células de origen en cada cepa de ratón. Para ello, evaluamos la presencia de fluorescencia

TdTomato o EGFP en la ventana de VEs. Como muestran los dot plots representativos (**Figura 26A**) y las gráficas siguientes (**Figura 26B y C**), las VEs conservaron la fluorescencia de su célula de origen independientemente del método de aislamiento utilizado, pero la proporción de VEs en las que se detectó la señal fluorescente endógena fue relativamente variable y menor al 50 % en prácticamente todos los casos. Por otro lado, la detección de señal en los canales fluorescentes correspondientes a los marcadores endógenos de los ratones reporteros, fue nula o despreciable en las muestras de los ratones C57BL/6.

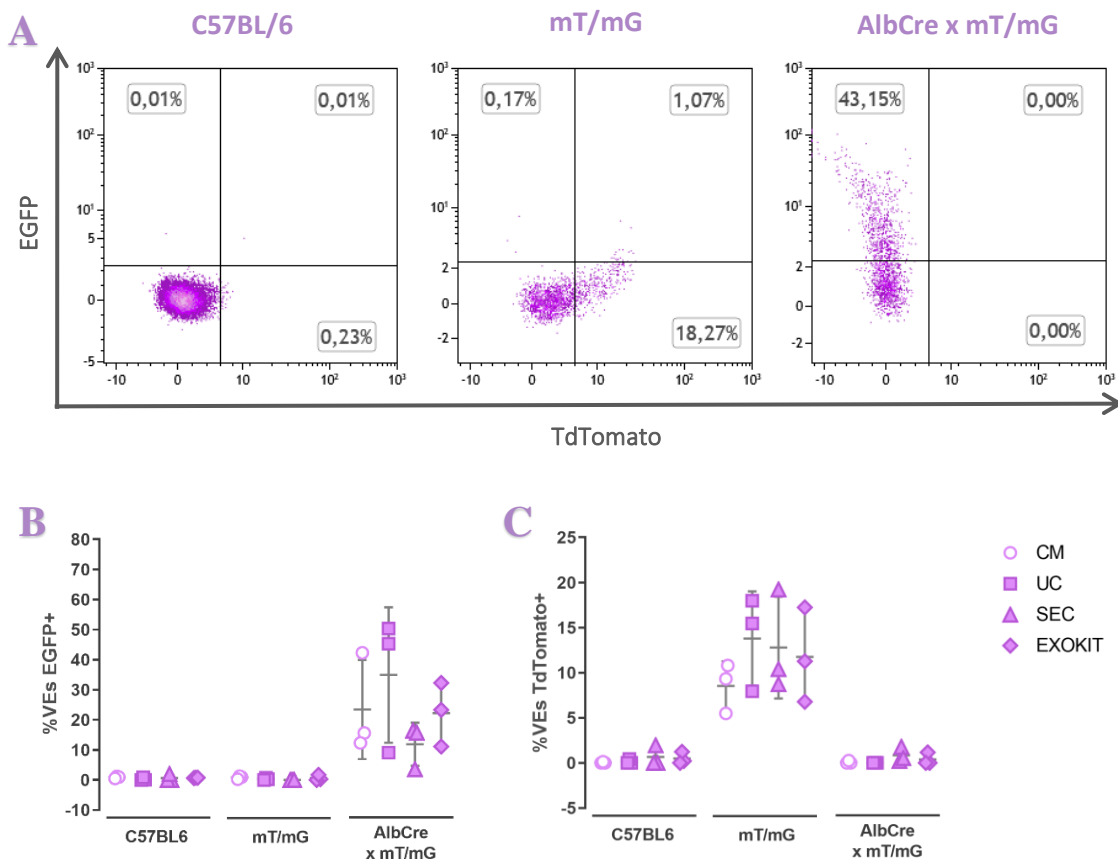


Figura 26. Análisis mediante citometría de flujo de la fluorescencia de las VEs (FM4-64+) en medio de cultivo (CM) o aisladas del mismo mediante diversos métodos, a partir de cultivos de hepatocitos primarios procedentes de ratones C57BL/6, mT/mG, y AlbCre x mT/mG. **A)** Dot plots representativos de VEs aisladas por UC de cada una de las cepas. Representación del porcentaje de vesículas **B)** EGFP+ y **C)** TdTomato+. One-way ANOVA para medidas repetidas con Tukey post-hoc. CM, medio condicionado, UC, ultracentrifugación, SEC, cromatografía de exclusión por tamaño, EXOKIT, kit de separación inmunomagnética.

2.a.3. Análisis del tamaño y la concentración de las VEs derivadas de hepatocitos primarios.

El análisis del tamaño y la concentración de las VEs aisladas mediante UC y SEC del medio de cultivo de los hepatocitos primarios se realizó utilizando la tecnología NanoSight, la cual se basa en la técnica de *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA). Las VEs aisladas por el método de selección inmuno-magnética se encontraban conjugadas con *microbeads*, impidiendo una correcta valoración con esta técnica dado que presentan el mismo tamaño que las VEs y no pueden discriminarse de éstas.

Las VEs aisladas mediante UC presentaron un diámetro mayor que las aisladas por SEC (108,5 nm [84,33 - 128,6] vs. 77,7 nm [76,05 - 88,75], $p=0,046$, **Figura 27A y C**). En concordancia con lo observado por citometría de flujo, la concentración de VEs también tendió a ser mayor cuando fueron aisladas mediante UC comparado con la SEC ($3,22 \times 10^9$ nanopartículas/ml [$4,27 \times 10^8 - 8,09 \times 10^9$] vs. $5,77 \times 10^8$ nanopartículas/ml [$1,84 \times 10^8 - 1,04 \times 10^9$], $p=0,1807$) (**Figura 27B**).

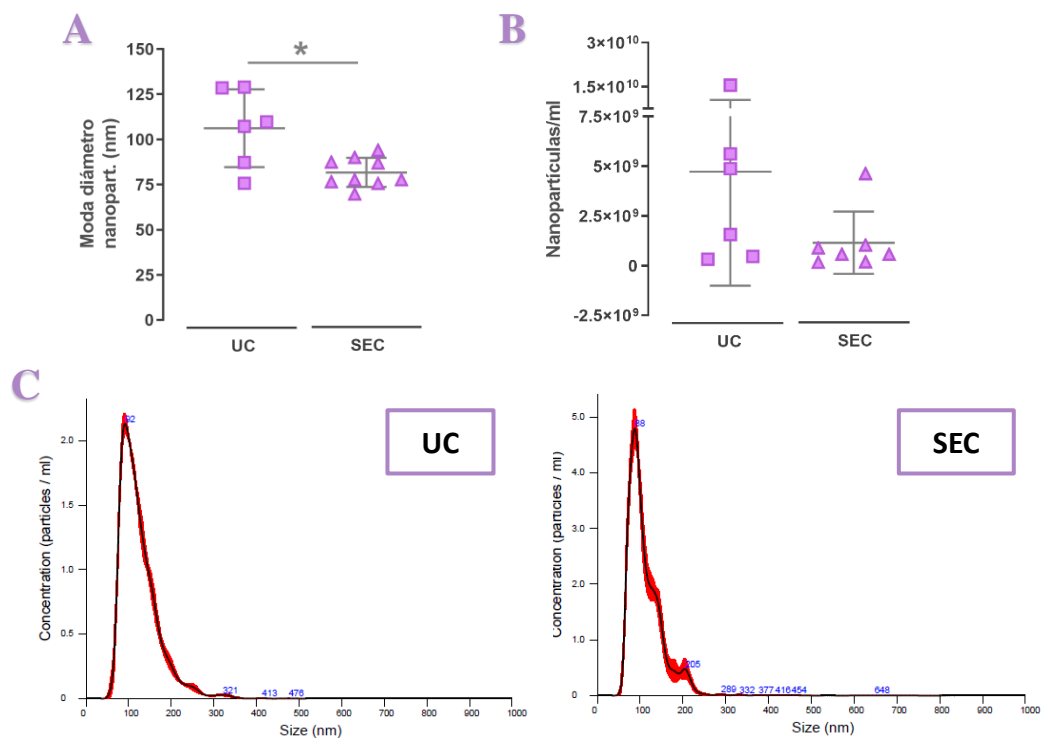


Figura 27. A) Tamaño y **B)** Concentración de las vesículas extracelulares (VEs) aisladas por ultracentrifugación (UC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) medidas por NTA (Nanosight). **C)** Gráficas representativas de la medición por NTA de una fracción de VEs aisladas por UC (izquierda) y SEC (derecha). Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

2.a.4. Caracterización de las VEs derivadas de hepatocitos mediante microscopía electrónica de transmisión y Western Blot

Para complementar la caracterización fenotípica y morfológica de las VEs procedentes de hepatocitos primarios aisladas mediante UC, realizamos microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la técnica de Western blot (WB).

Las imágenes obtenidas por TEM mostraron nanopartículas esféricas constituidas por una bicapa lipídica y con un tamaño inferior a los 200 nm de diámetro (**Figura 28**), corroborando los datos obtenidos mediante la técnica NTA.

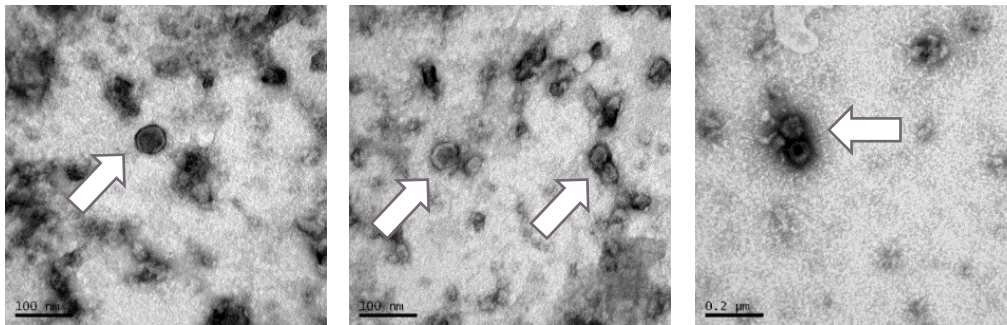


Figura 28. Imágenes representativas obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de vesículas extracelulares (VEs) aisladas mediante ultracentrifugación de medio de cultivo de hepatocitos primarios de ratón.

Para realizar la caracterización proteica de las VEs aisladas, analizamos la expresión de las proteínas CD81 (marcador de exosomas) y EGFP, proteína fluorescente expresada por los hepatocitos de la cepa de ratón AlbCre x mT/mG. Como control para ambas proteínas empleamos tejido hepático (LIV) de las cepas de ratones C57BL/6 (control negativo, sin fluorescencia endógena), y AlbCre x mT/mG (control positivo GFP). Las muestras aisladas mediante UC, tanto procedentes de ratones C57BL/6 como AlbCre x mT/mG, presentaron un claro aumento de expresión de CD81 respecto a las muestras del medio de cultivo condicionado (CM), confirmando una mayor concentración de VEs correspondientes presumiblemente a exosomas (**Figura 29**). Por otro lado, sólo observamos expresión de GFP en las muestras correspondientes a la cepa AlbCre x mT/mG. Asimismo, la señal de GFP también se detectó en la muestra de VEs obtenida mediante UC, apoyando la presencia de la proteína fluorescente EGFP en las VEs procedentes de los hepatocitos en cultivo.

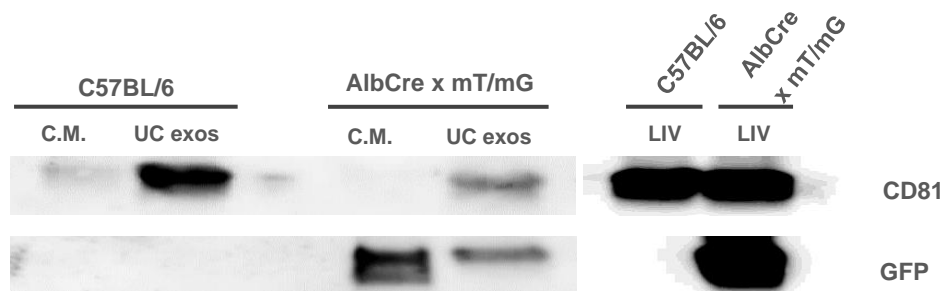


Figura 29. Análisis por Western blot de la expresión de las proteínas CD81 y GFP en muestras de medio de cultivo condicionado (CM) procedentes de hepatocitos primarios de las cepas de ratones C57BL/6 y AlbCre x mT/mG, en VEs aisladas del mismo mediante ultracentrifugación (UC exos), y en tejido hepático (LIV).

2.b. Evaluación de VEs circulantes derivadas de hepatocitos en ratones reporteros mT/mG - Estudio *in vivo*.

Para evaluar y caracterizar en ratones las VEs circulantes derivadas de hepatocitos *in vivo*, extrajimos mediante punción cardiaca sangre de ratones AlbCre x mT/mG tratados o no con anticuerpo Jo2 (anti-CD95, agonista de Fas) 24 horas antes. El anticuerpo Jo2 provoca apoptosis extensa de hepatocitos, por lo que sirvió como control de la contaminación por cuerpos apoptóticos en cada uno de los métodos de aislamiento de VEs utilizados. Tras obtener el plasma, llevamos a cabo el aislamiento de las VEs mediante UC y SEC, y caracterizamos mediante citometría de flujo las VEs tanto directamente en el plasma como tras aislarlas del mismo.

El análisis por citometría de flujo del plasma mostró que no había diferencias respecto a la proporción de VEs totales (FM4-64+) entre ratones tratados con el anticuerpo Jo2 y los controles (**Figura 30**). Aunque la proporción total de VEs fue similar, el porcentaje de VEs EGFP+ (VEs procedentes de hepatocitos) fue mayor en los ratones que recibieron Jo2 (1,75 [1,613 – 3,575] vs. 10,68 [7,425 – 12,26], $p=0,0286$ **Figura 30**). La proporción de VEs TdTomato+ (VEs liberadas por el resto de tipos celulares distintos al hepatocito) fue similar independientemente del tratamiento con anticuerpo Jo2 (**Figura 30**). Estos datos sugieren que la apoptosis de hepatocitos inducida por el anticuerpo Jo2 se acompaña de un aumento de la liberación de VEs al plasma por parte de estas células.

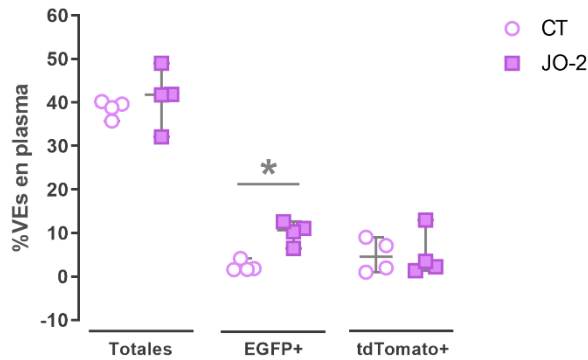


Figura 30. Proporción (%) de vesículas extracelulares (VEs) circulantes totales (eventos FM4-64+), de VEs EGFP+ y de VEs TdTomato+, en muestras de plasma de ratones AlbCre x mT/mG no tratados (control, CT) y tratados con anticuerpo Jo2, evaluada por citometría de flujo. Test U Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

Seguidamente, evaluamos por citometría de flujo las fracciones de VEs circulantes aisladas mediante UC y SEC, comparándolas con las muestras de plasma original. Los resultados muestran que ambas técnicas consiguen aumentar el enriquecimiento en VEs (% eventos FM4-64+) respecto al plasma original, siendo la SEC la técnica más eficiente (**Figura 31A**).

Las fracciones de VEs obtenidas por UC, pero no por la SEC, presentaron un mayor enriquecimiento en exosomas (FM4-64+ CD81+) respecto al plasma original (**Figura 31B**). Por otra parte, observamos un aumento de la proporción de cuerpos apoptóticos (definidos como VEs FM4-64+ AnnV+) en los ratones que recibieron Jo2 respecto a los ratones controles tanto al analizar el plasma original como en las muestras obtenidas por UC, pero dicho aumento no alcanzó significación estadística ($p = 0.309$) en las muestras obtenidas por la SEC (**Figura 31C**).

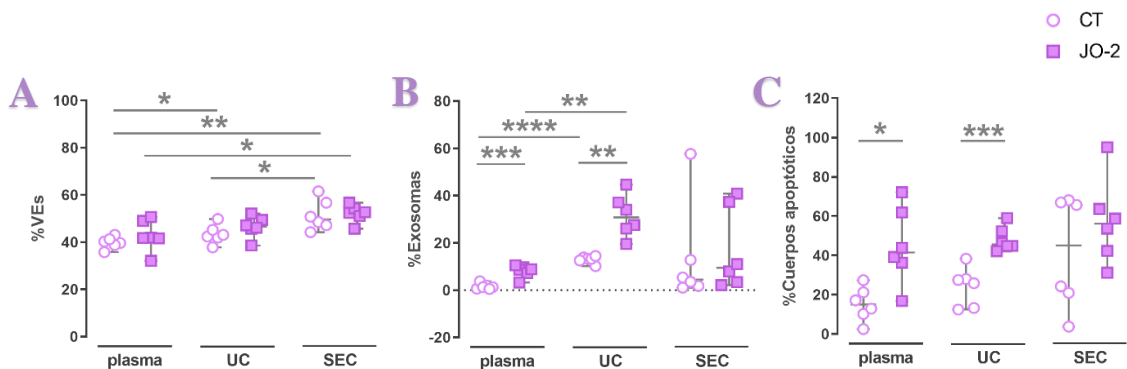


Figura 31. Análisis por citometría de flujo de las muestras de plasma, fracciones UC y SEC, tanto de la condición CT como JO-2. **A**) Porcentaje de eventos FM4-64+, las fracciones SEC presentan una proporción significativamente mayor de EVs que los plasmas originales. Dentro de las VEs, se analizaron **B**) los exosomas (CD81+) y **C**) los cuerpos apoptóticos (AnnV+). Two-Way ANOVA para medidas pareadas, con corrección de Geisser-Greenhouse, seguido de Uncorrected Fisher's LSD post-hoc. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

En cuanto al análisis de la concentración, observamos una gran variabilidad intragrupo tanto de los valores de VEs totales (FM4-64+) como de exosomas (FM4-64+ CD81+) y de cuerpos apoptóticos (FM4-64+ AnnV+) en las diferentes muestras analizadas (plasma, UC y SEC) en ambos grupos de estudio, lo que probablemente impidió detectar diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones realizadas (**Figura 32A-C**).

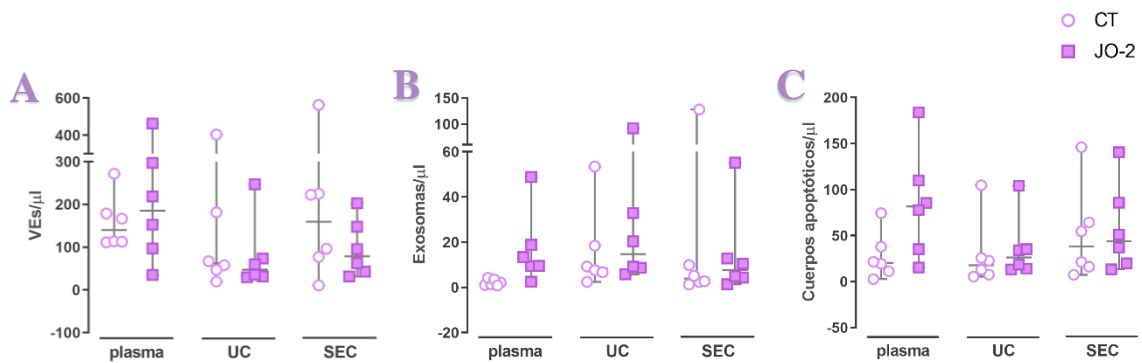


Figura 32. Concentración de **A**) VEs totales (FM4-64+), de **B**) exosomas (CD81+) y de **C**) cuerpos apoptóticos (AnnV+), medidos por citometría de flujo, de las muestras de plasma y de las fracciones obtenidas por UC y SEC procedentes de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron una inyección de anticuerpo Jo2 (JO-2) o de ratones controles (CT). Two-Way ANOVA para medidas pareadas, con corrección de Geisser-Greenhouse, seguido de Uncorrected Fisher's LSD post-hoc.

Por otro lado, la caracterización por NTA de las fracciones de VEs aisladas por UC y por SEC demostró que ambas técnicas aislaron partículas de un diámetro similar independientemente del tratamiento con el anticuerpo Jo2 (**CT-UC**: 101 nm [81-110] vs. **CT-SEC**: 102 nm [78-128] vs. **Jo2-UC**: 93 nm [86-96] vs. **Jo2-SEC**: 87 nm [76-95], **Figura 33A**). Tampoco observamos diferencias en la concentración de nanopartículas entre los grupos de muestras analizadas mediante el NTA (**CT-UC**: $1,64 \times 10^9/\mu\text{l}$ [$1,03 \times 10^9$ - $6,31 \times 10^9$] vs. **CT-SEC**: $1,03 \times 10^{10}/\mu\text{l}$ [$3,69 \times 10^9$ - $2,00 \times 10^{10}$] vs. **Jo2-UC**: $1,12 \times 10^{10}/\mu\text{l}$ [$4,76 \times 10^9$ - $2,08 \times 10^{10}$] vs. **Jo2-SEC**: $1,30 \times 10^{10}/\mu\text{l}$ [$7,38 \times 10^9$ - $1,62 \times 10^{10}$], **Figura 33B**).

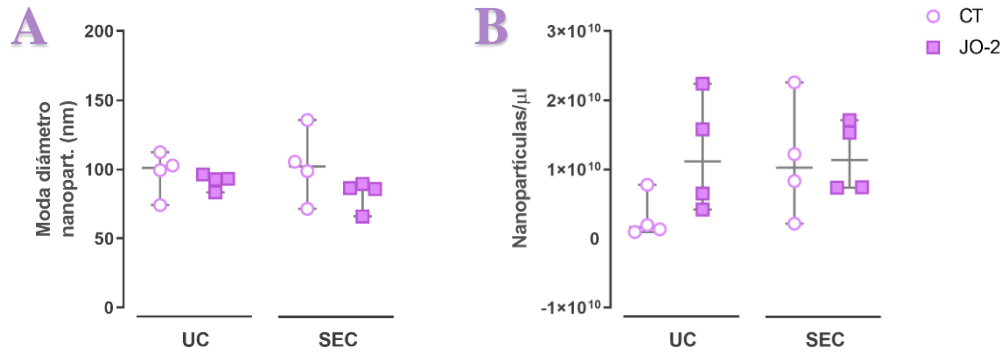


Figura 33. A) Tamaño (moda del diámetro) y **B)** concentración (μl) de las nanopartículas aisladas mediante ultracentrifugación (UC) o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) a partir de muestras de plasma de ratones AlbCre x mT/mG controles (CT) o tratados con una dosis de anticuerpo Jo2 (JO-2). El análisis de ambos parámetros se realizó por NTA. Modelo de efectos mixtos para medidas repetidas con Uncorrected Fisher's LSD post-hoc.

2.c. Evaluación de métodos de aislamiento de VEs marcadas con EGFP, específicas de tipo celular.

El aislamiento de VEs que expresen EGFP en ratones AlbCre x mT/mG es uno de los objetivos principales de este trabajo, ya que permitiría analizar con gran especificidad las VEs liberadas por los hepatocitos en un organismo vivo. Con este fin, utilizamos la técnica de separación inmuno-magnética con microesferas conjugadas a anticuerpos contra la proteína GFP.

En un primer experimento, muestras de plasma de ratones AlbCre x mT/mG controles (CT) o que recibieron una dosis de anticuerpo Jo2 (JO-2) fueron incubadas con las *microbeads* anti-GFP, y analizamos por citometría de flujo tanto el plasma original (PRE) como las fracciones post-aislamiento GFP+ (POST). Como muestra la **Figura 34**, las microesferas enriquecieron la muestra en VEs EGFP+ tanto en la condición CT como en la JO-2, consiguiendo a su vez eliminar la señal tdTomato en ambas condiciones.

Aunque la técnica de separación inmuno-magnética permitió separar nanopartículas que expresaban EGFP directamente desde el plasma, es probable que este protocolo directo pudiese arrastrar también nanopartículas EGFP+ que no fuesen VEs (como fragmentos de membrana de hepatocitos dañados, cuerpos apoptóticos, etc), particularmente en ratones con daño hepático. Para determinar qué método podía aislar VEs EGFP+ de forma más específica, realizamos la selección inmuno-magnética con microesferas frente a GFP partiendo tanto de muestras de plasma como de VEs aisladas previamente mediante UC

y SEC de ratones AlbCre x mT/mG controles (CT) o tratados con una dosis de anticuerpo Jo2 (JO-2). Las fracciones obtenidas las analizamos mediante citometría de flujo.

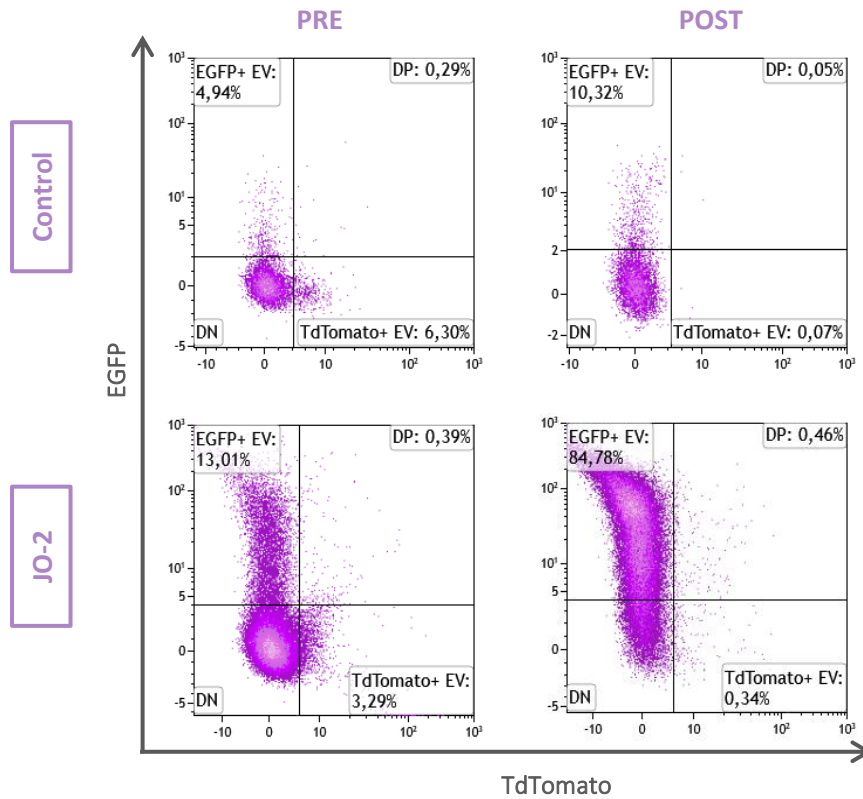


Figura 34. Dot plots representativos del análisis por citometría de flujo de las vesículas extracelulares (FM4-64+) de las muestras PRE y POST aislamiento de las vesículas EGFP+ utilizando las microesferas anti-GFP.

La proporción de VEs totales (FM4-64+) fue mayor en las fracciones obtenidas combinando la UC o la SEC con las microesferas anti-GFP que con la exposición directa del plasma a las microesferas (**Figura 35A**). Entre la población de VEs, la proporción de exosomas (FM4-64+ CD81+) aislados también fue mayor en las estrategias combinadas con UC o con SEC que en la incubación directa de las microesferas con el plasma, siendo la combinación UC-GFP+ la que mayor porcentaje de exosomas obtuvo (**Figura 35B**). La proporción de cuerpos apoptóticos (FM4-64+ AnnV+) tendió a ser mayor en los ratones que recibieron Jo2 excepto para las muestras aisladas mediante la combinación UC-GFP+, las cuales presentaron porcentajes de VEs FM4-64+ AnnV+ significativamente menores a las otras técnicas y similares a los ratones que recibieron suero salino en lugar de Jo2 (**Figura 35C**).

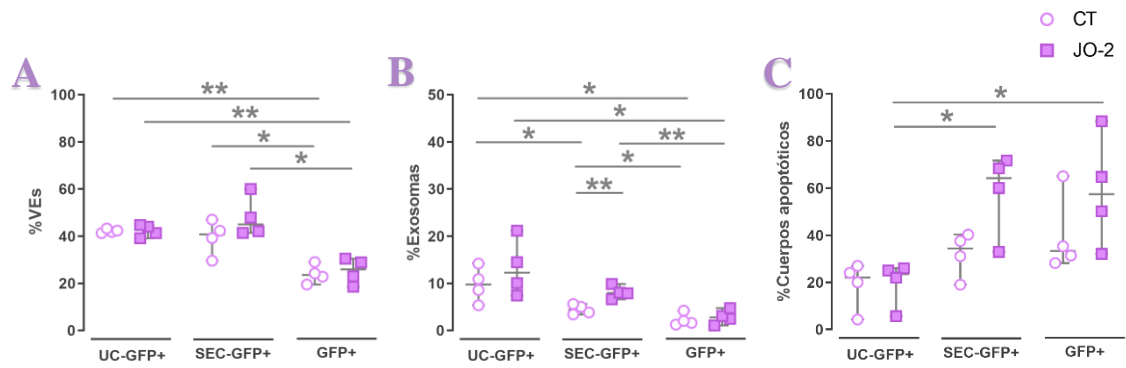


Figura 35. Comparación de diversos protocolos de aislamiento de vesículas extracelulares (VEs) EGFP+ empleando *microbeads* anti-GFP: UC-GFP+, SEC-GFP+, GFP+ partiendo de muestras de plasma de ratones AlbCre x mT/mG tratados o no con Jo2. Representación del porcentaje de **A**) VEs totales (FM4-64+), **B**) exosomas (CD81+) y **C**) cuerpos apoptóticos (AnnV+) obtenidos por citometría de flujo. Two-Way ANOVA para medidas pareadas, con corrección de Geisser-Greenhouse, seguido de Uncorrected Fisher's LSD post-hoc. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Respecto a la concentración tanto de VEs totales como de exosomas y cuerpos apoptóticos, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos y protocolos de aislamiento evaluados (**Figura 36A-C**).

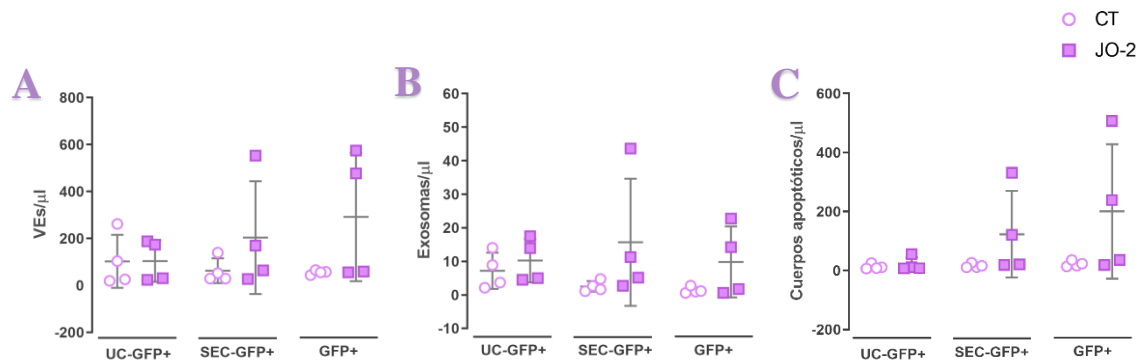


Figura 36. Concentración medida por citometría de flujo de las muestras procedentes de ratones AlbCre x mT/mG tratados o no con Jo2, obtenidas del aislamiento de EGFP+ VEs por UC-GFP+, SEC-GFP+, GFP+, de **A**) VEs (FM4-64+) **B**) exosomas (CD81+) y **C**) cuerpos apoptóticos (AnnV+). Two-Way ANOVA para medidas pareadas, con corrección de Geisser-Greenhouse, seguido de Uncorrected Fisher's LSD post-hoc. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Finalmente, analizamos la expresión de las proteínas fluorescentes EGFP y tdTomato en las fracciones de VEs aisladas por las tres estrategias descritas, comprobando que la selección con microesferas anti-GFP se acompañó en todos los casos de la pérdida de señal de la longitud de onda procedente de la proteína tdTomato (**Figura 37**).

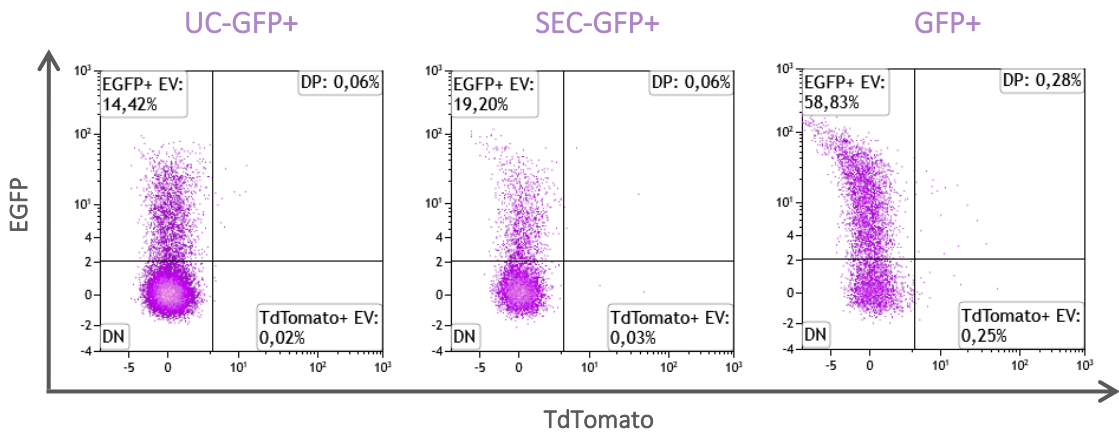


Figura 37. Dot plots representativos del análisis de las fluorescencias EGFP y tdTomato dentro del gate de vesículas (FM4-64+) de las muestras obtenidas tras los diferentes métodos de aislamiento de VEs EGFP+ empleados: UC-GFP+, SEC-GFP+ y GFP+.

3. Efecto del daño hepático agudo por paracetamol sobre el perfil inmunológico y las VEs procedentes de hepatocitos en ratones.

3.a. Caracterización histológica y bioquímica del modelo de daño agudo por paracetamol (APAP) en ratones AlbCre x mT/mG.

Para evaluar el impacto del daño hepático agudo sobre las células inmunes circulantes y sobre las VEs derivadas de hepatocitos, empleamos el modelo de daño hepático inducido por una dosis subletal de paracetamol (APAP, 300 mg/kg) en ratones reporteros AlbCre x mT/mG. Los experimentos se finalizaron a las 24 h de la inyección, y el daño hepático se confirmó tanto por parámetros bioquímicos como histológicos.

Comparado con los ratones controles que recibieron suero salino, los ratones que recibieron APAP presentaron importantes elevaciones de las transaminasas ALT (130,5 U/l [37,5 – 204,8] vs. 1660 U/l [936,5 - 2748], $p= 0,0022$) y AST (180 U/l [109,5 - 255] vs. 888 U/l [517,5 - 1385], $p= 0,0022$), y de la LDH (1206 U/l [673,5 – 1598] vs. 4796 U/l [3555-6965], $p= 0,0022$) (**Figura 38A-C**). El resto de los parámetros de bioquímica sanguínea analizados fueron similares en ambos grupos de ratones (**Figura 38D**).

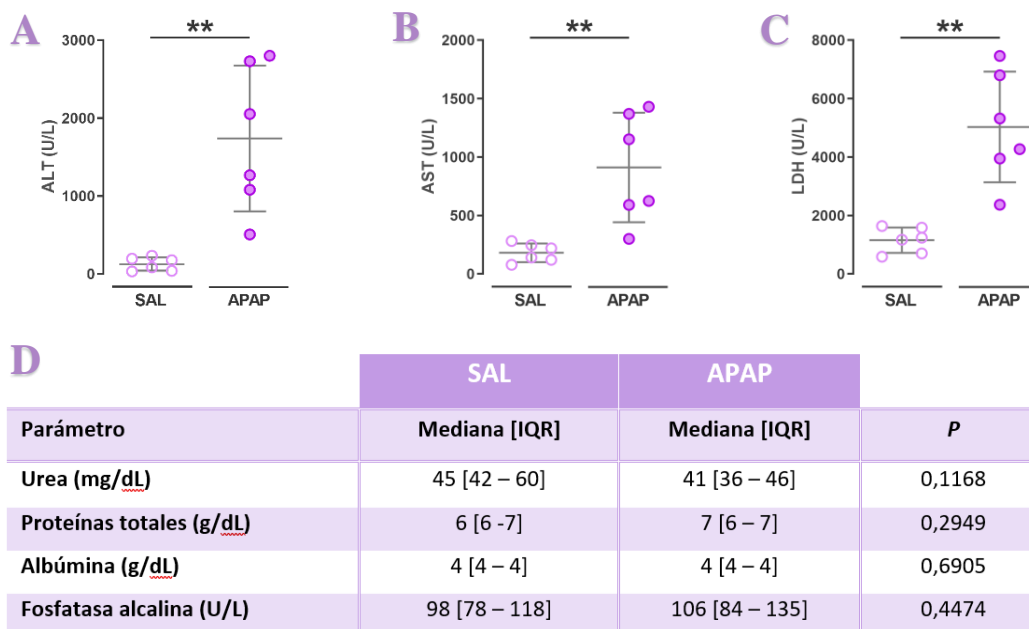


Figura 38. Concentración sérica de las enzimas hepáticas en ratones AlbCre x mT/mG a las 24 horas tras la administración de suero salino (SAL) o paracetamol (APAP): **A**) Alanina aminotransferasa (ALT), **B**) Aspartato aminotransferasa (AST) y **C**) Lactato deshidrogenasa (LDH). Se muestra la media y la DS. **D**) Tabla con la concentración sérica del resto de parámetros medidos: urea, proteínas totales, albúmina y fosfatasa alcalina. Se muestra la mediana, el rango intercuartílico y el P valor. Test U de Mann-Whitney. ** $p \leq 0,01$

El examen histológico de secciones de hígado teñidas con hematoxilina y eosina confirmó los resultados de la bioquímica sanguínea, mostrando la presencia de daño hepático y distintos grados de necrosis hepatocelular centrolobular y hemorragia sinusoidal en los ratones que recibieron APAP frente a la histología hepática normal presente en los ratones que recibieron suero salino (**Figura 39**).

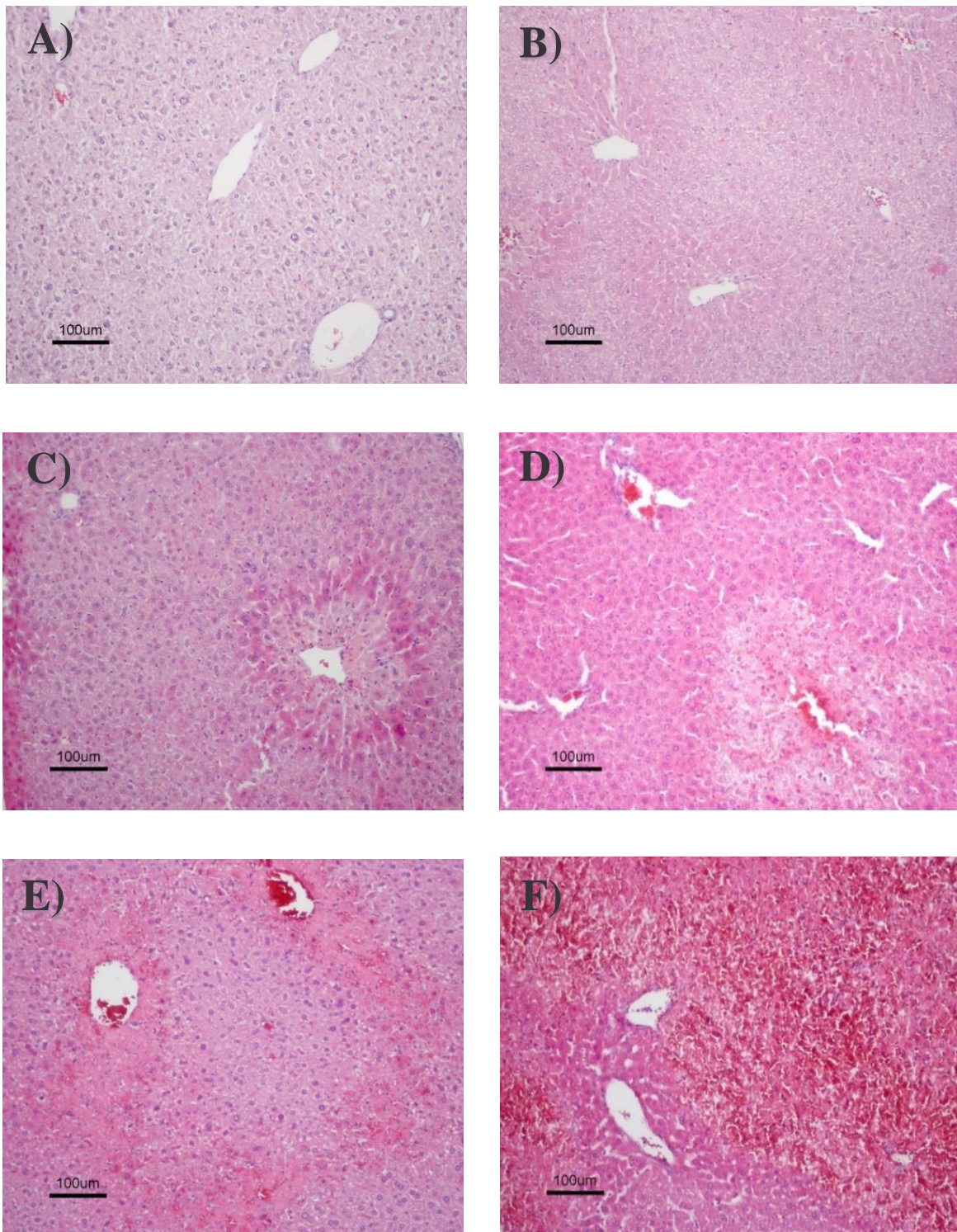


Figura 39. Imágenes representativas de los distintos grados de necrosis hepatocelular observadas en las secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina del hígado de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). **A)** Grado 0: morfología hepática normal en un ratón SAL. **B)** Grado 1: eosinofilia y signos sugestivos de daño hepatocelular (picnosis) en hepatocitos pericentrales. **C)** Grado 2: necrosis evidente en los hepatocitos pericentrales y áreas con signos de eosinofilia y edema en el margen próximo. **D)** Grado 3: área de necrosis de hepatocitos pericentrales extendida. **E)** Grado 4: áreas de necrosis creando puentes entre zonas pericentrales. **F)** Grado 5: áreas hemorrágicas y con necrosis confluyente extensa. Barra de calibración = 100µm.

El APAP indujo un aumento del índice de necrosis hepatocelular (**Figura 40A**), el cual además mostró una estrecha correlación positiva con la concentración sérica de ALT (**Figura 40B**, $r^2 = 0,8856$, $p < 0,0001$).

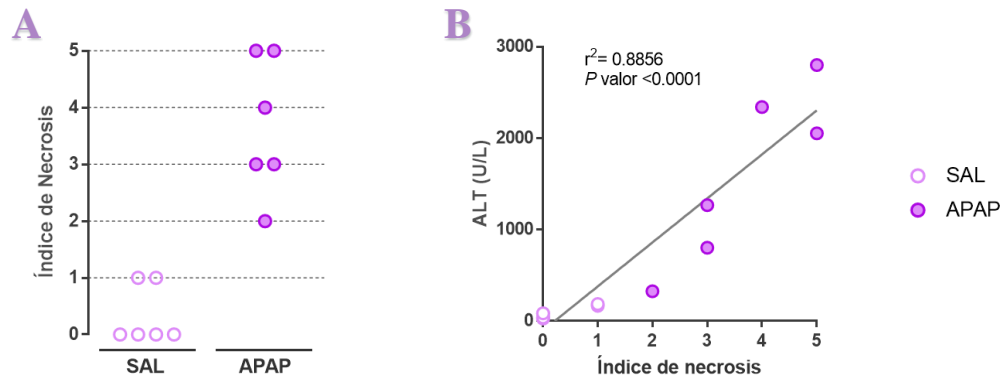


Figura 40. **A)** Representación de la puntuación otorgada en función del grado de necrosis hepatocelular a las secciones de tejido hepático de ratones APAP y SAL. **B)** Correlación entre concentración de la alanina aminotransferasa (ALT) sérica y el índice histológico de necrosis hepatocelular. Test de correlación de Pearson.

3.b. Efecto del daño hepático agudo por APAP sobre el perfil inmunológico celular sanguíneo en ratones AlbCre x mT/mG.

Los ratones AlbCre x mT/mG son una cepa reportera de linaje celular de doble fluorescencia, es decir, todas sus células expresan proteínas fluorescentes en su membrana: EGFP en el caso de los hepatocitos y la proteína tdTomato en el resto de las células, incluyendo las células del sistema inmune. La proteína tdTomato se excita por una longitud de onda (λ) de 554 nm y emite una señal de 581 nm (Shaner et al., 2004). Dado que nuestro citómetro no dispone del láser amarillo ($\lambda = 561$ nm) adecuado para excitar la proteína tdTomato, es el láser azul ($\lambda = 488$ nm) el encargado de ello y, por tanto, su señal es detectada por el filtro canal B2 ($\lambda = 579/34$ nm). Esto implica que los anticuerpos conjugados con el fluoróforo ficoeritrina (PE) compiten con la proteína endógena tdTomato de los ratones AlbCre x mT/mG y, por consiguiente, no se pueden emplear para caracterizar el sistema inmunológico en esta cepa de ratón. Por este motivo, realizamos una serie de modificaciones en los paneles de anticuerpos diseñados para estudiar las células inmunes circulantes mediante citometría de flujo en los ratones AlbCre x mT/mG.

Puesto que la viabilidad de las muestras de sangre utilizadas en la comparativa de ratones C57BL/6 e IL-10 KO fue superior al 95% (Objetivo 1), retiramos de los paneles el yoduro de propidio (PI) para evitar un mayor solapamiento puesto que se detecta en el canal adyacente (B3). De igual manera, eliminamos los anticuerpos conjugados con el fluoróforo ficoeritrina (PE, canal B2), realizando una serie de modificaciones en el diseño de los paneles. La **Tabla 11** muestra los paneles de anticuerpos finales utilizados para evaluar el sistema inmune de los ratones AlbCre x mT/mG. Esta reestructuración permitió, con una estrategia de *gating* similar, el análisis de todas las poblaciones y fenotipos incluidos en los paneles originales a excepción de las células Treg.

El uso de la citometría de flujo multiparamétrica con los paneles de anticuerpos desarrollados permitió evaluar el efecto del daño hepático agudo inducido por APAP sobre las poblaciones de células inmunes circulantes tanto pertenecientes a la inmunidad innata como a la adaptativa. Al igual que en los resultados del Objetivo 1, se obtuvieron datos tanto en porcentaje como en términos de concentración (células/ μ l), tal y como reflejan las **Tabla 12** y **Tabla 13**.

Panel Respuesta Inmune Adaptativa

Canal	Anticuerpos	Fenotipos	
V1 – VioBlue	CCR4 (CD194)	Linfocitos T	CD3+
V2 – VioGreen	CD4	T CD4+	CD4+
V3 - BV570	B220	T CD8+	CD4-
V4 - BV605	CCR6 (CD196)	<i>Naïve</i>	CD44- CD62L+
V5 - BV650	CD21/CD35	Memoria Central	CD44+ CD62L+
B1 – FITC	CD25	Memoria Efectora	CD44+ CD62L-
B2 – PE		Activadas	CD25+
B3 - PE-Vio615		Th1	CD44+ CCR4+ CCR6+ CXCR3+
B4 - PerCP/PC5	CD62L	Th2	CD44+ CCR4+ CCR6+
B5 - PC5.5	CD3	Th17	CD44+ CCR4+ CCR6+ IL-23R+
B6 - PC7	CD138	Th9	CD44+ CCR4- CCR6+
R1 – APC	IL-23R	Th22	CD44+ CCR4+ CCR6+ IL-23R-
R2 - APC5	CD44	Linfocitos B	CD3- B220+
R3 - APC7	CXCR3 (CD183)	Transicional tipe 1	CD21- CD23-
		Transicional tipe 2	CD21high CD23high
		Plasmablastos	B220 low/- CD138+

Panel Respuesta Inmune Innata

Canal	Anticuerpos	Fenotipos	
V1 – VioBlue	Siglec-F	Células Mieloides	LIN- CD11b+
V2 – VioGreen	MHCII	Monocitos	Ly6C+ F4/80+
V3 - BV570	CD19	<i>Mo patrolling</i>	CCR2-
V4 - BV605	Ly6G	<i>Mo proinflam</i>	CCR2+
V5 - BV650	NK1.1	Inmadura	Ly6Chigh
B1 – FITC	F4/80	Madura	Ly6Clow
B2 – PE		Células dendríticas	CD11c+ CD123+
B3 - PE-Vio615		DC madura	MHCII+
B4 - PerCP/PC5	Ly6C	DC inmadura	MHCII-
B5 - PC5.5	CD11b	Granulocitos	Ly6C/Gr-1+
B6 - PC7	CCR2	Eosinófilos	Siglec-F+
R1 – APC	CD49b	Basófilos	CD49b+
R2 - APC5	CD3	Neutrófilos	Ly6G+
R3 - APC7	CD11c	NK	CD3- NK1.1+
		NKT	CD3+ NK1.1+

Tabla 11. Paneles de anticuerpos para analizar por citometría de flujo multiparamétrica las poblaciones del sistema inmunológico responsables de la respuesta inmune innata y adaptativa de ratones de la cepa AlbCre x mT/mG en muestras de sangre total.

Fenotipos	SAL			APAP			P valor
	Mediana	Q1	Q3	Mediana	Q1	Q3	
Linfocitos	81,33	61,89	88,99	44,53	27,79	54,6	0,0286
Linfocitos T	9,625	4,475	12,15	15,7	13,31	19,38	0,0286
T CD4+	44,59	40,96	47,84	40,86	35,04	43,72	0,3429
naïve CD4+	33,84	15,87	40,68	39,86	20,81	60,11	0,4857
CMem CD4+	4,92	3,965	5,695	4,575	1,55	8,748	0,8857
EMem CD4+	10,33	6,295	19,13	7,83	6,83	8,665	0,6857
act CD4+	16,72	14,13	17,52	19,43	17,93	23,32	0,0286
Th1	25,52	17,3	31,69	18,93	12,12	25,58	0,3429
Th2	5,585	4,868	8,35	14,78	10,63	20,65	0,0286
Th17	0,075	0	0,3225	0,675	0,6125	0,9625	0,0286
Th22	0,2	0,0375	0,64	0,3	0	0,675	0,9143
Th9	2,72	0,9475	3,623	1,75	0	4,768	0,8
T CD8+	54,3	51,86	55,1	58,03	55,98	63,91	0,0286
naïve CD8+	31,75	19,43	44,39	40,67	19,71	54,04	0,6857
CMem CD8+	15,81	5,868	22,12	14,49	4,633	18,42	0,6857
EMem CD8+	16,82	13,48	26,72	21,87	16,26	24,95	0,6857
act CD8+	6,1	1,898	7,723	11,16	8,225	13,69	0,0286
Linfocitos B	70,3	63,67	78,67	48,45	27,55	49,01	0,0286
Células B T1	65,44	48,87	71,19	62,59	59,73	65,26	0,6857
Células B T2	34,56	28,81	51,09	37,42	34,75	40,27	0,6857
Plasmablastos	4,83	2,493	5,683	6,82	6,103	7,86	0,0286

Fenotipos	SAL			APAP			P valor
	Mediana	Q1	Q3	Mediana	Q1	Q3	
Células Mieloides	6,045	4,858	7,053	17,33	13,14	23,07	0,0286
Granulocitos	28,75	26,67	31,99	45,12	35,64	60,2	0,0286
Neutrófilos	75,75	60,34	78,52	89,12	82,17	90,94	0,0286
Eosinófilos	1,51	0,7525	4,323	0,775	0,54	2,72	0,4857
Basófilos	7,185	4,665	8,093	2,865	1,278	3,47	0,0286
Monocitos	50,1	48,8	55,97	44,64	28,88	46,4	0,0286
<i>patrolling Mo</i>	19,19	8,88	75,83	13,87	5,678	51,24	0,6857
Mo proinfl. inmat.	66,92	19,14	76,24	69,52	42,5	76,09	0,8857
Mo proinfl. mat.	12,68	4,353	13,19	15,46	4,98	17,58	0,2
Células Dendríticas	5,505	1,728	5,93	0,76	0,36	1,28	0,1143
DC inmaduras	38,07	29,82	49,33	13,86	7,48	18,22	0,0286
DC maduras	14,29	12,23	14,93	13,7	6,66	15,79	>0,9999
NK	2,57	1,17	4,075	3,77	2,418	4,755	0,3429
NKT	0,615	0,3675	1,358	1,47	0,55	2,488	0,3429

Tabla 12. Proporción (% , mediana, IQR) de cada tipo celular en sangre de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP), determinada mediante citometría de flujo con los paneles para el sistema inmune adaptativo (arriba) e innato (abajo). Cada proporción se refiere al fenotipo de categoría superior. Test U de Mann-Whitney.

Fenotipos	SAL			APAP			P valor
	Mediana	Q1	Q3	Mediana	Q1	Q3	
Linfocitos	3778,62	2342,39	5106,87	804,625	720,72	859,97	0,0286
Linfocitos T	364,07	72,33	646,33	134,12	97,25	146,53	0,3429
T CD4+	153,58	35,23	292,41	50,725	43,31	56,79	0,3429
naïve CD4+	51,94	4,11	114,57	21,91	7,7	28,37	0,3429
CMem CD4+	7,14	2,05	13,3	2,52	0,37	4,29	0,0286
EMem CD4+	14,93	7,33	23,71	4,085	2,89	4,76	0,1429
act CD4+	24,385	5,79	49,75	9,73	8,73	11,85	0,3429
Th1	6,065	1,45	10,55	1,305	0,47	2,1	0,0571
Th2	1,305	0,51	2,15	0,935	0,7	1,26	0,4857
Th17	0,025	0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,4286
Th22	0,07	0	0,09	0,025	0	0,05	0,4
Th9	0,63	0,05	0,98	0,115	0	0,37	0,4286
T CD8+	200,175	37,01	348,79	77,82	53,81	96,46	0,3429
naïve CD8+	64,7	6,25	163,99	30,405	12,51	33,55	0,3429
CMem CD8+	35,98	1,45	69,3	10,08	1,63	14,37	0,3429
EMem CD8+	40,18	6,39	52,59	15,935	10,97	20,95	0,3429
act CD8+	13,93	0,37	30,52	8,355	5,27	13,49	0,6857
Linfocitos B	2487,915	1906,01	3603,65	389,74	148,87	422,38	0,0571
Células B T1	1513,005	1029,33	2590,75	242,76	88,62	276,13	0,0286
Células B T2	910,79	735,42	1268,63	145,155	60,25	149,89	0,0286
Plasmablastos	174,205	42,75	287,47	45,455	39,39	57,54	0,1143

Fenotipos	SAL			APAP			P valor
	Mediana	Q1	Q3	Mediana	Q1	Q3	
Células Mieloides	283,525	167,21	351,31	382,875	282,85	557,9	0,3429
Granulocitos	79,94	47,32	120,82	142,38	134,63	359,29	0,0286
Neutrófilos	60,57	26,13	95,95	120,515	119,47	327,55	0,0286
Eosinófilos	1,075	0,84	2,38	1,425	0,98	4,99	0,4857
Basófilos	6,205	1,87	9,1	4,34	1,17	10,64	0,8857
Monocitos	135,845	96,74	175,37	145,925	123,43	204,03	0,6857
<i>patrolling Mo</i>	24,055	14,14	89,09	17,595	7,05	126,89	0,6857
Mo proinfl. inmat.	92,96	5,69	134,45	89,505	70,28	122,31	0,8857
Mo proinfl. mat.	17,175	1,59	23,33	19,975	4,34	27,91	0,6857
Células Dendríticas	15,47	0,98	20,63	2,475	1,45	6,11	0,3429
DC inmaduras	6	0,28	10,64	0,35	0,23	0,37	0,1714
DC maduras	2,125	0,14	2,71	0,28	0,19	0,47	0,3143
NK	115,38	26,79	205,75	24,01	21,14	46,11	0,1143
NKT	0,615	0,3675	1,358	1,47	0,55	2,488	0,3429

Tabla 13. Concentración (células/ μ l, mediana, IQR) de cada tipo celular en sangre de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP), determinada por citometría de flujo con los paneles para el sistema inmune adaptativo (arriba) e innato (abajo). Test U de Mann-Whitney).

Inicialmente, realizamos un análisis no supervisado de componentes principales (PCA) sobre las concentraciones sanguíneas de todos los tipos celulares evaluados mediante los paneles de anticuerpos modificados. Este análisis conjunto de la concentración en sangre total de los 35 fenotipos inmunes fue capaz de separar los grupos de estudio tratados con solución salina (SAL) o paracetamol (APAP) (**Figura 41**).

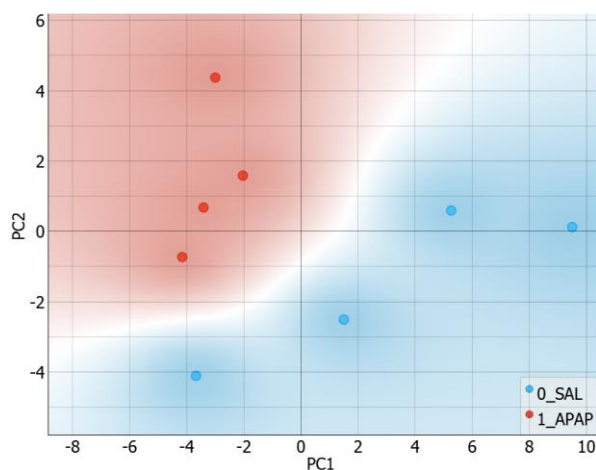


Figura 41. Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de ratones AlbCre x mT/mG tratados o no con APAP en base a la concentración sanguínea de los fenotipos inmunológicos estudiados.

Para ver de manera general las alteraciones que produce el APAP sobre las diferentes poblaciones del sistema inmune, realizamos un análisis de *clustering* y un *heat map* de las concentraciones sanguíneas de los diversos fenotipos celulares, tomando la media del grupo control para cada fenotipo celular como valor normalizador. Tal y como muestra la **Figura 42**, el análisis de *clustering* agrupó correctamente los dos grupos de ratones, y el daño hepático inducido por APAP produjo alteraciones más drásticas sobre las células protagonistas de la inmunidad adaptativa, causando una marcada linfopenia debida, en mayor medida, a la población de células B circulantes. Por el contrario, la concentración de las células de estirpe mieloide no sufrió variaciones tan llamativas, a excepción del aumento de la concentración de granulocitos y, dentro de estos, de los neutrófilos ($p=0,0286$, **Tabla 13**).

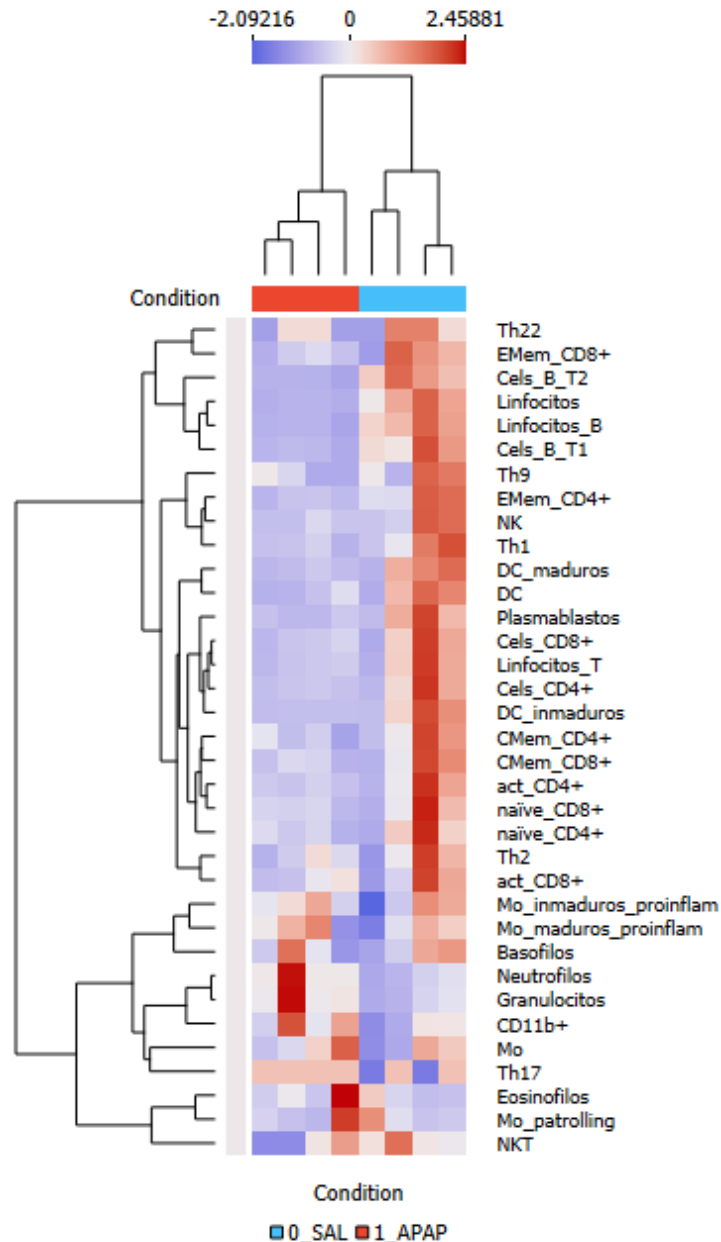


Figura 42. Análisis de *clustering* y *heat map* de la concentración sanguínea de los fenotipos inmunológicos obtenidos por citometría de flujo, tanto de la respuesta innata como adaptativa, en las muestras de ratones AlbCre x mT/mG tratados o no con APAP. Datos normalizados a la media de los valores del grupo control (SAL).

La comparación de los valores obtenidos de cada uno de los fenotipos estudiados entre el grupo de ratones tratado con APAP y los controles que recibieron suero salino (SAL), tanto porcentajes como concentraciones, se refleja en las [Tabla 12](#) y [Tabla 13](#), respectivamente.

Globalmente, en cuanto a las principales estirpes que conforman el sistema inmune (linfoide y mieloide), se observa en los ratones con daño hepático por APAP un importante descenso de linfocitos circulantes, tanto en términos absolutos como de

porcentaje, en ausencia de cambios en la concentración total de células mieloides (LIN-CD11b+, $p=0,3429$), traduciéndose en un aumento secundario de la proporción de estas últimas células (**Figura 43**).

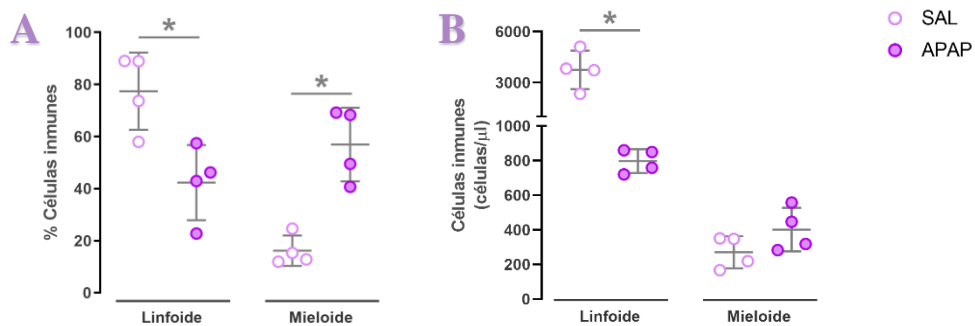


Figura 43. A) Proporción y B) concentración de la población linfóide y mielóide, medidos por citometría de flujo en muestras de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se refleja la media y DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$,

Analizando más en detalle los cambios inducidos por el daño hepático por APAP sobre las principales poblaciones de estirpe mielóide se observa un incremento significativo de los granulocitos en periferia, tanto en porcentaje como en concentración, siendo la subpoblación responsable de este aumento los neutrófilos. A consecuencia del incremento de los neutrófilos, la proporción de basófilos disminuyó en el grupo de ratones tratados con APAP sin que existiesen diferencias significativas en cuanto a su concentración (**Figura 45A** y **Tabla 13**).

Por otro lado, el aumento de granulocitos supuso el descenso secundario del porcentaje de monocitos ($p=0,0286$) sin que la concentración se viese afectada. Asimismo, los fenotipos de maduración de los Mo analizados presentaron unos niveles, tanto en proporción como en concentración (células/ μ l), similares entre ambos grupos (**Figura 45B** y **Tabla 13**). Respecto a las células dendríticas, no observamos diferencias excepto para el fenotipo inmaduro, cuya concentración se mostró ligeramente inferior ($p=0,171$), y significativamente reducido en cuanto a proporción ($p=0,029$) en el grupo de ratones tratados con APAP comparado con los controles (**Figura 45C** y **Tabla 13**).

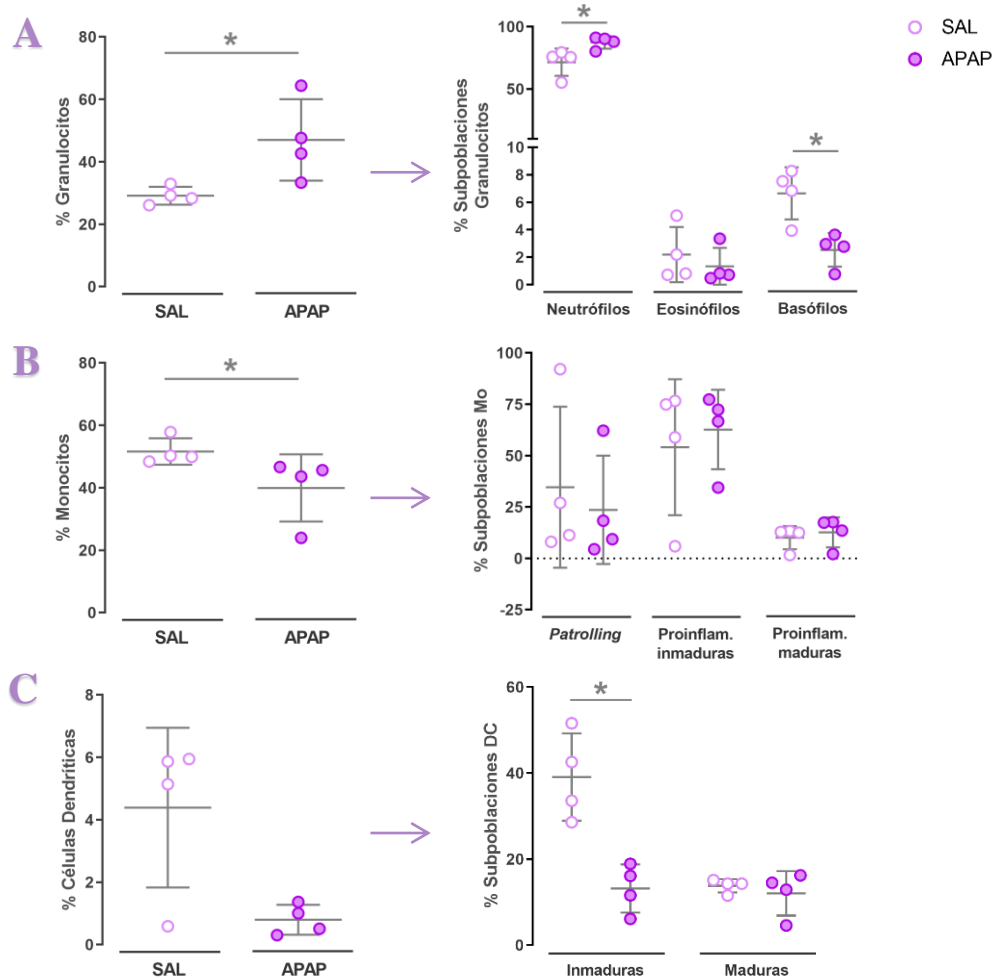


Figura 45. Porcentajes de **A)** granulocitos, **B)** monocitos (Mo) y **C)** células dendríticas (DC) dentro de las células mieloides (LIN- CD11b+), junto a sus subpoblaciones (paneles derechos), de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

Centrando nuevamente la atención sobre las poblaciones linfoides, la disminución de los linfocitos totales en el grupo de ratones tratados con APAP se debió principalmente a las células B, que sufrieron un descenso significativo tanto en porcentaje como en concentración. En cambio, el daño hepático por APAP no indujo alteraciones consistentes sobre los valores de los linfocitos T circulantes (**Figura 44**).

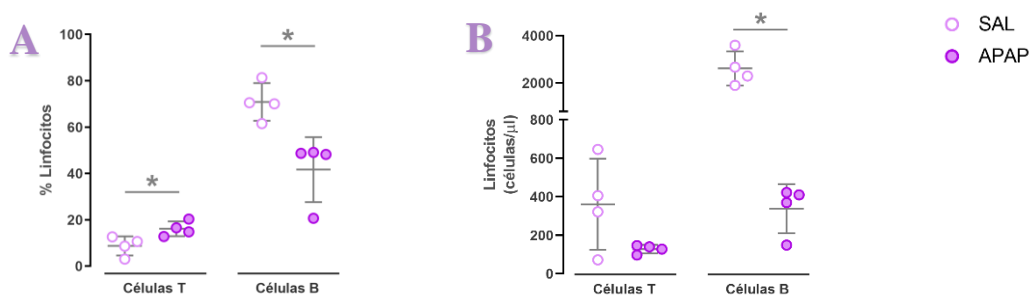


Figura 44. **A)** Proporción (%) respecto a la selección de linfocitos y **B)** concentración (células/ μ l) de los linfocitos T y B circulantes, evaluadas por citometría de flujo en muestras de sangre de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

Los paneles de citometría de flujo diseñados permitieron profundizar más aún en las diversas subpoblaciones y fenotipos de maduración de cada tipo celular. Así, observamos que la drástica disminución de la concentración de los linfocitos B en los ratones tratados con APAP afectó por igual a todas las subpoblaciones estudiadas (**Tabla 13**). Aunque la concentración de plasmablastos presentaba esa misma tendencia ($p= 0,1143$), su proporción entre los linfocitos B se elevó comparado con el grupo control (**Figura 46**).

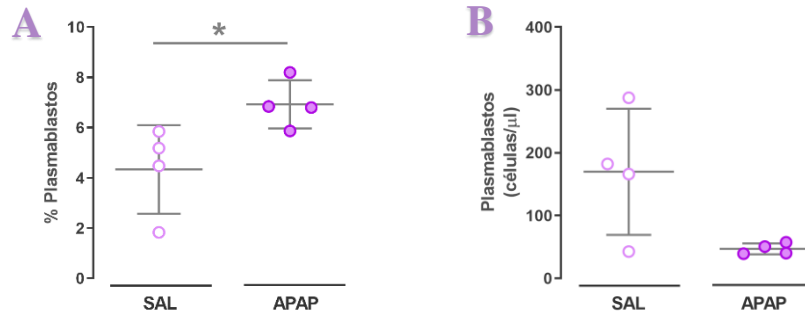


Figura 46. A) Proporción (%) respecto al *gate* “linfocitos” y B) concentración (células/ μ l) de los plasmablastos circulantes, evaluadas por citometría de flujo en muestras de sangre de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

En cuanto a los linfocitos T, el daño hepático por APAP no indujo cambios en la concentración de las poblaciones CD4+ y CD8+ (**Tabla 13**). La proporción de las células T CD8+, sin embargo, sí se alteró, aumentando en los ratones tratados con APAP en comparación con los controles (**Figura 47B**).

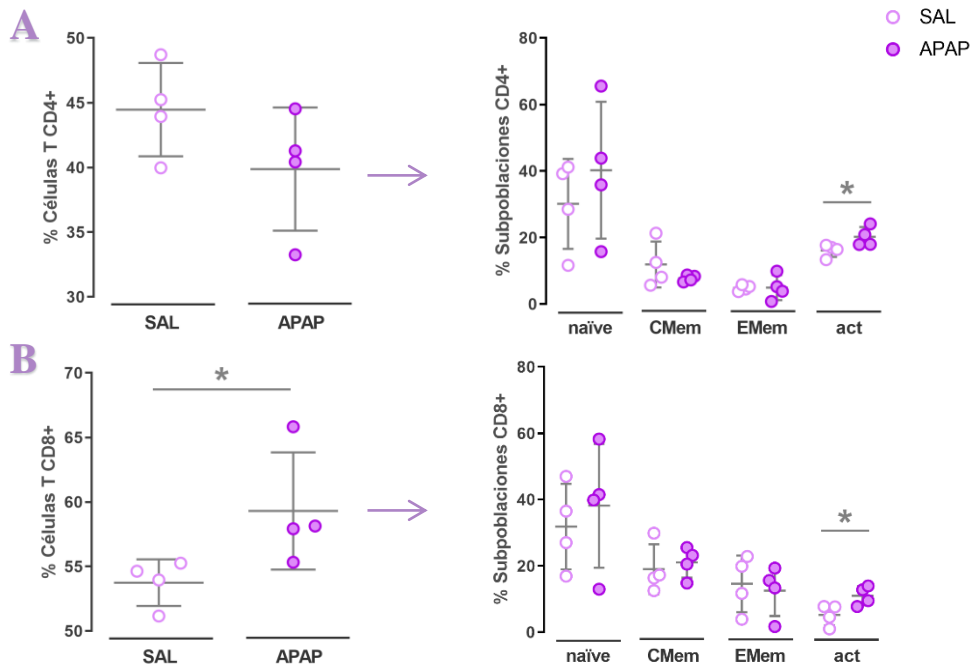


Figura 47. Proporción (%), respecto al *gate* de linfocitos T, de las subpoblaciones de células T circulantes A) CD4+ y B) CD8+ en ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Los paneles derechos muestran sus diferentes fenotipos de maduración: naïve, CMem, EMem y act. Se representan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$

Al igual que los paneles diseñados en el objetivo 1, los paneles modificados también permitieron el estudio de diferentes fenotipos de maduración de los linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+: *naïve*, memoria central (CMem), memoria efectora (EMem) y activadas (act). El daño hepático por APAP se asoció a una disminución de la concentración de linfocitos T CD4+ memoria central ($p=0,029$, **Tabla 13**) y a un aumento de la proporción del fenotipo activado tanto de las células T CD4+ ($p=0,029$, **Figura 47A**) como CD8+ ($p=0,029$, **Figura 47B**).

Asimismo, dentro de los linfocitos T CD4+ se analizaron las diferentes subpoblaciones T *helper* (Th), observando que el daño hepático por APAP tendió a disminuir la concentración de células Th1 circulantes ($p=0,057$, **Tabla 13**) y aumentó la proporción de Th2 y Th17 respecto a los ratones sin daño hepático (**Figura 48B y D**, respectivamente).

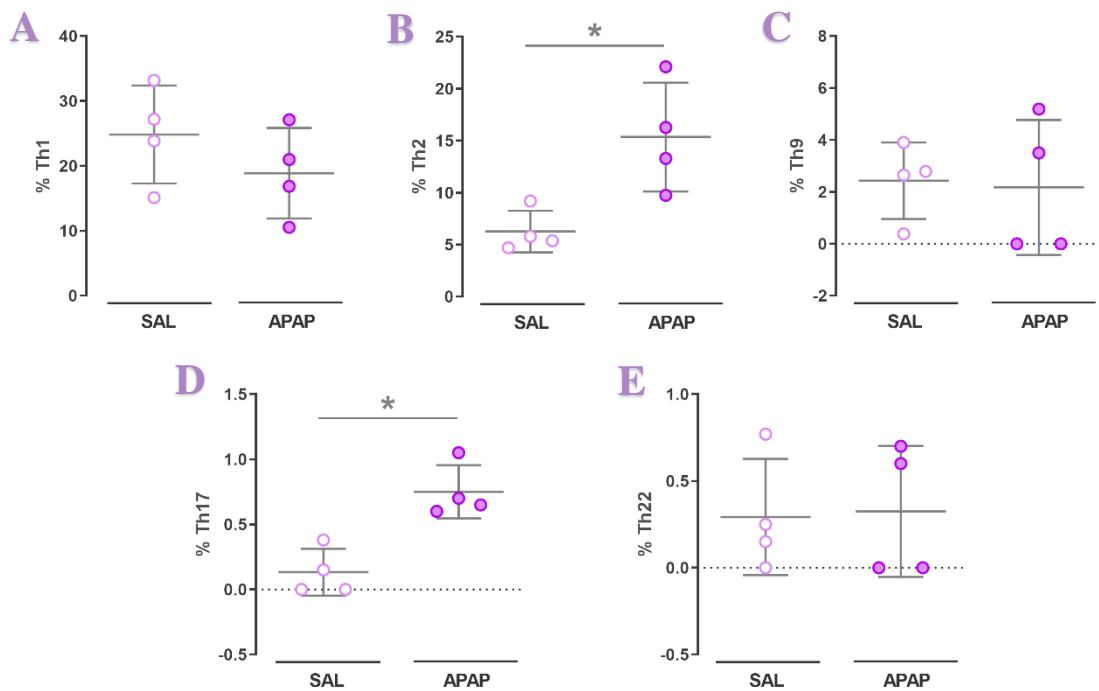


Figura 48. Proporción (%), respecto al gate de linfocitos T CD4+, de las diversas subpoblaciones T *helper*: **A)** Th1, **B)** Th2, **C)** Th9, **D)** Th17 y **E)** Th22, en ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se reflejan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

Para concluir con el estudio de la estirpe linfoide, analizamos las poblaciones de células NK y NKT. El daño hepático por APAP no se asoció a cambios reseñables en estas poblaciones a nivel periférico, salvo por una ligera tendencia a la disminución de la concentración de las células NK ($p=0,114$, **Tabla 13**).

3.c. Efecto del daño por APAP sobre las VEs procedentes de hepatocitos primarios de ratón – Estudio *in vitro*.

Con el fin de analizar el efecto del daño por APAP sobre las VEs procedentes de hepatocitos, realizamos primeramente un estudio *in vitro* exponiendo hepatocitos primarios de ratones AlbCre x mT/mG a dosis tóxicas de APAP (10 mM). En comparación con la situación basal y con los hepatocitos expuestos a solución vehículo, la exposición de los hepatocitos primarios a APAP resultó en una disminución significativa de la viabilidad a las 24 h, evaluada por la medición de la actividad de la enzima LDH en el medio de cultivo (**Figura 49**).

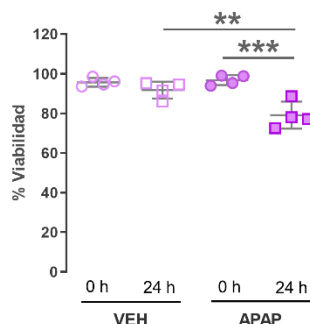


Figura 49. Viabilidad (%) de hepatocitos primarios puestos en cultivo en condiciones basales (0 h) y a las 24 horas de cultivo tras ser expuestos a suero salino (VEH) o a paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Two-Way ANOVA para medidas pareadas seguido de Uncorrected Fisher's LSD post-hoc. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Transcurridas 24 horas de la exposición a APAP o VEH, aislamos las VEs presentes en el medio de cultivo de los hepatocitos llevando a cabo el protocolo de ultracentrifugación. Los resultados del análisis por citometría de flujo de las VEs aisladas mostraron que la exposición a APAP aumentó el número de VEs (eventos FM4-64+) presentes en el medio de cultivo, tanto en términos de concentración como de porcentaje (**Figura 50**).

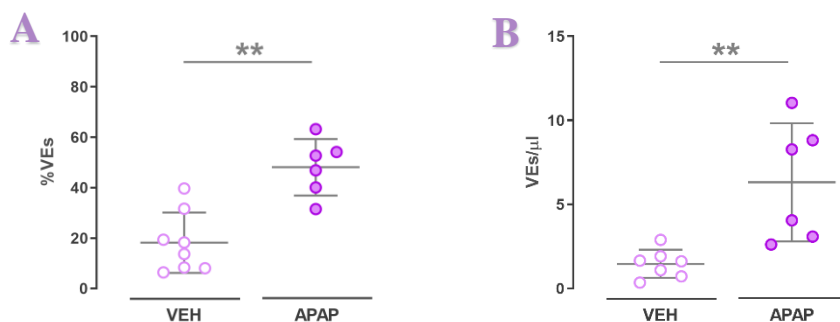


Figura 50. A) Proporción (% eventos FM4-64+ respecto a la selección de nanopartículas,) y **B)** concentración (VES/μl) de vesículas extracelulares (VEs) totales presentes en el medio de cultivo de hepatocitos primarios expuestos a suero salino (VEH) o a paracetamol (APAP). Se refleja la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. ** $p \leq 0,01$.

Seguidamente, evaluamos la presencia de exosomas (FM4-64+ CD81+) y de cuerpos apoptóticos (FM4-64+ AnnV+) entre las VEs aisladas. El tratamiento con APAP aumentó la concentración tanto de exosomas (**Figura 51B**) como de cuerpos apoptóticos (**Figura 51D**) en comparación con la exposición a VEH, mientras que en términos de proporción no observamos cambios significativos (**Figura 51A y C**).

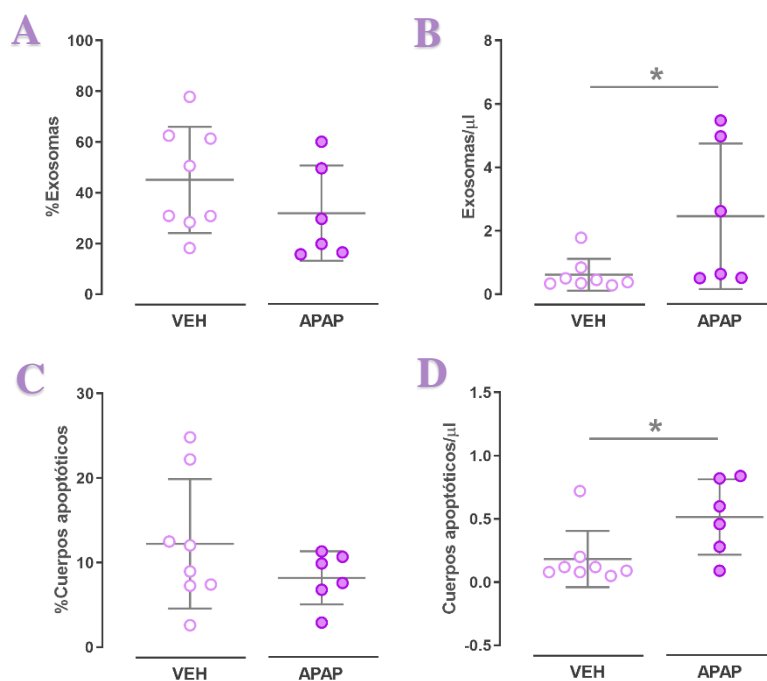


Figura 51. Proporción (%) y concentración de exosomas (**A** y **B**, respectivamente) y de cuerpos apoptóticos (**C** y **D**, respectivamente) liberados al medio de cultivo por hepatocitos primarios de ratón expuestos a suero salino (VEH) o a paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

Finalmente, evaluamos las VEs aisladas del medio de cultivo mediante el NTA, para evaluar posibles alteraciones inducidas por el APAP en el perfil de tamaño y concentración. Confirmando los resultados de la citometría de flujo, la exposición de los hepatocitos a APAP aumentó la concentración de VEs en el medio de cultivo (**Figura 52A y C**). Sin embargo, no observamos cambios en el tamaño de las VEs entre las dos condiciones de estudio (**Figura 52B**).

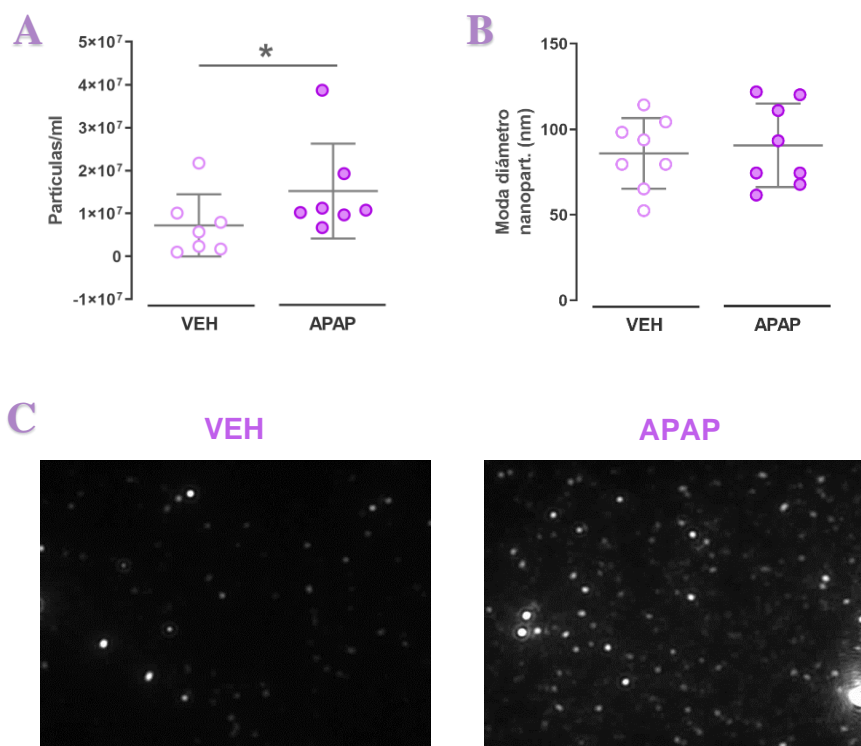


Figura 52. **A)** Concentración de nanopartículas (partículas/ml) y **B)** moda del tamaño de las nanopartículas (nm) evaluadas mediante la técnica de NTA en aislados de vesículas extracelulares (VEs) obtenidos mediante UC del medio de cultivo de hepatocitos primarios expuestos a suero salino (VEH) o a paracetamol (APAP). **C)** Imágenes representativas de la medición por NTA de muestras de los grupos VEH y APAP. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$,

3.d. Efecto del daño hepático agudo inducido por APAP sobre las VEs circulantes procedentes de hepatocitos en ratones – Estudio *in vivo*.

Para determinar el efecto del APAP sobre el perfil de VEs circulantes y, en particular, de aquellas liberadas por hepatocitos, realizamos la extracción de muestras de sangre mediante punción cardíaca de ratones de las cepas C57BL/6, mT/mG y AlbCre x mT/mG a las 24 horas de haber recibido bien solución salina (SAL) o bien APAP. Las muestras de plasma resultantes fueron marcadas con la sonda FM4-64 y analizadas por citometría de flujo.

El daño hepático inducido por APAP aumentó drásticamente la concentración de VEs circulantes (eventos FM4-64+) en todas las cepas de ratón analizadas (**Figura 53**). En todos los casos, las VEs (nanopartículas FM4-64+) representaron una gran proporción

entre el total de nanopartículas, observando también un aumento de esta proporción en el caso de las muestras de ratones con daño hepático.

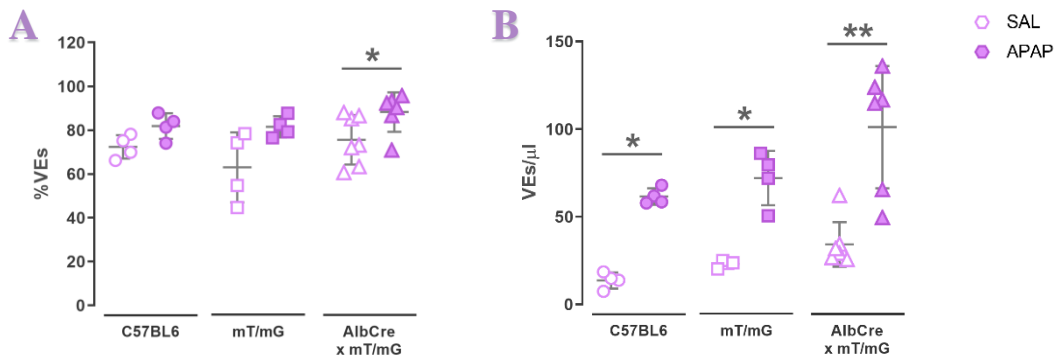


Figura 53. A) Proporción y **B)** concentración de vesículas extracelulares (VEs), medidas por citometría de flujo, en muestras de plasma de las cepas de ratón C57BL/6, mT/mG y AlbCre x mT/mG que han recibido suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Para determinar la contribución de las VEs procedentes de hepatocitos, analizamos la expresión de la proteína fluorescente EGFP en las VEs de los ratones AlbCre x mT/mG (cuyos hepatocitos son EGFP+), utilizando las muestras de las cepas de ratón C57BL/6 y mT/mG como controles negativos. Comparado con la administración de suero salino, el daño hepático por APAP indujo una elevación de las VEs EGFP+, tanto en términos de porcentaje como de concentración, en las muestras de los ratones AlbCre x mT/mG, mientras que las VEs EGFP+ fueron indetectables en las dos cepas control independientemente de la administración de APAP (Figura 54A y B).

Por otro lado, estudiamos el efecto del APAP sobre las VEs tdTomato+, detectables tanto en la cepa mT/mG como en la AlbCre x mT/mG. La administración de APAP aumentó tanto la proporción como la concentración de VEs tdTomato+ sólo en los ratones mT/mG, los cuales expresan la proteína tdTomato en todos los tipos celulares, incluyendo los hepatocitos (Figura 54C y D). Finalmente, las VEs EGFP+ o tdTomato+ fueron siempre indetectables en la cepa C57BL/6, como era esperable por no presentar proteínas fluorescentes en sus células.

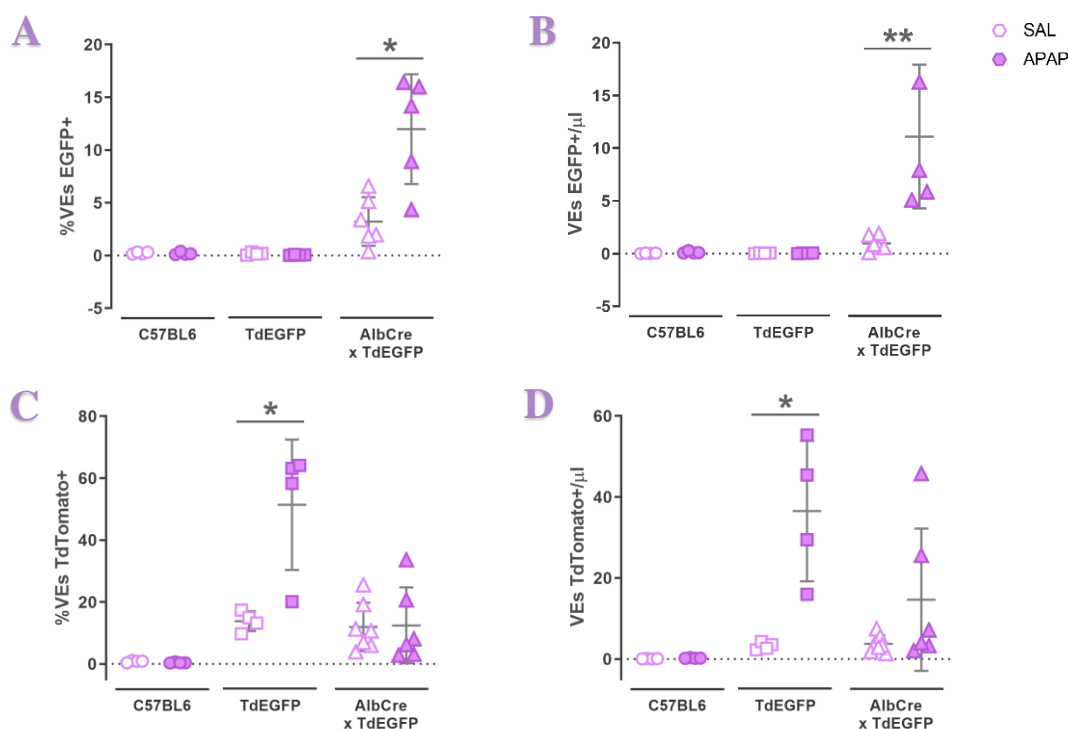


Figura 54. Proporción (%) y concentración de las vesículas extracelulares (VEs/ μ l, eventos FM4-64+) que son EGFP+ (A y B, respectivamente) y de las VEs que son tdTomato+ (C y D, respectivamente), medidas por citometría de flujo en muestras de plasma de ratones C57BL/6, mG/mT y AlbCre x mT/mG que han recibido suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se reflejan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

3.e. Análisis de la biodistribución de las VEs derivadas de hepatocitos en ratones sanos o con daño hepático por APAP.

Numerosos estudios demuestran la importancia de las VEs en la comunicación intra- e interórgano. Con el fin de determinar el/los órgano/s diana de las VEs derivadas de hepatocitos en el contexto de daño hepático por APAP, extrajimos y disgregamos las células del corazón, el bazo, los riñones y los pulmones de ratones AlbCre x mT/mG con y sin daño hepático por APAP.

Dado que las VEs liberadas por hepatocitos en ratones AlbCre x mT/mG mantienen la expresión EGFP propia de su célula de origen y que el resto de los tipos celulares de estos ratones expresan la proteína fluorescente tdTomato en su membrana, la detección de eventos dobles positivos para ambas longitudes de onda al analizar por citometría de flujo cada órgano distinto del hígado sería indicativo de células de cada órgano que presentan contenido procedente de hepatocitos. El análisis por citometría de flujo mostró que la señal EGFP fue detectable en las células de todos los órganos analizados de forma similar

entre ratones independientemente del daño hepático, siendo el riñón el órgano que presenta una intensidad media de fluorescencia (MFI) significativamente mayor (MFI bazo: 12,9; pulmón: 12,4; riñón: 23; corazón: 15,13; **Figura 55A**).

El daño hepático por APAP indujo un aumento de señal doble positiva EGFP+ tdTomato+ en las células del pulmón comparado con el grupo control, mientras que en los órganos restantes no se detectaron cambios significativos (**Figura 55B y C**). Estos resultados sugieren que el pulmón es el principal órgano diana de las VEs liberadas por los hepatocitos en el contexto de un daño hepático agudo.

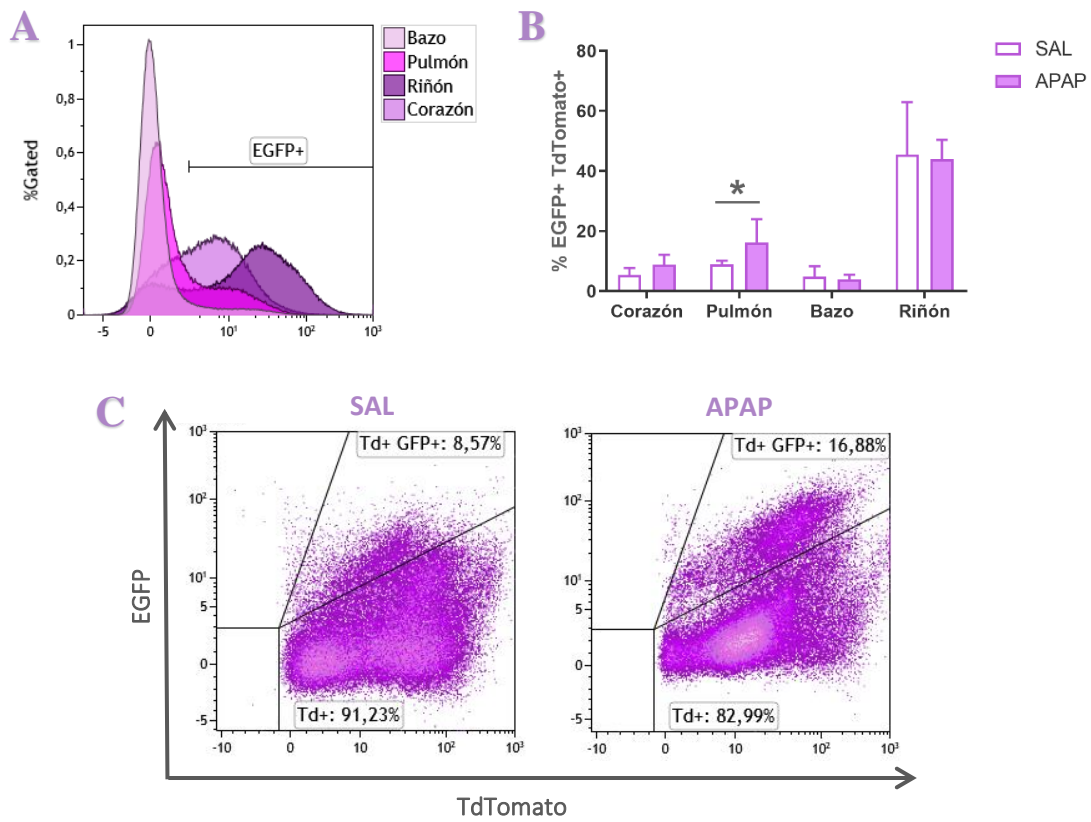


Figura 55. Análisis por citometría de flujo de la suspensión celular obtenida de la disgregación de diferentes órganos de ratones AlbCre x mT/mG que han recibido suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). **A**) Histograma representativo de la intensidad de señal EGFP detectada en los diferentes órganos evaluados. **B**) Análisis de la señal doble positiva EGFP+ tdTomato+ de las células disgregadas de corazón, pulmón, bazo y riñón procedentes de ratones AlbCre x mT/mG que han recibido SAL o APAP. Se reflejan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. **C**) Dot plots representativos del análisis por citometría de flujo de las células del pulmón de ratones que han recibido SAL o APAP. * $p \leq 0,05$.

DISCUSIÓN

El fracaso hepático agudo (ALF) es una patología grave y poco frecuente causada por diversos insultos (toxicidad por paracetamol, isquemia hepática, hepatitis viral o autoinmune, y otros) que causan lesión a los hepatocitos, pudiendo evolucionar en un periodo de tiempo variable de días a semanas y resultar letal en muchos casos (Stravitz & Lee, 2019). Mientras que el diagnóstico del ALF se basa en datos clínicos y pruebas de laboratorio de fácil obtención en atención primaria, la predicción y el diagnóstico temprano de esta enfermedad continúa siendo una necesidad insatisfecha (Thietart & Rautou, 2020). Por ello, la búsqueda de biomarcadores para la identificación de las fases más tempranas del ALF es de gran relevancia en el campo de la hepatología. Dado que el diagnóstico de ALF en pacientes se realiza en fases tardías dentro de la patogénesis del ALF (Bunchorntavakul & Reddy, 2018), los modelos animales suponen una herramienta determinante para el estudio de las diferentes etapas del desarrollo de esta enfermedad, particularmente de las etapas iniciales.

Por su fácil obtención a partir de una muestra de sangre periférica, las poblaciones y subpoblaciones inmunitarias en sangre periférica y las VEs circulantes representan biomarcadores potencialmente valiosos para múltiples enfermedades, incluyendo el ALF. Su evaluación en modelos murinos, sin embargo, no es fácil. Su pequeño tamaño y volumen sanguíneo hace que sea difícil realizar un estudio exhaustivo de las poblaciones inmunitarias circulantes sin comprometer la supervivencia del animal. Por otro lado, no existen métodos en la actualidad que permitan estudiar y aislar en el ratón las VEs liberadas a la circulación por un tipo celular concreto. En el presente trabajo, realizamos avances relevantes para superar estas limitaciones.

En primer lugar, desarrollamos dos paneles de anticuerpos para analizar por citometría de flujo multiparamétrica en ratones salvajes o con fluorescencia tdTomato endógena hasta 35 poblaciones inmunitarias empleando un volumen mínimo de sangre total que permite la supervivencia del ratón tras la recolección de la muestra. Estos paneles fueron validados analizando diferencias del perfil inmunológico sanguíneo entre ratones C57BL/6 salvajes y ratones con deficiencia de la citoquina antiinflamatoria IL-10, así como demostrando importantes alteraciones en diversas poblaciones y subpoblaciones inmunológicas en ratones reporteros de linaje celular de doble fluorescencia AlbCre x mT/mG con ALF inducido por APAP. En segundo lugar, confirmamos que las VEs en los ratones AlbCre x mT/mG conservan la fluorescencia de su célula de origen, y evaluamos y comparamos diversos métodos para el aislamiento de estas VEs a partir tanto

de cultivos primarios como de plasma obtenido de ratones sanos y con daño hepático, confirmando la utilidad de los ratones mT/mG y del sistema Cre/LoxP para el estudio del tipo celular de origen de VEs tanto in vitro como en animales vivos. Finalmente, evaluamos las alteraciones del perfil inmunológico sanguíneo y de las VEs circulantes procedentes de hepatocitos en ratones reporteros de linaje celular, abriendo la posibilidad de investigar su utilidad como posibles biomarcadores del daño hepático agudo en futuros estudios.

Desarrollo de paneles de citometría multiparamétrica para caracterizar el sistema inmunológico murino.

El análisis de las principales poblaciones del sistema inmunológico en sangre es una de las pruebas diagnósticas más realizadas en rutina clínica por ser rápida, sencilla y poco invasiva. El hígado es un órgano que cumple un amplio rango de funciones que incluyen la función inmunológica. Esta última se debe a que las células que componen el hígado (hepatocitos, células de Kupffer, células estrelladas y células endoteliales sinusoidales hepáticas) expresan moléculas que reclutan, activan, y regulan la respuesta inmunitaria (Chaudhry et al., 2019) y, por otro lado, a que existen poblaciones de células inmunes linfoides y mieloides que residen en el tejido hepático (Nemeth et al., 2009). Por ello, el análisis del perfil inmunológico podría aportar información valiosa sobre las diferentes fases, incluidas las más tempranas, de la patogenia del ALF. Sin embargo, en modelos de animal pequeño como el ratón, esta técnica presenta grandes limitaciones debido al pequeño volumen de sangre que se puede extraer sin requerir su eutanasia, lo que dificulta el obtener una visión general y completa del perfil inmunológico del modelo a nivel sistémico (Weaver et al., 2002). Además, realizar estudios longitudinales conlleva una gran dificultad por el poco volumen de sangre que se puede obtener sin sacrificar al animal.

Según el Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Investigación (NC3R, *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*) el promedio de volumen sanguíneo total de un ratón es alrededor de 58,5 ml/kg de peso, es decir, un ratón de 25 gr tiene un total de 1,46 ml de sangre. Siendo el volumen máximo para extracciones repetidas no superior al 10% del volumen sanguíneo total (Parasuraman S et al., 2010), la cantidad de sangre debe ser inferior a 140

μl. Los dos paneles desarrollados en el presente proyecto utilizan un volumen de sangre de 50 μl/panel, es decir, un total de 100 μl, por lo que la estrategia diseñada permite cumplir con las directrices establecidas respecto al volumen máximo de extracción y, por tanto, realizar medidas repetidas en el tiempo y llevar a cabo el seguimiento del modelo.

Para la puesta a punto de los paneles de anticuerpos para la citometría de flujo multiparamétrica se emplearon ratones C57BL/6 e IL-10 KO. Los ratones deficientes en IL-10 constituyen uno de los modelos más representativos y utilizados de enfermedad inflamatoria intestinal y, más específicamente, de colitis ulcerosa (Kühn et al., 1993). La IL-10 es reconocida como una de las citoquinas antiinflamatorias e inmunoregulatoras por excelencia, por lo que su deficiencia produce en este modelo un aumento de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IFN γ , favoreciendo la infiltración de células mononucleares y linfocitos T a la lámina propia de la mucosa intestinal (Berg et al., 2002).

La caracterización inmunológica mediante el uso de los paneles de citometría diseñados en el presente proyecto mostró una gran disminución de los linfocitos y una tendencia a una proporción más elevada de células mieloides, más específicamente neutrófilos, en los ratones IL-10 KO respecto a los C57BL/6, confirmando observaciones previas (Froicu et al., 2006). La tendencia a un aumento del fenotipo proinflamatorio tanto en los monocitos como en las células dendríticas en los ratones IL-10 KO podría estar en relación, además de con la falta de IL-10, con el conocido aumento en esta cepa de la expresión de CCL7 y CCR8, quimioquinas implicadas en el reclutamiento y migración de los monocitos y células dendríticas derivadas de monocito a los ganglios linfáticos (Qu et al., 2004).

La marcada linfopenia observada en los ratones IL-10 KO ha sido descrita previamente en este modelo de colitis, y se ha relacionado con la reubicación de estas células a las zonas del intestino con inflamación activa reduciendo su presencia en circulación (Froicu et al., 2006). Dicha linfopenia se debe a la drástica disminución de linfocitos B, resultando en un aumento relativo, sólo a nivel de porcentaje, de linfocitos T. Una situación similar ha sido descrita previamente en un modelo de *miastenia gravis* autoinmune inducido por inmunización contra el receptor de la acetilcolina donde también comparaban ratones C57BL/6 e IL-10 KO (Poussin et al., 2000).

Los ratones IL-10 KO también presentaron alteraciones en la proporción, dentro de los linfocitos T, de las poblaciones T CD4⁺ y CD8⁺ en comparación con los ratones

C57BL/6. El aumento del porcentaje de células CD4+ y la disminución del porcentaje de células CD8+ puede deberse a la distinta capacidad proliferativa de estas células. En este sentido, la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T CD4+ es mayor que la de los linfocitos T CD8+ en ratones de la cepa IL-10 KO (Pino-Martínez et al., 2018), lo que podría afectar a su proporción en circulación. Entre los fenotipos de maduración (naïve, activado, memoria efectora [EMem] y memoria central [CMem]), el aumento de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y T CD8+ activados en los ratones IL-10 KO también está en concordancia con el ambiente proinflamatorio característico de estos ratones.

Respecto a las subpoblaciones de linfocitos Th, observamos que la ratio Th1/Th2 fue menor en los ratones IL-10 KO debido al aumento de la concentración de linfocitos Th2 y la disminución de los Th1. Además, los niveles de células Th17, de carácter proinflamatorio, y de células Treg, de carácter inmunomodulador, aumentaron en los ratones IL-10 KO en comparación con la cepa C57BL/6. Estudios previos en modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal han demostrado el desarrollo de una inflamación crónica caracterizada principalmente por un desequilibrio en las células Th1, Th2, Th17 y T reguladoras (Fonseca-Camarillo & Yamamoto-Furusho, 2015). Por otro lado, existen evidencias sobre el papel fundamental de los linfocitos Th2 en el desarrollo de la colitis crónica en el modelo animal de deficiencia de IL-10. Asimismo, se ha descrito que la citoquina IL-4, producida por los linfocitos Th2, es necesaria para el desarrollo de la colitis (Specht et al., 2006).

En resumen, los paneles de anticuerpos diseñados para analizar el sistema inmunológico murino por citometría de flujo permitieron utilizar un volumen mínimo de sangre total para realizar un *screening* exhaustivo y con alta sensibilidad de las diversas poblaciones y subpoblaciones celulares responsables de la respuesta tanto innata como adaptativa. La utilización de estos paneles confirmó alteraciones en el perfil inmunológico de células circulantes ya conocidas y reveló otras alteraciones no descritas previamente en ratones con deficiencia de IL-10.

Ratones reporteros de linaje de doble fluorescencia AlbCre x mT/mG como herramienta para el estudio y trazabilidad de VEs derivadas de hepatocitos.

El estudio de las VEs derivadas de tipos celulares específicos en organismos vivos es actualmente una de las principales lagunas en el campo de la investigación en VEs. En el presente proyecto, evaluamos la cepa de ratón mT/mG de doble fluorescencia reportera de Cre recombinasa como una posible herramienta, partiendo de la hipótesis de que las VEs de este ratón mantienen la expresión de la proteína fluorescente correspondiente a su célula de origen y de que dicha fluorescencia puede ser detectada y utilizada para el aislamiento de VEs específicas de tipo celular en fluidos biológicos.

En primer lugar, tratamos de determinar qué método era el más eficiente para purificar y concentrar las VEs en este modelo experimental. Con este fin, realizamos un estudio *in vitro* con hepatocitos primarios de ratón en el que comparamos tres métodos de aislamiento (ultracentrifugación [UC], cromatografía de exclusión por tamaño [SEC] y selección inmuno-magnética [EXOKIT]) de VEs presentes en el medio de cultivo. Siguiendo la línea de otros estudios que apoyan la UC como el método preferente para aislar las VEs liberadas por hepatocitos primarios o de líneas celulares al medio de cultivo (Zivko et al., 2021), la UC fue el método con que obtuvimos un mayor porcentaje y concentración de VEs, en base al análisis realizado por citometría de flujo de los eventos FM4-64+. Sin embargo, la técnica que aportó una mayor pureza en exosomas (FM4-64+ CD81+) fue la SEC, a costa de una considerable reducción de la concentración de VEs aisladas. Por este motivo, varios estudios han empleado este método como un paso adicional tras la realización de UC o de gradiente de densidad (Arkesteijn et al., 2020; Van den Broek et al., 2020).

Por otro lado, con el objetivo de confirmar la expresión en las VEs del marcador fluorescente endógeno presentado en membrana por la célula de origen se utilizaron métodos ortogonales como la citometría de flujo y el Western Blot. Otros estudios siguen una estrategia similar para llevar a cabo análisis de trazabilidad y captación de las VEs, bien modificando genéticamente la célula para que exprese una proteína fluorescente de forma constitutiva en la membrana (Guerra-Rebollo et al., 2018; Ramos-Gomes et al., 2022) o bien transfectándola con un constructo en el cual se conjuga el gen de una de las tetraspaninas con el de una proteína fluorescente (Mittelbrunn et al., 2011). En nuestro trabajo, la variabilidad en la proporción de VEs en las que se detectó la señal fluorescente endógena, menor al 60 % en prácticamente todos los experimentos realizados, podría

deberse a que no todas las VEs derivadas de las células de los ratones reporteros de linaje celular mT/mG portan las moléculas fluorescentes endógenas (EGFP o TdTomato) y/o a limitaciones en la sensibilidad de la técnica o citómetro utilizados para su análisis.

La caracterización de las VEs aisladas por UC y SEC mediante NTA mostraron que las nanopartículas presentes en las fracciones UC tenían un tamaño algo superior a las obtenidas por SEC, resultado que entra dentro de lo esperable teniendo en cuenta que la SEC se basa en la exclusión de las partículas en suspensión de una muestra en función al tamaño. A pesar de esta diferencia, los datos e imágenes obtenidos tanto por NTA como por TEM respectivamente mostraron que ambos métodos aislaron nanopartículas de un tamaño inferior a 200 nm y de morfología vesicular, compatibles con VEs.

Una vez confirmada la presencia en las VEs de las proteínas fluorescentes (EGFP o tdTomato) expresadas por las células de los ratones mT/mG y AlbCre x mT/mG en un paradigma *in vitro*, evaluamos y caracterizamos las VEs circulantes *in vivo* en dichos ratones. El anticuerpo Jo2 (anti-CD95) es un agonista de Fas, receptor cuya unión a su ligando inicia una cascada intracelular que conduce a la activación de la caspasa-3 y, por ende, a la muerte celular por apoptosis (Malhi et al., 2006). Es bien conocido que los hepatocitos expresan altos niveles del receptor Fas en su membrana y que la administración del anticuerpo Jo2 tanto *in vitro* (Schlosser, 2000) como *in vivo* (Lopez et al., 2014) induce la apoptosis de dichas células. En el presente trabajo incluimos un grupo de ratones tratados con Jo2 con el fin de poder evaluar específicamente la contaminación por cuerpos apoptóticos en cada uno de los métodos de aislamiento de VEs circulantes.

Puesto que la citometría de flujo es una de las técnicas utilizadas en la caracterización de VEs, evaluamos el contenido en exosomas y cuerpos apoptóticos presente en los diversos aislados de VEs mediante el marcaje de CD81 y Anexina V (AnnV), respectivamente. Como se ha indicado anteriormente, la tetraspanina CD81 es uno de los principales marcadores de exosomas, mientras que la AnnV se une a la fosfatidilserina, fosfolípido de la membrana plasmática que queda expuesto al medio extracelular en un contexto de apoptosis y que, por tanto, está presente en la superficie de los cuerpos apoptóticos liberados por la célula en proceso de muerte (Edry-Botzer & Gerlic, 2017). Además, el anticuerpo AnnV puede reconocer lipoproteínas que contienen apolipoproteína (APO) B (Botha et al., 2022), por lo que sirve también como indicador de contaminación adicional por lipoproteínas u otras VEs no-exosoma.

Los resultados no mostraron diferencias en la cantidad total de VEs circulantes en plasma entre los ratones tratados o no tratados con Jo2, ni en términos de concentración ni de porcentaje de nanopartículas. Dentro de la población de VEs, sin embargo, sí observamos un consistente aumento de cuerpos apoptóticos (FM4-64+ AnnV+) en todos los ratones tratados con Jo2 tanto en el plasma como en las VEs aisladas mediante UC y SEC, apoyando la presencia de muerte celular por apoptosis en los mismos. Más aun, detectamos también un aumento de VEs EGFP+ en el grupo de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron Jo2, indicando que los hepatocitos son la fuente principal de cuerpos apoptóticos circulantes en este modelo experimental de apoptosis inducida por Jo2.

En las muestras obtenidas de este modelo *in vivo*, también evaluamos diferentes protocolos de aislamiento de exosomas a partir de muestras de plasma para determinar cuál era el más eficiente. De manera similar a lo encontrado en artículos previos (Böing et al., 2014; Stranska et al., 2018), la SEC consiguió aislar VEs en mayor proporción que la UC. Sin embargo, la proporción de exosomas (FM4-64+ CD81+) respecto al total de VEs fue mayor en las fracciones obtenidas por UC que mediante la SEC. Estos resultados podrían justificarse bien por una posible contaminación por partículas compuestas por bicapa lipídica de un tamaño similar al de los exosomas en las fracciones SEC (Sódar et al., 2016). Aunque la SEC obtiene una relación VEs:proteínas mucho mayor que la UC, se ha demostrado que la UC consigue un mayor rendimiento aislando VEs de menor tamaño y con menor contaminación por APO que las fracciones aisladas por SEC (Takov et al., 2019).

Además de poder identificar y cuantificar en organismos vivos las VEs procedentes de hepatocitos u otros tipos celulares concretos, el principal atractivo del modelo de ratón evaluado en el presente trabajo es la posibilidad de aislar dichas VEs de forma específica. Para optimizar el aislamiento de las VEs procedentes de hepatocitos (EGFP+) en los ratones AlbCre x mT/mG, probamos diferentes estrategias de aislamiento basadas en la selección inmuno-magnética con *microbeads* anti-GFP en combinación o no con las técnicas de aislamiento por UC y SEC.

La selección inmuno-magnética basada en microesferas se usa comúnmente desde los años 90 para separar poblaciones celulares determinadas, puesto que los anticuerpos a los que se encuentran conjugadas las microesferas reconocen marcadores específicos de la superficie celular (Zborowski & Chalmers, 2005). Dado que los exosomas también presentan en su membrana marcadores específicos (como las tetraspaninas CD9, CD63 y

CD81), varios estudios han usado microesferas magnéticas conjugadas con anticuerpos que reconocen las tetraspaninas como método de aislamiento para purificar exosomas (Karimi et al., 2022; Oksvold et al., 2015). En nuestro trabajo, los experimentos *in vitro* también confirmaron la capacidad de la selección inmuno-magnética frente a las tetraspaninas para separar exosomas. Tras confirmar que las *microbeads* eran eficientes en el reconocimiento y purificación de VEs, y puesto que nuestro objetivo era el aislamiento específico de VEs EGFP+, decidimos emplear microesferas magnéticas frente a la proteína fluorescente como un segundo paso a la purificación de VEs por SEC y UC a partir de muestras de plasma de ratones AlbCre x mT/mG.

Los resultados del presente trabajo sugieren que las estrategias combinadas tanto de UC como de SEC seguida de la selección inmuno-magnética con microesferas anti-GFP aumentan la proporción de VEs EGFP+ aisladas del plasma frente al uso aislado de las microesferas directamente con el plasma original. La combinación de UC + microesferas anti-GFP (UC-GFP+) consiguió aislar una mayor cantidad de VEs, y más concretamente de exosomas (FM4-64+ CD81+), que la combinación SEC + microesferas anti-GFP o que las microesferas de manera aislada. Esto puede deberse a que la proporción de exosomas de partida tras la UC era mayor que en la SEC, lo cual permite obtener un mayor porcentaje de exosomas EGFP+ tras la separación con las microesferas. También, es importante destacar que la estrategia combinada UC-GFP+ consiguió una mayor reducción de la proporción de cuerpos apoptóticos (FM4-64+ AnnV+) que los otros dos métodos, obteniendo, por tanto, una muestra final de VEs más enriquecida en exosomas y menos contaminada por cuerpos apoptóticos en los ratones AlbCre x mT/mG con daño hepático.

Efecto del daño hepático agudo por APAP sobre el perfil inmunológico celular y de VEs circulantes en ratones.

El modelo murino de hepatotoxicidad por APAP es uno de los más utilizados para conocer los mecanismos del daño hepático inducido por fármacos (*drug-induced liver injury*, DILI) así como para evaluar posibles intervenciones terapéuticas contra el mismo. Los ratones son más sensibles al APAP que las ratas, y desarrollan hepatotoxicidad a unas dosis similares a las de los humanos sin desarrollar los problemas de metahemoglobinemia y hemólisis observados en las ratas (McGill & Hinson, 2020).

Asimismo, ensayos *in vitro* de hepatotoxicidad por APAP con hepatocitos murinos muestran un comportamiento idéntico a las líneas de hepatocitos humanos (J. Akakpo et al., 2018). Por ello, el modelo de ratón tratado con APAP se ha convertido en uno de los modelos de referencia de hepatotoxicidad inducida por fármacos.

Los fármacos hepatotóxicos poseen patrones bioquímicos que, aun sin ser exclusivos, pueden ayudar en el diagnóstico de la enfermedad. En nuestro trabajo, el modelo de daño hepático agudo inducido por APAP realizado en ratones AlbCre x mT/mG reprodujo las manifestaciones más características. La elevación de las transaminasas y/o de la fosfatasa alcalina en sangre son parámetros bioquímicos que con frecuencia sugieren la existencia de hepatotoxicidad (Devarbhavi, 2012). Así, los ratones AlbCre x mT/mG tratados con APAP presentaron un aumento de la ALT y la AST, previamente descritos tanto en pacientes (Levine et al., 2016; O'Malley et al., 2015; Woolbright et al., 2022) como en modelos animales (Aprioku & Gospel, 2021; da Rocha et al., 2017). Igualmente, la LDH aumentó en el suero de los ratones con daño hepático por APAP. Durante los procesos de hepatotoxicidad, la translocación al núcleo de la enzima LDH aumenta la concentración de lactato con la subsiguiente inducción de genes de muerte celular y la posterior liberación de LDH a la circulación (Ferriero et al., 2018).

El estudio histológico de las secciones de hígado teñidas con hematoxilina-eosina también demostró hallazgos característicos en los ratones que recibieron APAP, incluyendo la presencia de eosinofilia, de cambios nucleares en los hepatocitos como picnosis y pérdida del contorno, y de necrosis hepatocitaria en las áreas centrolobulares (McGill & Hinson, 2020). Estas manifestaciones histológicas son las característicamente encontradas a las 24 horas de una sobredosis de APAP en ratones. Así, tanto los resultados de la bioquímica sanguínea como el estudio histológico confirmaron que el grupo APAP desarrolló el daño hepático propio del modelo de hepatotoxicidad.

a) Alteraciones del perfil inmunológico

La evaluación del perfil inmune de los ratones AlbCre x mT/mG con daño hepático por APAP se llevó a cabo gracias a la adaptación de los paneles de anticuerpos para citometría de flujo multiparamétrica a los ratones con fluorescencia Tdtomato endógena. La primera observación destacable de esta evaluación fue que los análisis no supervisados, como los realizados mediante el PCA, el análisis de *clustering* y el *heat map*, del conjunto de las

diferentes poblaciones de células inmunes circulantes fueron capaces de distinguir claramente los ratones con daño hepático por APAP de los ratones sin daño hepático.

La segunda observación destacable fue el desarrollo de una marcada linfopenia en los ratones con daño hepático por APAP. Esta reducción de la concentración de linfocitos circulantes probablemente se explica por la infiltración de estos en el hígado y su subsiguiente depleción en la circulación periférica (Hammerich et al., 2011). El análisis de las diferentes poblaciones linfocitarias resultó en varias aportaciones novedosas. Así, la linfopenia en este modelo experimental ocurrió a expensas de los linfocitos B y, en concreto, de los fenotipos de linfocitos B transicionales T1 y T2 pero no de los plasmablastos. Aunque no existe demasiada bibliografía respecto a las células B en el contexto de DILI por APAP, un estudio analizó la infiltración de células en el hígado y demostró un aumento de las células B y de células plasmáticas en el tejido hepático de pacientes con DILI respecto al grupo control de individuos sanos (Du et al., 2021). Esta observación apoyaría que la drástica disminución de linfocitos B en la periferia observada en nuestro trabajo era debida a la infiltración en el hígado por parte de estas células.

Por otro lado, nuestro trabajo observó alteraciones con potencial relevancia patogénica en diversas subpoblaciones de linfocitos T a pesar de que el APAP no indujo cambios en la concentración total de linfocitos T circulantes. Así, los ratones con daño hepático por APAP mostraron un aumento de los fenotipos activados de linfocitos T tanto de la subpoblación CD4⁺ como de la CD8⁺. Esta observación reproduce lo descrito en un caso clínico donde, tras analizar la activación de los linfocitos T y monocitos en muestras de sangre obtenidas de pacientes con DILI, demuestran que los linfocitos T activados se manifiestan en la fase aguda de la lesión hepática (Plüß et al., 2022). Varios estudios han sugerido también que la respuesta inmune dominante en un contexto de DILI es de tipo Th1, dado que se observa un aumento de infiltración de estas células en el tejido hepático tanto en modelos animales (Masubuchi et al., 2009) como en biopsias humanas (Islam et al., 2014). Este escenario podría explicar el descenso de la concentración de células Th1 circulantes en los ratones con daño hepático por APAP. Asimismo, esta disminución a nivel sistémico de las células Th1 ocurrió en paralelo al aumento de las células Th2. En este sentido, algunos estudios sugieren que la IL-4, citoquina producida por las células Th2, juega un papel en el efecto hepatotóxico de diversos fármacos puesto que la concentración de ésta aumenta en plasma en modelos murinos de DILI y su supresión se ha asociado a reducción de la hepatotoxicidad (Kobayashi et al., 2012). Por último, dado

que la lesión hepática por APAP es un proceso inflamatorio agudo, las células Th17 podrían cumplir una función esencial en el desarrollo de la enfermedad. En este sentido, diversos estudios demuestran un aumento significativo de la IL-17, citoquina producida por estas células, tanto en plasma tanto de pacientes (Zhu & Uetrecht, 2013) como de modelos animales de DILI (H.-C. Lee et al., 2018). La observación en nuestro trabajo de un aumento de la concentración de células Th17 circulantes en los ratones con daño hepático apoyaría el papel de las células Th17 en la patogénesis del DILI inducido por APAP.

Otra observación que destacar fue la alteración ocasionada por el daño hepático por APAP sobre las poblaciones de células de estirpe mieloide (Triantafyllou et al., 2021). Como en estudios previos, el aumento de las poblaciones mieloides se debió principalmente al aumento de los granulocitos y más concretamente, de los neutrófilos (Liu et al., 2004). También observamos una disminución en la proporción de monocitos circulantes en los ratones con daño hepático por APAP. En un contexto de ALF, los monocitos son característicamente reclutados en el hígado a través de su receptor CCR2 y, una vez en el tejido, se transforman en macrófagos que, junto con los neutrófilos, participan en el proceso inflamatorio (Krenkel et al., 2014). Junto a estas alteraciones, el daño hepático por APAP también disminuyó la concentración circulante del fenotipo inmaduro de las células dendríticas, posiblemente porque el ambiente inflamatorio causado por el APAP indujo el fenotipo maduro de estas células.

b) Alteraciones de las VEs derivadas de hepatocitos.

El modelo animal desarrollado en el presente trabajo, basado en el uso de ratones reporteros de linaje celular de doble fluorescencia, permitió explorar las alteraciones inducidas por el daño hepático por APAP sobre el perfil de VEs circulantes y, más aún, sobre las VEs procedentes en concreto de los hepatocitos, siendo este último un aspecto de gran novedad. Antes de realizar los experimentos en el modelo *in vivo*, evaluamos el efecto del APAP *in vitro* utilizando hepatocitos primarios de ratón. Diversos estudios demuestran que la resistencia de los hepatocitos al APAP varía en función de la especie, de la concentración del APAP y de la ventana de tiempo de acción. Jemnitz et al. observaron que los hepatocitos murinos, de rata y de humanos comenzaban a presentar resistencia y mayor viabilidad a partir de las 24 horas de cultivo en presencia del APAP

(Jemnitz et al., 2008), por lo que en nuestro trabajo escogimos las 24 horas tras la exposición a APAP como el punto de estudio del perfil de las VEs liberadas por los hepatocitos *in vitro*. En estos ensayos observamos que la inducción de citotoxicidad por APAP resultaba en un aumento de la LDH y de la concentración de VEs, exosomas (FM4-64+ CD81+) y cuerpos apoptóticos (FM4-64+ AnnV+) en el medio de cultivo, sin alteración del tamaño de las VEs.

En condiciones *in vivo*, estudios previos han comunicado un aumento significativo de las VEs en circulación en el modelo de daño hepático inducido por APAP, detectable incluso 6 horas post-administración (Duan et al., 2019). Además de confirmar esta observación, nuestro trabajo fue capaz de determinar que el aumento de VEs circulantes se debía específicamente a VEs liberadas por los hepatocitos. Así, detectamos un aumento significativo de las VEs EGFP+ tras la administración de APAP, es decir, de las VEs derivadas de hepatocitos, en la cepa AlbCre x mT/mG. Apoyando la utilidad de la cepa reportera mT/mG para investigar el tipo celular de origen de las VEs *in vivo*, hemos colaborado recientemente en un estudio en el que comunicamos el aumento de VEs procedentes de hepatocitos (EGFP+) en ratones AlbCre x mT/mG con enfermedad hepática por depósito de grasa, así como la presencia de marcadores en ellas (Epcam, CD133) indicadores de la presencia de esteatohepatitis (Muñoz-Hernández et al., 2023).

c) Biodistribución de VEs derivadas de hepatocitos *in vivo* en el contexto de daño hepático inducido por APAP

La comunicación entre órganos mediada a través de VEs se ha descrito en numerosos estudios: las células de los diferentes tejidos liberan vesículas a los fluidos corporales que son transportadas y captadas por otros distantes (Yáñez-Mó et al., 2015). Siendo el hígado un órgano que repercute en múltiples sistemas, es concebible que muchas de sus diversas funciones pueden estar mediadas por VEs. El desarrollo de cambios transcriptómicos en órganos extrahepáticos se ha demostrado en diferentes modelos murinos de ALF, sugiriendo que existe una comunicación entre el hígado y el resto de los órganos mediada por metabolitos séricos (Zheng et al., 2020). Por ello, en este proyecto investigamos la biodistribución de las VEs secretadas por hepatocitos en el modelo murino de daño hepático inducido por APAP. El empleo de la cepa reportera de linaje celular AlbCre x

mT/mG nos permitió determinar la localización de las VEs liberadas por los hepatocitos mediante el análisis de la expresión de EGFP+ en diferentes tejidos extrahepáticos.

El principal hallazgo en estos experimentos fue que la inducción de daño hepático agudo por APAP aumentó el número de células con expresión EGFP+, procedente de los hepatocitos, en los pulmones de ratones AlbCre x mT/mG comparado con el observado en los ratones sin daño hepático. La existencia de una interacción entre el hígado y el pulmón es bien conocida. Así, existen complicaciones pulmonares específicas de la enfermedad hepática crónica como el síndrome hepatopulmonar, la hipertensión portopulmonar o el hidrotórax hepático (Raevens et al., 2021), aunque la patogenia de estas alteraciones no se conoce con precisión. En el caso del daño hepático agudo, varios estudios preclínicos han demostrado cambios morfológicos y transcriptómicos en órganos extrahepáticos, especialmente en el pulmón (Zheng et al., 2020). Dentro de las causas de DILI, la intoxicación por APAP también se ha asociado con el desarrollo de disfunción pulmonar. Se ha demostrado que ratones expuestos a una dosis de APAP de 280 mg/kg presentaron una clara histopatología pulmonar, inflamación y cambios enfisematosos, así como aumento de la expresión de CYP2E1 y acúmulos de aductos APAP-proteína en el pulmón (Sandoval et al., 2019). Nuestros resultados evidencian la existencia de una comunicación hígado-pulmón en el contexto del ALF inducido por APAP, ya que la elevada señal EGFP+ detectada en el pulmón de ratones AlbCre x mT/mG con daño hepático agudo procede de la fluorescencia expresada por los hepatocitos en esta cepa.

A su vez, los resultados del experimento de biodistribución mostraron una alta intensidad EGFP+ detectada en el riñón de los ratones AlbCre x mT/mG, tanto sanos como con daño hepático inducido por APAP. Aunque existe una comunicación bidireccional entre el riñón y el hígado tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Capalbo et al., 2019), la elevada señal EGFP+ encontrada en los riñones probablemente se deba a la autofluorescencia del riñón y de la orina detectada en el canal del FITC/EGFP (Sun et al., 2011). Apoyando este escenario, en el análisis por microscopía confocal no se encontró señal EGFP específica en el riñón de ratones AlbCre x mT/mG al sustraer el *background*, y el riñón de ratones C57BL/6 salvajes, sin marcador fluorescente endógeno, también emite autofluorescencia en el canal FITC/EGFP (datos no mostrados). Por tanto, es muy probable que la mayor parte de la señal EGFP+ detectada no se deba a partículas procedentes de los hepatocitos.

Dificultades y limitaciones del estudio

Es importante destacar que el abordaje de los objetivos de nuestro trabajo implicó afrontar y superar una serie de dificultades y algunas limitaciones existentes en estudios previos. Entre estas dificultades, el empleo del ratón como modelo experimental conllevó una serie de inconvenientes. Un problema relevante fue la falta de conocimiento sobre su sistema inmunológico, particularmente a nivel periférico. Así, la mayoría de los estudios que analizan la respuesta inmune en ratones parten de los órganos linfoides (bazo, timo, placas de Peyer, etc) o bien de diversos tejidos implicados en cada patología (Misharin et al., 2013; Mogilenko et al., 2021; Yousefzadeh et al., 2021), lo que conlleva el sacrificio del animal y la obtención de información de un único punto temporal. Los pocos trabajos publicados que estudian el sistema inmunológico murino en sangre total analizan un número limitado de poblaciones, puesto que se desconocen los fenotipos presentes en la circulación periférica (Hensel et al., 2019; Skordos et al., 2021). Para solventar este problema, hay grupos que están desarrollando cepas de ratón “humanizado” que presentan un sistema inmune de origen humano, ya que éste se encuentra descrito con mayor detalle y podría simular de manera más similar la fisiopatología humana. Sin embargo, estos modelos presentan una serie de inconvenientes que aún deben mejorarse como la falta o desorganización de los órganos linfoides secundarios, la respuesta de las células del propio ratón frente al injerto de células humanas o la falta de reproducibilidad a la hora de generar la misma cepa (Chen et al., 2022). Estas limitaciones de los modelos humanizados imprimen mayor valor a la necesidad de caracterizar la respuesta inmunológica del ratón. En este sentido, la falta de referencias sobre los fenotipos característicos de las células inmunológicas en periferia y el desarrollo de un protocolo que permitiese la supervivencia del animal empleando un volumen mínimo de sangre fueron dos importantes retos que debimos superar para diseñar los paneles de anticuerpos dedicados al estudio del sistema inmune murino mediante citometría de flujo. Otra dificultad que afrontamos en el trabajo fue el desarrollo de un método de purificación de VEs derivadas de hepatocitos en base a la expresión endógena de la proteína fluorescente EGFP. Dada la escasa información de referencia disponible, el desarrollo de la técnica de aislamiento de VEs en combinación con el uso de *microbeads* anti-GFP supuso un reto técnico importante.

También es importante reconocer algunas limitaciones del presente trabajo. En primer lugar, el reducido volumen de plasma obtenido en cada ratón nos obligó a agrupar

muestras de varios ratones con el fin de conseguir un volumen de partida suficiente para comparar adecuadamente los diferentes protocolos de aislamiento de VEs que evaluamos en el presente trabajo. Pese a este problema, los experimentos tuvieron una buena reproducibilidad y homogeneidad intragrupo, consiguiendo revelar diferencias estadísticamente significativas entre las diversas condiciones y protocolos. En segundo lugar, no realizamos una caracterización completa de los aislados de VEs por Western blot, ya que no evaluamos la presencia de contaminación por proteínas no presentes en las VEs tal como indican las guías de la MISEV (*Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles*) (Théry et al., 2018). Esta limitación, sin embargo, no menoscaba el hallazgo de la presencia de EGFP en los aislados de VEs y, por otro lado, caracterizamos los aislados de VEs mediante técnicas complementarias como la citometría de flujo, que también proporcionó información relativa a la contaminación por partículas no-VEs. En tercer lugar, la cepa C57BL/6 tiene 2 subcepas: 6N y 6J. La cepa C57BL/6N es considerada el tipo salvaje puro mientras que la C57BL/6J, empleada en este proyecto, presenta una mutación en el gen de la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa, enzima implicada en la desintoxicación de ROS a nivel mitocondrial. Los ratones C57BL/6J son menos susceptibles que los C57BL/6N a la toxicidad inducida por APAP por presentar menos estrés oxidativo (Jaeschke et al., 2021), siendo posible que los ratones C57BL/6N presentasen manifestaciones más floridas del ALF como mayor aumento de la fosfatasa alcalina y la bilirrubina o reducción de la albúmina y las proteínas totales en suero (Aprioku & Gospel, 2021). Sin embargo, todos los ratones transgénicos utilizados en nuestro trabajo tenían trasfondo genético C57BL/6J, por lo que escogimos los ratones C57BL/6J salvajes como los controles más apropiados. Finalmente, los resultados del presente trabajo determinaron que la UC es la técnica más eficiente en el aislamiento de VEs presentes tanto en medio de cultivo como en plasma, pero varios estudios muestran la SEC como mejor método de purificación de VEs partiendo de muestras de plasma (Lobb et al., 2015; Welton et al., 2015). Otros estudios sugieren que la UC tiene menor rendimiento que la SEC, pero logra aislar VEs con mayor pureza (Takov et al., 2019). Estas discrepancias ponen de manifiesto la necesidad de estandarizar y uniformar los métodos de aislamiento de las VEs y, sobre todo, la manera de comunicar y detallar los métodos empleados en los estudios de VEs, siendo uno de los principales objetivos de la ISEV y de las guías publicadas por esta sociedad.

Perspectivas futuras

Actualmente, la detección de las enfermedades hepáticas se da con frecuencia en fases avanzadas de la patología, es decir, cuando la clínica es evidente. Esto se debe a que las pruebas realizadas en atención primaria, como un análisis de sangre, no aportan la información suficiente como para diagnosticarlas y pronosticar su evolución con precisión (Mijač et al., 2022). En el campo de la hepatología, sigue siendo necesaria la búsqueda de biomarcadores que ayuden a predecir y detectar dichas enfermedades en el ámbito de la atención primaria para así evitar complicaciones y estadios más avanzados cuyo último recurso sea el trasplante hepático. Las diferencias encontradas en nuestro trabajo entre las condiciones estudiadas (controles sanos y DILI inducido por APAP) abren una puerta hacia el análisis del perfil inmunológico y de las VEs como posibles biomarcadores de enfermedad hepática analizables en muestras obtenidas por una técnica mínimamente invasiva y realizada de forma rutinaria en clínica, como es un análisis de sangre. Objetivos futuros podrían incluir el análisis del contenido de las VEs derivadas de los hepatocitos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, así como la caracterización de la respuesta inmunológica en diferentes modelos de enfermedad hepática a lo largo de distintos puntos temporales.

CONCLUSIONES

1. La estrategia de citometría de flujo multiparamétrica desarrollada permite el estudio de una amplia variedad de fenotipos inmunes murinos empleando un volumen mínimo de sangre con supervivencia del animal.
2. Los ratones deficientes en IL-10 presentan en sangre una marcada linfopenia a expensas de linfocitos B, una desregulación de subpoblaciones de linfocitos T hacia fenotipos proinflamatorios activados, y un aumento de las células mieloides, en especial, neutrófilos y células dendríticas maduras.
3. Las VE derivadas de las células del ratón mT/mG reportero de Cre recombinasa conservan la fluorescencia de la célula de origen demostrando la validez de esta herramienta para evaluar VEs de un tipo celular específico en un organismo completo.
4. La combinación de ultracentrifugación y la separación inmuno-magnética frente a GFP consiguió el mejor balance entre cantidad y pureza para el aislamiento de exosomas EGFP+ del plasma en el modelo experimental murino.
5. El daño hepático agudo por paracetamol en ratones produjo alteraciones en diversas poblaciones inmunes detectadas en sangre periférica, así como el aumento de las VEs circulantes procedentes de hepatocitos.
6. El estudio de biodistribución apoya que el pulmón es el principal órgano de destino de las VEs derivadas de hepatocitos en el contexto de daño hepático agudo por paracetamol.
7. El empleo de la cepa mT/mG reportera de Cre recombinasa para el estudio de las VEs derivadas de un tipo celular específico, así como de su biodistribución en un organismo vivo, representa una estrategia de gran interés para superar dos de las principales limitaciones existentes en este campo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- Ahmadi, A., Fallah Vastani, Z., Abounoori, M., Azizi, M., Labani-Motlagh, A., Mami, S., & Mami, S. (2022). The role of NK and NKT cells in the pathogenesis and improvement of multiple sclerosis following disease-modifying therapies. *Health Science Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1002/hsr2.489>
- Aimaletdinov, A. M., & Gomzikova, M. O. (2022). Tracking of Extracellular Vesicles' Biodistribution: New Methods and Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11312. <https://doi.org/10.3390/ijms231911312>
- Akakpo, J., Ramachandran, A., Kandel, S., Ni, H., Kumer, S., Rumack, B., & Jaeschke, H. (2018). 4-Methylpyrazole protects against acetaminophen hepatotoxicity in mice and in primary human hepatocytes. *Human & Experimental Toxicology*, 37(12), 1310–1322. <https://doi.org/10.1177/0960327118774902>
- Akakpo, J. Y., Ramachandran, A., Duan, L., Schaich, M. A., Jaeschke, M. W., Freudenthal, B. D., Ding, W.-X., Rumack, B. H., & Jaeschke, H. (2019). Delayed Treatment With 4-Methylpyrazole Protects Against Acetaminophen Hepatotoxicity in Mice by Inhibition of c-Jun n-Terminal Kinase. *Toxicological Sciences*, 170(1), 57–68. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz077>
- Almeida, S., Santos, L., Falcão, A., Gomes, C., & Abrunhosa, A. (2020). In Vivo Tracking of Extracellular Vesicles by Nuclear Imaging: Advances in Radiolabeling Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9443. <https://doi.org/10.3390/ijms21249443>
- Aprioku, J. S., & Gospel, P. (2021). Concurrent administration of acetaminophen and ethanol: impact on mouse liver and testis. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 32(6), 1065–1074. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0136>
- Arifin, D. R., Witwer, K. W., & Bulte, J. W. M. (2022). Non-Invasive imaging of extracellular vesicles: Quo vaditis in vivo? *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(7). <https://doi.org/10.1002/jev2.12241>

- Arkesteijn, G. J. A., Lozano-Andrés, E., Libregts, S. F. W. M., & Wauben, M. H. M. (2020). Improved Flow Cytometric Light Scatter Detection of Submicron-Sized Particles by Reduction of Optical Background Signals. *Cytometry Part A*, *97*(6), 610–619. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24036>
- Bachurski, D., Schuldner, M., Nguyen, P., Malz, A., Reiners, K. S., Grenzi, P. C., Babatz, F., Schauss, A. C., Hansen, H. P., Hallek, M., & von Strandmann, E. P. (2019). Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis – An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *Journal of Extracellular Vesicles*, *8*(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1596016>
- Bajt, M. L., Cover, C., Lemasters, J. J., & Jaeschke, H. (2006). Nuclear Translocation of Endonuclease G and Apoptosis-Inducing Factor during Acetaminophen-Induced Liver Cell Injury. *Toxicological Sciences*, *94*(1), 217–225. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl077>
- Bala, S., Petrasek, J., Mundkur, S., Catalano, D., Levin, I., Ward, J., Alao, H., Kodys, K., & Szabo, G. (2012). Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology*, *56*(5), 1946–1957. <https://doi.org/10.1002/hep.25873>
- Berg, D. J., Zhang, J., Weinstock, J. v., Ismail, H. F., Earle, K. A., Alila, H., Pamukcu, R., Moore, S., & Lynch, R. G. (2002). Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology*, *123*(5), 1527–1542. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.1231527>
- Bernal, W., & Wendon, J. (2013). Acute Liver Failure. *New England Journal of Medicine*, *369*(26), 2525–2534. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208937>
- Bernaldo de Quiros, E., Seoane-Reula, E., Alonso-Lebrero, E., Pion, M., & Correa-Rocha, R. (2018). The role of regulatory T cells in the acquisition of tolerance to food allergens in children. *Allergologia et Immunopathologia*, *46*(6), 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.02.002>
- Böing, A. N., van der Pol, E., Grootemaat, A. E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-

- exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 23430.
<https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>
- Botha, J., Handberg, A., & Simonsen, J. B. (2022). Lipid-based strategies used to identify extracellular vesicles in flow cytometry can be confounded by lipoproteins: Evaluations of annexin V, lactadherin, and detergent lysis. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(4). <https://doi.org/10.1002/jev2.12200>
- BOYD, E. M., & BERECZKY, G. M. (1966). LIVER NECROSIS FROM PARACETAMOL. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 26(3), 606–614. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1966.tb01841.x>
- Boyer, T. D., & Rouff, S. L. (1971). Acetaminophen-induced hepatic necrosis and renal failure. *JAMA*, 218(3), 440–441.
- Bunchorntavakul, C., & Reddy, K. R. (2013). Acetaminophen-related Hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease*, 17(4), 587–607. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.07.005>
- Bunchorntavakul, C., & Reddy, K. R. (2018). Acetaminophen (APAP or N-Acetyl-p-Aminophenol) and Acute Liver Failure. *Clinics in Liver Disease*, 22(2), 325–346. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2018.01.007>
- Busse, S., Hoffmann, J., Michler, E., Hartig, R., Frodl, T., & Busse, M. (2021). Dementia-associated changes of immune cell composition within the cerebrospinal fluid. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 14, 100218. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100218>
- Cabeza-Cabrerizo, M., Cardoso, A., Minutti, C. M., Pereira da Costa, M., & Reis e Sousa, C. (2021). Dendritic Cells Revisited. *Annual Review of Immunology*, 39(1), 131–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020-053707>
- Cai, S., Cheng, X., Pan, X., & Li, J. (2017). Emerging role of exosomes in liver physiology and pathology. *Hepatology Research*, 47(2), 194–203. <https://doi.org/10.1111/hepr.12794>
- Cao, L., Yang, X., Chen, Y., Zhang, D., Jiang, X.-F., & Xue, P. (2019). Exosomal miR-21 regulates the TETs/PTENp1/PTEN pathway to promote hepatocellular carcinoma growth. *Molecular Cancer*, 18(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1075-2>

- Capalbo, O., Giuliani, S., Ferrero-Fernández, A., Casciato, P., & Musso, C. G. (2019). Kidney–liver pathophysiological crosstalk: its characteristics and importance. *International Urology and Nephrology*, *51*(12), 2203–2207. <https://doi.org/10.1007/s11255-019-02288-x>
- Carayon, K., Chaoui, K., Ronzier, E., Lazar, I., Bertrand-Michel, J., Roques, V., Balor, S., Terce, F., Lopez, A., Salomé, L., & Joly, E. (2011). Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(39), 34426–34439. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257444>
- Carnino, J. M., Hao Kwok, Z., & Jin, Y. (2021). Extracellular Vesicles: A Novel Opportunity for Precision Medicine in Respiratory Diseases. *Frontiers in Medicine*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.661679>
- Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Morishita, M., Matsumoto, A., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (2017). Cell type-specific and common characteristics of exosomes derived from mouse cell lines: Yield, physicochemical properties, and pharmacokinetics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *96*, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.009>
- maceutical Sciences*, *96*, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.009>
- Chaudhry, S., Emond, J., & Griesemer, A. (2019). Immune Cell Trafficking to the Liver. *Transplantation*, *103*(7), 1323–1337. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002690>
- Chayanupatkul, M., & Schiano, T. D. (2020). Acute Liver Failure Secondary to Drug-Induced Liver Injury. *Clinics in Liver Disease*, *24*(1), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2019.09.005>
- Chen, J., Liao, S., Xiao, Z., Pan, Q., Wang, X., Shen, K., Wang, S., Yang, L., Guo, F., Liu, H., & Pan, Q. (2022). The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007579>
- Chin, D. S., Lim, C. S. Y., Nordin, F., Arifin, N., & Jun, T. G. (2022). Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Through Natural Killer (NK) Cells: Unlocking NK Cells for Future Immunotherapy. *Current Pharmaceutical*

Biotechnology, 23(4), 552–578.

<https://doi.org/10.2174/1389201022666210820093608>

- Cho, Y.-E., Mezey, E., Hardwick, J. P., Salem, N., Clemens, D. L., & Song, B.-J. (2017). Increased ethanol-inducible cytochrome P450-2E1 and cytochrome P450 isoforms in exosomes of alcohol-exposed rodents and patients with alcoholism through oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Hepatology Communications*, 1(7), 675–690. <https://doi.org/10.1002/hep4.1066>
- Cho, Y.-E., Seo, W., Kim, D.-K., Moon, P.-G., Kim, S.-H., Lee, B.-H., Song, B.-J., & Baek, M.-C. (2018). Exogenous exosomes from mice with acetaminophen-induced liver injury promote toxicity in the recipient hepatocytes and mice. *Scientific Reports*, 8(1), 16070. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34309-7>
- Chuo, S. T.-Y., Chien, J. C.-Y., & Lai, C. P.-K. (2018). Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0494-5>
- Clemens, M. M., McGill, M. R., & Apte, U. (2019). *Mechanisms and biomarkers of liver regeneration after drug-induced liver injury* (pp. 241–262). <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.03.001>
- Collin, M., & Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 154(1), 3–20. <https://doi.org/10.1111/imm.12888>
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Connolly, M. K., Ayo, D., Malhotra, A., Hackman, M., Bedrosian, A. S., Ibrahim, J., Cieza-Rubio, N. E., Nguyen, A. H., Henning, J. R., Dorvil-Castro, M., Pachter, H. L., & Miller, G. (2011). Dendritic cell depletion exacerbates acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, 54(3), 959–968. <https://doi.org/10.1002/hep.24429>
- Connolly, M. K., Bedrosian, A. S., Malhotra, A., Henning, J. R., Ibrahim, J., Vera, V., Cieza-Rubio, N. E., Hassan, B. U., Pachter, H. L., Cohen, S., Frey, A. B., & Miller, G. (2010). In Hepatic Fibrosis, Liver Sinusoidal Endothelial Cells Acquire

- Enhanced Immunogenicity. *The Journal of Immunology*, 185(4), 2200–2208.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000332>
- Coumans, F. A. W., Brisson, A. R., Buzas, E. I., Dignat-George, F., Drees, E. E. E., El-Andaloussi, S., Emanuelli, C., Gasecka, A., Hendrix, A., Hill, A. F., Lacroix, R., Lee, Y., van Leeuwen, T. G., Mackman, N., Mäger, I., Nolan, J. P., van der Pol, E., Pegtel, D. M., Sahoo, S., ... Nieuwland, R. (2017). Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circulation Research*, 120(10), 1632–1648.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309417>
- Cover, C., Mansouri, A., Knight, T. R., Bajt, M. L., Lemasters, J. J., Pessayre, D., & Jaeschke, H. (2005). Peroxynitrite-Induced Mitochondrial and Endonuclease-Mediated Nuclear DNA Damage in Acetaminophen Hepatotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(2), 879–887.
<https://doi.org/10.1124/jpet.105.088898>
- da Rocha, B. A., Ritter, A. M. V., Ames, F. Q., Gonçalves, O. H., Leimann, F. V., Bracht, L., Natali, M. R. M., Cuman, R. K. N., & Bersani-Amado, C. Ap. (2017). Acetaminophen-induced hepatotoxicity: Preventive effect of trans anethole. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 213–220.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.014>
- Davidson, D. G., & Eastham, W. N. (1966). Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *BMJ*, 2(5512), 497–499. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5512.497>
- Deets, K. A., & Vance, R. E. (2021). Inflammasomes and adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 22(4), 412–422. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00869-6>
- Del Bianco, P., Pinton, L., Magri, S., Canè, S., Masetto, E., Basso, D., Padovan, M., Volpin, F., d'Avella, D., Lombardi, G., Zagonel, V., Bronte, V., Della Puppa, A., & Mandruzzato, S. (2022). Myeloid Diagnostic and Prognostic Markers of Immune Suppression in the Blood of Glioma Patients. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.809826>
- Devarbhavi, H. (2012). An Update on Drug-induced Liver Injury. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2(3), 247–259.
<https://doi.org/10.1016/j.jceh.2012.05.002>

- di Zeo-Sánchez, D. E., Segovia-Zafra, A., Matilla-Cabello, G., Pinazo-Bandera, J. M., Andrade, R. J., Lucena, M. I., & Villanueva-Paz, M. (2022). Modeling drug-induced liver injury: current status and future prospects. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *18*(9), 555–573.
<https://doi.org/10.1080/17425255.2022.2122810>
- Dong, V., Nanchal, R., & Karvellas, C. J. (2020). Pathophysiology of Acute Liver Failure. *Nutrition in Clinical Practice*, *35*(1), 24–29.
<https://doi.org/10.1002/ncp.10459>
- Doyle, L., & Wang, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, *8*(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Du, H.-J., Zhao, S.-X., Zhao, W., Fu, N., Li, W.-C., Qin, X.-J., Zhang, Y.-G., Nan, Y.-M., & Zhao, J.-M. (2021). Hepatic Macrophage activation and the LPS pathway in patients with different degrees of severity and histopathological patterns of drug induced liver injury. *Histology and Histopathology*, *36*(6), 653–662.
<https://doi.org/10.14670/HH-18-340>
- Duan, L., Ramachandran, A., Akakpo, J. Y., Weemhoff, J. L., Curry, S. C., & Jaeschke, H. (2019). Role of extracellular vesicles in release of protein adducts after acetaminophen-induced liver injury in mice and humans. *Toxicology Letters*, *301*, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.11.005>
- Edry-Botzer, L., & Gerlic, M. (2017). Exploding the necroptotic bubble. *Cell Stress*, *1*(2), 107–109. <https://doi.org/10.15698/cst2017.11.112>
- Ferriero, R., Nusco, E., De Cegli, R., Carissimo, A., Manco, G., & Brunetti-Pierri, N. (2018). Pyruvate dehydrogenase complex and lactate dehydrogenase are targets for therapy of acute liver failure. *Journal of Hepatology*, *69*(2), 325–335.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.016>
- Fonseca-Camarillo, G., & Yamamoto-Furusho, J. K. (2015). Immunoregulatory Pathways Involved in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(9), 2188–2193. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000477>
- Foureau, D. M., Walling, T. L., Maddukuri, V., Anderson, W., Culbreath, K., Kleiner, D. E., Ahrens, W. A., Jacobs, C., Watkins, P. B., Fontana, R. J., Chalasani, N.,

- Talwalkar, J., Lee, W. M., Stolz, A., Serrano, J., & Bonkovsky, H. L. (2015). Comparative analysis of portal hepatic infiltrating leucocytes in acute drug-induced liver injury, idiopathic autoimmune and viral hepatitis. *Clinical and Experimental Immunology*, *180*(1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/cei.12558>
- Froicu, M., Zhu, Y., & Cantorna, M. T. (2006). Vitamin D receptor is required to control gastrointestinal immunity in IL-10 knockout mice. *Immunology*, *117*(3), 310–318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02290.x>
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology*, *12*(4), 253–268. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Gandham, S., Su, X., Wood, J., Nocera, A. L., Alli, S. C., Milane, L., Zimmerman, A., Amiji, M., & Ivanov, A. R. (2020). Technologies and Standardization in Research on Extracellular Vesicles. *Trends in Biotechnology*, *38*(10), 1066–1098. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.05.012>
- Geerts, A., Niki, T., Hellemans, K., De Craemer, D., Van Den Berg, K., Lazou, J.-M., Stange, G., Van De Winkel, M., & De Bleser, P. (1998). Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting. *Hepatology*, *27*(2), 590–598. <https://doi.org/10.1002/hep.510270238>
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*, *327*(5966), 656–661. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>
- Gilfillan, A. M., & Rivera, J. (2009). The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunological Reviews*, *228*(1), 149–169. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00742.x>
- Gil-Manso, S., Herrero-Quevedo, D., Carbonell, D., Martínez-Bonet, M., Bernaldo-de-Quirós, E., Kennedy-Batalla, R., Gallego-Valle, J., López-Esteban, R., Blázquez-López, E., Miguens-Blanco, I., Correa-Rocha, R., Gomez-Verdejo, V., & Pion, M. (2023). Multidimensional analysis of immune cells from COVID-19 patients identified cell subsets associated with the severity at hospital admission. *PLOS Pathogens*, *19*(6), e1011432. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011432>

- Ginès, P., Krag, A., Abalde, J. G., Solà, E., Fabrellas, N., & Kamath, P. S. (2021). Liver cirrhosis. *The Lancet*, 398(10308), 1359–1376.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01374-X)
- GRANGE, C., TAPPARO, M., BRUNO, S., CHATTERJEE, D., QUESENBERRY, P. J., TETTA, C., & CAMUSSI, G. (2014). Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *International Journal of Molecular Medicine*, 33(5), 1055–1063.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1663>
- Guerra-Rebollo, M., Nogueira de Moraes, C., Alcoholado, C., Soler-Botija, C., Sanchez-Cid, L., Vila, O. F., Meca-Cortés, O., Ramos-Romero, S., Rubio, N., Becerra, J., Blanco, J., & Garrido, C. (2018). Glioblastoma Bystander Cell Therapy: Improvements in Treatment and Insights into the Therapy Mechanisms. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 11, 39–51.
<https://doi.org/10.1016/j.omto.2018.09.002>
- Guo, H., Chen, S., Xie, M., Zhou, C., & Zheng, M. (2021). The complex roles of neutrophils in APAP-induced liver injury. *Cell Proliferation*, 54(6).
<https://doi.org/10.1111/cpr.13040>
- Guo, S.-C., Tao, S.-C., & Dawn, H. (2018). Microfluidics-based on-a-chip systems for isolating and analysing extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1508271. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1508271>
- Hadizadeh, N., Bagheri, D., Shamsara, M., Hamblin, M. R., Farmany, A., Xu, M., Liang, Z., Razi, F., & Hashemi, E. (2022). Extracellular vesicles biogenesis, isolation, manipulation and genetic engineering for potential in vitro and in vivo therapeutics: An overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1019821. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1019821>
- Hammerich, L., Heymann, F., & Tacke, F. (2011). Role of IL-17 and Th17 Cells in Liver Diseases. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2011/345803>
- Hanawa, N., Shinohara, M., Saberi, B., Gaarde, W. A., Han, D., & Kaplowitz, N. (2008). Role of JNK Translocation to Mitochondria Leading to Inhibition of Mitochondria Bioenergetics in Acetaminophen-induced Liver Injury. *Journal of*

Biological Chemistry, 283(20), 13565–13577.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M708916200>

Harmon, C., Robinson, M. W., Fahey, R., Whelan, S., Houlihan, D. D., Geoghegan, J., & O'Farrelly, C. (2016). Tissue-resident Eomes^{hi} T-bet^{lo} CD56^{bright} NK cells with reduced proinflammatory potential are enriched in the adult human liver. *European Journal of Immunology*, 46(9), 2111–2120. <https://doi.org/10.1002/eji.201646559>

Hart, S. (1995). Immunohistochemical Localization of Acetaminophen in Target Tissues of the CD-1 Mouse: Correspondence of Covalent Binding with Toxicity. *Fundamental and Applied Toxicology*, 24(2), 260–274. <https://doi.org/10.1006/faat.1995.1029>

Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., Seremwe, M., Dismuke, W. M., Bieberich, E., Stamer, W. D., Hamrick, M. W., & Liu, Y. (2017). A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. *PLOS ONE*, 12(1), e0170628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170628>

Hendrikx, T., Porsch, F., Kiss, M. G., Rajcic, D., Papac-Miličević, N., Hoebinger, C., Goederle, L., Hladik, A., Shaw, L. E., Horstmann, H., Knapp, S., Derdak, S., Bilban, M., Heintz, L., Krawczyk, M., Paternostro, R., Trauner, M., Farlik, M., Wolf, D., & Binder, C. J. (2022). Soluble TREM2 levels reflect the recruitment and expansion of TREM2⁺ macrophages that localize to fibrotic areas and limit NASH. *Journal of Hepatology*, 77(5), 1373–1385. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.06.004>

Hensel, J. A., Khattar, V., Ashton, R., & Ponnazhagan, S. (2019). Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations. *Laboratory Investigation*, 99(1), 93–106. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0137-1>

Hodgman, M. J., & Garrard, A. R. (2012). A Review of Acetaminophen Poisoning. *Critical Care Clinics*, 28(4), 499–516. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.006>

Holman, N. S., Mosedale, M., Wolf, K. K., LeCluyse, E. L., & Watkins, P. B. (2016). Subtoxic Alterations in Hepatocyte-Derived Exosomes: An Early Step in Drug-

Induced Liver Injury? *Toxicological Sciences*, 151(2), 365–375.

<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw047>

- Hu, L., Wickline, S. A., & Hood, J. L. (2015). Magnetic resonance imaging of melanoma exosomes in lymph nodes. *Magnetic Resonance in Medicine*, 74(1), 266–271. <https://doi.org/10.1002/mrm.25376>
- Huang, X.-Y., Huang, Z.-L., Huang, J., Xu, B., Huang, X.-Y., Xu, Y.-H., Zhou, J., & Tang, Z.-Y. (2020). Exosomal circRNA-100338 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via enhancing invasiveness and angiogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-1529-9>
- Imai, T., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Kato, K., Morishita, M., Yamashita, T., Matsumoto, A., Charoenviriyakul, C., & Takakura, Y. (2015). Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 26238. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.26238>
- Ishida, Y., Kondo, T., Ohshima, T., Fujiwara, H., Iwakura, Y., & Mukaida, N. (2002). A pivotal involvement of IFN- γ in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *The FASEB Journal*, 16(10), 1227–1236. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0046com>
- Islam, M. S., Wright, G., Tanner, P., & Lucas, R. (2014). A case of anastrozole-related drug-induced autoimmune hepatitis. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 7(5), 414–417. <https://doi.org/10.1007/s12328-014-0512-4>
- Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>
- Jaeschke, H., Adelusi, O. B., Akakpo, J. Y., Nguyen, N. T., Sanchez-Guerrero, G., Umbaugh, D. S., Ding, W.-X., & Ramachandran, A. (2021). Recommendations for the use of the acetaminophen hepatotoxicity model for mechanistic studies and how to avoid common pitfalls. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(12), 3740–3755. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.09.023>

- Jaeschke, H., Akakpo, J. Y., Umbaugh, D. S., & Ramachandran, A. (2020). Novel Therapeutic Approaches Against Acetaminophen-induced Liver Injury and Acute Liver Failure. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, *174*(2), 159–167. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa002>
- Jaeschke, H., McGill, M. R., & Ramachandran, A. (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*, *44*(1), 88–106. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.602688>
- James, L. P., Letzig, L., Simpson, P. M., Capparelli, E., Roberts, D. W., Hinson, J. A., Davern, T. J., & Lee, W. M. (2009). Pharmacokinetics of Acetaminophen-Protein Adducts in Adults with Acetaminophen Overdose and Acute Liver Failure. *Drug Metabolism and Disposition*, *37*(8), 1779–1784. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.026195>
- Jemnitz, K., Veres, Z., Monostory, K., Kóbori, L., & Vereczkey, L. (2008). Interspecies differences in acetaminophen sensitivity of human, rat, and mouse primary hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, *22*(4), 961–967. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.02.001>
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry*, *262*(19), 9412–9420.
- Kang, A. M., Padilla-Jones, A., Fisher, E. S., Akakpo, J. Y., Jaeschke, H., Rumack, B. H., Gerkin, R. D., & Curry, S. C. (2020). The Effect of 4-Methylpyrazole on Oxidative Metabolism of Acetaminophen in Human Volunteers. *Journal of Medical Toxicology*, *16*(2), 169–176. <https://doi.org/10.1007/s13181-019-00740-z>
- Karimi, N., Dalirfardouei, R., Dias, T., Lötvall, J., & Lässer, C. (2022). Tetraspanins distinguish separate extracellular vesicle subpopulations in human serum and plasma – Contributions of platelet extracellular vesicles in plasma samples. *Journal of Extracellular Vesicles*, *11*(5). <https://doi.org/10.1002/jev2.12213>
- Karlsson, J. O. G., Ignarro, L. J., Lundström, I., Jynge, P., & Almén, T. (2015). Calmangafodipir [Ca₄Mn(DPDP)₅], mangafodipir (MnDPDP) and MnPLED with

- special reference to their SOD mimetic and therapeutic properties. *Drug Discovery Today*, 20(4), 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.008>
- Keeney, M., Hedley, B. D., & Chin-Yee, I. H. (2017). Flow cytometry-Recognizing unusual populations in leukemia and lymphoma diagnosis. *International Journal of Laboratory Hematology*, 39, 86–92. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12666>
- Khan, U., & Ghazanfar, H. (2018). T Lymphocytes and Autoimmunity. *Int Rev Cell Mol Biol*, 125–168. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.008>
- Kobayashi, M., Higuchi, S., Ide, M., Nishikawa, S., Fukami, T., Nakajima, M., & Yokoi, T. (2012). Th2 cytokine-mediated methimazole-induced acute liver injury in mice. *Journal of Applied Toxicology*, 32(10), 823–833. <https://doi.org/10.1002/jat.2731>
- Kormelink, T. G., Arkesteijn, G. J. A., Nauwelaers, F. A., van den Engh, G., Nolte-’t Hoen, E. N. M., & Wauben, M. H. M. (2016). Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. *Cytometry Part A*, 89(2), 135–147. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22644>
- Kostallari, E., Hirsova, P., Prasnicka, A., Verma, V. K., Yaqoob, U., Wongjarupong, N., Roberts, L. R., & Shah, V. H. (2018). Hepatic stellate cell-derived platelet-derived growth factor receptor-alpha-enriched extracellular vesicles promote liver fibrosis in mice through SHP2. *Hepatology*, 68(1), 333–348. <https://doi.org/10.1002/hep.29803>
- Krenkel, O., Mossanen, J. C., & Tacke, F. (2014). Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 3(6), 331–343. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.01>
- Kubes, P., & Jenne, C. (2018). Immune Responses in the Liver. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 247–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052415>
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., & Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2), 263–274. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80068-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80068-P)

- Kusuma, G. D., Barabadi, M., Tan, J. L., Morton, D. A. v., Frith, J. E., & Lim, R. (2018). To Protect and to Preserve: Novel Preservation Strategies for Extracellular Vesicles. *Frontiers in Pharmacology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01199>
- Lakkaraju, A., & Rodriguez-Boulan, E. (2008). Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends in Cell Biology*, *18*(5), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.03.002>
- Larson, A. M. (2007). Acetaminophen Hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease*, *11*(3), 525–548. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.06.006>
- Lawson, J. A. (2000). The Hepatic Inflammatory Response after Acetaminophen Overdose: Role of Neutrophils. *Toxicological Sciences*, *54*(2), 509–516. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.2.509>
- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, *112*(5), 1570–1580. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>
- Lee, H.-C., Liao, C.-C., Day, Y.-J., Liou, J.-T., Li, A. H., & Liu, F.-C. (2018). IL-17 deficiency attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicology Letters*, *292*, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.04.021>
- Lee, Y.-S., Kim, S. Y., Ko, E., Lee, J.-H., Yi, H.-S., Yoo, Y. J., Je, J., Suh, S. J., Jung, Y. K., Kim, J. H., Seo, Y. S., Yim, H. J., Jeong, W.-I., Yeon, J. E., Um, S. H., & Byun, K. S. (2017). Exosomes derived from palmitic acid-treated hepatocytes induce fibrotic activation of hepatic stellate cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 3710. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03389-2>
- Levine, M., O'Connor, A. D., Padilla-Jones, A., & Gerkin, R. D. (2016). Comparison of Prothrombin Time and Aspartate Aminotransferase in Predicting Hepatotoxicity After Acetaminophen Overdose. *Journal of Medical Toxicology*, *12*(1), 100–106. <https://doi.org/10.1007/s13181-015-0504-x>
- Li, L., & Zeng, Z. (2020). Live Imaging of Innate and Adaptive Immune Responses in the Liver. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.564768>

- Li, Y.-J., Wu, J.-Y., Wang, J.-M., Hu, X.-B., & Xiang, D.-X. (2020). Emerging strategies for labeling and tracking of extracellular vesicles. *Journal of Controlled Release*, 328, 141–159. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.08.056>
- Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N., & Brisson, A. R. (2015). High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 29509. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.29509>
- Liu, Z.-X., Govindarajan, S., & Kaplowitz, N. (2004). Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology*, 127(6), 1760–1774. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.08.053>
- Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., & Sandvig, K. (2013). Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(7), 1302–1309. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.04.011>
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen Wen, S., Wong, C. S. F., Wiegmans, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 27031. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031>
- Lopez, M., Kopec, A. K., Joshi, N., Geddings, J. E., Cline, H., Towery, K. L., Rockwell, C. E., Mackman, N., & Luyendyk, J. P. (2014). Fas-Induced Apoptosis Increases Hepatocyte Tissue Factor Procoagulant Activity In Vitro and In Vivo. *Toxicological Sciences*, 141(2), 453–464. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu139>
- López-Abente, J., Martínez-Bonet, M., Bernaldo-de-Quirós, E., Camino, M., Gil, N., Panadero, E., Gil-Jaurena, J. M., Clemente, M., Urschel, S., West, L., Pion, M., & Correa-Rocha, R. (2021). Basiliximab impairs regulatory T cell (TREG) function and could affect the short-term graft acceptance in children with heart transplantation. *Scientific Reports*, 11(1), 827. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80567-9>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4+ T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>

- Mackay, I. R. (2002). Hepatoimmunology: A perspective. *Immunology and Cell Biology*, 80(1), 36–44. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2002.01063.x>
- Malhi, H., Gores, G. J., & Lemasters, J. J. (2006). Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths? *Hepatology*, 43(S1), S31–S44. <https://doi.org/10.1002/hep.21062>
- Mao, X., Tey, S. K., Yeung, C. L. S., Kwong, E. M. L., Fung, Y. M. E., Chung, C. Y. S., Mak, L.-Y., Wong, D. K. H., Yuen, M.-F., Ho, J. C. M., Pang, H., Wong, M. P., Leung, C. O.-N., Lee, T. K. W., Ma, V., Cho, W. C.-S., Cao, P., Xu, X., Gao, Y., & Yam, J. W. P. (2020). Nidogen 1-Enriched Extracellular Vesicles Facilitate Extrahepatic Metastasis of Liver Cancer by Activating Pulmonary Fibroblasts to Secrete Tumor Necrosis Factor Receptor 1. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 7(21), 2002157. <https://doi.org/10.1002/advs.202002157>
- Marques, P. E., Oliveira, A. G., Pereira, R. V., David, B. A., Gomides, L. F., Saraiva, A. M., Pires, D. A., Novaes, J. T., Patricio, D. O., Cisalpino, D., Menezes-Garcia, Z., Leevy, W. M., Chapman, S. E., Mahecha, G., Marques, R. E., Guabiraba, R., Martins, V. P., Souza, D. G., Mansur, D. S., ... Menezes, G. B. (2015). Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology*, 61(1), 348–360. <https://doi.org/10.1002/hep.27216>
- Martin-Murphy, B. v., Holt, M. P., & Ju, C. (2010). The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Toxicology Letters*, 192(3), 387–394. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.11.016>
- Martin-Murphy, B. v., Kominsky, D. J., Orlicky, D. J., Donohue, T. M., & Ju, C. (2013). Increased susceptibility of natural killer T-cell-deficient mice to acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology*, 57(4), 1575–1584. <https://doi.org/10.1002/hep.26134>
- Masson, M. J., Carpenter, L. D., Graf, M. L., & Pohl, L. R. (2008). Pathogenic role of natural killer T and natural killer cells in acetaminophen-induced liver injury in mice is dependent on the presence of dimethyl sulfoxide. *Hepatology*, 48(3), 889–897. <https://doi.org/10.1002/hep.22400>

- Masubuchi, Y., Sugiyama, S., & Horie, T. (2009). Th1/Th2 cytokine balance as a determinant of acetaminophen-induced liver injury. *Chemico-Biological Interactions*, 179(2–3), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.028>
- McGill, M. R., & Hinson, J. A. (2020). The development and hepatotoxicity of acetaminophen: reviewing over a century of progress. *Drug Metabolism Reviews*, 52(4), 472–500. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1832112>
- McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2013). Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharmaceutical Research*, 30(9), 2174–2187. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1007-6>
- McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2019). Animal models of drug-induced liver injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(5), 1031–1039. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.037>
- McGill, M. R., Lebofsky, M., Norris, H.-R. K., Slawson, M. H., Bajt, M. L., Xie, Y., Williams, C. D., Wilkins, D. G., Rollins, D. E., & Jaeschke, H. (2013). Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: Dose–response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 269(3), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.03.026>
- McLellan, M. A., Rosenthal, N. A., & Pinto, A. R. (2017). Cre- lox P-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Current Protocols in Mouse Biology*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/cpmo.22>
- Metushi, I. G., Sanders, C., Lee, W. M., & Uetrecht, J. (2014). Detection of anti-isoniazid and anti-cytochrome P450 antibodies in patients with isoniazid-induced liver failure. *Hepatology*, 59(3), 1084–1093. <https://doi.org/10.1002/hep.26564>
- Mijač, D., Krstić, M. N., Marković, A. P., Popović, D. D., Krstić, J. M., & Milosavljević, T. (2022). Abnormal Liver Blood Tests: Primary Care Approach. *Digestive Diseases*, 40(2), 215–222. <https://doi.org/10.1159/000517016>
- Miranda, K. C., Bond, D. T., McKee, M., Skog, J., Păunescu, T. G., da Silva, N., Brown, D., & Russo, L. M. (2010). Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney International*, 78(2), 191–199. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.106>

- Misharin, A. V., Morales-Nebreda, L., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. S., & Perlman, H. (2013). Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(4), 503–510. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0086MA>
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M. Á., Bernad, A., & Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature Communications*, 2(1), 282. <https://doi.org/10.1038/ncomms1285>
- Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2012). Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(5), 328–335. <https://doi.org/10.1038/nrm3335>
- Mogilenko, D. A., Shpynov, O., Andhey, P. S., Arthur, L., Swain, A., Esaulova, E., Brioschi, S., Shchukina, I., Kerndl, M., Bambouskova, M., Yao, Z., Laha, A., Zaitsev, K., Burdess, S., Gillfilan, S., Stewart, S. A., Colonna, M., & Artyomov, M. N. (2021). Comprehensive Profiling of an Aging Immune System Reveals Clonal GZMK+ CD8+ T Cells as Conserved Hallmark of Inflammaging. *Immunity*, 54(1), 99-115.e12. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.005>
- Momen-Heravi, F., Catalano, D., Talis, A., Szabo, G., & Bala, S. (2021). Protective effect of LNA-anti-miR-132 therapy on liver fibrosis in mice. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 25, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.05.007>
- Morrison, E. E., Oatey, K., Gallagher, B., Grahamslaw, J., O'Brien, R., Black, P., Oosthuyzen, W., Lee, R. J., Weir, C. J., Henriksen, D., & Dear, J. W. (2019). Principal results of a randomised open label exploratory, safety and tolerability study with calmagafodipir in patients treated with a 12 h regimen of N-acetylcysteine for paracetamol overdose (POP trial). *EBioMedicine*, 46, 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.013>
- Mueller, S. K., Nocera, A. L., & Bleier, B. S. (2018). Exosome function in aerodigestive mucosa. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(2), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.10.008>

- Muñoz-Hernández, R., Gato, S., Gil-Gómez, A., Aller, R., Rojas, A., Morán, L., Gallego, J., Blázquez-López, E., Gallego-Durán, R., Montero-Vallejo, R., García-Fernández, V., Maya-Miles, D., Rico, M. del C., Cubero, F. J., Vaquero, J., Ampuero, J., Bañares, R., & Romero-Gómez, M. (2023). Role of EpCAM+ CD133+ extracellular vesicles in steatosis to steatohepatitis transition in NAFLD. *Liver International*, *43*(9), 1909–1919. <https://doi.org/10.1111/liv.15604>
- Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., & Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis*, *45*(9), 593–605. <https://doi.org/10.1002/dvg.20335>
- Nagasawa, M., Mitsuiki, N., Yanagimachi, M., Yamamoto, M., Fukuda, T., Miura, O., Oba, R., Igarashi, A., Nagata, K., & Morio, T. (2021). Utility of novel T-cell-specific extracellular vesicles in monitoring and evaluation of acute GVHD. *International Journal of Hematology*, *113*(6), 910–920. <https://doi.org/10.1007/s12185-021-03113-x>
- Nemeth, E., Baird, A. W., & O’Farrelly, C. (2009). Microanatomy of the liver immune system. *Seminars in Immunopathology*, *31*(3), 333–343. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0173-4>
- Ni, M., Wang, L., Yang, M., Neuber, B., Sellner, L., Hückelhoven-Krauss, A., Schubert, M.-L., Luft, T., Hegenbart, U., Schönland, S., Wuchter, P., Chen, B., Eckstein, V., Krüger, W., Yerushalmi, R., Beider, K., Nagler, A., Müller-Tidow, C., Dreger, P., ... Schmitt, A. (2019). Shaping of CD56^{bri} Natural Killer Cells in Patients With Steroid-Refractory/Resistant Acute Graft-vs.-Host Disease via Extracorporeal Photopheresis. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00547>
- Nojima, H., Freeman, C. M., Schuster, R. M., Japtok, L., Kleuser, B., Edwards, M. J., Gulbins, E., & Lentsch, A. B. (2016). Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate. *Journal of Hepatology*, *64*(1), 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.030>
- Oksvold, M. P., Neurauter, A., & Pedersen, K. W. (2015). Magnetic Bead-Based Isolation of Exosomes. In *Methods Mol Biol* (pp. 465–481). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1538-5_27

- Ollinger, J. M., & Fessler, J. A. (1997). Positron-emission tomography. *IEEE Signal Processing Magazine*, *14*(1), 43–55. <https://doi.org/10.1109/79.560323>
- O'Malley, G., Mizrahi, F., Giraldo, P., O'Malley, R., Rollins, D., & Wilkins, D. (2015). Protein-Derived Acetaminophen-Cysteine Can Be Detected After Repeated Supratherapeutic Ingestion of Acetaminophen in the Absence of Hepatotoxicity. *Journal of Medical Toxicology*, *11*(3), 317–320. <https://doi.org/10.1007/s13181-015-0484-x>
- Palomo, L., Mleczko, J. E., Azkargorta, M., Conde-Vancells, J., González, E., Elortza, F., Royo, F., & Falcon-Perez, J. M. (2018). Abundance of Cytochromes in Hepatic Extracellular Vesicles Is Altered by Drugs Related With Drug-Induced Liver Injury. *Hepatology Communications*, *2*(9), 1064–1079. <https://doi.org/10.1002/hep4.1210>
- Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., & Johnstone, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, *101*(3), 942–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942>
- Parasuraman S, Raveendran R, & Kesavan R. (2010). Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, *1*(2), 87–93. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.72350>
- Parhamifar, L., Andersen, H., & Moghimi, S. M. (2019). Lactate Dehydrogenase Assay for Assessment of Polycation Cytotoxicity. *Methods in Molecular Biology*, 291–299. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9092-4_18
- Park, J. H., Kwon, J. G., Kim, S. J., Song, D. K., Lee, S. G., Kim, E. S., Cho, K. B., Jang, B. I., Kim, D. H., Sin, J.-I., Kim, T. W., Song, I. H., & Park, K. S. (2015). Alterations of Colonic Contractility in an Interleukin-10 Knockout Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, *21*(1), 051–061. <https://doi.org/10.5056/jnm14008>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, *357*(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Payancé, A., Silva-Junior, G., Bissonnette, J., Tanguy, M., Pasquet, B., Levi, C., Roux, O., Nekachtali, O., Baiges, A., Hernández-Gea, V., Laouénan, C., Lebrech, D.,

- Albuquerque, M., Paradis, V., Moreau, R., Valla, D., Durand, F., Boulanger, C. M., Garcia-Pagan, J., & Rautou, P. (2018). Hepatocyte microvesicle levels improve prediction of mortality in patients with cirrhosis. *Hepatology*, *68*(4), 1508–1518. <https://doi.org/10.1002/hep.29903>
- Pino-Martínez, A. M., Miranda, C. G., Batalla, E. I., González-Cappa, S. M., & Alba Soto, C. D. (2018). IL-10 participates in the expansion and functional activation of CD8⁺ T cells during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Leukocyte Biology*, *105*(1), 163–175. <https://doi.org/10.1002/JLB.3A0318-111RR>
- Plüß, M., Tampe, D., Schwörer, H., Bremer, S. C. B., & Tampe, B. (2022). Case report: Kinetics of human leukocyte antigen receptor HLA-DR during liver injury induced by potassium para-aminobenzoate as assessed for causality using the updated RUCAM. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.966910>
- Poussin, M. A., Goluszko, E., Hughes, T. K., Duchicella, S. I., & Christadoss, P. (2000). Suppression of experimental autoimmune myasthenia gravis in IL-10 gene-disrupted mice is associated with reduced B cells and serum cytotoxicity on mouse cell line expressing AChR. *Journal of Neuroimmunology*, *111*(1–2), 152–160. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00385-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00385-4)
- Povero, D., Panera, N., Eguchi, A., Johnson, C. D., Papouchado, B. G., de Araujo Horcel, L., Pinatel, E. M., Alisi, A., Nobili, V., & Feldstein, A. E. (2015). Lipid-Induced Hepatocyte-Derived Extracellular Vesicles Regulate Hepatic Stellate Cells via MicroRNA Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ . *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *1*(6), 646-663.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.07.007>
- Prescott, L. F., Roscoe, P., Wright, N., & Brown, S. S. (1971). PLASMA-PARACETAMOL HALF-LIFE AND HEPATIC NECROSIS IN PATIENTS WITH PARACETAMOL OVERDOSAGE. *The Lancet*, *297*(7698), 519–522. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91125-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91125-1)
- Qu, C., Edwards, E. W., Tacke, F., Angeli, V., Llodrá, J., Sanchez-Schmitz, G., Garin, A., Haque, N. S., Peters, W., van Rooijen, N., Sanchez-Torres, C., Bromberg, J., Charo, I. F., Jung, S., Lira, S. A., & Randolph, G. J. (2004). Role of CCR8 and

- Other Chemokine Pathways in the Migration of Monocyte-derived Dendritic Cells to Lymph Nodes. *Journal of Experimental Medicine*, 200(10), 1231–1241.
<https://doi.org/10.1084/jem.20032152>
- Raevens, S., Boret, M., De Pauw, M., Fallon, M. B., & Van Vlierberghe, H. (2021). Pulmonary Abnormalities in Liver Disease: Relevance to Transplantation and Outcome. *Hepatology*, 74(3), 1674–1686. <https://doi.org/10.1002/hep.31770>
- Ramos-Gomes, F., Ferreira, N., Alves, F., & Markus, M. (2022). An Alternative Technique for Monitoring the Live Interaction of Monocytes and Tumor Cells with Nanoparticles in the Mouse Lung. *BIO-PROTOCOL*, 12(2).
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4293>
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V, Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1161–1172.
<https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Ratziu, V., Charlotte, F., Heurtier, A., Gombert, S., Giral, P., Bruckert, E., Grimaldi, A., Capron, F., & Poynard, T. (2005). Sampling Variability of Liver Biopsy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 128(7), 1898–1906.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.084>
- Reina-Campos, M., Scharping, N. E., & Goldrath, A. W. (2021). CD8+ T cell metabolism in infection and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 21(11), 718–738. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00537-8>
- Robinson, M. W., Harmon, C., & O’Farrelly, C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular & Molecular Immunology*, 13(3), 267–276. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.3>
- Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2006). THE EOSINOPHIL. *Annual Review of Immunology*, 24(1), 147–174.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720>

- Royo, F., Moreno, L., Mleczko, J., Palomo, L., Gonzalez, E., Cabrera, D., Cogolludo, A., Vizcaino, F. P., van-Liempd, S., & Falcon-Perez, J. M. (2017). Hepatocyte-secreted extracellular vesicles modify blood metabolome and endothelial function by an arginase-dependent mechanism. *Scientific Reports*, 7, 42798. <https://doi.org/10.1038/srep42798>
- Royo, F., Schlangen, K., Palomo, L., Gonzalez, E., Conde-Vancells, J., Berisa, A., Aransay, A. M., & Falcon-Perez, J. M. (2013). Transcriptome of Extracellular Vesicles Released by Hepatocytes. *PLoS ONE*, 8(7), e68693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068693>
- Sadallah, S., Eken, C., & Schifferli, J. A. (2010). Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 163(1), 26–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04271.x>
- Saha, B., Momen-Heravi, F., Furi, I., Kodys, K., Catalano, D., Gangopadhyay, A., Haraszti, R., Satishchandran, A., Iracheta-Vellve, A., Adejumo, A., Shaffer, S. A., & Szabo, G. (2018). Extracellular vesicles from mice with alcoholic liver disease carry a distinct protein cargo and induce macrophage activation through heat shock protein 90. *Hepatology*, 67(5), 1986–2000. <https://doi.org/10.1002/hep.29732>
- Saito, C., Zwingmann, C., & Jaeschke, H. (2010). Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology*, 51(1), 246–254. <https://doi.org/10.1002/hep.23267>
- Saito-Moriya, R., Nakayama, J., Kamiya, G., Kitada, N., Obata, R., Maki, S. A., & Aoyama, H. (2021). How to Select Firefly Luciferin Analogues for In Vivo Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1848. <https://doi.org/10.3390/ijms22041848>
- Salvador-Coloma, C., Santaballa, A., Sanmartín, E., Calvo, D., García, A., Hervás, D., Cordon, L., Quintas, G., Ripoll, F., Panadero, J., & Font de Mora, J. (2020). Immunosuppressive profiles in liquid biopsy at diagnosis predict response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *European Journal of Cancer*, 139, 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.08.020>
- Sandoval, J., Orlicky, D. J., Allawzi, A., Butler, B., Ju, C., Phan, C. T., Toston, R., De Dios, R., Nguyen, L., McKenna, S., Nozik-Grayck, E., & Wright, C. J. (2019).

Toxic Acetaminophen Exposure Induces Distal Lung ER Stress, Proinflammatory Signaling, and Emphysematous Changes in the Adult Murine Lung. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–15.

<https://doi.org/10.1155/2019/7595126>

SCHEININ, T., BUTLER, D. M., SALWAY, F., SCALLON, B., & FELDMANN, M. (2003). Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 133(1), 38–43. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02193.x>

Schlosser, S. (2000). Induction of Murine Hepatocyte Death by Membrane-Bound CD95 (Fas/APO-1)-Ligand: Characterization of an In Vitro System. *Hepatology*, 32(4), 779–785. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.18422>

Setshedi, M., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2010). Acetaldehyde Adducts in Alcoholic Liver Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(3), 178–185. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.3.12288>

Shah, R., Patel, T., & Freedman, J. E. (2018). Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *New England Journal of Medicine*, 379(10), 958–966. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1704286>

Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1567–1572. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>

Shi, M., Yang, Q., Monsel, A., Yan, J., Dai, C., Zhao, J., Shi, G., Zhou, M., Zhu, X., Li, S., Li, P., Wang, J., Li, M., Lei, J., Xu, D., Zhu, Y., & Qu, J. (2021). Preclinical efficacy and clinical safety of clinical-grade nebulized allogenic adipose mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(10). <https://doi.org/10.1002/jev2.12134>

Shi, M., Zhou, Z., Zhou, Z., Shen, L., Shen, J., Zhou, G., & Zhu, R. (2022). Identification of key genes and infiltrating immune cells among acetaminophen-induced acute liver failure and HBV-associated acute liver failure. *Annals of Translational Medicine*, 10(14), 775–775. <https://doi.org/10.21037/atm-22-2742>

- Shinoda, H., Shannon, M., & Nagai, T. (2018). Fluorescent Proteins for Investigating Biological Events in Acidic Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1548. <https://doi.org/10.3390/ijms19061548>
- Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6466. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- Simoës, C., Chillon, M.-C., Martínez-Cuadrón, D., Calasanz, M.-J., Vridiales, M.-B., Vazquez, I., Hernández-Ruano, M., Ariceta, B., Aguirre-Ruiz, P., Burgos, L., Alignani, D., Sarvide, S., Villar, S., Pierola, A. A., Prosper, F., Ayala, R., Martínez-López, J., Bergua Burgues, J. M., Vives, S., ... Paiva, B. (2023). Integrated flow cytometry and sequencing to reconstruct evolutionary patterns from dysplasia to acute myeloid leukemia. *Blood Advances*, *7*(1), 167–173. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008141>
- Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*(4), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007>
- Singer, A. J., Carracio, T. R., & Mofenson, H. C. (1995). The Temporal Profile of Increased Transaminase Levels in Patients With Acetaminophen-Induced Liver Dysfunction. *Annals of Emergency Medicine*, *26*(1), 49–53. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(95\)70237-7](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(95)70237-7)
- Singh, R., Sharma, P., & Wadhwan, V. (2021). Neutrophils defending the defenders. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, *25*(1), 177. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_495_20
- Skordos, I., Demeyer, A., & Beyaert, R. (2021). Analysis of T cells in mouse lymphoid tissue and blood with flow cytometry. *STAR Protocols*, *2*(1), 100351. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100351>
- Sódar, B. W., Kittel, Á., Pálóczi, K., Vukman, K. v, Osteikoetxea, X., Szabó-Taylor, K., Németh, A., Sperlágh, B., Baranyai, T., Giricz, Z., Wiener, Z., Turiák, L., Drahos, L., Pállinger, É., Vékey, K., Ferdinandy, P., Falus, A., & Buzás, E. I. (2016). Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles

- during isolation and detection. *Scientific Reports*, 6(1), 24316.
<https://doi.org/10.1038/srep24316>
- Specht, S., Arriens, S., & Hoerauf, A. (2006). Induction of chronic colitis in IL-10 deficient mice requires IL-4. *Microbes and Infection*, 8(3), 694–703.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.09.006>
- Šrajer Gajdošik, M., Kovač Peić, A., Begić, M., Grbčić, P., Brilliant, K. E., Hixson, D. C., & Josić, D. (2022). Possible Role of Extracellular Vesicles in Hepatotoxicity of Acetaminophen. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 8870.
<https://doi.org/10.3390/ijms23168870>
- Stone, K. D., Prussin, C., & Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S73–S80.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.017>
- Stranska, R., Gysbrechts, L., Wouters, J., Vermeersch, P., Bloch, K., Dierickx, D., Andrei, G., & Snoeck, R. (2018). Comparison of membrane affinity-based method with size-exclusion chromatography for isolation of exosome-like vesicles from human plasma. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/s12967-017-1374-6>
- Strauss-Ayali, D., Conrad, S. M., & Mosser, D. M. (2007). Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(2), 244–252. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307191>
- Stravitz, R. T., & Lee, W. M. (2019). Acute liver failure. *The Lancet*, 394(10201), 869–881. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31894-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31894-X)
- Sun, H., Sun, C., Xiao, W., & Sun, R. (2019). Tissue-resident lymphocytes: from adaptive to innate immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(3), 205–215.
<https://doi.org/10.1038/s41423-018-0192-y>
- Sun, Y., Yu, H., Zheng, D., Cao, Q., Wang, Y., Harris, D., & Wang, Y. (2011). Sudan Black B Reduces Autofluorescence in Murine Renal Tissue. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(10), 1335–1342. <https://doi.org/10.5858/arpa.2010-0549-OA>

- Takahashi, Y., Nishikawa, M., Shinotsuka, H., Matsui, Y., Ohara, S., Imai, T., & Takakura, Y. (2013). Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *Journal of Biotechnology*, *165*(2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.03.013>
- Takov, K., Yellon, D. M., & Davidson, S. M. (2019). Comparison of small extracellular vesicles isolated from plasma by ultracentrifugation or size-exclusion chromatography: yield, purity and functional potential. *Journal of Extracellular Vesicles*, *8*(1), 1560809. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1560809>
- Taylor, D. D., & Shah, S. (2015). Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods*, *87*, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.02.019>
- Tey, S. K., Wong, S. W. K., Chan, J. Y. T., Mao, X., Ng, T. H., Yeung, C. L. S., Leung, Z., Fung, H. L., Tang, A. H. N., Wong, D. K. H., Mak, L.-Y., Yuen, M.-F., Sin, C.-F., Ng, I. O.-L., Ma, S. K. Y., Lee, T. K. W., Cao, P., Zhong, K., Gao, Y., ... Yam, J. W. P. (2022). Patient pIgR-enriched extracellular vesicles drive cancer stemness, tumorigenesis and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, *76*(4), 883–895. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.12.005>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, *30*(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O., & Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunology*, *3*(12), 1156–1162. <https://doi.org/10.1038/ni854>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the

- MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thietart, S., & Rautou, P.-E. (2020). Extracellular vesicles as biomarkers in liver diseases: A clinician's point of view. *Journal of Hepatology*, 73(6), 1507–1525.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.014>
- Thoolen, B., Maronpot, R. R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D. E., Kaufmann, W., Küttler, K., Deschl, U., Nakae, D., Gregson, R., Vinlove, M. P., Brix, A. E., Singh, B., Belpoggi, F., & Ward, J. M. (2010). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicologic Pathology*, 38(7 Suppl), 5S-81S.
<https://doi.org/10.1177/0192623310386499>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Triantafyllou, E., Gudd, C. L. C., Mawhin, M.-A., Husbyn, H. C., Trovato, F. M., Siggins, M. K., O'Connor, T., Kudo, H., Mukherjee, S. K., Wendon, J. A., Bernsmeier, C., Goldin, R. D., Botto, M., Khamri, W., McPhail, M. J. W., Possamai, L. A., Woollard, K. J., Antoniadou, C. G., & Thursz, M. R. (2021). PD-1 blockade improves Kupffer cell bacterial clearance in acute liver injury. *Journal of Clinical Investigation*, 131(4). <https://doi.org/10.1172/JCI140196>
- Tujios, S. R., & Lee, W. M. (2018). Acute liver failure induced by idiosyncratic reaction to drugs: Challenges in diagnosis and therapy. *Liver International*, 38(1), 6–14. <https://doi.org/10.1111/liv.13535>
- Umbaugh, D. S., & Jaeschke, H. (2021). Extracellular vesicles: Roles and applications in drug-induced liver injury. *Adv Clin Chem.*, 63–125.
<https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.08.010>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659.
<https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- van den Broek, B., Pintelon, I., Hamad, I., Kessels, S., Haidar, M., Hellings, N., Hendriks, J. J. A., Kleinewietfeld, M., Brône, B., Timmerman, V., Timmermans,

- J., Somers, V., Michiels, L., & Irobi, J. (2020). Microglial derived extracellular vesicles activate autophagy and mediate multi-target signaling to maintain cellular homeostasis. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10*(1).
<https://doi.org/10.1002/jev2.12022>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(4), 213–228.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Vella, L. J., Sharples, R. A., Nisbet, R. M., Cappai, R., & Hill, A. F. (2008). The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases. *European Biophysics Journal*, *37*(3), 323–332. <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0246-z>
- Verma, V. K., Li, H., Wang, R., Hirsova, P., Mushref, M., Liu, Y., Cao, S., Contreras, P. C., Malhi, H., Kamath, P. S., Gores, G. J., & Shah, V. H. (2016). Alcohol stimulates macrophage activation through caspase-dependent hepatocyte derived release of CD40L containing extracellular vesicles. *Journal of Hepatology*, *64*(3), 651–660. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.020>
- Vilella-Figuerola, A., Padró, T., Roig, E., Mirabet, S., & Badimon, L. (2022). New factors in heart failure pathophysiology: Immunity cells release of extracellular vesicles. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *9*.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.939625>
- Wang, N., Tesfaluul, N., Li, J., Gao, X., Liu, S., & Yue, B. (2019). Enrichment of circulating myeloma cells by immunomagnetic beads combined with flow cytometry for monitoring minimal residual disease and relapse in patients with multiple myeloma. *Annals of Hematology*, *98*(12), 2769–2780.
<https://doi.org/10.1007/s00277-019-03833-5>
- Wang, X., Shen, H., Zhangyuan, G., Huang, R., Zhang, W., He, Q., Jin, K., Zhuo, H., Zhang, Z., Wang, J., Sun, B., & Lu, X. (2018). 14-3-3ζ delivered by hepatocellular carcinoma-derived exosomes impaired anti-tumor function of tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cell Death & Disease*, *9*(2), 159. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0180-7>

- Wang, X., Sun, R., Wei, H., & Tian, Z. (2013). High-mobility group box 1 (HMGB1)-toll-like receptor (TLR)4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: Interaction of $\gamma\delta$ T cells with macrophages. *Hepatology*, 57(1), 373–384. <https://doi.org/10.1002/hep.25982>
- Weaver, J. L., Broud, D. D., McKinnon, K., & Germolec, D. R. (2002). Serial phenotypic analysis of mouse peripheral blood leukocytes. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 12(2), 95–118. <https://doi.org/10.1080/10517230290075341>
- Weber, L. W. D., Boll, M., & Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2), 105–136. <https://doi.org/10.1080/713611034>
- Welton, J. L., Webber, J. P., Botos, L.-A., Jones, M., & Clayton, A. (2015). Ready-made chromatography columns for extracellular vesicle isolation from plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 27269. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27269>
- Wen, S., Dooner, M., Papa, E., Del Tatto, M., Pereira, M., Borgovan, T., Cheng, Y., Goldberg, L., Liang, O., Camussi, G., & Quesenberry, P. (2019). Biodistribution of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in a Radiation Injury Bone Marrow Murine Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5468. <https://doi.org/10.3390/ijms20215468>
- Wiklander, O. P. B., Nordin, J. Z., O’Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mäger, I., Vader, P., Lee, Y., Sork, H., Seow, Y., Heldring, N., Alvarez-Erviti, L., Smith, C. I. E., le Blanc, K., Macchiarini, P., Jungebluth, P., Wood, M. J. A., & Andaloussi, S. el. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 26316. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.26316>
- Willis, C. M., Ménoret, A., Jellison, E. R., Nicaise, A. M., Vella, A. T., & Crocker, S. J. (2017). A Refined Bead-Free Method to Identify Astrocytic Exosomes in Primary Glial Cultures and Blood Plasma. *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00335>

- Woolbright, B. L., Nguyen, N. T., McGill, M. R., Sharpe, M. R., Curry, S. C., & Jaeschke, H. (2022). Generation of pro-and anti-inflammatory mediators after acetaminophen overdose in surviving and non-surviving patients. *Toxicology Letters*, 367, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.07.813>
- Wu, I.-W., Wu, Y.-L., Yang, H.-Y., Hsu, C.-K., Chang, L.-C., Twu, Y.-C., Chang, Y.-L., Chung, W.-H., Yang, C.-W., Hsieh, W.-P., & Su, S.-C. (2023). Deep immune profiling of patients with renal impairment unveils distinct immunotypes associated with disease severity. *Clinical Kidney Journal*, 16(1), 78–89. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfac196>
- Xu, J., Ji, L., Liang, Y., Wan, Z., Zheng, W., Song, X., Gorshkov, K., Sun, Q., Lin, H., Zheng, X., Chen, J., Jin, R., Liang, X., & Cai, X. (2020). CircRNA-SORE mediates sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by stabilizing YBX1. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 298. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00375-5>
- Xue, T., & Yam, J. W. P. (2022). Role of Small Extracellular Vesicles in Liver Diseases: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 000(000), 000–000. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2022.00008>
- Yan, M., Huo, Y., Yin, S., & Hu, H. (2018). Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biology*, 17, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.019>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yang, W., Tao, Y., Wu, Y., Zhao, X., Ye, W., Zhao, D., Fu, L., Tian, C., Yang, J., He, F., & Tang, L. (2019). Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nature Communications*, 10(1), 1076. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09046-8>

- Ye, L., He, S., Mao, X., Zhang, Y., Cai, Y., & Li, S. (2020). Effect of Hepatic Macrophage Polarization and Apoptosis on Liver Ischemia and Reperfusion Injury During Liver Transplantation. *Frontiers in Immunology*, *11*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01193>
- Ye, X., Zhang, N., Jin, Y., Xu, B., Guo, C., Wang, X., Su, Y., Yang, Q., Song, J., Yu, W., Cheng, P., Cheng, L., Gong, Y., Fu, X., & Sun, H. (2020). Dramatically changed immune-related molecules as early diagnostic biomarkers of non-small cell lung cancer. *The FEBS Journal*, *287*(4), 783–799.
<https://doi.org/10.1111/febs.15051>
- Yi, Y. W., Lee, J. H., Kim, S.-Y., Pack, C.-G., Ha, D. H., Park, S. R., Youn, J., & Cho, B. S. (2020). Advances in Analysis of Biodistribution of Exosomes by Molecular Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(2), 665.
<https://doi.org/10.3390/ijms21020665>
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*, *38*(1), 79–91.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Yousefzadeh, M. J., Flores, R. R., Zhu, Y., Schmiechen, Z. C., Brooks, R. W., Trussoni, C. E., Cui, Y., Angelini, L., Lee, K.-A., McGowan, S. J., Burrack, A. L., Wang, D., Dong, Q., Lu, A., Sano, T., O’Kelly, R. D., McGuckian, C. A., Kato, J. I., Bank, M. P., ... Niedernhofer, L. J. (2021). An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs. *Nature*, *594*(7861), 100–105.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03547-7>
- Zarobkiewicz, M. K., & Bojarska-Junak, A. A. (2022). The Mysterious Actor— $\gamma\delta$ T Lymphocytes in Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL). *Cells*, *11*(4), 661.
<https://doi.org/10.3390/cells11040661>
- Zborowski, M., & Chalmers, J. J. (2005). Magnetic Cell Sorting. In *Immunochemical Protocols* (pp. 291–300). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-873-0:291>

- Zecevic, L., Karamehic, J., Coric, J., Stubljar, D., Avdagic, N., Selmanovic, K., Jukic, T., & Savic, S. (2018). Potential Immune Biomarkers in Diagnosis and Clinical Management for Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Medical Biochemistry*, 37(2), 163–171. <https://doi.org/10.1515/jomb-2017-0048>
- Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., Mark, M. T., Molina, H., Martin, A. B., Bojmar, L., Fang, J., Rampersaud, S., Hoshino, A., Matei, I., Kenific, C. M., Nakajima, M., Mutvei, A. P., Sansone, P., Buehring, W., ... Lyden, D. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature Cell Biology*, 20(3), 332–343. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4>
- Zhang, M., Jin, K., Gao, L., Zhang, Z., Li, F., Zhou, F., & Zhang, L. (2018). Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods*, 2(9), 1800021. <https://doi.org/10.1002/smt.201800021>
- Zhang, Y., Yu, M., & Tian, W. (2016). Physiological and pathological impact of exosomes of adipose tissue. *Cell Proliferation*, 49(1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/cpr.12233>
- Zheng, Y., Cui, B., Sun, W., Wang, S., Huang, X., Gao, H., Gao, F., Cheng, Q., Lu, L., An, Y., Li, X., & Sun, N. (2020). Potential Crosstalk between Liver and Extra-liver Organs in Mouse Models of Acute Liver Injury. *International Journal of Biological Sciences*, 16(7), 1166–1179. <https://doi.org/10.7150/ijbs.41293>
- Zhu, X., & Uetrecht, J. (2013). A novel T_H 17-type cell is rapidly increased in the liver in response to acetaminophen-induced liver injury: T_H 17 cells and the innate immune response. *Journal of Immunotoxicology*, 10(3), 287–291. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.724730>
- Zivko, C., Fuhrmann, G., & Luciani, P. (2021). Liver-derived extracellular vesicles: A cell by cell overview to isolation and characterization practices. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1865(4), 129559. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129559>

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de hepatotoxicidad inducida por sobredosis de paracetamol (APAP). Ruta metabólica del APAP en el hepatocito. Adaptación con Biorender de Yan et al., 2018.	17
Figura 2. Diagrama de las poblaciones celulares responsables de la respuesta inmune innata y adaptativa. Adaptación con Biorender de Dranoff G, 2004.....	21
Figura 3. Diagrama de la respuesta inmunológica que tiene lugar en el hígado característica de la hepatotoxicidad inducida por APAP. Las flechas representan la inducción de activación.	27
Figura 4. Clasificación de las vesículas extracelulares en base a su biogénesis. Adaptación por Biorender de Hadizadeh et al., 2022.....	32
Figura 5. Composición general de las vesículas extracelulares: representación esquemática de la estructura de una VEs y de su contenido en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Adaptación por Biorender de Théry C. et al., 2014.....	33
Figura 6. Generación de la cepa de ratón reportera de linaje doble fluorescente AlbCre x mT/mG.	60
Figura 7. Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina de cortes histológicos del hígado de ratones. .	65
Figura 8. Protocolo de disgregación de tejidos basado en la digestión enzimática por la acción de la colagenasa.....	67
Figura 9. Protocolo de Ultracentrifugación (UC) para aislar vesículas extracelulares (VEs) liberadas por hepatocitos al medio de cultivo.....	72
Figura 10. Estrategia de selección de poblaciones del panel Sistema Inmune Innato.....	85
Figura 11. Estrategia de selección de poblaciones del panel Sistema Inmune Adaptativo parte I.	86
Figura 12. Estrategia de selección de poblaciones del panel Sistema Inmune Adaptativo parte II.....	87
Figura 13. Proporción (%) de células mieloides (LIN- CD11b+) respecto a las células totales (panel superior izquierdo) y concentración absoluta de células mieloides (células/ μ l, panel superior derecho), evaluadas por citometría de flujo en sangre de ratones WT e IL-10 KO. Dot plots representativos del análisis de las células mieloides de un ratón WT (abajo izquierda) y de un ratón IL-10 KO (abajo derecha). Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	88
Figura 14. Proporción de A) granulocitos, B) monocitos (Mo) y C) células dendríticas (DC) respecto al total de células mieloides sanguíneas circulantes, junto a sus subpoblaciones (paneles a la izquierda), en ratones C57BL/6 (WT) y ratones IL-10 KO medidas mediante citometría de flujo. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	91
Figura 15. Ratio Maduro/inmaduro del A) porcentaje y B) la concentración de los monocitos proinflamatorios en ratones WT e IL-10 KO. Los porcentajes utilizados en A) son los calculados sobre la gate de monocitos. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	92
Figura 16. Proporción (%) de células A) NK y B) NKT respecto al total de linfocitos definidos por tamaño y complejidad en sangre de ratones WT e IL-10 KO. Test U de Mann-Whitney.....	92
Figura 17. Proporción de A) linfocitos totales respecto al total de células circulantes, y de B) linfocitos B y C) linfocitos T partiendo del gate linfocitos, en sangre de ratones WT e IL-10 KO. Las líneas representan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$	93

Figura 18. Concentración (células/ μ l) de A) linfocitos B y de las subpoblaciones de B) linfocitos B T1 y C) linfocitos B T2 en sangre de ratones WT e IL-10 KO. Las líneas representan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. *** $p \leq 0,001$	93
Figura 19. Proporción (%) de las subpoblaciones de linfocitos T A) CD4+ y B) CD8+ respecto al total de las células T y, en los paneles derechos, sus diferentes fenotipos de maduración (naïve, CMem, EMem y activadas) en ratones WT e IL-10 KO. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$	94
Figura 20. Evaluación de las subpoblaciones T CD4+ Thelper en muestras de sangre de ratones WT e IL-10 KO: A) ratio del porcentaje (%) Th1/Th2 respecto a los linfocitos T CD4+, concentración de linfocitos B) Th1 y C) Th2, D) proporción de linfocitos Th17 respecto a las células T CD4+ y E) concentración de linfocitos Th17. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,0001$	95
Figura 21. A) Porcentaje respecto al total de linfocitos T CD4+ y B) concentración de los linfocitos Treg, medidas por citometría de flujo en sangre de ratones WT e IL-10 KO. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	95
Figura 22. Viabilidad (%) de los hepatocitos primarios en condiciones basales (0h) y tras 24 h de cultivo. Test para medidas pareadas Wilcoxon. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$	97
Figura 23. Dot plots representativos del análisis por citometría de flujo de la fluorescencia de los hepatocitos obtenidos de ratones C57Bl/6, mT/mG, y AlbCre x mT/mG.	98
Figura 24. Estrategia de gating utilizada para analizar las vesículas extracelulares (VEs) presentes en los medios de cultivo y plasmas condicionados, así como en las fracciones de VEs purificadas por los diferentes métodos. Se muestran también los correspondientes controles FMO (fluorescence minus one, en gris) realizados para la puesta punto de FM4-64: marcador de VEs, Anexina V (AnnV): marcador de cuerpos apoptóticos, y CD81: marcador de exosomas.	99
Figura 25. A) Porcentaje y B) concentración de VEs (eventos FM4-64+), y C) Porcentaje y D) concentración de exosomas (eventos FM4-64+ CD81+) evaluadas por citometría de flujo en medio condicionado (CM) de cultivo de hepatocitos primarios de ratón y tras su aislamiento por ultracentrifugación (UC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o selección inmuno-magnética (EXOKIT). One-way ANOVA para medidas repetidas con Tukey post-hoc. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$	100
Figura 26. Análisis mediante citometría de flujo de la fluorescencia de las VEs (FM4-64+) en medio de cultivo (CM) o aisladas del mismo mediante diversos métodos, a partir de cultivos de hepatocitos primarios procedentes de ratones C57BL/6, mT/mG, y AlbCre x mT/mG. A) Dot plots representativos de VEs aisladas por UC de cada una de las cepas. Representación del porcentaje de vesículas B) EGFP+ y C) TdTomato+. One-way ANOVA para medidas repetidas con Tukey post-hoc. CM, medio condicionado, UC, ultracentrifugación, SEC, cromatografía de exclusión por tamaño, EXOKIT, kit de separación inmunomagnética.	101
Figura 27. A) Tamaño y B) Concentración de las vesículas extracelulares (VEs) aisladas por ultracentrifugación (UC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) medidas por NTA (Nanosight). C) Gráficas representativas de la medición por NTA de una fracción de VEs asiladas por UC (izquierda) y SEC (derecha). Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	102

Figura 28. Imágenes representativas obtenidas por microscopia electrónica de transmisión de vesículas extracelulares (VEs) aisladas mediante ultracentrifugación de medio de cultivo de hepatocitos primarios de ratón.	103
Figura 29. Análisis por Western blot de la expresión de las proteínas CD81 y GFP en muestras de medio de cultivo condicionado (CM) procedentes de hepatocitos primarios de las cepas de ratones C57BL/6 y AlbCre x mT/mG, en VEs aisladas del mismo mediante ultracentrifugación (UC exos), y en tejido hepático (LIV).....	104
Figura 30. Proporción (%) de vesículas extracelulares (VEs) circulantes totales (eventos FM4-64+), de VEs EGFP+ y de VEs TdTomato+, en muestras de plasma de ratones AlbCre x mT/mG no tratados (control, CT) y tratados con anticuerpo Jo2, evaluada por citometría de flujo. Test U Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	105
Figura 31. Análisis por citometría de flujo de las muestras de plasma, fracciones UC y SEC, tanto de la condición CT como JO-2. A) Porcentaje de eventos FM4-64+, las fracciones SEC presentan una proporción significativamente mayor de EVs que los plasmas originales. Dentro de las VEs, se analizaron B) los exosomas (CD81+) y C) los cuerpos apoptóticos (AnnV+). Two-Way ANOVA para medidas pareadas, con corrección de Geisser-Greenhouse, seguido de Uncorrected Fisher's LSD post-hoc. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$	105
Figura 32. Concentración de A) VEs totales (FM4-64+), de B) exosomas (CD81+) y de C) cuerpos apoptóticos (AnnV+), medidos por citometría de flujo, de las muestras de plasma y de las fracciones obtenidas por UC y SEC procedentes de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron una inyección de anticuerpo Jo2 (JO-2) o de ratones controles (CT). Two-Way ANOVA para medidas pareadas, con corrección de Geisser-Greenhouse, seguido de Uncorrected Fisher's LSD post-hoc.	106
Figura 33. A) Tamaño (moda del diámetro) y B) concentración ($/\mu\text{l}$) de las nanopartículas aisladas mediante ultracentrifugación (UC) o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) a partir de muestras de plasma de ratones AlbCre x mT/mG controles (CT) o tratados con una dosis de anticuerpo Jo2 (JO-2). El análisis de ambos parámetros se realizó por NTA. Modelo de efectos mixtos para medidas repetidas con Uncorrected Fisher's LSD post-hoc.	107
Figura 34. Dot plots representativos del análisis por citometría de flujo de las vesículas extracelulares (FM4-64+) de las muestras PRE y POST aislamiento de las vesículas EGFP+ utilizando las microesferas anti-GFP.....	108
Figura 35. Comparación de diversos protocolos de aislamiento de vesículas extracelulares (VEs) EGFP+ empleando microbeads anti-GFP: UC-GFP+, SEC-GFP+, GFP+ partiendo de muestras de plasma de ratones AlbCre x mT/mG tratados o no con Jo2. Representación del porcentaje de A) VEs totales (FM4-64+), B) exosomas (CD81+) y C) cuerpos apoptóticos (AnnV+) obtenidos por citometría de flujo. Two-Way ANOVA para medidas pareadas, con corrección de Geisser-Greenhouse, seguido de Uncorrected Fisher's LSD post-hoc. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$	109
Figura 36. Concentración medida por citometría de flujo de las muestras procedentes de ratones AlbCre x mT/mG tratados o no con JO-2, obtenidas del aislamiento de EGFP+ VEs por UC-GFP+, SEC-GFP+, GFP+, de A) VEs (FM4-64+) B) exosomas (CD81+) y C) cuerpos apoptóticos (AnnV+). Two-Way	

ANOVA para medidas pareadas, con corrección de Geisser-Greenhouse, seguido de Uncorrected Fisher's LSD post-hoc. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$	109
Figura 37. Dot plots representativos del análisis de las fluorescencias EGFP y tdTomato dentro del gate de vesículas (FM4-64+) de las muestras obtenidas tras los diferentes métodos de aislamiento de VEs EGFP+ empleados: UC-GFP+, SEC-GFP+ y GFP+.....	110
Figura 38. Concentración sérica de las enzimas hepáticas en ratones AlbCre x mT/mG a las 24 horas tras la administración de suero salino (SAL) o paracetamol (APAP): A) Alanina aminotransferasa (ALT), B) Aspartato aminotransferasa (AST) y C) Lactato deshidrogenasa (LDH). Se muestra la media y la DS. D) Tabla con la concentración sérica del resto de parámetros medidos: urea, proteínas totales, albúmina y fosfatasa alcalina. Se muestra la mediana, el rango intercuartílico y el P valor. Test U de Mann-Whitney. ** $p \leq 0,01$	111
Figura 39. Imágenes representativas de los distintos grados de necrosis hepatocelular observadas en las secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina del hígado de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). A) Grado 0: morfología hepática normal en un ratón SAL. B) Grado 1: eosinofilia y signos sugestivos de daño hepatocelular (picnosis) en hepatocitos pericentrales. C) Grado 2: necrosis evidente en los hepatocitos pericentrales y áreas con signos de eosinofilia y edema en el margen próximo. D) Grado 3: área de necrosis de hepatocitos pericentrales extendida. E) Grado 4: áreas de necrosis creando puentes entre zonas pericentrales. F) Grado 5: áreas hemorrágicas y con necrosis confluyente extensa. Barra de calibración = 100µm.	113
Figura 40. A) Representación de la puntuación otorgada en función del grado de necrosis hepatocelular a las secciones de tejido hepático de ratones APAP y SAL. B) Correlación entre concentración de la alanina aminotransferasa (ALT) sérica y el índice histológico de necrosis hepatocelular. Test de correlación de Pearson.	114
Figura 41. Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de ratones AlbCre x mT/mG tratados o no con APAP en base a la concentración sanguínea de los fenotipos inmunológicos estudiados.....	119
Figura 42. Análisis de clustering y heat map de la concentración sanguínea de los fenotipos inmunológicos obtenidos por citometría de flujo, tanto de la respuesta innata como adaptativa, en las muestras de ratones AlbCre x mT/mG tratados o no con APAP. Datos normalizados a la media de los valores del grupo control (SAL).	120
Figura 43. A) Proporción y B) concentración de la población linfoide y mieloide, medidos por citometría de flujo en muestras de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se refleja la media y DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$,	121
Figura 44. A) Proporción (%) respecto a la selección de linfocitos y B) concentración (células/µl) de los linfocitos T y B circulantes, evaluadas por citometría de flujo en muestras de sangre de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	122
Figura 45. Porcentajes de A) granulocitos, B) monocitos (Mo) y C) células dendríticas (DC) dentro de las células mieloides (LIN- CD11b+), junto a sus subpoblaciones (paneles derechos), de ratones AlbCre	

<i>x</i> mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	122
Figura 46. A) Proporción (%) respecto al gate “linfocitos” y B) concentración (células/ μ l) de los plasmablastos circulantes, evaluadas por citometría de flujo en muestras de sangre de ratones AlbCre <i>x</i> mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	123
Figura 47. Proporción (%), respecto al gate de linfocitos T, de las subpoblaciones de células T circulantes A) CD4+ y B) CD8+ en ratones AlbCre <i>x</i> mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Los paneles derechos muestran sus diferentes fenotipos de maduración: naïve, CMem, EMem y act. Se representan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	123
Figura 48. Proporción (%), respecto al gate de linfocitos T CD4+, de las diversas subpoblaciones T helper: A) Th1, B) Th2, C) Th9, D) Th17 y E) Th22, en ratones AlbCre <i>x</i> mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se reflejan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	124
Figura 49. Viabilidad (%) de hepatocitos primarios puestos en cultivo en condiciones basales (0 h) y a las 24 horas de cultivo tras ser expuestos a suero salino (VEH) o a paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Two-Way ANOVA para medidas pareadas seguido de Uncorrected Fisher’s LSD post-hoc. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$	125
Figura 50. A) Proporción (% eventos FM4-64+ respecto a la selección de nanopartículas,) y B) concentración (VEs/ μ l) de vesículas extracelulares (VEs) totales presentes en el medio de cultivo de hepatocitos primarios expuestos a suero salino (VEH) o a paracetamol (APAP). Se refleja la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. ** $p \leq 0,01$	125
Figura 51. Proporción (%) y concentración de exosomas (A y B, respectivamente) y de cuerpos apoptóticos (C y D, respectivamente) liberados al medio de cultivo por hepatocitos primarios de ratón expuestos a suero salino (VEH) o a paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$	126
Figura 52. A) Concentración de nanopartículas (partículas/ml) y B) moda del tamaño de las nanopartículas (nm) evaluadas mediante la técnica de NTA en aislados de vesículas extracelulares (VEs) obtenidos mediante UC del medio de cultivo de hepatocitos primarios expuestos a suero salino (VEH) o a paracetamol (APAP). C) Imágenes representativas de la medición por NTA de muestras de los grupos VEH y APAP. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$,.....	127
Figura 53. A) Proporción y B) concentración de vesículas extracelulares (VEs), medidas por citometría de flujo, en muestras de plasma de las cepas de ratón C57BL/6, mT/mG y AlbCre <i>x</i> mT/mG que han recibido suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se representa la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$	128
Figura 54. Proporción (%) y concentración de las vesículas extracelulares (VEs/ μ l, eventos FM4-64+) que son EGFP+ (A y B, respectivamente) y de las VEs que son tdTomato+ (C y D, respectivamente), medidas por citometría de flujo en muestras de plasma de ratones C57BL/6, mG/mT y AlbCre <i>x</i> mT/mG que han recibido suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). Se reflejan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$	129

*Figura 55. Análisis por citometría de flujo de la suspensión celular obtenida de la disgregación de diferentes órganos de ratones AlbCre x mT/mG que han recibido suero salino (SAL) o paracetamol (APAP). A) Histograma representativo de la intensidad de señal EGFP detectada en los diferentes órganos evaluados. B) Análisis de la señal doble positiva EGFP+ tdTomato+ de las células disgregadas de corazón, pulmón, bazo y riñón procedentes de ratones AlbCre x mT/mG que han recibido SAL o APAP. Se reflejan la media y la DS. Test U de Mann-Whitney. C) Dot plots representativos del análisis por citometría de flujo de las células del pulmón de ratones que han recibido SAL o APAP. * $p \leq 0,05$.*

..... 130

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Cuadro clínico de las diferentes fases de progresión del daño hepático agudo inducido por fármacos (DILI). Tabla adaptada de Bunchorntavakul & Reddy, 2018.</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 2. Métodos de aislamiento de vesículas extracelulares (VEs): descripción, ventajas y desventajas. Adaptada de Gandham et al., 2020.</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados en el diseño de los dos paneles de citometría multiparamétricos para analizar el sistema inmunológico murino a nivel sistémico.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 4. Índice de necrosis hepatocelular. Puntuación histológica semicuantitativa del daño hepático otorgando una valoración de 0 a 5 en función de la gravedad de la necrosis.</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 5. Lista de reactivos que conforman el Exosome-free Attachment media.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados en el Western Blot.</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 7. Paneles de anticuerpos para analizar las poblaciones del sistema inmunológico murino por citometría multiparamétrica.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabla 8. Tabla de fenotipos del sistema inmunológico de ratón y marcadores utilizados para definir cada fenotipo mediante los paneles de anticuerpos diseñados.</i>	<i>84</i>
<i>Tabla 9. Proporción (mediana, Q1= 1^{er} cuartil y Q3= 3^{er} cuartil) de cada tipo celular inmune en sangre de ratones C57BL/6 (WT) e IL-10 KO, determinada mediante citometría de flujo. Cada proporción se refiere al fenotipo de categoría superior. Test U de Mann-Whitney.</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 10. Concentración (mediana, Q1= 1^{er} cuartil y Q3= 3^{er} cuartil) de cada tipo celular inmune en sangre de ratones C57BL/6 (WT) e IL-10 KO, determinada mediante citometría de flujo. Cada proporción se refiere al fenotipo de categoría superior. Test U de Mann-Whitney.....</i>	<i>90</i>
<i>Tabla 11. Paneles de anticuerpos para analizar por citometría de flujo multiparamétrica las poblaciones del sistema inmunológico responsables de la respuesta inmune innata y adaptativa de ratones de la cepa AlbCre x mT/mG en muestras de sangre total.....</i>	<i>116</i>
<i>Tabla 12. Proporción (% , mediana, IQR) de cada tipo celular en sangre de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP), determinada mediante citometría de flujo con los paneles para el sistema inmune adaptativo (arriba) e innato (abajo). Cada proporción se refiere al fenotipo de categoría superior. Test U de Mann-Whitney.....</i>	<i>117</i>
<i>Tabla 13. Concentración (células/μl, mediana, IQR) de cada tipo celular en sangre de ratones AlbCre x mT/mG que recibieron suero salino (SAL) o paracetamol (APAP), determinada por citometría de flujo con los paneles para el sistema inmune adaptativo (arriba) e innato (abajo). Test U de Mann-Whitney.</i>	<i>118</i>

