



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Generació de cèl·lules estrellades derivades de iPSCs i la seva utilització com a model per l'estudi de la fibrosi hepàtica

Júlia Vallverdú Ginès

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

GENERACIÓ DE CÈL·LULES ESTRELLADES HEPÀTIQUES DERIVADES DE IPSC I LA SEVA UTILITZACIÓ COM A MODEL PER L'ESTUDI DE LA FIBROSI HEPÀTICA

Memòria de tesi doctoral presentada per:

Júlia Vallverdú Ginès

Per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona

Dirigida per:

Pau Sancho Bru

Pere Ginès Gibert

Programa de Doctorat de Medicina i Recerca Translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona

Octubre del 2021

Nosaltres, Dr. Pau Sancho Bru i Dr.Pere Ginès Gibert, directors de la tesi doctoral de Júlia Vallverdú Ginès donem el vist i plau a la presentació d'aquesta tesi doctoral amb el títol de: Generació de cèl·lules estrellades hepàtiques derivades de iPSCs i la seva utilització com a model per l'estudi de la fibrosi hepàtica.

**SANCHO
BRU PAU -
38150118
H**

Firmado digitalmente por
SANCHO BRU PAU -
38150118H
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-3815011
8H, givenName=PAU,
sn=SANCHO BRU,
cn=SANCHO BRU PAU -
38150118H
Fecha: 2021.09.29 16:08:11
+02'00'

Pau Sancho Bru
(Director)

**PERE
GINES
GIBERT /
num:0814
2480**

Firmado
digitalmente por
PERE GINES
GIBERT /
num:08142480
Fecha:
2021.09.29
16:12:43 +02'00'

Pere GinèsGibert
(Director / Tutor)

**VALLVER
DU GINES
JULIA -
40358881
E**

Firmado
digitalmente
por VALLVERDU
GINES JULIA -
40358881E
Fecha:
2021.09.30
20:34:15 +02'00'

Júlia Vallverdú Ginès
(Estudiant de doctorat)

AGRAÏMENTS



Doncs bé, es tanca una etapa de la meua vida, però abans de començar l'altra, m'agradaria agrair a totes les persones que d'alguna manera o altra, n'han format part.

Primer de tot, voldria començar agraint al Dr. Pau Sancho i el Dr. Pere Ginès per haver-me donat l'oportunitat de poder entrar en el laboratori i entendre de primera mà el què era la recerca translacional. Moltes gràcies Pere per obrir-me les portes i ajudar-me a formar part del grup de recerca que ha permès formar-me durant tants anys. Moltes gràcies Pau per confiar en mi i donar-me l'oportunitat de treballar al teu grup involucrant-me en tot, des dels microRNAs fins a les cèl·lules mare, i per evolucionar d'una noia universitària a una estudiant de doctorat. Gràcies a tu m'he pogut formar en el camp de la recerca i participar en projectes importants, congressos i cursos de formació que sé que en un futur, triï el camí que triï, serà un aprenentatge molt valuós. Moltes gràcies!

També voldria agrair a totes aquelles persones que han estat des de l'inici de la tesi amb mi donant-me tota la formació que necessitava. Moltes gràcies Delia per ensenyar-me com s'ha de treballar en un laboratori. Ensenyar-me que s'ha de ser ordenat i meticulós, però que si en lloc de rentar les cèl·lules en 2mL de DPBS són 1.95mL que tampoc passa res! Aquesta vida no fa falta ser tan quadrat! Moltes gràcies també per aquesta etapa final on has aconseguit treure'm una gran riulla amb alguns dels teus monòlegs sobre la vida del PhD i de la maternitat. Moltes gràcies Mar per guiar-me en moments de caos i desesperació, i motivar-me amb el teu punt de "cheerlisme" a tirar endavant la tesi doctoral. Gràcies per ajudar-me a entrar en el món de les iPSCs i formar part juntament amb en Luis, de tota l'època del CellStemCell; una època llarga i dura, però amb un èxitós i feliç final!

A part voldria agrair a les 4 imprescindibles; Bea, Raquel, Celia i Silvia! Gràcies per tots aquests anys que hem compartit al laboratori. Ha estat un regal!! Gràcies pels viatges gironins, les tardes de pinchos amb l'Isma i els berenars-sopars de pulpo i, perquè no, de cecina, que m'han alegrat les tardes de doctorat. Moltes gràcies Celia per alegrar-me els matins amb els teus "Buenos días bella flor" i per arrencar-me un somriure amb el teu "y pa quien los tenga". Sort de la Dolores, guapa, que sempre ens ha acompanyat i guiat en la tesi doctoral. Moltes gràcies Silvia per la teua generositat i disposició a ajudar-

me sempre que ho he necessitat, i per compartir amb mi aquelles llargues tardes al laboratori, quasi sempre amb un bon entrepà de la Uni! Moltes gràcies Raquel per aportar llum i alegria en aquest món de les iPSCs!!! He tingut molta sort de poder COMPARTIR tants moments amb tu a la P2, formant el nostre iPSCs team, i DISFRUTAR de tots els nostres èxits com el nostre fill NP! He tingut la millor companya de projectes i de tesi doctoral que mai hagués pogut imaginar! I moltes gràcies Bea per compartir de l'inici a fi la tesi doctoral amb mi! Segur que no hauria estat el mateix sense la meua croque, que sempre m'anima i em dona la seva opinió acompanyada del "aaiii hija" que és tan essencial per mi! Moltes gràcies a totes pel vostre suport diari i per ajudar-me a recuperar a la Júlia de sempre! Recordeu que queden moltes coses pendents: un viatge a Edimburg, sopars a mil i un restaurants de Barcelona o de tot el món, seguint les estrelletes interminables del google maps de la Celia i la Raquel, i moltes celebracions! Gràcies noies!!!!

Moltes gràcies a la resta del laboratori: Andrea, Laura, Cristina i Silvia per ajudar-me en certs moments de la tesi. En especial a l'Andrea per ajudar-nos en aquest últim any a cuidar les plaques i més plaques de l'incubador de la P2, i suportar les contaminacions que acabaven amb la nostra paciència! Moltes gràcies Pepa, per ser la millor lab manager i ajudar-nos a trobar solucions a tots els nostres problemes!

A banda, voldria agrair a la Catherine per donar-me l'oportunitat de fer una estada en el seu laboratori, i a la Tine i Arefe que em van ensenyar les diferents tècniques d'edició gènica, un camp molt desconegut per mi.

A part, voldria agrair a tota aquella gent que ha compartit amb mi tants moments al llarg d'aquests anys de la tesi doctoral. Moltes gràcies als "Claria" per tot el subministrament de DPBS, Kit de quantificació de proteïna i la supermàquina de transferència de WB que ens han tret de grans "apuros" experimentals. Gràcies Mireia i Marta per les festes i post-festes doctorals que animaven a tornar al dilluns amb més alegria, o no.... Gràcies als veïns de la cabina de la P2, en especial a la Carmen i en Josep que amb la seva música dels anys 80 i les classes de "burpees" ajudaven a fer menys dures les hores interminables de cultius. Gràcies Josep per les teves converses, moltes vegades incomprensibles, que sempre acabaven amb alguns atacs de riure. Gràcies a les nenes

“Panes”, en especial a l’Aïda i l’Alba per compartir moltes xerrades a l’office i també el super viatge a Milà. Gràcies Aïda pel teu recolzament al final de la tesi. Ha estat meravellós compartir el dipòsit, la presentació i els interrogants del futur amb tu.

A part de tota la gent del laboratori, voldria agrair a la família i amics que han estat al meu costat tot aquest temps. No podria haver gaudit del meu inici en el laboratori sense l’equip de 7 persones extraordinàries que vaig conèixer al màster. Moltes gràcies a l’Andresito, en Carlos, en Roger, la Dorrego, l’Alba, l’Ana, l’Andrea i a les últimes incorporacions, l’Aïda i els gatets, i al petit Lucas! Moltes gràcies a les nenes de Barcelona per ensenyar-me que en aquesta vida, cada petit detall, és un motiu de celebració! Moltes gràcies Ana per la paciència de dibuixar totes les cel·luletes de la portada fins a trobar la forma ideal!!!

Moltes gràcies Anna, Maria i Laura per seguir juntes des de l’escola, i mantenir després de tants anys, aquesta amistat tan important per mi. Moltes gràcies també a la nova colla gironina, en especial a la Mireia, Marta, Carla i Manel, per compartir les festes d’estiu i els sopars infinits que sempre acabaven amb mi....

Moltes gràcies a tota la família de patinatge; a la família Sastre i Terra per aquests dinars de diumenge que m’ajudaven a agafar amb més força, moltes vegades gràcies als tupers que m’emportava, l’inici de la setmana. Gràcies Peque, la Sandra i la Mireia per seguir al meu costat des dels 6 anys evolucionant i creixent juntes! Gràcies Nuri per deixar-me combinar la feina amb la meva gran passió i poder viure al teu costat grans èxits que mai ens hauríem imaginat!!! WRG!!

Moltes gràcies Nuria i Jordi per la vostra generositat oferint-nos Calella i convidant-nos a mil i un dinars. Gràcies per descobrir-me els vins alemanys que m’han ajudat a emprendre la tesi d’una manera més dolça!

Moltes gràcies Diana pel teu suport constant que m’ha permès tirar endavant aquesta tesi doctoral i fer-me créixer com a persona. Estaré sempre agraïda!

I per últim allà va... la família! Voldria començar amb la baba, que als seus 97 anys encara segueix animant-me i recolzant-me en tot el que faig, i sempre acompanyat d’un “estic molt orgullosa de tu”!. Estic molt contenta d’haver pogut gaudir de tu durant tot aquest

temps! Gràcies a la M^a Àngels, la Montse i en Pere pel vostre suport constant i les vostres xerrades sempre amb un punt d'experiència i saviesa.

Moltes gràcies Pau i Gemma, que des de la distància m'heu recolzat tot aquest temps i m'heu permès viure grans viatges i experiències que no hagués pogut viure sense vosaltres! Recordeu, queda un viatge pendent que ha d'anar acompanyat d'un sopar per celebrar aquesta etapa!

També voldria donar les gràcies a en Nil. Moltes gràcies Nil per tot "l'aguante" que has tingut amb mi, que sé que no ha estat fàcil! Moltes gràcies per animar-me dia a dia i fer-me sentir que tot i els 1584 km, 1274km o 100km que ens han distanciat, segueixes al meu costat!

Moltes gràcies mama i papa per tot el que heu fet per mi, que no ha estat poc! Moltes gràcies papa per les xuxes salvadores en moments crítics i per ajudar-me, amb el teu toc d'humor, a donar la volta a les situacions que anomenem com a "crisis amb en Crisis"!! Moltes gràcies mama pel teu suport constant, les múltiples passejades i llargues xerrades que sempre acabaven amb un sopar improvisat recordant vells moments viscuts i imaginant futures experiències per viure!! És una sort tenir-vos al meu costat!!

Moltes gràcies a tothom!!! Ha estat una etapa molt bonica de la meva vida que sempre recordaré i que m'ha ajudat a formar-me a nivell laboral i personal! Gràcies.

ÍNDEX



ÍNDIX

AGRAÏMENTS	1
ÍNDIX.....	7
GLOSSARI	13
ENUMERACIÓ DELS ARTICLES.....	17
INTRODUCCIÓ	21
1. EL FETGE: LA IMPORTÀNCIA DE MODELAR EL FETGE IN VITRO	23
2. PUNTS CLAU PER MODELAR IN VITRO LA FISIOLOGIA HEPÀTICA	25
2.1. ESTRUCTURA I ORGANITZACIÓ CEL·LULAR DEL FETGE	26
2.2. CÈL·LULES ESTRELLADES HEPÀTIQUES	28
2.2.1 Cèl·lules estrellades hepàtiques en l'homeòstasi hepàtica	30
2.2.2. Cèl·lules estrellades hepàtiques en la fibrosi hepàtica	31
2.2.3. Cèl·lules estrellades hepàtiques en la regressió de la fibrosi hepàtica.....	34
2.2.4. Heterogeneïtat i zonació de les cèl·lules estrellades hepàtiques	36
2.3. LÍNIES CEL·LULARS I CÈL·LULES PRIMÀRIES.....	38
2.4. CÈL·LULES MARE PLURIPOTENTS	41
2.4.1. Cèl·lules mare pluripotentes induïdes (iPSCs).....	42
2.4.2. Generació de cèl·lules hepàtiques a partir de iPSCs	45
a. Desenvolupament embrionari del fetge	45
b. Generació de cèl·lules parenquimals i no-parenquimals hepàtiques a partir de iPSCs	48
c. Generació de cèl·lules estrellades hepàtiques a partir de iPSCs.....	51
2.4.3. Models in vitro complexos de cèl·lules hepàtiques derivades de iPSCs	52
3. PUNTS CLAU PER MODELAR IN VITRO LA FISIOPATOLOGIA HEPÀTICA	54
3.1. MODELS IN VITRO PER L'ESTUDI DE LA FIBROSI HEPÀTICA	55
3.2. TERÀPIA PER LA FIBROSI HEPÀTICA	56
3.3. MALALTIA DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLICA	57
3.3.1. Els polimorfismes com a factor de risc per la malaltia de fetge gras no alcohòlica.....	59
3.3.2. Variant del gen Hidroxiesteroid 17-Beta Deshidrogenasa 13 (HSD17B13).....	60
3.3.3. Modelatge in vitro de la malaltia de fetge gras no alcohòlica	62
3.2. TECNOLOGIES D'EDICIÓ GÈNICA EN IPSCS.....	63
HIPÒTESI	65
OBJECTIUS.....	69
MATERIALS I MÈTODES.....	73

1. CÈL·LULES MARE PLURIPOTENTS INDUÏDES (iPSC)	75
1.1. Línies de iPSCs	75
1.2. Cultiu cel·lular de les diferents línies de iPSCs	75
2. SOBREXPRESSIÓ DE LA SEQÜÈNCIA TRUNCADA DE HSD17B13	76
2.1. Generació de la seqüència truncada de HSD17B13	76
2.2. Digestió del plasmidi HC3x i ensamblatge amb la seqüència truncada de HSD17B13	76
2.3. Inserció del vector en bacteris per amplificar el DNA del plasmidi	78
2.4. Seqüenciació de Sanger de les colònies bacterianes	78
2.5. Nucleofecció de les iPSC-FRT.....	79
2.6. Selecció positiva i negativa de les colònies de iPSCs.....	79
2.7. Expansió cel·lular de la línia transgènica de iPSCs	80
3. PROTOCOLS DE DIFERENCIACIÓ DE IPSC A CÈL·LULES HEPÀTIQUES	80
3.1. Protocol de diferenciació de iPSCs a cèl·lules estrellades hepàtiques (iPSC-HSCs)	80
3.1.2. Diferenciació de iPSCs a HSCs (iPSC-HSCs)	80
3.1.3. Expansió de les iPSC-HSCs	82
3.1.4. Congelació i descongelació de les iPSC-HSCs	83
3.1.5. Estimulació de les iPSC-HSCs.....	83
3.1.5.1. Modelatge de la fibrosi hepàtica a partir de les iPSC-HSCs	84
3.1.5.2. Modelatge de la inflamació a partir de les iPSC-HSCs.....	84
3.1.5.3. Cribratge de compostos anti-fibrogènics en les iPSC-HSCs.....	84
3.2. Protocol de diferenciació de iPSCs a hepatòcits (iPSC-Hep)	85
3.2.1. Preparació de les iPSC-HSD17B13 per la diferenciació a Hepatòcits	85
3.2.2. Diferenciació de iPSC-HSD17B13 a Hepatòcits	85
3.2.3. Estimulació dels iPSC-Hep amb medi lipotòxic	87
4. AÏLLAMENT DE CÈL·LULES HEPÀTIQUES PRIMÀRIES.....	87
4.1. Aïllament de HSCs primàries	87
4.2. Aïllament de macròfags hepàtics primaris.....	88
5. CO-CULTIU DE LES IPSC-HSCS AMB HEPATÒCITS.....	88
6. ANÀLISI D'EXPRESSIÓ GÈNICA.....	89
7. TINCIÓ PER IMMUNOFLUORESCÈNCIA	91
8. CITOMETRIA DE FLUX (FACS).....	92
9. SEQÜENCIACIÓ DE RNA DE SINGLE- CELL DE LES IPSC-HSCS	93
10. ANÀLISI ESTADÍSTIC.....	94

RESULTATS	95
OBJECTIU 1: IMPLEMENTAR EL PROTOCOL DE DIFERENCIACIÓ DE IPSCS A CÈL·LULES ESTRELLADES HEPÀTIQUES I CARACTERITZAR LES CÈL·LULES OBTINGUDES	97
OBJECTIU 2: AVALUAR EL POTENCIAL ÚS DE LES CÈL·LULES ESTRELLADES HEPÀTIQUES DERIVADES DE IPSCS	123
OBJECTIU 3: DESENVOLUPAR UNA LÍNIA DE IPSCS AMB EL POLIMORFISME DE HSD17B13 PER TAL DE MODELAR IN VITRO LA MALALTIA HEPÀTICA	133
DISCUSSIÓ.....	134
CONCLUSIONS	134
BIBLIOGRAFIA.....	134
ANNEX	134

GLOSSARI



AAVS1: Adeno-Associated Virus Integration Site 1

ACTA2: Actin Alpha 2, Smooth Muscle

ADAM: A disintegrin and metalloproteinase domain

ALCAM: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule

ALT: Alanine Aminotransferase

AST: Aspartate Aminotransferase

BAX: BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator

BMPs: Bone Morphogenetic Protein

COL1 α 1: Collagen Type I Alpha 1 Chain

DAMPs: Damage-Associated Molecular Patterns

DDR: Discoidin Domain Receptors

DES: Desmin

DILI: Drug-induced liver injury

ECM: Extracellular Matrix Components

EMT: Epithelial-mesenchymal transition

ESC: Embryonic Stem Cells

FGF: Fibroblast Growth Factor

GFAP: Glial Fibrillary Acid Protein

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HSCs: Hepatic Stellate Cells

IPSCs: Induced Pluripotent Stem Cells

KC: Kupffer cells

LHX2: LIM Homeobox 2

LRAT: Lecithin Retinol Acyltransferase

LSEC: liver sinusoidal endothelial cells

MMPs: Matrix Metalloproteinases

MMT: Mesothelial-mesenchymal transition

NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule

NK: Natural Killers

P75NTR / NGFR: Nerve Growth Factor Receptor

PCDH7: Protocadherin 7

PDGFR β : Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta

PPAR γ Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma

RELN: Reelin

RMCE: Recombinase-Mediated Cassette Exchange System

ROS: Reactive Oxygen Species

STM: Septum Transversum Mesenchyme

SYP: Synaptophysin

TALEN: transcription Activator-Like Effector Nucleases

TGF β : Transforming Growth Factor

TIMPs: Tissue Inhibitor Metalloproteinases

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

VIM: Vimentin

VSMC: Vascular Smooth Muscle Cell

**ENUMERACIÓ
DELS ARTICLES**



Tesi en format clàssic amb un article annexat.

La tesi consta de 3 objectius i 1 article publicat.

OBJECTIUS:

- **Objectiu 1:** Implementar el protocol de diferenciació de iPSCs a cèl·lules estrellades i caracteritzar les cèl·lules obtingudes.
- **Objectiu 2:** Avaluar el potencial ús de les cèl·lules estrellades hepàtiques derivades de iPSCs.
- **Objectiu 3:** Desenvolupar una línia de iPSCs amb el polimorfisme de HSD17B13 per modelar *in vitro* la malaltia hepàtica.

ARTICLE PUBLICAT:

Vallverdú J, Martínez García de la Torre RA, Mannaerts I, Verhulst S, Smout A, Coll M, Ariño S, Rubio-Tomás T, Aguilar-Bravo B, Martínez-Sánchez C, Blaya D, Verfaillie CM, van Grunsven LA, Sancho-Bru P. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells to hepatic stellate cells. *Nature Protocols*. 2020; 16(5):2542-2563. doi: 10.1038/s41596-021-00509-1. PMID: 33864055. Factor d'impacte: 13.491. Quartil 1. Àrea: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology.

L'article publicat està citat en l'objectiu 1 i 2 de la tesi doctoral.

INTRODUCCIÓ



1. EL FETGE: LA IMPORTÀNCIA DE MODELAR EL FETGE IN VITRO

El fetge és un òrgan del sistema digestiu encarregat de portar a terme més de 500 funcions vitals per l'organisme. El fetge regula el metabolisme de carbohidrats, lípids i aminoàcids, així com l'emmagatzematge de glicogen i triglicèrids. A més, secreta albúmina, urea i bilis, i és responsable de la detoxificació de compostos xenobiòtics procedents d'altres òrgans (1). Però, aquestes funcions poden estar alterades per un dany hepàtic induït per fàrmacs (en anglès abreujat com DILI, *Drug-induced liver injury*), malalties genètiques o per malalties hepàtiques generades per diferents agents etiològics.

El dany hepàtic induït per fàrmacs representa la causa més comuna d'insuficiència hepàtica aguda a Europa i és la principal causa de retirada de fàrmacs en assaig clínic. El DILI es pot desenvolupar a causa de la dosi, la via, la duració de l'administració del fàrmac o per factors desconeguts, i pot comprendre des d'un estadi asimptomàtic, hepatitis aguda o crònica, o fins a desenvolupar insuficiència hepàtica crònica. La toxicitat d'un determinat fàrmac pot variar entre individus degut a factors hereditaris i factors ambientals, dificultant la seva aplicació en la clínica. S'ha descrit que aproximadament la meitat dels fàrmacs en desenvolupament no passen de la fase I/II dels assaigs clínics, i que quasi 1,000 compostos farmacèutics han estat retirats del mercat pels efectes secundaris produïts per la toxicitat hepàtica (2), (3).

Per altra banda, les malalties hepàtiques cròniques tenen una alta incidència, prevalença i taxa de mortalitat registrant-se fins a 2 milions de morts a l'any (4). A més, s'espera que en els pròxims anys la incidència augmenti per l'increment de pacients amb obesitat i diabetis, dos factors de risc per la progressió de la malaltia (4), (5). Hi ha diferents malalties hepàtiques segons el seu agent etiològic: les infeccions víriques (Hepatitis B i C), malaltia hepàtica alcohòlica, malaltia de fetge gras no alcohòlica, malalties autoimmunes i malalties hereditàries. Tot i la diversitat en el seu agent causal, les malalties hepàtiques cròniques es caracteritzen per la lesió del parènquima hepàtic, l'activació de la resposta inflamatòria, la presència de fibrosi hepàtica i la resposta de cicatrització del teixit (4).

Durant els últims anys, el tractament de les malalties hepàtiques i el dany hepàtic generat per fàrmacs ha estat centrat a prevenir possibles complicacions i poder aturar la progressió de la malaltia eliminant l'agent causal. Tot i els grans avanços en el desenvolupament de nous compostos farmacològics, el trasplantament hepàtic continua sent l'única opció terapèutica per curar la lesió del fetge (3). El trasplantament hepàtic permet augmentar la supervivència i la qualitat de vida dels pacients, però l'escassetat d'òrgans disponibles, el cost del trasplantament i el tractament d'immunosupressió que requereixen els pacients, limiten la seva utilització en la clínica (6). Una de les possibles estratègies per millorar la qualitat de vida dels pacients és la utilització dels sistemes artificials hepàtics, ja que aporten el suport extracorporal de l'òrgan controlant l'eliminació dels compostos tòxics de la sang. Tot i això, en ser un sistema no-biològic, impedeix reproduir a la perfecció la funcionalitat hepàtica humana, i per aquest motiu, es va plantejar desenvolupar sistemes bioartificials hepàtics compostos de cèl·lules hepàtiques. Malgrat això, l'aplicabilitat d'aquests sistemes és limitada degut a la falta d'una font cel·lular estable (7).

Una de les alternatives al trasplantament hepàtic que s'està estudiant és la teràpia cel·lular. En el camp de l'hepatologia, els hepatòcits han estat utilitzats com a teràpia cel·lular en pacients, principalment en pacients amb malalties metabòliques (8). La dificultat en l'obtenció d'una gran quantitat d'hepatòcits, el manteniment del seu fenotip metabòlic, i la baixa qualitat post-criopreservació, impedeixen que aquest sistema es pugui establir com a teràpia rutinària i eficient en els hospitals (9), (10). Per tant, les estratègies terapèutiques actuals presenten limitacions importants que dificulten establir un tractament efectiu per les malalties hepàtiques.

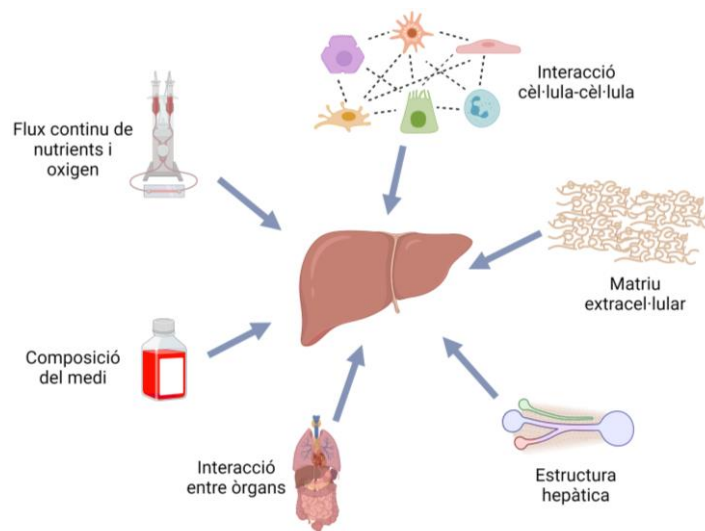
Per tal de desenvolupar noves teràpies efectives, es requereixen sistemes que permetin estudiar els mecanismes implicats en el desenvolupament de les malalties hepàtiques i sistemes per realitzar el cribratge de fàrmacs. Actualment, els cultius cel·lulars i models animals són àmpliament utilitzats per les dues aplicacions. Els models animals, tot i que permeten recapitular la interacció entre òrgans important en la resposta hepàtica, presenten certes limitacions degut a les diferències metabòliques i fisiopatològiques entre espècies. De fet, s'ha descrit que molts fàrmacs prèviament testats en models animals han acabat induint toxicitat en pacients, i que alguns mecanismes patològics no

succeeixen de la mateixa manera en la patologia humana (11). Per tots aquests motius, la tendència actual del món de la recerca translacional es centra a generar sistemes *in vitro* basats en el cultiu de cèl·lules humanes. A més, en els últims anys s'estan desenvolupant models *in vitro* més complexos que recapitulen la fisiologia hepàtica permetent estudiar mecanismes de la fisiopatologia humana identificant possibles dianes terapèutiques.

2. PUNTS CLAU PER MODELAR IN VITRO LA FISIOLOGIA HEPÀTICA

En les últimes dècades, els investigadors i companyies biotecnològiques s'han centrat a desenvolupar models *in vitro* complexos que mimetitzin l'estructura i les funcions vitals del fetge pel cribratge de fàrmacs i modelatge de les malalties hepàtiques. D'aquesta manera el camp del cultiu cel·lular està progressant del monocultiu en 2 dimensions a dispositius biotecnològics que recapitulen l'entorn fisiològic de l'òrgan. Per generar un bon model biomimètic, es necessita tenir en compte diferents punts claus. Un d'ells consisteix a mimetitzar l'arquitectura de l'òrgan i l'organització cel·lular en els sinusoides hepàtics incorporant diferents cèl·lules hepàtiques. Aquesta interacció cèl·lula-cèl·lula és essencial pel manteniment de l'homeòstasi del fetge i pels mecanismes implicats en la progressió i regressió de les malalties hepàtiques. Els sistemes *in vitro* contemplan integrar compostos de la matriu extracel·lular per generar el suport estructural present a l'òrgan i recollir la interacció cèl·lula-matriu extracel·lular. A més, un altre aspecte important és la recapitulació de la interacció present entre òrgans. A part, els models *in vitro* complexos necessiten un sistema de flux continu de nutrients i oxigen a una concentració i pressió similar al transport present en els sinusoides hepàtics. El fet de poder desenvolupar aquests sistemes tan complexos permetrien estudiar de manera més precisa, els mecanismes de les malalties hepàtiques humanes i la resposta a determinats fàrmacs (12), (13).

La realitat és que en l'actualitat no disposem de sistemes tan complexos i perfectes, però s'està treballant en diferents aproximacions que incorporin alguns d'aquests paràmetres. En el nostre cas ens centrem en l'obtenció de cèl·lules hepàtiques a partir de iPSCs per tal d'establir noves fonts cel·lulars que mimetitzin les cèl·lules primàries i puguin ser utilitzades pel modelatge *in vitro*.



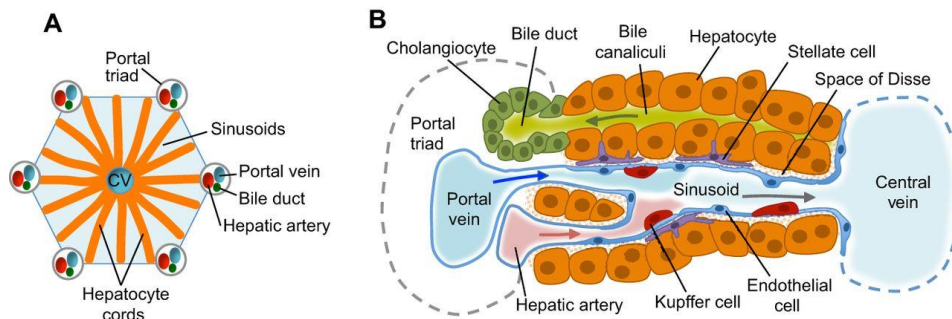
Il·lustració 1. Imatge representativa dels punts clau i essencials pel modelatge *in vitro* de la fisiologia hepàtica. Adaptació de la figura publicada per Ruoβ et al., (14).

2.1. ESTRUCTURA I ORGANITZACIÓ CEL·LULAR DEL FETGE

El fetge s'organitza en lobulets hepàtics que són la principal unitat funcional de l'òrgan. Aquests tenen una estructura hexagonal i consisteixen en múltiples capes d'hepatòcits envoltats pels sinusoides hepàtics que irradien fins a la vena central. Els sinusoides hepàtics són cavitats fenestrades revestides per les cèl·lules endotelials (en anglès abreuiat com LSECs, *Liver Sinusoidal Endothelial Cells*) i estan poblades per les cèl·lules de Kupffer (en anglès abreuiat com KCs, *Kupffer cells*). Entre la capa endotelial i la membrana apical dels hepatòcits es forma l'espai de Disse on es situen les cèl·lules estrellades hepàtiques (en anglès abreuiat com HSCs, *Hepatic Stellate Cells*) (1). En cada vèrtex del lobulet hepàtic es localitza la triada portal que inclou la vena porta, l'artèria hepàtica i el conducte biliar. La sang transportada per la vena porta rica en nutrients, i la sang procedent de l'artèria hepàtica rica en oxigen, es barregen i entren al fetge sent transportada pels sinusoides hepàtics fins a la vena central (15).

Durant la circulació sanguínia, els hepatòcits adjacents als sinusoides hepàtics capten i metabolitzen els diferents compostos, i finalment els metabòlits restants són excretats als conductes biliars. Al llarg del lobulet hepàtic es genera una zonació cel·lular deguda al gradient de compostos transportats en el sinusoides hepàtic, de manera que els hepatòcits situats a la zona portal, al captar més oxigen i nutrients, realitzen funcions relacionades amb la gluconeogènesi, producció d'urea i β -oxidació, mentre que els

hepatòcits de la zona central regulen l'eliminació de tòxics i es centren en processos com la glicòlisi i la lipogènesi (16), (17). Estudis recents suggereixen que la zonació cel·lular es dona també en altres tipus cel·lulars com les HSCs i LSECs (18), (19), (20).



Il·lustració 2. (A) Estructura del lobulec hepàtic mostrant la triada portal, la vena central i els sinusoides hepàtics. (B) Localització dels diferents tipus cel·lulars al llarg del lobulec hepàtic. Figura extreta de la publicació de Gordillo et al., (2015) (21).

Els hepatòcits són la principal població cel·lular de l'òrgan representant un 70% del volum total del fetge i porten a terme diverses funcions: síntesi de proteïnes com l'albumina, funcions metabòliques com la producció d'urea i gluconeogènesi, processos de degradació de nombroses biomolècules, i la detoxificació de compostos xenobiòtics. Tot i això, com s'ha comentat anteriorment, no són una població homogènia, ja que es poden identificar subpoblacions depenent de la zonació lobular (22). Els colangiòcits són les cèl·lules epitelials situades en els conductes biliars que permeten el transport dels àcids biliars secretats pels hepatòcits fins a l'intestí. Tenen una funció de control de regulació de la fluïdesa dels àcids biliars i tenen la capacitat de reabsorbir compostos circulants com la glucosa (15), (17).

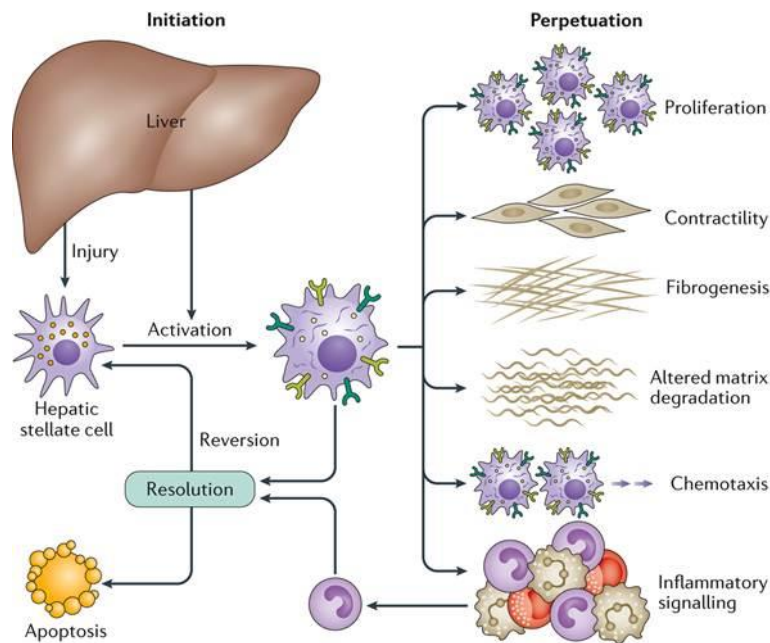
Per altra banda, les cèl·lules no-parenquimals formades per les KCs, LSECs i HSCs, tot i no ser tan abundants, són essencials pel correcte manteniment de la funcionalitat hepàtica. Les KCs són els macròfags residents del fetge situats en el lumen del sinusoides hepàtic i són la principal font cel·lular responsable de la fagocitosi d'agents patògens provinents de la circulació portal (23). A més, representen una potent font de molècules quimioattractants per altres cèl·lules del sistema immunitari. D'altra banda, les LSECs estan situades en la paret del sinusoides hepàtic formant fenestracions que permeten la regulació del flux de partícules a l'espai de Disse. A més, regulen la pressió del flux

sanguini evitant la vasoconstricció del sinusoides hepàtic (24). Per últim, les HSCs estan implicades en la fibrosi hepàtica i són les principals cèl·lules de l'estudi d'aquesta tesi doctoral (25). A més, el fetge presenta cèl·lules del sistema immunitari com les cèl·lules NKs, en anglès *Natural Killers*, i cèl·lules dendrítiques hepàtiques que són les responsables de la resposta immunitària del fetge envers una infecció microbiana o un agent químic (15).

Totes aquestes cèl·lules hepàtiques es troben interrelacionades amb complexes interaccions que permeten el manteniment de la funció hepàtica, així com la progressió i reparació del dany. Per tant, poder recapitular aquestes interaccions cel·lulars en models *in vitro* ajudaria a estudiar, de manera més robusta, els mecanismes fisiològics i fisiopatològics de l'òrgan.

2.2. CÈL·LULES ESTRELLADES HEPÀTIQUES

Les cèl·lules estrellades hepàtiques són cèl·lules no-parenquimals localitzades a l'espai de Disse entre els hepatòcits i les LSECs, i representen aproximadament un 10% de la població cel·lular total del fetge. En situació fisiològica, les HSCs es troben en estat quiescent i són responsables de l'acumulació d'èsters de retinil (Vitamina A) en les gotes lipídiques del citoplasma i en regular l'homeòstasi dels compostos de la matriu extracel·lular (en anglès abreuiat com ECM, *Extracellular Matrix Components*). Però, en una situació de dany, les HSCs s'activen adquirint un fenotip de miofibroblast i participant en la resposta de la cicatrització del teixit. Si el dany és agut o limitat, el fenotip de les HSCs pot revertir a un estat similar al quiescent, o morir per apoptosi o per l'activitat de les cèl·lules NKs. No obstant, si el dany es manté, les HSCs activades perden l'acumulació d'èsters de retinil i adquireixen la capacitat proliferativa i contràctil, secreten citocines pro-inflamatòries i pro-fibrogèniques, i acumulen ECM donant lloc a la fibrosi hepàtica (26), (27).

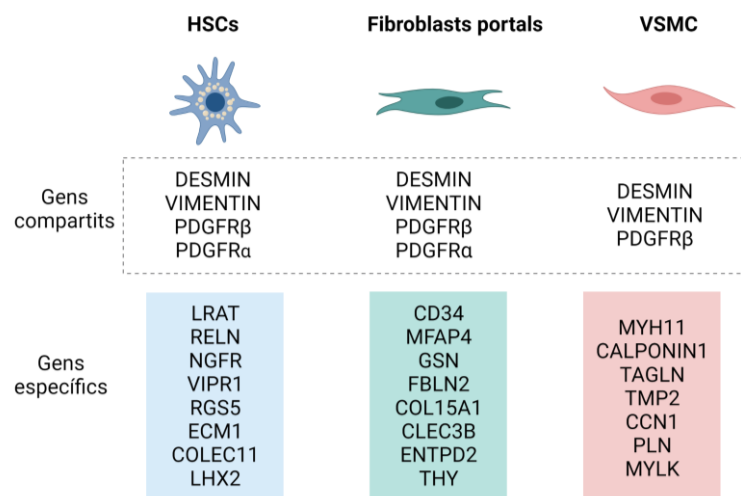


Il·lustració 3. Fenotip i funcions adquirides de les HSCs en una situació fisiopatològica. Esquema extret de la publicació de Tsuchida et al., (2017) (28).

Les HSCs es caracteritzen per expressar gens relacionats amb el metabolisme del retinol com *Lecithin Retinol Acyltransferase* (LRAT) (29), citoesquelet com *Desmin* (DES) i *Vimentin* (VIM) (26), molècules d'adhesió com *Protocadherin 7* (PCDH7) (30), proteïnes de ECM com *Reelin* (RELN) (31) i *Collagen Type I Alpha 1 Chain* (COL1 α 1) (26), i receptors nuclears reguladors de la transcripció com *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma* (PPAR γ) (32). A més, una curiositat de les HSCs és que es caracteritzen per expressar marcadors mesodèrmics i mesenquimals com *Actin Alpha 2, Smooth Muscle* (ACTA2) i *Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta* (PDGFR β), i també marcadors neuronals com *Glial Fibrillary Acid Protein* (GFAP), *Synaptophysin* (SYP), *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) i *Nerve Growth Factor Receptor* (p75NTR/NGFR) (27).

El fet que les HSCs siguin cèl·lules mesenquimals amb característiques de perícits i fibroblasts residents, dificulta poder-les distingir d'altres tipus cel·lulars mesenquimals presents al fetge com els fibroblasts portals i les cèl·lules musculars llises de la vasculatura (en anglès abreviades com VSMCs, *Vascular Smooth Muscle Cells*) (33). Tot i que les tres poblacions comparteixen certs marcadors com PDGFR β , VIM i DES (18), es diferencien per l'expressió d'alguns gens característics. En el cas de les HSCs, l'anàlisi

transcriptòmic publicat per Zhang et al., (2016) va descriure una signatura gènica de 122 gens específica de les HSCs i va identificar PCDH7 com a marcador de membrana d'aquesta població (30). Per altra banda, els fibroblasts portals es caracteritzen per l'expressió de *Thy-1 Cell Surface Antigen* (THY1), *Microfibril Associated Protein 4* (MFAP4) i *Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2* (ENTPD2) (18), (34), (35), mentre que les VSMCs presenten l'expressió de *Myosin Heavy Chain 11* (MYH11), *Myosin Light Chain Kinase* (MYLK), *Transgelin 1* (TAGLN1) i *Leiomodin 1* (LMOD1) (18), (36).



Il·lustració 4. Esquema identificant alguns dels principals marcadors compartits i específics de les HSCs, fibroblasts portals i VSMCs descrits en la publicació de Dobie et al., (2019) (18).

2.2.1 Cèl·lules estrellades hepàtiques en l'homeòstasi hepàtica

La principal funció de les HSCs és l'emmagatzematge de Vitamina A en forma d'èsters de retinil en les gotes lipídiques del citoplasma, i es coneix que acumulen un 80% del retinol de l'organisme. Les HSCs són capaces de captar el retinol de la circulació sanguínia o dels hepatòcits adjacents, i esterificar-lo a èsters de retinil pel seu emmagatzematge. El procés d'esterificació de retinol a èsters de retinil està mediat per l'enzim LRAT (37). Aquesta característica és específica de les HSCs permetent diferenciar-les de les altres poblacions mesenquimals i podent-les aïllar de biòpsies de teixit hepàtic mitjançant la seva detecció per autofluorescència en citometria de flux (FACS), o per un gradient de densitat gràcies a la flotabilitat atribuïda a aquest emmagatzematge (26).

L'acumulació d'èsters de retinil és una característica fisiològica de les HSCs i és essencial pel manteniment de l'estat de quiescència de les cèl·lules, però, quan aquestes s'activen per un dany o pel contacte en plàstic, perden les gotes lipídiques alliberant el seu contingut. Actualment, encara es desconeix si la pèrdua de Vitamina A és una causa o una conseqüència de l'activació de les HSCs, però estudis en ratolins deficients de LRAT han demostrat que l'absència de gotes lipídiques riques en Vitamina A no està associada a la progressió de la fibrosi hepàtica ni a l'activació de les HSCs (29).

A més, les HSCs participen en l'homeòstasi de ECM. La matriu extracel·lular representa una complexa xarxa de diferents proteïnes incloent col·làgens, glicoproteïnes com per exemple l'elastina, laminina i fibronectina, glicosaminoglicans i proteoglicans com la decorina i fibromodulina, entre d'altres (38). Els ECM tenen una funció estructural de l'òrgan sent presents en la càpsula de Glisson, venes centrals i portals, i l'espai de Disse, però també tenen un paper important en la modulació de diferents factors de creixement com per exemple la fibronectina i laminina que regulen *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α), els col·làgens que regulen PDGF, *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) i *Interleukin 2* (IL-2), i la decorina que interacciona amb *Transforming Growth Factor* (TGF β) (39). A més, els ECM interaccionen amb les diferents cèl·lules hepàtiques adjacents i regulen la seva migració, proliferació, diferenciació i supervivència mitjançant receptors d'adhesió de membrana específics com *A Disintegrin And Metalloproteinase Domain* (ADAM) i *Discoidin Domain Receptors* (DDR) (39). Per tant, les proteïnes de la matriu extracel·lular són essencials no només per l'organització estructural de l'òrgan, sinó per la regulació de les funcions fisiològiques d'aquest.

2.2.2. Cèl·lules estrellades hepàtiques en la fibrosi hepàtica

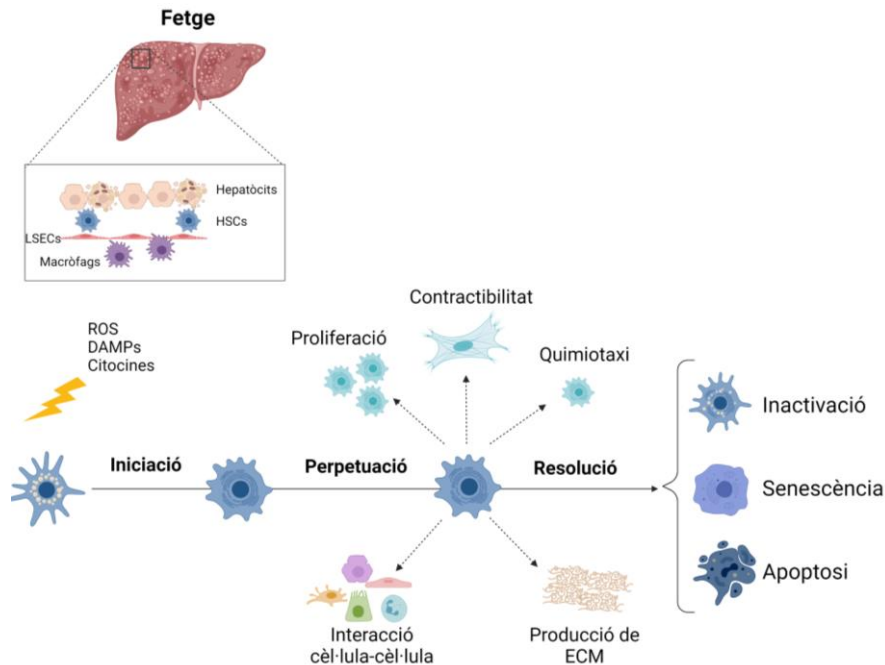
A conseqüència d'un insult hepàtic, es pot produir la fibrosi hepàtica. La fibrosi hepàtica es dona per una excessiva acumulació de ECM produïda per un desequilibri entre la producció i la degradació dels compostos de la matriu regulat per les famílies de proteïnes anomenades com *Matrix Metalloproteinases* (MMPs), principalment MMP2, MMP9, MMP3 i MMP13, i *Tissue Inhibitor Metalloproteinases* (TIMPs), principalment TIMP1 i TIMP2. A part del desequilibri entre la generació i degradació, la fibrosi també va acompanyada d'un canvi en la composició de les proteïnes de ECM. En homeòstasi,

la matriu extracel·lular està composta de col·lagen tipus IV i VI, mentre que en dany hepàtic és reemplaçada per col·lagen I, III i fibronectina. Aquesta alteració genera una xarxa proteica més resistent a la degradació que impedeix el flux de compostos entre l'espai sinusoidal i els hepatòcits alterant la funcionalitat hepàtica, i dificultant la regressió de la fibrosi (39).

La principal font cel·lular per la producció de ECM són els miofibroblasts que es caracteritzen per expressar ACTA2, COL1 α 1, *Collagen Type III Alpha 1 Chain* (COL3 α 1), *Lysyl Oxidase* (LOX), TIMP1 i VIM. Diferents fonts cel·lulars com les cèl·lules mesenquimals obtingudes del procés de EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*), fibroblasts derivats de la medul·la òssia, cèl·lules mesotelials obtingudes pel procés de MMT (*Mesothelial-Mesenchymal Transition*), fibroblasts portals i HSCs, s'han suggerit com a possible font de miofibroblasts (40). Estudis experimentals de llinatge cel·lular han permès excloure els hepatòcits i colangiòcits com a font de cèl·lules miofibroblàstiques (41), (42), així com identificar la baixa contribució dels fibroblasts derivats de la medul·la òssia en la fibrosi hepàtica (43). A més, s'ha descrit que les cèl·lules mesotelials poden donar lloc a fibroblasts situats a la superfície del fetge, però no a miofibroblasts intrahepàtics (44). D'altra banda, els fibroblasts portals, en una situació de lesió hepàtica colestatàtica, es poden activar adquirint un fenotip miofibroblàstic participant juntament amb les HSCs, en la generació de la fibrosi hepàtica (45), (46). Tot i això, un estudi de llinatge en el model animal LRATCre va demostrar que les HSCs són les principals productores de col·lagen en diferents etiologies, representant aproximadament un 85% de la població de miofibroblasts en el model per tòxic, colèstasi i fetge gras (47).

El procés de transdiferenciació de les HSCs a cèl·lules fibrogèniques és complex, i es dona per canvis progressius de funcionalitat cel·lular que es poden dividir en dues etapes: iniciació i perpetuació. En l'etapa d'iniciació, les HSCs, en rebre senyals de les cèl·lules adjacents danyades, s'activen adquirint propietats pro-fibrogèniques, i a més, modulen citocines i factors de creixement per activar vies de senyalització per respondre al dany. Posteriorment, en el procés de perpetuació, les HSCs adquireixen la capacitat contràctil i proliferativa, participen en la quimiotaxi, i secreten factors pro-fibrogènics i pro-inflamatoris per amplificar l'acumulació de ECM generant la cicatrització del teixit (28).

Per tant, en aquest estadi les HSCs adquireixen totes les característiques miofibroblàstiques, que juntament amb la resta de cèl·lules hepàtiques, amplifiquen la progressió del dany.



Il·lustració 5. Esquema del procés d'iniciació, perpetuació i resolució de l'activació de les HSCs. Figura extreta de la publicació de Kitto et al., (2021) (48).

El procés d'iniciació de l'activació de les HSCs es dona per la senyalització provinent d'altres tipus cel·lulars com poden ser els hepatòcits, les cèl·lules endotelials i les cèl·lules inflamatòries. Els hepatòcits danyats secreten una sèrie de senyals com *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), espècies reactives d'oxigen (ROS, *Reactive Oxygen Species*) i factors fibrogènics, que afecten directament a les HSCs i a altres cèl·lules hepàtiques que també acabaran induint l'activació de les HSCs (49). Les cèl·lules endotelials deixen de secretar òxid nítric (NO), compost que permet el manteniment de les HSCs en estat de quiescència, i indueixen l'activació del receptor *Fibroblast Growth Factor Receptor 1* (FGFR1) en les LSECs. Aquests dos fets, juntament amb altres, permeten activar les HSCs (49). D'altra banda, les KCs s'activen secretant una cascada de citocines inflamatòries i ROS que indueixen l'activació de les HSCs incrementant el dipòsit de col·lagen I, fibronectina i altres compostos de ECM. A més, alliberen PDGF que permet la migració de les HSCs a la zona afectada per reparar el teixit

(50). A part, l'activació de les HSCs també es pot donar via interacció amb les proteïnes de ECM com les integrines i DDRs que al regular la secreció i activació de TGF β i pro-col·lagen respectivament, indueixen l'increment de la fibrosi hepàtica.

Durant el procés de perpetuació del dany, les HSCs adquireixen la capacitat proliferativa, contràctil, quimiotàctica i fibrogènica mitjançant citocines i factors de creixement secretats en el teixit. La citocina amb major efecte fibrogènic és el TGF β (51). Aquesta citocina és alliberada per diferents tipus cel·lulars hepàtics, incloent les HSCs, que s'uneix i fosforila les proteïnes *SMAD Family Member 2* i *3* (SMAD2 i SMAD3) que indueixen la transcripció de gens fibrogènics com COL1 α 1, *Collagen Type I Alpha 2 Chain* (COL1 α 2) i ACTA2, entre d'altres (52). A més, el TGF β també indueix l'activació de les vies de senyalització *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK) i *C-Jun N-Terminal Kinase* (JNK), tots elles relacionades amb l'activació de les HSCs. A part del TGF β , s'ha descrit que la Leptina, IL-6 i *Interleukin 17* (IL-17) poden induir l'expressió de pro-col·lagen tipus I (53), (54). De manera similar, el factor de creixement *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) participa en la fibrogènesi del fetge activant l'expressió de COL1 α 1 de manera independent a la via de senyalització de TGF β . A més, s'ha descrit que aquest factor de creixement té un paper important en la proliferació, migració, adhesió i supervivència cel·lular (49).

D'altra banda, la capacitat de proliferació i migració de les HSCs al lloc del dany hepàtic està mediada en gran part pel factor PDGF, principalment la isoforma PDGF-BB, que incrementa l'expressió dels seus receptors *Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha* (PDGFR α) i PDGFR β per l'acció de TGF β . A més, també s'ha identificat el factor *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) com un inductor de la proliferació i l'angiogènesi (55).

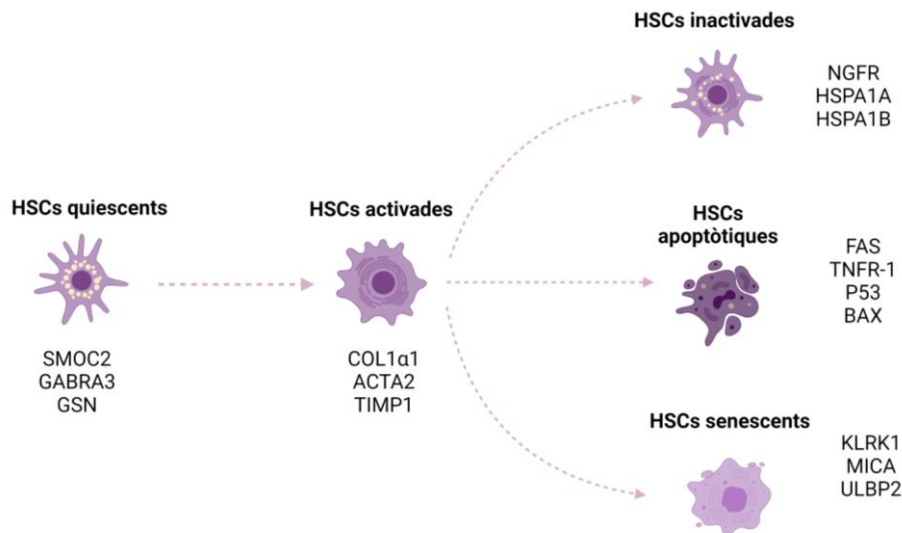
2.2.3. Cèl·lules estrellades hepàtiques en la regressió de la fibrosi hepàtica

La capacitat del fetge a revertir la fibrosi s'ha demostrat en les últimes dècades en models animals i en pacients després de l'eliminació de l'agent etiològic. La regressió de la fibrosi va associada a una reducció de l'activació i el nombre de miofibroblasts, la disminució de la producció de compostos pro-fibrogènics i pro-inflamatoris, i l'augment de la degradació de ECM (56). Per la reducció del nombre de miofibroblasts, es coneix

que les HSCs activades poden entrar en apoptosi, convertir-se en cèl·lules senescentes per ser posteriorment eliminades, o fins i tot, revertir a un tercer estadi conegut com a estadi de resolució o d'inactivació (48).

Es coneix que les HSCs entren en apoptosi incrementant l'expressió de *Fas Cell Surface Death Receptor* (FAS) o *TNF Receptor 1* (TNFR-1) que indueix l'activació de *Caspase8/Caspase3* i incrementen l'expressió de proteïnes apoptòtiques com *Tumor Protein P53* (P53), *BCL2 Associated X Apoptosis Regulator* (BAX) i *Caspase9*, i són finalment eliminades pels macròfags (57). A més, les HSCs poden entrar en un estadi de senescència on expressen els lligands *Killer Cell Lectin Like Receptor K1* (KLRK1), *MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A* (MICA) i *UL16 Binding Protein 2* (ULBP2), i són eliminades per l'acció citotòxica de les cèl·lules NK (58). Ambdós processos permeten l'eliminació de la cèl·lula fibrogènica facilitant la resolució de la fibrosi del teixit.

Durant molts anys s'ha pensat que el procés de regressió es centrava en aquests dos únics mecanismes, però estudis de llinatge cel·lular han permès identificar que els miofibroblasts poden revertir a un estadi d'inactivació (59), (60), tal i com s'havia observat prèviament en cultiu cel·lular (61). De fet, s'ha descrit que aproximadament un 50% dels miofibroblasts o HSCs activades són eliminades pel procés d'apoptosi, mentre que el 50% restant són inhibits pel procés d'inactivació. En aquest estadi, les cèl·lules reverteixen a un estat similar, però diferent a l'estat original de quiescència, reduint l'expressió de gens fibrogènics i augmentant l'expressió de gens de quiescència (PPAR γ) i gens anti-apoptòtics (62). Un estudi de seqüenciació de RNA de *single-cell* (scRNA-seq) d'un model animal de regressió d'esteatosi, va determinar la presència de la subpoblació de HSCs inactivades caracteritzada per l'expressió de *SPARC Related Molecular Calcium Binding 2* (SMOC2), *Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Alpha3* (GABRA3) i *Gelsolin* (GSN), la subpoblació de cèl·lules quiescents caracteritzada per l'expressió de NGFR, *Heat shock protein family A membre 1a i b* (HSPA1A i HSPA1B), i l'expressió de COL1 α 1, ACTA2 i TIMP1 en la subpoblació de HSCs activades (62). Les cèl·lules inactivades presenten un estat més activat que les cèl·lules quiescents tendint a reactivar-se primeres per respondre a un estímul fibrogènic.



Il·lustració 6. Esquema representant els canvis fenotípics de les HSCs durant el desenvolupament i la regressió de la fibrosi hepàtica indicant alguns dels marcadors específics de cada estadi cel·lular.

2.2.4. Heterogeneïtat i zonació de les cèl·lules estrellades hepàtiques

Fins al moment, les HSCs s'han considerat com una població homogènia capaç de transdiferenciar a un fenotip miofibroblàstic per induir la fibrosi hepàtica, però realment no s'havien realitzat estudis experimentals que demostrassin aquesta homogeneïtat funcional i espacial tant en situació fisiològica com fisiopatològica. A més, aquest pensament no concordava amb l'heterogeneïtat metabòlica descrita en el fetge, sobretot en els hepatòcits (16). El descobriment de la tecnologia de seqüenciació de RNA de *single-cell* ha permès estudiar l'heterogeneïtat cel·lular en mostres humanes i de ratolí, identificant la funcionalitat i zonació de cada subpoblació, i descobrint els mecanismes implicats en la progressió i regressió de les malalties hepàtiques (63). Per exemple, estudis en mostres humanes han permès reafirmar la clara zonació dels hepatòcits (19), descriure l'heterogeneïtat epitelial i identificar la seva població progenitora (20), (64), descriure diferents poblacions de macròfags hepàtics (19), i identificar la zonació de les LSECs en el lobulec hepàtic (19), (20).

Primer de tot, la publicació de Ramachandran et al., (2019) va permetre identificar l'heterogeneïtat mesenquimal en mostres de pacients sans i cirròtics (33). Concretament, va identificar 4 poblacions mesenquimals que consistien en les cèl·lules VSCMs (positives per MYH11), cèl·lules mesotelials, cèl·lules HSCs quiescent (positives per *Regulator Of G Protein Signaling 5*, RGS5 i absents en fetge fibròtic) i cèl·lules

associades a la resposta de cicatrització del teixit (positives per PDGFR α i expandides en fetge fibròtic) (33). De manera similar, Dobie et al., (2019), mitjançant el ratolí PDGFR β -GFP, va identificar tres poblacions mesenquimals; VSCMs (MYH11+ PDGFR β +), fibroblasts portals (MFAP4+ PDGFR β +) i HSCs (RGS5+ PDGFR β +) (18).

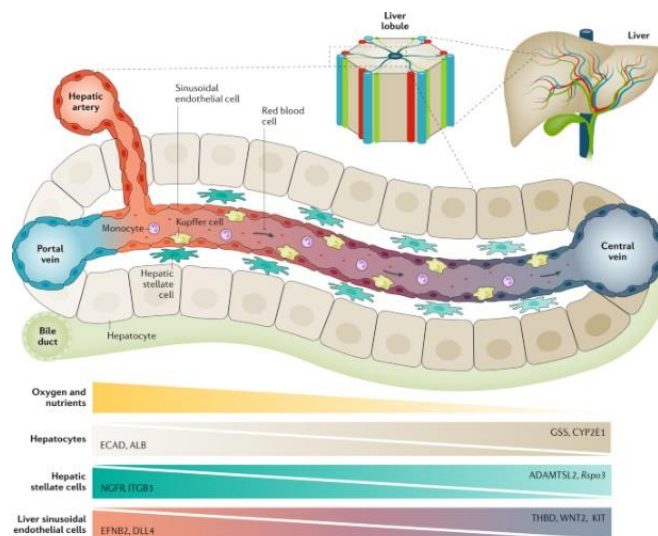
En el cas de les HSCs, també es van realitzar estudis de scRNA-seq tant en mostres humanes com d'origen animal. Alguns d'aquests estudis defensaven l'homogeneïtat de les HSCs i d'altres descriuen l'heterogeneïtat d'aquesta població en estat fisiològic. MacParland et al., (2018) va identificar, en mostres humanes, una única població que expressava marcadors de HSCs com ACTA2, COL1 α 1, *Transgelin* (TAGLN), *Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich* (SPARC), *Retinol Binding Protein 1* (RBP1), *Collectin Subfamily Member 11* (COLEC11) entre d'altres (19). L'estudi de Wang et al., (2021) també va descriure una única població caracteritzada per l'expressió de LRAT i PDGFR β , i va identificar el gen *Transcription Factor 21* (TCF21) com a marcador específic de les HSCs (65). De manera similar, Krenkel et al., (2019) i Terkelsen et al., (2020) van descriure aquesta homogeneïtat de les HSCs quiescents en ratolins control, mentre que en estar tractats amb Tetraclorur de Carboni (CCl₄) apareixen varies poblacions en funció del seu estat d'activació i expressió de gens de ECM, inflamació i proliferació (66),(67).

D'altra banda, Dobie et al., (2019) va identificar subpoblacions de les HSCs depenent de la seva localització en el lobulec hepàtic: les HSCs associades a la vena portal, positives per NGFR i *Integrin Subunit Beta 3* (ITGB3), i les HSCs associades a la vena central, positives per *ADAMTS Like 2* (ADAMTSL2) i *R-Spondin 3* (RSPO3) (18). Aquesta zonació cel·lular també es va descriure en l'estudi publicat per Valéry et al., (2021), on van identificar la població positiva per *Glypican 3* (GPC3) localitzada a la zona de les venes portals i centrals, i la segona població positiva per *Dopamine Beta-Hydroxylase* (DBH) localitzada en els sinusoides hepàtics. Tot i que ambdues poblacions expressaven gens característics de l'organització i producció de ECM, les HSCs de les venes portals i centrals estaven involucrades en el metabolisme de glicosaminoglicans, mentre que les del sinusoides hepàtic realitzaven la funció de cèl·lules presentadores d'antígens (68). Per tant, aquests dos estudis validaven la zonació lobular de les HSCs prèviament observada en seccions hepàtiques de porcs per Wake et al., (1993) (69) i en l'article publicat per

D'Ambrosio et al., (2011) on identificava en ratolins control, l'existència de dues poblacions de HSCs amb diferent capacitat d'emmagatzematge de retinol i lípids (70).

En situació fisiopatològica, Dobie et al., (2019) va descriure que les HSCs de la zona central eren les responsables de la producció de col·lagen en un dany fibrogènic produït pel tractament amb CCl₄ (18). D'altra banda, Rosenthal et al., (2021) va descriure la presència de 4 subgrups de HSCs en un model animal tractat amb dieta alta en grasses, que corresponien a un grup miofibroblàstic, inflamatori i immunològic, proliferatiu i intermedi, així com la presència d'un clúster similar, però no idèntic a les HSCs quiescents identificades en el model animal de regressió (animals tractats amb dieta alta en grasses i dieta control) (62). En mostres procedents de pacients cirròtics, les cèl·lules productores de col·lagen es distingien per presentar una alta expressió de PDGFR α (33).

Per tant, tots aquests estudis han permès identificar la presència de diferents grups de HSCs quiescents, i també, descriure la zonació lobular d'aquestes. A més, en una situació de dany, les HSCs es poden activar d'una manera diferencial adquirint diferents estadis d'activació. Aquest fet indica l'alta capacitat plàstica d'aquestes cèl·lules.



Il·lustració 7. Representació de la zonació de les cèl·lules hepàtiques al llarg del sinusoides hepàtic indicant els gens específics de la vena portal i central. Figura extreta de la publicació de Ramachandran P et al., (2020) (63).

2.3. LÍNIES CEL·LULARS I CÈL·LULES PRIMÀRIES

Fins al moment, les principals fonts cel·lulars utilitzades pel modelatge *in vitro* han estat les cèl·lules primàries i línies cel·lulars. Les cèl·lules primàries s'obtenen de recessions

hepàtiques humanes a partir d'un seguit de digestions mecàniques i enzimàtiques del teixit, i posteriorment mitjançant un gradient de densitat, es poden separar les diferents poblacions hepàtiques. No obstant, la utilització de les cèl·lules primàries ha estat limitada per la dificultat en l'obtenció de mostres humanes, l'escassetat de reseccions hepàtiques, la gran heterogeneïtat entre donants i la baixa quantitat i qualitat de cèl·lules obtingudes per mostra. Tot i que les cèl·lules hepàtiques aïllades presentin algunes característiques pròpies de les cèl·lules *in vivo*, aquestes divergeixen en aspectes fenotípics essencials per poder establir models *in vitro* per l'estudi de malalties hepàtiques, assaigs toxicològics, així com per la seva utilització en la teràpia cel·lular.

Els hepatòcits primaris humans han representat les cèl·lules de referència pel modelatge hepàtic *in vitro* i pels assaigs de toxicitat, però la variabilitat funcional entre els diferents donants, la dificultat en mantenir el fenotip metabòlic en cultiu i la limitada capacitat proliferativa, ha significat un impediment per la seva utilització en el camp de la biomedicina i la clínica. A més, els hepatòcits primaris disminueixen la seva viabilitat i el fenotip metabòlic després de la criopreservació, limitant la seva extensa aplicació (14).

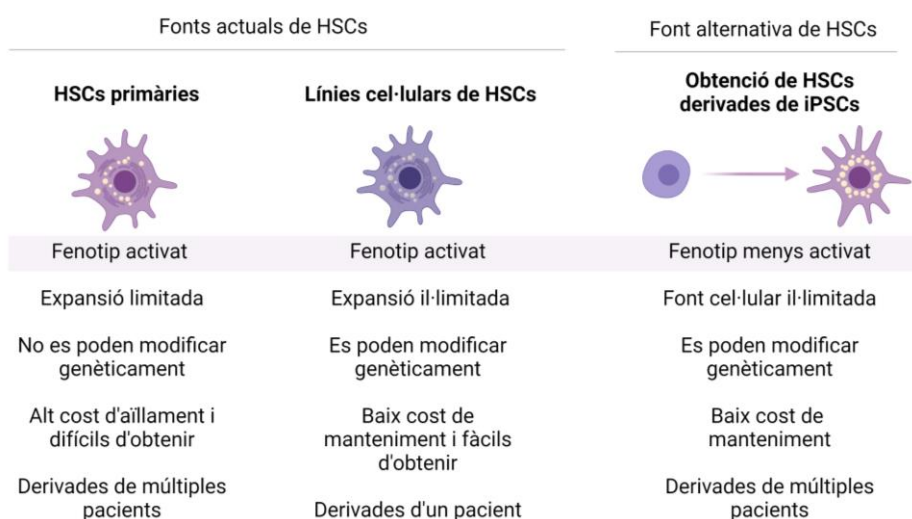
D'altra banda, les HSCs primàries es poden aïllar pel contingut de les gotes lipídiques, perquè els hi confereixen una densitat inferior a les altres cèl·lules hepàtiques, o per detecció d'autofluorescència emesa per la Vitamina A mitjançant citometria de flux (71), (72). Quan les HSCs es cultiven, a l'estar en contacte en plàstic, adquireixen un fenotip activat perdent el contingut de les gotes lipídiques. A més, presenten una capacitat proliferativa limitada podent-les expandir fins a només 8-10 vegades, ja que a mesura que es van expandint van adquirint un fenotip cada cop més activat podent arribar a apoptosar. A part, s'ha descrit que l'activació induïda pel cultiu *in vitro* no reflecteix el procés d'activació que es dona en la fibrosi hepàtica, sent el perfil d'expressió gènica de les HSCs aïllades de pacients cirròtics diferent de les HSCs cultivades (73), (74). Tot i la millora en certs aspectes del cultiu de les HSCs, el fenotip quiescent no es manté a llarg termini *in vitro*, limitant la generació de models per l'estudi de la fibrosi hepàtica.

Actualment, moltes companyies biotecnològiques han afegit en el mercat, cèl·lules primàries hepàtiques. Aquestes cèl·lules comercials permeten abastir l'escassetat de mostres de pacients, però presenten una gran diferència entre donants i vials

disponibles, i a més, en el cas dels hepatòcits tenen una baixa capacitat metabòlica, i en el cas de les HSCs preserven el fenotip activat.

D'altra banda, les línies cel·lulars han aparegut com a nova font cel·lular per substituir les cèl·lules primàries. Les línies cel·lulars presenten molts avantatges: representen una font renovable i il·limitada degut a la seva alta capacitat proliferativa, es poden modificar genèticament i es poden criopreservar mantenint el seu fenotip inicial. En el cas dels hepatòcits, s'han desenvolupat diferents línies cel·lulars, però les més utilitzades són les HUH7, HepaRG i HepG2. Aquestes han estat àmpliament utilitzades pel cribratge de fàrmacs, però la baixa expressió d'enzims metabòlics dificulten la seva àmplia aplicació (75). En el cas de les HSCs, les LX-1 i les LX-2 són les línies cel·lulars més utilitzades, i tot i que presenten algunes característiques de les HSCs primàries, la seva activació intrínseca limita l'aplicació d'aquestes en certs assaigs *in vitro* (76).

Per tant, les característiques de les fonts cel·lulars actuals limiten l'establiment de sistemes *in vitro* que mimetitzin la fisiologia hepàtica. És per això, que hi ha la necessitat d'obtenir una línia estable de cèl·lules hepàtiques. En aquest context, les cèl·lules mare pluripotents induïdes (en anglès abreujat com iPSCs, *Induced Pluripotent Stem Cells*) obren les portes a noves oportunitats per desenvolupar models *in vitro* hepàtics.



Il·lustració 8. Esquema representatiu de les principals diferències entre les dues actuals fonts de HSCs, les cèl·lules primàries i les línies cel·lulars, i la font alternativa basada en les HSCs derivades de iPSCs.

2.4. CÈL·LULES MARE PLURIPOTENTS

Les cèl·lules mare pluripotents són cèl·lules que es caracteritzen per la capacitat il·limitada d'autorenovació mantenint la pluripotència i la capacitat de diferenciació a múltiples cèl·lules adultes. Degut aquestes característiques, tenen un gran interès en la comunitat científica, ja que representen una eina important, no només per l'estudi de la reparació i la regeneració del teixit, sinó per la seva utilització en el modelatge *in vitro* de malalties i l'estudi del desenvolupament embrionari humà.

Les cèl·lules mare es classifiquen en diferents tipus segons la seva font d'origen i el seu potencial de diferenciació. En funció del seu origen, hi ha les cèl·lules mare embrionàries derivades de la massa interna del blastòcit, i les cèl·lules mare adultes. D'altra banda, les cèl·lules mare tenen diferents graus de potencialitat segons l'estadi de desenvolupament embrionari: totipotents, pluripotents, multipotents i unipotents (les cèl·lules progenitores) (77).

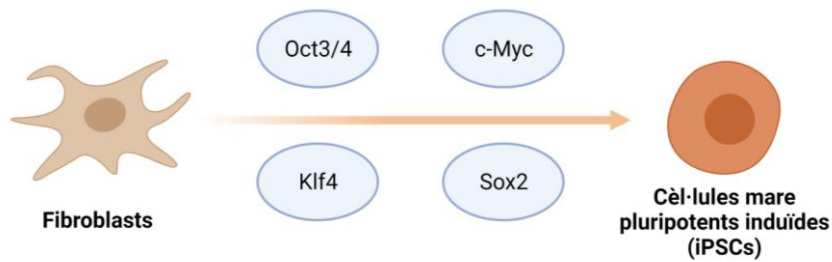
En el desenvolupament embrionari d'un organisme multicel·lular, el zigot presenta cèl·lules totipotents capaces de formar un organisme complex donant lloc al teixit embrionari i extraembrionari. Posteriorment, el zigot evoluciona formant la mòrula, que quan creix i augmenta el nombre de cèl·lules, acaba esdevenint al blastòcit compost per una massa cel·lular interna amb potencial pluripotent. Les cèl·lules pluripotents procedents del blastòcit són les que coneixem com a cèl·lules mare embrionàries i tenen la capacitat de diferenciar-se a les tres capes germinals; ectoderma, mesoderma i endoderma, i les cèl·lules gonadals. Posteriorment, les cèl·lules es van especialitzant adquirint el fenotip de cèl·lula mare multipotent on el seu potencial de diferenciació està restringit a generar cèl·lules d'un mateix llinatge cel·lular, com són per exemple les cèl·lules mare neurals o les cèl·lules mare hematopoètiques. I per últim, algunes esdevenen a cèl·lules amb la capacitat unipotencial que es centren en generar un tipus cel·lular concret (77).

Si ens centrem en les cèl·lules mare embrionàries (en anglès ESCs, *Embryonic Stem Cells*), Evans i Kaufman et al., (1981) van descriure per primera vegada l'obtenció de cèl·lules mare pluripotents procedents de blastòcits pre-implantats de ratolins. Aquestes cèl·lules es podien cultivar preservant el seu cariotip normal i presentaven la capacitat

de formar de EBs (en anglès *Embryoid Bodies*) i generar teratomes després de ser trasplantats en ratolins (78). De forma similar, Thomson et al., (1998) va descriure la generació de diverses línies de ESCs a partir de blastòcits d'embrions humans que tenien característiques pluripotents com la capacitat proliferativa il·limitada, l'expressió de marcadors de pluripotència i la capacitat de diferenciació a les tres capes germinals (79). Tot i que les ESCs s'hagin utilitzat durant molts anys per la generació de múltiples cèl·lules adultes, les restriccions ètiques i la dificultat d'obtenció d'embrions humans, han limitat la seva aplicació en la investigació biomèdica (80).

2.4.1. Cèl·lules mare pluripotentes induïdes (iPSCs)

Per primera vegada, l'any 2006, els investigadors Takahashi i Yamanaka van descriure la generació de cèl·lules mare pluripotents induïdes a partir de fibroblasts de ratolí mitjançant la inducció viral de 4 factors de transcripció: *Octamer-Binding Protein 3/4* (Oct3/4), *SRY-Box Transcription Factor 2* (Sox-2), *MYC Proto-Oncogene*, *BHLH Transcription Factor* (c-Myc) i *Kruppel Like Factor 4* (Klf4) (81). L'addició d'aquests 4 factors, anomenats com factors de Yamanaka, a l'estar involucrats en el manteniment del fenotip de les ESCs, permetia la reprogramació de les cèl·lules somàtiques a cèl·lules pluripotents (82), (83), (84), (85). Les iPSCs obtingudes del procés de reprogramació presentaven característiques de les ESCs com l'expressió de gens de pluripotència, l'activitat de la telomerasa, així com el mateix cariotip i morfologia cel·lular en cultiu (81). A més, les iPSCs eren capaces de formar teratomes i un cop incorporades en el blastòcit de ratolí, podien desenvolupar un animal quimèric gràcies al seu fenotip de pluripotència. Un any després d'aquesta publicació, el mateix grup de Yamanaka va descriure la generació de iPSCs humanes a partir de fibroblasts de la pell utilitzant la mateixa combinació de factors de transcripció (86). Aquesta tecnologia permetia utilitzar cèl·lules mare pluripotents per estudis experimentals sense restriccions ètiques.

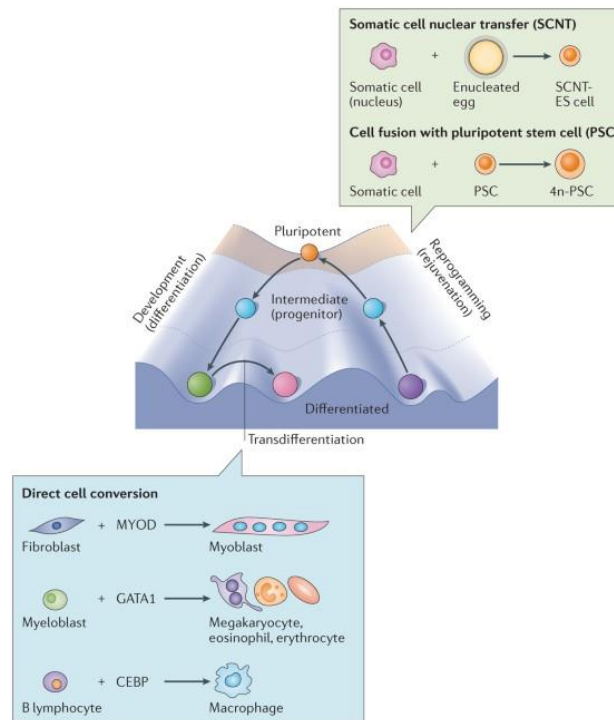


Il·lustració 9. Esquema representatiu del procés de reprogramació de fibroblasts humans a cèl·lules mare pluripotents induïdes mitjançant l'addició dels quatre factors de Yamanaka; Oct3/4, c-Myc, Klf4 i Sox2.

En els últims anys s'han desenvolupat noves alternatives per obtenir iPSCs utilitzant diferents estratègies de reprogramació i variant els compostos de transcripció. Tot i que Takahashi i Yamanaka demostrassin una alta eficiència de reprogramació amb els vectors retrovirals, el fet que la integració sigui aleatòria, generava el risc de produir alteracions genòmiques obtenint cèl·lules tumorals. Per aquest motiu, s'han descrit mètodes més segurs basats en la no-integració de vectors com *Sendai Virus (SeV)-based Vectors* (87), *PiggyBac Transposont Transgenesis* (88), mRNAs sintètics (89) o l'addició directa de les proteïnes de reprogramació (90). A més, s'han generat nous protocols d'obtenció de iPSCs substituint c-Myc per *Lin-28 Homolog A (LIN28)* (91), i fins i tot, eliminant c-Myc i Klf4, dos oncogens, per tal de poder establir la tecnologia de les iPSCs en la clínica i representar una possible teràpia cel·lular (92).

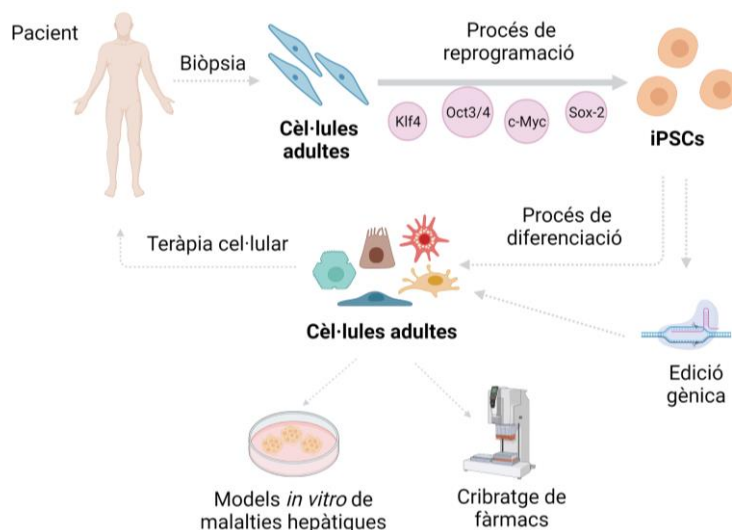
Aquesta troballa va confirmar el concepte de reprogramació cel·lular anteriorment descrit per Gurdon et al., (1962) on va demostrar que al transferir el nucli d'una cèl·lula somàtica a l'òocit enucleat permetia generar un embrió genèticament idèntic al donant de la cèl·lula somàtica. Aquest fet va demostrar per primera vegada, la memòria epigenètica del genoma de les cèl·lules somàtiques durant el procés de reprogramació a un estadi pluripotent (93). L'aparició de les iPSCs trencaven la hipòtesi que descrivia que la plasticitat i destí cel·lular era unidireccional passant d'un estat immadur (pluripotent) a un estat madur (diferenciat). Aquesta idea es representa amb la muntanya de Waddington, on les cèl·lules situades al pic de la muntanya baixen rodolant per la vall adquirint el seu fenotip madur. Tot i això, ara es coneix que les cèl·lules, mitjançant processos de reprogramació, poden passar d'un estadi diferenciat a un pluripotent, representant la pujada de la muntanya de Waddington. També, s'ha pogut demostrar que les cèl·lules diferenciades i específiques es poden convertir en cèl·lules

madures d'un altre llinatge cel·lular per un procés conegut com a transdiferenciació, representat com el moviment horitzontal d'una vall a una altra (94), (95).



II·lustració 10. Esquema representatiu de la teoria de la plasticitat i destí cel·lular de Waddington extreta de la publicació de Takahashi i Yamanaka (2016) (96).

El descobriment de les iPSCs ha aportat molts avantatges en el camp científic, ja que al presentar una capacitat il·limitada de diferenciació i de proliferació permeten generar, a gran escala, qualsevol cèl·lula d'interès i així poder revertir l'escassetat de les cèl·lules primàries. A més, el fet que les iPSCs es puguin generar a partir de cèl·lules de diferents pacients permeten realitzar estudis poblacionals tenint en compte polimorfismes associats a malalties, així com realitzar assaigs de cribratge de fàrmacs des d'un punt més personalitzat. A part, les iPSCs es poden modificar genèticament permetent estudiar gens implicats en mecanismes de progressió i regressió de les malalties hepàtiques i poder determinar possibles dianes terapèutiques. A més, també representen una bona eina per estudiar el desenvolupament embrionari i els processos d'especificació i llinatge de cèl·lules humanes.



Il·lustració 11. Esquema del procés d'obtenció de les iPSCs i les seves possibles aplicacions.

2.4.2. Generació de cèl·lules hepàtiques a partir de iPSCs

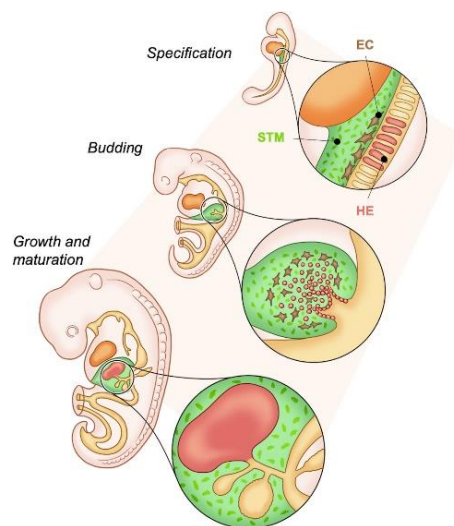
a. Desenvolupament embrionari del fetge

Els protocols de diferenciació de iPSCs a cèl·lules hepàtiques es basen en recapitular el desenvolupament embrionari i fetal del fetge mitjançant l'addició de factors de creixement i citocines implicades en l'embriogènesi de l'òrgan (97).

El desenvolupament embrionari del fetge es dona per múltiples i progressives interaccions entre cèl·lules de capes germinals diferents, sobretot l'endoderma i el mesoderma, que donen lloc a una gran variabilitat de poblacions hepàtiques segons el seu origen embrionari (21). Es coneix que les cèl·lules de la capa germinal endodèrmica donen lloc als hepatòcits i colangiòcits, mentre que les cèl·lules procedents del mesoderma originen les HSCs, KCs, LSECs cèl·lules mesenquimals i cèl·lules hematopoètiques (98), (99).

Durant la gastrulació, el *primitive streak* genera les tres capes germinals: ectoderma, mesoderma i endoderma. En l'estadi del desenvolupament embrionari de ratolí E7.5, les cèl·lules de l'endoderma definitiu s'agrupen en múltiples capes generant el tub intestinal epitelial que es divideix en la part anterior, intermèdia i posterior (98). Concretament, les cèl·lules del tub intestinal anterior de la part ventral s'especifiquen

generant les cèl·lules de l'hepatoblast que es caracteritza per ser una població bipotent i progenitora dels hepatòcits i colangiòcits (100). Posteriorment, les cèl·lules progenitores hepàtiques comencen a proliferar i migrar envaint la capa adjacent mesodèrmica que es coneix com a *Septum Transversum Mesenchyme* (STM) per acabar formant el *liver bud*. La formació del *liver bud* es dona gràcies a les senyals temporals i espacials de factors de creixement com *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Wnt*, *Bone Morphogenetic Protein* (BMPs) i àcid retinoic, secretats per les cèl·lules adjacents; les cèl·lules del mesoderma cardíac, les cèl·lules del STM i les cèl·lules de l'endoteli (98). En l'estadi de E10-15, el *liver bud* entra en procés de proliferació cel·lular i vascularització, així com la colonització de cèl·lules hematopoètiques que acaba formant el fetge fetal amb la presència d'hepatòcits en el parènquima i colangiòcits a les zones portals (21), (98).



Il·lustració 12. Esquema del desenvolupament embrionari indicant l'estadi de la migració de les cèl·lules de l'hepatoblast (HE) en el STM i la formació del *liver bud*. Imatge extreta de la publicació de Thompson et al., (2021) (101).

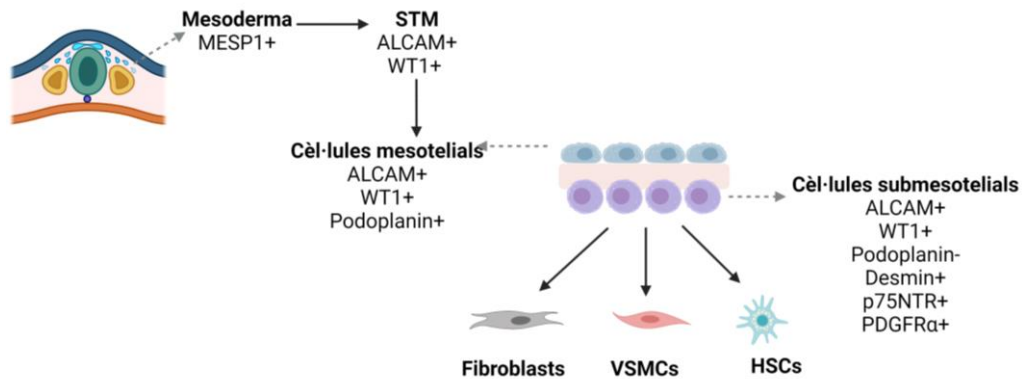
Si ens centrem en les cèl·lules de la capa mesodèrmica, aquestes s'especifiquen en tres zones generant el mesoderma intermedi, paraxial i la placa lateral. En l'estadi del desenvolupament embrionari de ratolí E8.0, les cèl·lules de la placa lateral acaben esdevenint a les cèl·lules del STM que donen lloc a cèl·lules mesotelials i finalment a les HSCs (99), (102). Diferents estudis experimentals han identificat la contribució del STM per la formació de les HSCs (103), (104), i han descrit l'expressió de marcadors característics del STM com *Forkhead Box F1* (FOXF1) i *LIM Homeobox 2* (LHX2), en les

HSCs suggerint la possible relació entre STM i aquesta població mesenquimal (105), (106). Tot i això, durant molts anys es pensava que les HSCs podrien derivar de les cèl·lules de la cresta neural degut a l'expressió de marcadors neuronals. Però, un estudi de llinatge cel·lular publicat per Cassiman et al., (2006) va demostrar que les HSCs no provenien de la cresta neural i van suggerir el seu origen en les cèl·lules del STM, cèl·lules de l'endoderma o les cèl·lules mesotelials hepàtiques (107).

Els estudis de llinatge cel·lular publicats per Asahina et al., (2009 i 2011) van permetre identificar que les cèl·lules mesodèrmiques que són positives pel gen *Mesoderm Posterior Protein 1* (MESP1) contribueixen en la formació de les cèl·lules del STM (108), (109). El STM és una població heterogènia que envolta les cèl·lules del tub intestinal anterior i es caracteritza per expressar marcadors com *FOXF1*, *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule* (ALCAM), *LHX2*, *GATA Binding Protein 4* (GATA4), *Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 1* (HAND1), *H2.0 Like Homeobox* (HLX) i *Wilms Tumor Protein* (WT1).

Un cop el STM és envaït per l'hepatoblast, les cèl·lules del STM es va aplanant formant una monocapa de cèl·lules mesotelials immadures que es caracteritzen per expressar *Podoplanin* (PDPN), ALCAM i WT1, i secretar *Peliotrophin* (PTN) i HGF per induir la proliferació de les cèl·lules progenitores hepàtiques (108), (109). Concretament, Asahina et al., (2011) va descriure que les cèl·lules del STM que es diferenciaven a cèl·lules mesotelials eren aquelles positives per ALCAM i WT1 (109). Les cèl·lules mesotelials es troben separades de les cèl·lules submesotelials per la làmina basal composta de col·lagen tipus IV. La diferència entre aquestes dues poblacions, és que les cèl·lules submesotelials comencen a expressar marcadors de HSCs com P75NTR, DES i PDGFR α , suggerint que les cèl·lules submesotelials són una població intermèdia entre les cèl·lules mesotelials i les HSCs. De fet, van determinar que les cèl·lules mesotelials i submesotelials positives pels marcadors WT1, ALCAM, DES, p75NTR i PDGFR α migren des de la superfície del fetge per generar les HSCs i cèl·lules mesenquimals perivasculares (109), (108). Aquesta migració s'havia descrit anteriorment en un estudi en ratolins *Wt1-LacZ* on descrivien que les cèl·lules del mesoteli hepàtic es podien incorporar a les parets del sinusoides hepàtic generant les HSCs (110), i també, es va descriure en un altre estudi realitzat en seccions histològiques humanes de 7-20 setmanes de gestació (111). A més,

un anàlisi de seqüenciació de RNA de *single-cell* de cèl·lules parenquimals i no-parenquimals d'embrions fetals de ratolí, van determinar l'aparició de les HSCs i cèl·lules del mesoteli a partir de les cèl·lules del STM (112). Per tant, aquests estudis apuntaven a que les cèl·lules mesotelials del STM són les cèl·lules progenitores de les HSCs en el desenvolupament embrionari, i que és similar al que succeeix en el desenvolupament embrionari del mesoderma cardíac, pulmonar i intestinal (113), (114), (115).

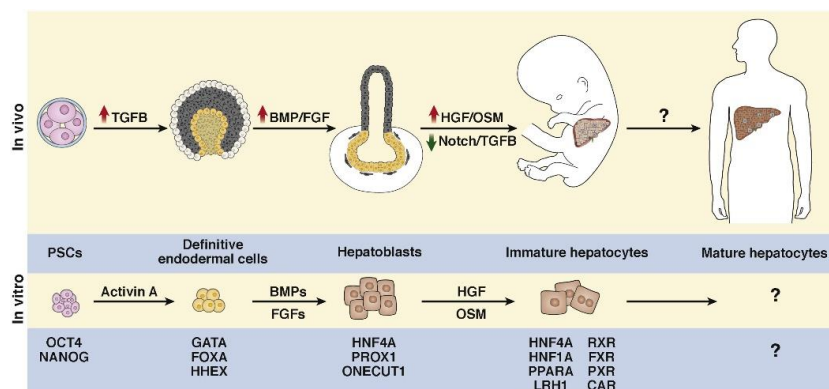


Il·lustració 13. Esquema del desenvolupament embrionari de les HSCs, VSMCs i fibroblasts a partir de les cèl·lules mesotelials i submesotelials derivades del STM. Adaptació de les imatges de la publicació d'Asahina et al., (2009 i 2011) (108), (109).

b. Generació de cèl·lules parenquimals i no-parenquimals hepàtiques a partir de iPSCs

En el camp de l'hepatologia, els primers protocols de diferenciació de iPSCs que es van publicar es centraven en la generació d'hepatòcits (116), (117), (118), (119). Actualment, s'han descrit molts protocols de diferenciació, i tot i que presenten algunes diferències, tots ells es caracteritzen per ser protocols dirigits que mimetitzen el desenvolupament embrionari i fetal del fetge. El primer estadi es centra en la diferenciació de iPSCs a endoderma definitiu mitjançant l'addició de Activina A, un membre de la família de TGFβ implicat en l'especificitat endodèrmica (120). A més, molts protocols afegixen BMP4 o *Wnt Family Member 3A* (Wnt3A) per acabar d'induir aquest estadi embrionari (121), (122). Posteriorment, es porta a terme la inducció de l'estadi d'endoderma hepàtic (hepatoblast) a partir de l'addició de FGFs i BMP4, on les cèl·lules comencen a expressar marcadors fetals com *Alpha-Fetoprotein* (AFP), *HNF1 Homeobox B* (HNF1β) i *Forkhead*

Box A2 (FOXA2) (123). I per últim, l'estadi d'hepatoblast es diferencia a hepatòcits amb l'addició normalment de HGF i *Oncostatin M* (OSM) (124), (125). La població final és positiva per marcadors com *Albumin* (ALB), *Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4* (CYP3A4), *E-cadherin* (CDH1), *Asialoglycoprotein Receptor 1* (ASGR1), *Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha* (HNF4 α) i *Serpin Family A Member 1* (SERPINA1), i executen funcions similars als hepatòcits aïllats de recessions hepàtiques com l'acumulació de lípids i glicogen, i la síntesi d'urea. Tot i això, el grau de maduració dels hepatòcits diferenciats és menor als hepatòcits primaris presentant una activitat disminuïda del citocrom CYP3A4 i una disminuïda expressió d'albumina, mentre que mantenen l'expressió del marcador fetal AFP (126), (127). Per aquest motiu, s'estan desenvolupant noves estratègies per millorar la maduració dels hepatòcits com l'addició en el cultiu cel·lular d'hormones, corticoesteroides i factors de creixement en el medi, tots ells implicats en la maduració dels hepatòcits. S'ha descrit que després del naixement els compostos presents en la dieta com són els àcids grassos i colesterol permeten la maduració de la població hepàtica, i per aquest motiu, s'han generat nous protocols de diferenciació que es centren en l'addició d'aquests compostos en l'etapa final de la diferenciació (128), (129). Una altra estratègia és la de maduració cel·lular mitjançant el cultiu en 3 dimensions en diferents matrius de suport (130), (131) o pel cocultiu amb cèl·lules mesenquimals i endotelials (132), (133), on s'ha demostrat la millora del seu fenotip metabòlic i el manteniment de la seva funcionalitat hepàtica durant un llarg període de cultiu.



Il·lustració 14. Esquema del desenvolupament embrionari *in vitro* per l'obtenció d'hepatòcits a partir de iPSCs indicant els factors i citocines implicades en cada estadi de la diferenciació, i la recapitulació dels processos embrionaris que succeeixen *in vivo*. Esquema extret de la publicació de Chen et al., (2018) (134).

D'altra banda es van establir protocols de diferenciació de iPSCs a colangiòcits seguint els processos embrionaris utilitzats per la diferenciació *in vitro* d'hepatòcits, però modificant les condicions de cultiu per induir la diferenciació d'hepatoblast a colangiòcits. Aquesta diferenciació es porta a terme mitjançant l'exposició del cultiu a citocines i factors de creixement com *Epidermal Growth Factor* (EGF), IL-6, *Sodium Taurocholate*, TGF β , *Jagged Canonical Notch Ligand 1* (Jagged1), *Sonic Hedgehog Signaling Molecule* (SHH) o HGF (135), (136), (137), (138). La població final obtinguda de la diferenciació presenta el perfil d'expressió gènica característic de les cèl·lules biliars sent positives per *Keratin 19* (KRT19), *CF Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) i *SRY-Box Transcription Factor 9* (SOX9), i quan es cultiven en 3D, els colangiòcits diferenciats formen estructures tubulars i biliars (135), (137), (138).

El nombre de protocols publicats per la generació de cèl·lules no-parenquimals està incrementant en els últims anys, però tot i això, encara són limitats. En el cas de les cèl·lules de Kupffer el protocol publicat per Tasnim et al., (2018) es basa en l'obtenció d'una població precursora de macròfags a partir de les iPSCs mitjançant l'exposició de *Monocyte-Colony Stimulating Factor* (M-CSF), *Interleukin 3* (IL-3) i β -mercaptoethanol, i posteriorment, cultivar les cèl·lules amb medi condicionat d'hepatòcits per l'obtenció de macròfags hepàtics. La població final expressa marcadors característics de les KCs com *C-Type Lectin Domain Family 4 Member F* (CLEC-4F) i *HLH Protein* (ID1), i presenta la capacitat fagocítica i l'habilitat per secretar IL-6 i TNF- α després d'una situació de dany (139).

En el cas de la generació de cèl·lules endotelials s'han descrit diversos protocols que tot i presentar diferències entre les citocines utilitzades, comparteixen la inducció mesodèrmica i la posterior obtenció del fenotip endotelial a partir de l'addició de VEGF, FGF (140), (141), o per la selecció de la població positiva per *Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1* (CD31) i *Fc Fragment Of IgG Receptor II* (FCGR2) (142). Les cèl·lules obtingudes expressen marcadors característics de les LSECs com *Stabilin 2* (STAB2) i *Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1* (LYEV1) (143).

c. Generació de cèl·lules estrellades hepàtiques a partir de iPSCs

El primer protocol de diferenciació per etapes i dirigit a l'obtenció de HSCs va ser publicat pel nostre grup (Coll et al., 2018, Vallverdú et al., 2021) (144), (145). El protocol es basa en l'addició subseqüent de factors de creixement i citocines relacionades amb el desenvolupament embrionari del fetge durant 12 dies. Tot i que estudis experimentals van determinar que les HSCs provenien de les cèl·lules mesotelials diferenciades del STM (108), (109), totes les vies de senyalització i factors implicats en la generació de les HSCs no estan ben definits. El protocol de diferenciació s'inicia amb l'addició de BMP4, un factor de la família de TGF β expressat al STM, que s'ha descrit com essencial per la generació de la població mesodèrmica a partir de ESCs humanes (146), (147). Altres factors com la família de FGFs juguen un paper en la inducció del mesoderma, així com la proliferació i expansió de les cèl·lules mesenquimals. Concretament en aquest protocol, s'afegeix FGF1 i FGF3 per induir l'obtenció de cèl·lules amb un fenotip mesotelial/mesenquimal (148), (149), (150). Per últim, les cèl·lules s'incuben amb àcid palmític i retinol per promoure la diferenciació i la maduració de les HSCs (109), (110). Per tant, aquest protocol intenta simular el desenvolupament embrionari diferenciant les iPSCs a un estadi mesodèrmic, un estadi mesotelial/mesenquimal, i finalment a un estadi de HSCs immadures i fetals que acaben evolucionat a HSCs madures. La població final (iPSC-HSCs) és similar a nivell fenotípic, transcriptòmic i funcional a les HSCs primàries presentant un fenotip intermedi entre l'estat d'activació i de quiescència, i amb la capacitat de respondre a estímuls fibrogènics aguts i crònics. A més, es poden co-cultivar amb hepatòcits formant esferoides hepàtics que mantenen la capacitat de resposta a agents fibrogènics i toxicològics (144), (145). Aquest protocol de diferenciació ha estat utilitzat en varies publicacions científiques centrades en la generació de models *in vitro* complexos. Les iPSC-HSCs es poden co-cultivar amb hepatoblasts, cèl·lules endotelials i macròfags derivats de iPSCs per modelar l'esteatohepatitis i la fibrosi hepàtica (151), i també es poden incorporar en dispositius automatitzats per generar a gran escala, esferoides de cèl·lules hepàtiques derivades de iPSCs per modelar malalties hepàtiques i realitzar cribratge de fàrmacs (152), (153).

A part d'aquest protocol de diferenciació, s'han publicat altres estratègies alternatives per generar HSCs a partir de iPSCs. Miyoshi et al., (2019) va descriure un protocol de 6

dies basat en el cultiu de les iPSCs amb les citocines com BMP4, bFGF, CHIR99012, B-27 i el suplement de N-2. Aquestes cèl·lules derivades de iPSCs eren capaces d'acumular Vitamina A, d'activar-se envers un estímul fibrogènic i madurar el fenotip de la població parenquimal en co-cultiu (154). D'altra banda, Kouji et al., (2017), va descriure la generació de les HSCs a partir de la diferenciació de iPSCs a un progenitor mesodèrmic positiu per ALCAM. La població progenitora es podia expandir i diferenciar a HSCs madures mitjançant l'exposició de Y27632 (un inhibidor de *Rhodopsin*, Rho) i induïa, en una situació de co-cultiu, la maduració dels hepatòcits (155). Utilitzant l'estratègia de co-diferenciació, Ouchi et al., (2019) va obtenir organoides compostos tant de cèl·lules parenquimals com no-parenquimals, identificant una població amb característiques de HSCs. Aquests organoides derivats de iPSCs tenen el potencial per modelar l'esteatohepatitis *in vitro* (156), (157), i per ser utilitzats per estudis toxicològics de fàrmacs (158).

2.4.3. Models *in vitro* complexos de cèl·lules hepàtiques derivades de iPSCs

Les cèl·lules hepàtiques obtingudes dels protocols de diferenciació de iPSCs es poden utilitzar per modelar *in vitro* la fisiologia i fisiopatologia hepàtica substituint les cèl·lules primàries i les línies cel·lulars. Tot i presentar algunes diferències en el perfil d'expressió gènica, al derivar de les iPSCs permeten poder-les generar a gran escala, obtenir-les de pacients específics i modificar-les genèticament aportant molts avantatges en el camp del cultiu cel·lular.

Tot i els avantatges descrits, per recapitular completament la fisiologia hepàtica i estudiar respostes més complexes, és essencial la utilització de models *in vitro* multicel·lulars. Hi ha diferents estratègies per generar models complexos en 3D segons el grau de complexitat: el co-cultiu de cèl·lules diferenciades generant esferoides hepàtics, la generació d'organoides hepàtics amb protocols de co-diferenciació, la inclusió cel·lular en dispositius biotecnològics com *organ-on-a-chip*, l'estratègia de *bioprinting* i la incorporació cel·lular en fetges descel·lularitzats d'origen animal.

Els principals sistemes de co-cultiu de cèl·lules derivades de iPSCs han estat el cultiu d'hepatòcits diferenciats amb el suport de línies cel·lulars mesenquimals i endotelials en superfícies no adherents o sobre matrius, o fins i tot, per gravetat mitjançant l'estratègia

de *Hanging drop*. Aquest sistema de cultiu permet la maduració dels hepatòcits diferenciats gràcies al contacte cèl·lula-cèl·lula (132), (133), (159). Tot i això, en els últims anys s'han desenvolupat co-cultius en 3D compostos de cèl·lules, totes elles derivades de iPSCs. Un exemple és la publicació de Takeishi et al., (2020) que va descriure la generació d'un cultiu complex compost d'hepatòcits, colangiòcits i cèl·lules endotelials obtingudes de tres protocols de diferenciació independents que tenien la capacitat de mantenir la seva funcionalitat un cop trasplantats en ratolins (128). També es van publicar articles on demostraven la generació d'esferoides hepàtics multicel·lulars derivats de iPSCs utilitzant plaques amb una matriu d'hidrogel o directament en bioreactors, que permetien modelar la malaltia hepàtica i generar, a gran escala, cultius multicel·lulars (151), (152), (153).

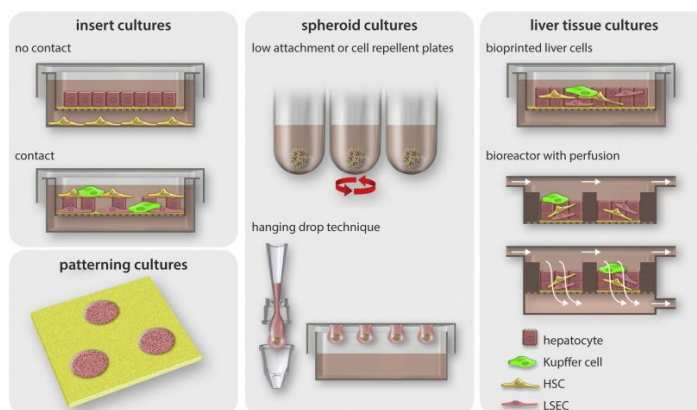
En els últims anys s'han descrit diversos mètodes per generar organoides hepàtics a partir de iPSCs. El primer organoide hepàtic de cèl·lules derivades de iPSCs va ser publicat per Takebe et al., (2014) on descrivia que el cultiu de la població progenitora hepàtica diferenciada amb una línia cel·lular endotelial i cèl·lules mare mesenquimal, generava una estructura en 3D vascularitzada i funcional, similar al *liver bud*. Aquest cultiu multicel·lular, al ser trasplantat en un model animal, permetia la maduració de les iPSCs a hepatòcits madurs (160). A més, van generar aquesta mateixa estratègia, però amb totes les cèl·lules derivades de iPSCs (161).

D'altra banda, han sorgit nous estudis on combinen la tecnologia dels organoides amb els protocols de co-diferenciació. Els protocols de co-diferenciació es basen en recapitular els mecanismes del desenvolupament embrionari i dirigir simultàniament, la generació de diferents cèl·lules hepàtiques a partir de iPSCs. Per exemple, Guan et al., (2017) i Ramli et al., (2020) van generar organoides hepàtics a partir de iPSCs i van demostrar el seu potencial per modelar respectivament, la malaltia genètica de la Síndrome d'Alagille i la malaltia de fetge gras no alcohòlica (162), (163). A part, la publicació de Ouchi et al., (2019) va descriure la generació d'organoides compostos d'hepatòcits, HSCs i KCs amb la capacitat de modelar *in vitro* l'esteatohepatitis (156).

Per millorar la complexitat dels sistemes *in vitro*, les cèl·lules derivades de iPSCs s'han incorporat en bioreactors o sistemes microfisiològics com *organ-on-a-chip*, així com

també en fetges descel·lularitzats. El fet de diferenciar les iPSCs en bioreactors, permet controlar tant els paràmetres fisicoquímics de l'ambient i el flux i la pressió del medi, aconseguint millorar la maduració de la població final en comparació al cultiu en 2D (164) i co-cultiu (165).

D'altra banda, els *organ-on-a-chip* i l'estratègia de *bioprinting* permeten cultivar les cèl·lules en un dispositiu o en una matriu que mimetitza l'estructura, l'ambient i l'organització cel·lular de l'òrgan. Ma et al., (2016) va generar una estructura hexagonal en 3D on les cèl·lules progenitores hepàtiques derivades de iPSCs, les cèl·lules mesenquimals i endotelials es reorganitzaven dins de l'estructura generada (166). D'altra banda, Lorvellec et al., (2020) va dissenyar un *organ-on-a-chip* per cultivar hepatòcits derivats de iPSCs dins d'un fetge de ratolí descel·lularitzat (167). El fet d'utilitzar un fetge descel·lularitzat que manté l'estructura dels vasos i sinusoides hepàtiques, permet una millor organització cel·lular. Un exemple és la publicació de Collin de l'Hortet et al., (2019) que incorporava en aquests fetges descel·lularitzats, hepatòcits derivats de iPSCs juntament amb cèl·lules de suport (168). Per tant, totes aquestes estratègies de cultiu *in vitro* complexos permeten una millor maduració de les cèl·lules derivades de iPSCs.



Il·lustració 15. Esquema de les diferents estratègies de cultiu complexos *in vitro*. Imatge extreta de la publicació de van Grunsven et al., (2017) (169).

3. PUNTS CLAU PER MODELAR IN VITRO LA FISIOPATOLOGIA HEPÀTICA

Els cultius cel·lulars *in vitro* són claus per mimetitzar i estudiar els mecanismes implicats en la fisiopatologia hepàtica. La principal estratègia per mimetitzar les malalties

hepàtiques *in vitro* es basa en l'addició de factors inductors del dany o de l'estrès cel·lular com els factors fibrogènics, citocines inflamatòries, àcids grassos, metabòlits relacionats amb l'estrès oxidatiu, entre d'altres. Una altra estratègia es centra en modificar genèticament les cèl·lules. Gràcies a les noves tecnologies d'edició gènica, es pot induir o eliminar l'expressió de gens característics de la patologia i determinar la seva implicació en la progressió de la malaltia. Per tant, els sistemes *in vitro* ens permeten entendre els mecanismes patològics humans i identificar noves dianes terapèutiques (170). En aquesta tesi doctoral ens centrem en el modelatge *in vitro* de la fibrosi hepàtica i de la malaltia de fetge gras no alcohòlica.

3.1. MODELS IN VITRO PER L'ESTUDI DE LA FIBROSI HEPÀTICA

La fibrosi hepàtica és el resultat comú de la majoria de les malalties hepàtiques cròniques, així com de la toxicitat associada al consum de fàrmacs, i es caracteritza per l'acumulació de ECM que genera la cicatriçació del teixit (50). Tot i que s'ha descrit que la fibrosi pot revertir després de l'eliminació de l'agent causant (171), si el dany persisteix, la fibrosi pot evolucionar a cirrosis generant la disrupció de l'arquitectura original de l'òrgan i acabar donant lloc al carcinoma hepatocel·lular (50).

Com hem comentat anteriorment, les HSCs són les principals cèl·lules fibrogèniques (47). Per aquest motiu, el monocultiu de HSCs primàries o línies cel·lulars ha estat el model *in vitro* de referència per estudiar la fibrosi hepàtica i avaluar l'efecte de compostos anti-fibrogènics en desenvolupament. Aquesta estratègia es basa a induir l'activació de les HSCs mitjançant el cultiu directe en plàstic o l'estimulació, principalment, de la citocina profibrogènica TGF β (169). Tot i això, les cèl·lules activades *in vitro* no recapitulen la situació *in vivo* que es produeix en les malalties hepàtiques cròniques (73). L'activació per plàstic és deguda a la rigidesa exercida pel suport de cultiu, i la reducció d'aquesta mitjançant matrius o gels sintètics permeten el manteniment de les HSCs en un estat una mica més quiescent (172). Per aquest motiu, el sistema més utilitzat és l'estimulació aguda o crònica amb TGF β . Un cop estimulades, la resposta de les HSCs es pot avaluar per l'expressió gènica de marcadors d'activació com COL1 α 1, ACTA2, TIMP1, LOX, i la secreció de mediadors pro-fibrogènics com pro-

col·lagen tipus I. A més, es pot realitzar l'assaig de cicatrització del teixit per avaluar la migració i proliferació cel·lular (173).

A part del cultiu en 2D, també s'han establert cultius tridimensionals multicel·lulars de HSCs primàries, línies cel·lulars o derivades de iPSCs per recapitular l'ambient fibrogènic. Estudis experimentals han identificat que esferoides de HSCs i hepatòcits tractats amb compostos coneguts com a inductors de la fibrosi, Alcohol al·lílic, Metotrexat i TGF β , induïa l'increment de la secreció de pro-col·lagen tipus I (174), (144). De manera similar, l'estimulació d'esferoides compostos tant de cèl·lules primàries com derivades de iPSCs amb Tioacetamida i Acetaminofèn, causava l'activació de les HSCs demostrant la importància de la interacció cèl·lula-cèl·lula pel desenvolupament de la fibrosi hepàtica (174), (144). Per tant, les HSCs es poden activar en cultiu en 2D i 3D mitjançant compostos fibrogènics, i es poden utilitzar per estudiar els mecanismes implicats en la fibrosi hepàtica.

3.2. TERÀPIA PER LA FIBROSI HEPÀTICA

Els miofibroblasts, i per tant, les HSCs, s'han situat com a diana terapèutica per reduir la fibrosi hepàtica fent servir diferents estratègies com: reduir l'activitat fibrogènica de les HSCs, induir la reversió de les HSCs activades a estat quiescent, o eliminar els miofibroblasts per processos d'apoptosi o mort cel·lular (175).

Per inhibir l'activitat dels miofibroblasts, una de les estratègies plantejades es basa en la inhibició de TGF β , però s'ha descrit que a llarg termini podria accelerar la proliferació cel·lular i la resposta neoplàsica. Per aquest motiu s'han generat fàrmacs compostos de molècules associades a TGF β com els inhibidors d'integrines, que al perdre la unió amb TGF β , provoquen un efecte supressor en la progressió de la fibrosi (176).

Per induir la quiescència de les HSCs, es pot interferir en les vies de senyalització o marcadors fibrogènics per tal de recuperar l'estat de quiescència inicial. Alguns lligands inhibidors dels receptors de col·lagen tipus VI, PDGF, RBP, SYP i IGF1R s'han utilitzat com agents anti-fibrogènics en estudis pre-clínic (177). A més, una altra estratègia per induir la inactivació, es basa en afectar a lligands de PPAR γ , com és el cas del compost Pioglitazone, que permet la reducció del nombre de miofibroblasts (178).

A part, també es podria plantejar interferir en l'acció d'altres cèl·lules hepàtiques com els hepatòcits o les cèl·lules del sistema immune, per tal de canviar l'ambient fibrogènic amb la reducció de l'acumulació de fibres i estrès oxidatiu, i revertir en cert grau, la fibrosi hepàtica (179).

3.3. MALALTIA DEL FETGE GRAS NO ALCOHÒLICA

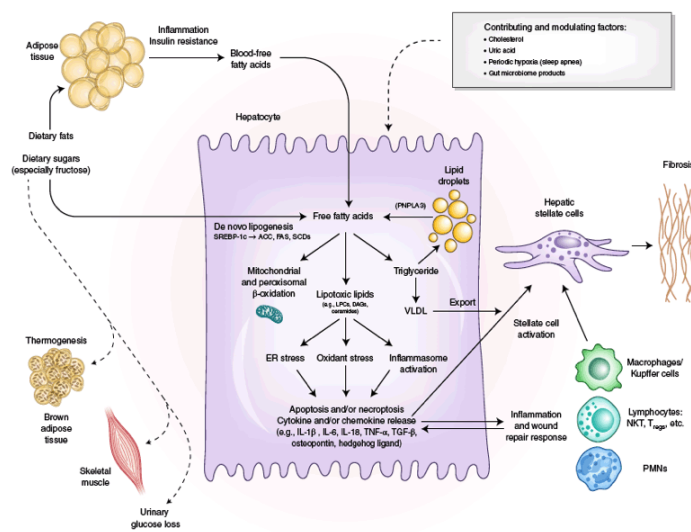
La malaltia de fetge gras no alcohòlica, actualment anomenada com malaltia de fetge gras associada al metabolisme, és una de les malalties hepàtiques més prevalent del món afectant fins a un 20% de la població adulta, i es preveu que en els pròxims anys la incidència augmenti i acabi esdevenint la principal causa de trasplantament hepàtic (180), (181). La malaltia de fetge gras no alcohòlica és una malaltia hepàtica metabòlica que es caracteritza per l'acumulació excessiva d'àcids grassos i triglicèrids en el fetge que no és atribuïda al consum d'alcohol (182). És una malaltia complexa que inclou un ampli espectre d'alteracions hepàtiques, començant per una esteatosi simple fins a l'esteatohepatitis no alcohòlica. L'esteatosi simple es caracteritza per l'acumulació de greix sense inflamació i per presentar més d'un 5% d'hepatòcits que acumulen lípids en el citoplasma. Aquest estadi és reversible i no acostuma a anar associat a altres complicacions (183). Posteriorment, si el dany es manté, apareix l'estadi d'esteatohepatitis no alcohòlica caracteritzat per la presència d'esteatosi, inflamació lobular i dany hepatocitari, on els hepatòcits acumulen lípids agafant la morfologia anomenada com *Hepatocellular ballooning*. A més, és molt freqüent que hi hagi la deposició de ECM que genera la cicatrització i la fibrosi del teixit. Els pacients amb esteatohepatitis presenten un major risc a evolucionar a una cirrosi, insuficiència hepàtica i arribar a desenvolupar un carcinoma hepatocel·lular (182), (184).

L'aparició de la malaltia de fetge gras no alcohòlica es deu a alteracions dels nivells d'àcids grassos que provoquen l'acumulació de compostos lipotòxics que acabaran induint estrès i dany cel·lular. Els àcids grassos provenen de la dieta en forma de grasses que s'acumulen al teixit adipós o en forma de carbohidrats que són utilitzats per l'activitat muscular. Per mitjà de la lipòlisi, en el cas dels triglicèrids, o de la lipogènesi de novo pels carbohidrats, es generen els àcids grassos del fetge. Aquests són posteriorment esterificats i β -oxidats en el mitocondri dels hepatòcits per generar

triglicèrids. Aquests triglicèrids poden ser transportats mitjançant les lipoproteïnes de baixa densitat (en anglès abreuiat com VLDL, *Very Low Density Lipoprotein*) a altres cèl·lules hepàtiques, o emmagatzemats en les gotes lipídiques que poden ser alliberats mitjançant el procés de lipòlisis com a àcids grassos lliures (182), (184).

Quan l'eliminació dels àcids grassos o la generació dels triglicèrids es veu alterada, es produeix l'acumulació d'àcids grassos que genera compostos lipotòxics que indueixen estrès en el reticle endoplasmàtic, estrès oxidatiu, activació de vies de senyalització apoptòtiques i l'activació de l'inflamasoma, generant l'apoptosi i/o necrosis dels hepatòcits. Aquests hepatòcits danyats activen les HSCs generant la fibrosi del teixit, així com les cèl·lules del sistema immunitari que indueixen la inflamació del teixit i a la vegada activen les HSCs (38).

La malaltia de fetge gras no alcohòlica es considera una malaltia multifactorial on diferents factors metabòlics com són l'obesitat, diabetis tipus 2, la resistència a la insulina i la síndrome metabòlica, tenen efectes directes en el desenvolupament de la malaltia. A més, també s'ha descrit que l'ambient, el microbioma, la varietat ètnica, l'edat avançada i els factors genètics i epigenètics, són altres factors de risc de la malaltia (185). Aquesta variabilitat factorial fa que la malaltia progressi de manera molt diferent entre individus, produint una gran divergència entre les manifestacions clíniques i dificultant l'aplicació d'una teràpia àmpliament efectiva (184).

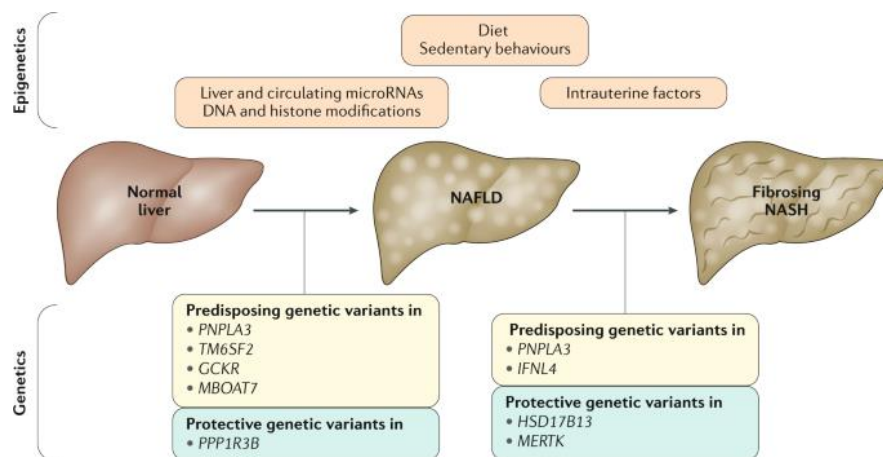


Il·lustració 16. Esquema del procés de dany hepàtic induït per la sobrecàrrega d'àcids grassos. Figura extreta de l'article publicat per Friedman et al., (2018) (184).

3.3.1. Els polimorfismes com a factor de risc per la malaltia de fetge gras no alcohòlica

Els factors genètics juguen un paper molt important en el desenvolupament i la progressió de la malaltia de fetge gras no alcohòlica (186), tal i com demostren estudis en germans bessons, on descriuen que aproximadament el 50% de variabilitat de l'acumulació de grassa en el fetge es deu als factors hereditaris, que aquests a la vegada, determinen el risc de fibrosi hepàtica (187), (188).

L'aparició d'estudis d'associació de tot el genoma (GWAS, *Genome-Wide Association Study*) han permès identificar l'associació de variants genètiques amb l'acumulació de grassa en el fetge i el consegüent desenvolupament de la malaltia de fetge gras no alcohòlica. Un dels factors hereditaris més estudiat és el polimorfisme, en anglès abreviat com SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*, rs738409 C>G en el gen *Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3* (PNPLA3) que genera una proteïna no funcional que al modificar la seva activitat lipasa, indueix l'acumulació de lípids en les cèl·lules hepàtiques (189), (190). La variant de PNPLA3 incrementa la susceptibilitat de tot l'espectre de la malaltia, des de l'esteatosi simple fins a l'aparició de carcinoma hepatocel·lular, i està associada a un major risc de mortalitat (190). A part de la variant de PNPLA3, considerada com el polimorfisme més implicat en la predisposició d'aquesta malaltia (189), s'han descrit altres variacions genètiques en el gen *Transmembrane 6 Superfamily Membre 2* (TM6SF2) que genera la reducció de la secreció de VLDL (191), (192), o el gen *Membrane Bound O-Acyltransferase Domain-Containing 7* (MBOAT7) que genera una proteïna no funcional promovent l'esteatosi del fetge (193), (194). Tot i això, recentment s'ha descrit que la variant en el gen *Hidroxiesteroid 17-Beta Deshidrogenasa 13* (HSD17B13) (rs72613567:TA) té un efecte protector en la progressió de la malaltia i l'aparició d'inflamació, cirrosi i carcinoma hepatocel·lular (195).



Il·lustració 17. Esquema indicant els factors epigenètics i ambientals, així com les variants genètiques que representen un factor de risc o protector per la progressió de la malaltia de fetge gras no alcohòlica (NAFLD) (l·listat de l'esquerra) i de la inflamació i fibrogènesi hepàtica (*Fibrosing NASH*) (l·listat de la dreta). Figura extreta de l'article publicat per Nobili et al., (2019) (196).

3.3.2. Variant del gen Hidroxiesteroid 17-Beta Deshidrogenasa 13 (HSD17B13)

El gen *Hidroxiesteroid 17-Beta Deshidrogenasa 13* (HSD17B13) és un membre de la família d'enzims deshidrogenases-reductases de cadena curta (SDRs) que es centren en la regulació del metabolisme de les hormones sexuals. Tot i això, s'ha descrit que alguns membres d'aquesta família accepten altres substrats com àcids grassos, àcids biliars i retinol, indicant la seva possible implicació en la regulació de vies metabòliques hepàtiques (197), (198).

El gen HSD17B13 codifica per una proteïna associada a les gotes lipídiques i s'expressa específicament en el fetge (199), (200), (201), (202). Tot i que aquest gen es situa en les gotes lipídiques, no regula el seu contingut, i per tant, presenta una altra funció. La principal funció d'aquest enzim és de retinol deshidrogenasa (RDH) que utilitzen principalment el cofactor NAD(P)(H) d'alguns substrats com els esteroides, lípids bioactius i retinols per convertir el retinol a retinal (203). Per tant, aquest gen podria jugar un paper en el metabolisme del retinol (203).

La publicació de Su et al., (2014) va descriure, per primera vegada, que la proteïna HSD17B13 es trobava altament expressada en mostres hepàtiques de pacients amb la malaltia de fetge gras no alcohòlica i en un model animal amb dieta alta en grasses. A

més, el nombre i la mida de gotes lipídiques, el contingut de triglicèrids en els hepatòcits i els processos lipogènics estaven augmentats en un model animal que presentava sobreexpressat el gen HSD17B13 en el fetge (204). Un altre estudi relacionava l'expressió de HSD17B13 amb l'expressió de *Liver X Receptor Alpha* (LXR α) i *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c* (SREBP-1c), dos gens involucrats en el metabolisme dels lípids (205). Aquests resultats indicaven que l'enzim HSD17B13 generava una proteïna patogènica per la progressió de la malaltia i que el seu efecte podria estar associat al metabolisme hepàtic

Anys més tard, Abul-Husn et al., (2018) mitjançant un anàlisi de seqüenciació, va identificar l'associació d'una variant del gen HSD17B13 amb baixos nivells sèrics de *Alanine Aminotransferase* (ALT) i *Aspartate Aminotransferase* (AST) (195). Aquesta variant anomenada com rs7261356T:A es generava per la inserció d'una adenina a la regió no codificant entre l'exó 6 i 7 que resultava en una proteïna no funcional (195). La freqüència d'aquesta variant és del 26% i presenta un efecte protector envers la progressió de malalties hepàtiques. Els homozigots per l'al·lel minoritari presenten un 53% de reducció del risc de la malaltia hepàtica alcohòlica i un 30% de reducció del risc de la malaltia de fetge gras no alcohòlica, presentant una menor probabilitat a desenvolupar una malaltia hepàtica de forma depenent a la dosi d'al·lels afectats. A més, està associada al 52% de reducció del risc a desenvolupar esteatohepatitis i un 61% de reducció de risc a progressar a fibrosi. Altres estudis experimentals identificaven l'efecte protector de la variant genètica a la progressió de carcinoma hepatocel·lular i també en la malaltia de Wilson (206), (207). La variant de HSD17B13 doncs, genera una proteïna truncada que perd la seva funció de RDH i provoca una disminució del nivell d'inflamació, fibrosi i dany hepatocitari reduint la progressió de malalties hepàtiques cròniques. Tot i això, els mecanismes pels quals la variant genètica té un efecte protector es desconeixen.

Estudis de cohorts poblacionals de diferents països, races, edats i etiologies de malalties hepàtiques cròniques, han identificat que tot i haver-hi una diferència en la freqüència de l'al·lel minoritari, la variant presenta el mateix efecte protector (208), (209), (210), (211), (212), (213). De fet, s'ha observat que la variant redueix els factor de risc com l'obesitat, el consum d'alcohol i les variants genètiques. S'ha descrit que pacients

portadors de la mutació I148M en el gen PNPLA3, amplifiquen l'efecte protector de la variant de HSD17B13 indicant la relació sinèrgica entre ambdues variants genètiques (209).

Aquest efecte beneficiós de la variant HSD17B13 remarca el seu potencial com a possible diana terapèutica. Actualment, hi ha companyies farmacèutiques com *Regeneron Pharmaceuticals* i *Alnylam Pharmaceuticals* que es troben en procés de desenvolupament de RNA interference (RNAi) per HSD17B13. Aquesta estratègia es basa en silenciar el gen patogènic com a tractament per la malaltia de fetge gras no alcohòlica. Altres companyies com *IniPharm* i *Forendo Pharma* estan desenvolupant altres estratègies de silenciament del gen. A més, *Arrowhead Pharmaceuticals* va anunciar al 2020, que començaven la fase 1/2 de l'estudi ARO-HSD amb l'administració de la primera dosi d'un inhibidor de la proteïna HSD17B13 en pacients "control" i pacients en estadi d'esteatosi.

3.3.3. Modelatge *in vitro* de la malaltia de fetge gras no alcohòlica

Els principals sistemes *in vitro* per modelar la malaltia de fetge gras no alcohòlica es centren en el monocultiu d'hepatòcits exposats entre 48 i 72 hores a àcids grassos lliures (en anglès abreujat com FFA, *Free Fatty Acids*), especialment àcid palmític (C16:0) i àcid oleic (C18:1), FFA més abundants en el fetge, en una proporció 1:2. L'exposició de FFA induïa als hepatòcits, l'acumulació de triglicèrids, estrès del reticle endoplasmàtic, inflamació, citotoxicitat i mort cel·lular, principals marcadors de dany l'esteatosi simple (214), (215). En els últims anys aquests assaigs *in vitro* estan evolucionant a sistemes més complexos compostos d'hepatòcits tan primaris, derivats de iPSCs o línies cel·lulars, juntament amb cèl·lules no-parenquimals per recapitular la interacció cel·lular, important per la progressió de la malaltia de fetge gras no alcohòlica. S'han generat des d'esferoides hepàtics (216), (217), sistemes microfluídics (218), (219) i sistemes de *liver-on-a-chip* (220), (221), (222) permetent l'estudi de la resposta fibrogènica i inflamatòria.

Aquests sistemes *in vitro* s'utilitzen pel cribratge de compostos terapèutics en desenvolupament, però el gran impacte dels factors genètics, genera la necessitat d'establir cultius que contemplin aquestes varietats hereditàries. Per aquest motiu, s'estan generant models *in vitro* de cèl·lules que presentin alguns d'aquests

polimorfismes. Aquests cultius es basen en cèl·lules primàries de pacients amb la variant genètica (219), la generació de línies cel·lulars amb el SNP (223), o l'obtenció de cèl·lules hepàtiques a partir de iPSCs de pacients que presenten la variant genètica (224) o que han estat modificades genèticament (225). La majoria d'estudis publicats es centren en el polimorfisme del gen PNPLA3, on realment es pot observar canvis en el fenotip de les cèl·lules derivades de iPSCs amb l'alteració o sense, i a més, es pot detectar la variabilitat en la susceptibilitat cel·lular envers a una situació de dany (225). La inclusió d'aquests factors de risc permeten modelar la variabilitat en la progressió de les malalties hepàtiques i la resposta a fàrmacs entre pacients, apropant així, la teràpia més personalitzada.

3.2. TECNOLOGIES D'EDICIÓ GÈNICA EN IPSCS

En els últims anys han aparegut moltes tècniques per l'edició del genoma de les iPSCs obrint les portes a importants aplicacions en el món de la biotecnologia i de la medicina. Aquestes tecnologies permeten introduir canvis genètics a un lloc específic del genoma de les iPSCs per tal d'estudiar els mecanismes d'acció de gens involucrats en la fisiopatologia de l'òrgan, mimetitzar l'efecte de variants genètiques, així com corregir mutacions directament en cèl·lules derivades de iPSCs de pacients per establir una teràpia cel·lular personalitzada. Per tal d'eliminar o introduir mutacions genètiques en cèl·lules humanes, s'utilitzen diferents tècniques com *Zinc-Finger Nucleases* (ZFN) (226), *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs) (227) i *CRISPR-Cas9* (228).

En el cas de la sobreexpressió d'un gens d'interès, una de les estratègies utilitzada és el sistema publicat per Ordovás et al., (2015). En aquesta publicació van demostrar la generació d'una línia de ESCs i de iPSCs humanes amb la capacitat d'intercanviar cassets mitjançant la recombinació d'enzims flipasa (Flp). Concretament, es va pre-integrar la seqüència diana de reconeixement de flipases (FRT) mitjançant una recombinació per ZFNs en el locus AAVS1 (*Adeno-Associated Virus Integration Site 1*) localitzat en el primer intró del gen PPP1R12C del cromosoma 19 del genoma humà (229). Aquest lloc es coneix com a *Safe harbor*, perquè permet l'expressió estable del transgèn sense afectar la pluripotència de les cèl·lules (230). A més, aquest sistema demostrava ser robust i eficient per obtenir la línia de iPSCs amb el gen d'interès correctament integrat. De fet

aquest sistema permet induir l'expressió del gen sota el tractament de doxiciclina permetent veure el seu efecte en moments concrets de la diferenciació i elucidar el seu paper en el desenvolupament embrionari de la cèl·lula (229).

HIPÒTESI



La hipòtesi d'aquesta tesi doctoral és que les iPSCs representen una bona eina per generar noves fonts de cèl·lules hepàtiques i per establir sistemes *in vitro* pel modelatge del fetge i el cribratge de fàrmacs. A més, les cèl·lules derivades de iPSCs podrien substituir les cèl·lules primàries i línies cel·lulars, els models *in vitro* de referència actuals, perquè presenten una capacitat de renovació i diferenciació il·limitada, es poden modificar genèticament i es poden derivar de pacients específics permetent establir estudis personalitzats.

OBJECTIUS



El principal objectiu d'aquesta tesi doctoral era caracteritzar i avaluar el potencial de les cèl·lules estrellades hepàtiques derivades de iPSCs, i generar una línia de iPSCs que presenti el polimorfisme del gen HSD17B13 per poder modelar *in vitro* la malaltia de fetge gras no alcohòlica.

Els tres objectius específics d'aquesta tesi doctoral eren:

Objectiu 1: Implementar el protocol de diferenciació de iPSCs a cèl·lules estrellades hepàtiques i caracteritzar les cèl·lules obtingudes

- 1.1. Implementació del protocol de diferenciació de iPSCs a HSCs
- 1.2. Caracterització cel·lular al llarg del protocol de diferenciació
- 1.3. Descripció de les poblacions obtingudes al llarg de la diferenciació mitjançant scRNA-seq
- 1.4. Caracterització de la població final

Objectiu 2: Avaluar el potencial ús de les cèl·lules estrellades hepàtiques derivades de iPSCs

- 2.1. Expansió i criopreservació de les iPSC-HSCs
- 2.2. Estimulació de les iPSC-HSCs amb compostos pro-fibrogènics i pro-inflamatoris
- 2.3. Ús de les iPSC-HSCs pel cribratge de fàrmacs anti-fibrogènics
- 2.4. Co-cultiu de les iPSC-HSCs amb hepatòcits

Objectiu 3: Desenvolupar una línia de iPSCs amb el polimorfisme de HSD17B13 per tal de modelar *in vitro* la malaltia hepàtica

- 3.1 Generació de la línia de iPSCs amb la variant del gen HSD17B13
- 3.2 Expressió del gen HSD17B13 en iPSCs, HSCs i hepatòcits primaris
- 3.3 Sobreexpressió de la variant HSD17B13 en hepatòcits derivats de iPSCs
- 3.4 Estimulació d'hepatòcits derivats de iPSC-HSD17B13 amb medi lipotòxic per modelar *in vitro* la malaltia de fetge gras no alcohòlica
- 3.5 Sobreexpressió de la variant de HSD17B13 en HSCs derivades de iPSCs

MATERIALS I
MÈTODES



1. CÈL·LULES MARE PLURIPOTENTS INDUÏDES (IPSC)

1.1. Línies de iPSCs

En aquesta tesi doctoral es van utilitzar diferents línies humanes de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs) per diferenciar a cèl·lules hepàtiques.

- 1. iPSCs BJ1:** Línia de iPSCs generada a partir de fibroblast humans (ATCC® CRL-2522™28) en el laboratori de la Catherine Verfaillie de *Stem Cell Institute in KU Leuven*, Bèlgica. Les iPSCs BJ1 es van utilitzar per la caracterització del protocol de diferenciació a HSCs (iPSC-HSCs) publicat per Coll et al., (2018) (144) i Vallverdú et al., (2021) (145).
- 2. iPSCs Sigma:** Línia obtinguda de la companyia Sigma-Aldrich (iPSCs Epithelial-1, iPSC0028). Les iPSCs Sigma es van diferenciar a iPSC-HSCs per validar la robustesa del protocol de diferenciació publicat pel nostre grup.
- 3. iPSCs Sigma- FRT:** Línia de iPSCs generada en el laboratori de la Catherine Verfaillie a partir de la línia Sigma iPSC0028 amb la inclusió d'un casset FRT en el locus AAVS1, i publicada per Ordovás et al. (2016) (229). Aquesta línia de iPSCs es va utilitzar per sobreexpressar la seqüència truncada de HSD17B13 i posteriorment diferenciar a hepatòcits seguint el protocol publicat per Roelandt et al., (2012) (118) i Roelandt et al., (2013) (119), i a HSCs.

Totes les línies de iPSCs es van caracteritzar mitjançant expressió gènica, citometria de flux (FACS) i immunofluorescència per la presència de marcadors de pluripotència (*OCT4*, *SOX2* i *NANOG*), i també es va avaluar la capacitat de generació de EBs (en anglès, *Embryoid Bodies*).

1.2. Cultiu cel·lular de les diferents línies de iPSCs

Les tres línies cel·lulars de iPSCs es van cultivar en *Essential 8™ Medium* (Medi E8) (Thermo Fisher Scientific) en plaques de 6 pous prèviament tractades amb un recobriment específic. La línia iPSCs BJ1 es va cultivar sobre el 1% de Vitronectina (Thermo Fisher Scientific) diluïda amb *DPBS without Calcium and Magnesium* (DBPS (-/-)) (Lonza), mentre que les iPSCs Sigma i Sigma-FRT en 2% de *Matrigel ESC-Qualified Matrix*, anomenat com *Human Matrigel* (Corning) diluït en *DMEM low glucose* (Thermo Fisher Scientific). El canvi de medi es va realitzar cada dia fins a adquirir una confluència del 70%.

Per expandir les iPSCs, les cèl·lules es van incubar en EDTA 0.5mM (Thermo Fisher Scientific) durant 2-3 minuts a temperatura ambient i es van plaquejar en Medi E8 a una dilució 1:6 per tal d'obtenir el nombre suficient de cèl·lules per iniciar els protocols de diferenciació.

2. SOBREXPRESSIÓ DE LA SEQÜÈNCIA TRUNCADA DE HSD17B13

Per tal de sobreexpressar la proteïna truncada de HSD17B13 es va utilitzar la línia iPSCs Sigma-FRT publicada per Ordovás et al., (2015) que permet l'intercanvi de cassets mitjançant la recombinació homòloga per l'acció d'enzims flipasa (Flp), en anglès anomenat com *Recombinase-Mediated Cassette Exchange System* (RMCE) (229). Per dur a terme la clonació cel·lular es van seguir diferents passos: 1) Generació de la seqüència truncada de HSD17B13, 2) Digestió del plasmidi HC3x i ensamblatge amb la seqüència de HSD17B13, 3) Inserció del vector en bacteris per amplificar el DNA del plasmidi, 4) Seqüenciació de Sanger de les colònies bacterianes, 5) Nucleofecció de les iPSC-FRT, 6) Selecció positiva i negativa de les colònies de iPSCs i 7) Expansió cel·lular de la línia transgènica de iPSCs.

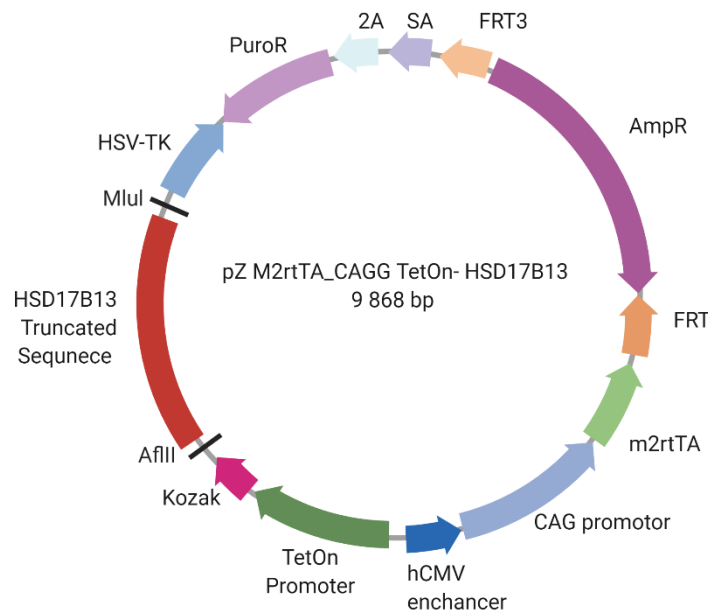
2.1. Generació de la seqüència truncada de HSD17B13

La seqüència codificant del gen HSD17B13 es va modificar afegint el codó *stop* TGA a l'inici de l'exó 7 per generar la ruptura del marc de lectura i produir la proteïna truncada i no funcional d'interès (Figura 1 de l'Annex 3). La seqüència dissenyada presentava 825 nucleòtids i es va produir com un fragment de doble cadena de DNA anomenada com *gBlocks™ Gene Fragments*, per la companyia *Integrated DNA Technologies* (IDT).

2.2. Digestió del plasmidi HC3x i ensamblatge amb la seqüència truncada de HSD17B13

Es va utilitzar el plasmidi HC3x per integrar la seqüència modificada de HSD17B13. Aquest vector presenta en els extrems dues seqüències FRT que són les reconegudes per l'enzim recombinasa flipasa (Flp). A més, té la seqüència de dos gens de resistència; el gen de Ampicil·lina (AmpR) per seleccionar durant el procés de transformació a bacteris, i el gen de Puromicina (PuroR) per seleccionar els clons després de la nucleofecció. També presenta el promotor TetOn per induir mitjançant m2rtTA i el tractament a doxiciclina, l'expressió del gen d'interès i la seqüència *Herpes simplex virus*

(HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal sequence (HSV-tk) que mitjançant l'addició de *Fialuridine* (FIAU) permet eliminar els clons que hagin integrat la seqüència en un lloc a l'atzar. A part, també hi ha integrada la seqüència truncada de HSD17B13 a prop dels enzims de restricció Mlul i AflII. Una representació del vector HC3x es troba en la il·lustració 18.



Il·lustració 18. Esquema del plasmidi HC3x amb la seqüència truncada de HSD17B13 integrada.

Primer de tot es va fer la digestió del plasmidi HC3x amb els enzims de restricció AflII (seqüència CTTAAG) i Mlul (seqüència ACGCGT) molt properes a la zona d'inserció de la seqüència d'interès. Es va afegir 1µg del plasmidi HC3x, 1µL AflII, 2µL Mlul i 2µL del buffer *Orange* (Thermo Fisher Scientific) i el restant de 20µL es va suplementar amb aigua. El producte de la PCR es va purificar mitjançant el *PCR Purification Kit* (Invitrogen).

Posteriorment, la seqüència de *gBlock* de HSD17B13 es va integrar al plasmidi digerit mitjançant la lligació de Gibson utilitzant NEBuilder (New England BioLabs). La lligació de Gibson permet l'ensamblatge de dos fragments que no presenten una alta compatibilitat en les seqüències dels seus extrems, i consisteix en afegir 30ng del producte de digestió, 50ng de *gBlock* i 5µL de NEB en un total de 10µL. La reacció d'ensamblatge es dona incubant els compostos 1 hora a 50°C. La seqüència del plasmidi

HC3x amb la seqüència truncada de HSD17B13 integrada, es mostra en la Figura 2 de l'Annex 3.

2.3. Inserció del vector en bacteris per amplificar el DNA del plasmidi

Per l'amplificació del plasmidi es van utilitzar cèl·lules competents d'*Escherichia coli* DH5 α TM (Invitrogen). El DNA del plasmidi procedent de la reacció de Gibson es va barrejar directament amb els bacteris, i la transformació es va donar per un seguit de xocs tèrmics. Primer, el DNA es va incubar durant 30 minuts en gel, després 30 segons en el bany a una temperatura de 42°C, 5 minuts en gel, i finalment es va incubar 1 hora a 250rpm d'agitació i 37°C amb el *SOC medium* (Thermo Fisher Scientific). El cultiu es va sembrar de forma homogènia en les plaques d'agar LB (*Lysogeny Broth*) i es va incubar a 37°C durant la 12 hores. L'endemà es van picar 4 colònies individuals, es van afegir en 2mL de *LB/Ampicillin medium* i es van incubar a 37°C en un agitador a 250rpm. Al cap de 24 hores, el plasmidi es va aïllar utilitzant *Miniprep Isolation Kit* (Invitrogen).

2.4. Seqüenciació de Sanger de les colònies bacterianes

Per assegurar que les diferents colònies bacterianes seleccionades presentaven una correcta clonació del plasmidi, es va realitzar la seqüenciació de Sanger. Per la seqüenciació es va afegir 5 μ M de cada primer (Taula 1) i 100ng/ μ L del DNA del plasmidi, i posteriorment es va enviar a seqüenciar a GATC BiotechTM.

Taula 1. Seqüència del primer *Forward* i *Reverse* utilitzats per la seqüenciació de Sanger per amplificar la zona d'inserció de la seqüència truncada de HSD17B13 en el plasmidi HC3x.

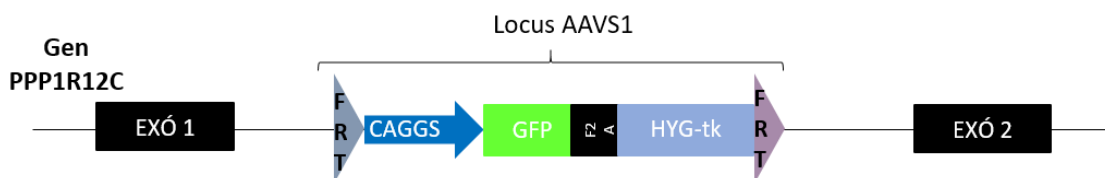
Forward	Reverse
AACAAACGACCCACCGTG	CCCAACACCGTGCGTTTTA

Un cop obtinguts els resultats de seqüenciació (Figura 3 de l'Annex 3), es va seleccionar una colònia, es va picar de les plaques d'agar i es va deixar créixer en un volum de 200mL de *LB/Ampicillin medium* durant 12 hores per amplificar el nombre de bacteris que contenen el plasmidi d'interès. Posteriorment, el plasmidi es va aïllar utilitzant el *Maxiprep Isolation Kit* (Invitrogen).

2.5. Nucleofecció de les iPSC-FRT

Per la integració del gen d'interès en les iPSCs es va utilitzar la línia iPSCs Sigma-FRT. Les iPSCs Sigma-FRT presenten en el AAVS1 localitzat en el primer intró del gen PPP1R12C, un casset compost de les seqüències FRT per la recombinació homòloga, un promotor CAGGS per induir l'expressió de la seqüència GFP (*Green Fluorescent Protein*) i la seqüència *Hygromycin/thymidine kinase* (HYG/TK) per la selecció negativa dels clons (Il·lustració 19).

Pel procés de nucleofecció, les iPSCs Sigma-FRT a una confluència del 70% es van incubar durant 1 hora amb *mTeSR* (Stemcell Technologies) i 1:1000 de *Rock Inhibitor* (Y-27632) (Sigma-Aldrich). Posteriorment es van incubar amb *Accutase* (Stemcell Technologies) durant 2-3 minuts a 37°C i es va afegir 100µL *Nucleofector Solution 2* (Lonza), 5µg de plasmidi HSD17B13 i 2µg del vector d'expressió Flp (pFLPe). Les cèl·lules es van electroporar amb *Nucleofector™ 110VAC/230VAC 50-60 Hz* (Amaxa Biosystems) i finalment es van cultivar en medi *mTeSR* i 1:1000 de *Rock Inhibitor*. El següent dia, el medi es va substituir per Medi E8 amb 1:100 de *Revita Cell* (Thermo Fisher Scientific).



Il·lustració 19. Esquema del genoma de les iPSC Sigma-FRT indicant el casset integrat en el locus AAVS1 del gen PPP1R12C.

2.6. Selecció positiva i negativa de les colònies de iPSCs

Al cap de 5 dies de l'electroporació, es va començar la selecció positiva de les cèl·lules que havien integrat el plasmidi en el genoma mitjançant un increment progressiu de la concentració de Puomicina (Sigma-Aldrich). Es va començar amb una concentració de 80ng/µL i al cap d'aproximadament 10-15 dies, la concentració es va augmentar fins a 300ng/mL. Posteriorment, el cultiu cel·lular es va tractar amb 2µL/mL de *Fialuridine* (FIAU) (Sigma-Aldrich) durant 2 dies per eliminar mitjançant l'expressió del gen suïcida HSV-tk aquells clons cel·lulars que presentaven una integració del plasmidi a una zona incorrecta. De les colònies cel·lulars restants, es van seleccionar aquelles que no presentaven fluorescència per l'expressió de GFP i es van picar i expandir de manera

independent sobre el recobriment de *Human Matrigel* i amb el Medi E8. Finalment quan les cèl·lules es van expandir i van adquirir una alta confluència, es va realitzar l'anàlisi de citometria de flux (FACS) per l'expressió de GFP, descrit en l'apartat 8 de materials i mètodes, per assegurar la correcta integració del gen en el locus AAVS1.

2.7. Expansió cel·lular de la línia transgènica de iPSCs

Un cop analitzada l'expressió de GFP i determinar la inserció de la seqüència truncada de HSD17B13 en els dos al·lels, les iPSCs, anomenades com iPSC-HSD171B3, es van expandir i criopreservar per poder realitzar la diferenciació a hepatòcits i HSCs.

3. PROTOCOLS DE DIFERENCIACIÓ DE IPSC A CÈL·LULES HEPÀTIQUES

En aquest estudi es van utilitzar dos protocols de diferenciació de iPSCs; 1) Protocol de diferenciació de iPSCs a cèl·lules estrellades hepàtiques (iPSC-HSCs) (144), (145) i 2) Protocol de diferenciació de iPSCs a hepatòcits (iPSC-Hep) (118), (119).

3.1. Protocol de diferenciació de iPSCs a cèl·lules estrellades hepàtiques (iPSC-HSCs)

Les tres línies de iPSCs es van diferenciar a HSCs (iPSC-HSCs) seguint el protocol publicat per Coll et al., (2018) (144) i Vallverdú et al., (2021) (145). Aquest protocol de diferenciació consisteix en l'addició de diferents factors de creixements involucrats en el desenvolupament embrionari i fetal del fetge durant 12 dies.

3.1.1. Preparació de les iPSCs per la diferenciació a HSCs

Per tal de començar el protocol de diferenciació, les iPSCs es van incubar en EDTA 0.5mM (Thermo Fisher Scientific) durant 1-2 minuts a 37°C, les colònies cel·lulars es van disgregar en Medi E8 i es va plaquejar una densitat cel·lular de 15,000 cèl·lules/cm² en una placa de 12 pous prèviament tractada amb un recobriment de 2% de *Matrigel Growth Factor Reduced*, anomenat com *Differentiated Matrigel* (Corning). El següent dia, si el cultiu cel·lular no presentava la confluència necessària per començar la diferenciació, el medi es canviava per nou Medi E8.

3.1.2. Diferenciació de iPSCs a HSCs (iPSC-HSCs)

Quan les iPSCs van adquirir una confluència del 70% es va començar el protocol de diferenciació substituint el Medi E8 pel medi de diferenciació anomenat com *Liver Differentiation Medium* (LdM) i amb els factors de creixement específics de cada dia. El

medi LdM estava compost de 57% *DMEM low glucose* (Thermo Fisher Scientific), 40% MCDB (Sigma-Aldrich), 1% *Penicillin-streptomycin Mixture (P/S)* (LONZA), 10^{-4} M *L-ascorbic Acid* (Sigma-Aldrich), 0.25x *Insulin-Transferrin-Selenium (100X)* (ITS-G) (Invitrogen), 0.25x *Linoleic Acid-Albumin from Bovine Serum Albumin (LA-BSA)* (Sigma-Aldrich), 50 μ M *2-Mercaptoethanol* (Invitrogen) i 2.5 μ M *Dexamethasone* (Sigma). D'altra banda els factors de creixements utilitzats van ser el *Bone Morphogenic Protein 4* (BMP4) (R&D Systems) a una concentració final de 20 μ g/mL, *Fibroblast Growth Factor 1 i 3* (FGF1 i FGF3) (R&D Systems) a 20 μ g/mL, Retinol (Sigma- Aldrich) a 5 μ M i Àcid Palmític (Sigma- Aldrich) a 100 μ M.

Per portar a terme la diferenciació de iPSCs a HSCs es va seguir el protocol mostrat en la Figura 1A de l'apartat de resultats on s'indica els factors de creixements que s'han d'afegir cada dia. A més, la Taula 2 mostra de manera detallada els canvis de medi que s'han de realitzar el dia 0, 2, 4, 6, 8, 10 i 12 del protocol així com els possibles anàlisis a realitzar per la caracterització de la diferenciació.

Taula 2. Esquema del protocol de diferenciació de iPSCs a HSCs indicant els canvis de medis i els anàlisis requerits al llarg dels 12 dies de protocol.

Dia	Tractament	Anàlisis
0	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL de BMP4 (stock de 10mg/mL)	Recollir un pou per expressió gènica, dos per l'anàlisi de PDGFRβ mitjançant FACS i un pou per Vitamina A
2	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL de BMP4 (stock de 10mg/mL)	N/A
4	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL de BMP4 (stock de 10mg/mL) + 2µL/mL de FGF1 (stock de 10mg/mL) + 2µL/mL de FGF3 (stock de 10mg/mL)	Recollir un pou per expressió gènica
6	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL de FGF1 (stock de 10mg/mL) + 2µL/mL de FGF3 (stock de 10mg/mL) + 1µL/mL Retinol (stock de 1M) + 1µL/mL Àcid Palmític (stock de 0.1M)	N/A
8	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 1µL/mL Retinol (stock de 1M) + 1µL/mL Àcid Palmític (stock de 0.1M)	Recollir un pou per expressió gènica, dos per l'anàlisi de PDGFRβ mitjançant FACS i un pou per Vitamina A
10	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 1µL/mL Retinol (stock de 1M) + 1µL/mL Àcid Palmític (stock de 0.1M)	Recollir un pou per expressió gènica
12	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 1µL/mL Retinol (stock de 1M) + 1µL/mL Àcid Palmític (stock de 0.1M)	Recollir un pou per expressió gènica, dos per l'anàlisi de PDGFRβ mitjançant FACS i un pou per Vitamina A

Al final de la diferenciació, les iPSC-HSCs es van expandir per realitzar estudis de modelatge *in vitro*, es van co-cultivar amb hepatòcits i es van criopreservar.

3.1.3. Expansió de les iPSC-HSCs

Per tal d'expandir les iPSC-HSCs, a dia 12 del protocol les cèl·lules es van incubar amb DPBS (-/-) durant 1 minut a temperatura ambient, i posteriorment amb *Trypsin-EDTA* 0.25% (Thermo Fisher Scientific) durant 1-2 minuts a 37°C. Les cèl·lules es van centrifugar 5 minuts a 300g i es van plaquejar a una densitat cel·lular de 73,000

cèl·lules/cm² en plaques de 12 pous tractades amb 2% de *Differentiated Matrigel*. En aquest cas les cèl·lules es van cultivar en Medi d'Expansió compost de *DMEM*, *high glucose*, *GlutaMAX™* (Thermo Fisher Scientific), 10% *Gibco™ Fetal Bovine Serum* (FBS) (Life Technologies) i 1% P/S. El següent dia, es va realitzar el canvi de medi i posteriorment cada 48 hores fins a adquirir la confluència del 70% necessària per realitzar els diferents assaigs *in vitro*.

3.1.4. Congelació i descongelació de les iPSC-HSCs

A part de poder expandir les HSCs derivades de iPSCs, es poden congelar per futurs estudis *in vitro*. Per la criopreservació, les cèl·lules de dia 12 es van recol·lectar seguint els passos descrits a la secció 3.1.3, però en aquest cas, el pellet es va resuspendre en Medi de Congelació compost de 80% de FBS i 20% de *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) (Sigma). En cada vial es va afegir 1 milió de cèl·lules per cada mil·lilitre de medi de congelació, i es va dipositar a tancs de nitrogen líquid per un emmagatzematge a llarg termini.

Per descongelar les cèl·lules, el vial es va introduir al bany d'aigua a 37°C durant 1-2 minuts i les cèl·lules es van centrifugar 5 minuts a 300g per extreure el DMSO. Posteriorment, es va plaquejar una densitat cel·lular de 145,000 cèl·lules/cm² en una placa de 12 pous recoberta de 2% de *Differentiated Matrigel* en Medi d'Expansió. Normalment, s'utilitza 1 vial per plaquejar 2 pous d'una placa de 12. El següent dia, es va renovar el medi i subseqüentment cada dos dies fins a arribar a la confluència del 70% on les cèl·lules es van utilitzar per a diferents assaigs *in vitro*.

3.1.5. Estimulació de les iPSC-HSCs

Les iPSC-HSCs obtingudes a dia 12 de la diferenciació, les cèl·lules de fase 1 i les cèl·lules descongelades es van estimular amb diferents insults fibrogènics i inflamatoris per tal d'avaluar la capacitat de resposta envers un dany. A més, les iPSC-HSCs de fase 1 es van tractar amb diferents compostos anti-fibrogènics per determinar el seu potencial com a font cel·lular pel cribratge de fàrmacs.

Per tal de dur a terme les estimulacions, quan el cultiu va adquirir una confluència del 70%, les cèl·lules es van incubar durant 24 hores amb el Medi 1% FBS basat en *DMEM Glutamax*, 1% FBS i 1% P/S.

3.1.5.1. Modelatge de la fibrosi hepàtica a partir de les iPSC-HSCs

Les diferents fonts de iPSC-HSCs es van cultivar amb 5ng/mL de *TGF-beta 1 human recombinant* (TGF β) (Peprotech) durant 24 hores i 7 dies, per tal de modelar *in vitro* la fibrosi hepàtica aguda i crònica, respectivament. En el cas de l'estimulació crònica, el medi es va renovar cada 48 hores mantenint l'estímul. Posteriorment, les mostres es van recollir per l'anàlisi d'expressió gènica de marcadors d'activació de les HSCs.

3.1.5.2. Modelatge de la inflamació a partir de les iPSC-HSCs

Per l'estudi de la resposta inflamatòria de les cèl·lules diferenciades, les iPSC-HSCs de fase 1 i descongelades es van incubar amb 100ng/mL de *Lipopolysaccharide* (LPS) (Sigma) durant 24 hores i posteriorment, es van recollir el RNA de les cèl·lules per avaluar l'expressió gènica de marcadors pro-inflamatoris mitjançant RT-qPCR.

A més, les iPSC-HSCs a fase 1 es van tractar amb el sobrenedant de les cèl·lules Kupffer aïllades de pacients "controls" i cirròtics durant 24 hores, i posteriorment es va avaluar l'expressió gènica de marcadors pro-inflamatoris i fibrogènics.

3.1.5.3. Cribratge de compostos anti-fibrogènics en les iPSC-HSCs

Les iPSC-HSCs de fase 1 es van exposar a diferents compostos anti-fibrogènics durant 24 hores per determinar el potencial de les cèl·lules diferenciades pel cribratge de fàrmacs en desenvolupament. Les cèl·lules es van tractar amb 200 μ M d'Elafibranor, un agonista de PPAR α/δ (MedChem Tronica) i 2 altres compostos descrits en la Taula 3, a tres concentracions diferents durant 24 hores. Posteriorment, es van recollir les mostres i es va avaluar l'expressió gènica dels principals marcadors fibrogènics mitjançant RT-qPCR.

Taula 3. Llistat dels compostos anti-fibrogènics amb la descripció de la seva diana i les concentracions utilitzades per l'estimulació en les iPSC-HSCs a fase 1.

Referència	Diana	Concentracions
GS-834356	ACCi	2,5nM, 5nM and 10nM
GS-836644	GLS1i	6.5nM, 13nM and 26nM

3.2. Protocol de diferenciació de iPSCs a hepatòcits (iPSC-Hep)

La nova línia de iPSCs generada amb la sobreexpressió de la seqüència truncada del gen HSD17B13 (iPSC-HSD17B13) es va diferenciar a hepatòcits seguint el protocol publicat per Roelandt et al., (2010) (118) i Roelandt et al., (2013) (119). Aquest protocol es basa en l'estimulació de les iPSCs durant 20 dies amb diferents factors de creixement induint l'estadi d'endoderma definitiu, hepatoblast i per últim, la maduració de la població parenquimal.

3.2.1. Preparació de les iPSC-HSD17B13 per la diferenciació a Hepatòcits

Les iPSC-HSD17B13 es van incubar amb *Accutase* (StemCell Technologies) a 37°C durant 2 minuts, les colònies cel·lulars es van disgregar amb Medi E8 i es van centrifugar 300g durant 5 minuts. Posteriorment, es va plaquejar una densitat cel·lular de 300,000 cells/cm² en plaques de 24 pous prèviament tractades amb un recobriment del 2% de *Differentiated Matrigel* i cultivades en Medi *mTeSR* i 1:100 de *Revita Cell*. El següent dia, es va renovar el medi per fresc *mTeSR* i sense *Revita Cell* fins que el cultiu cel·lular va adquirir una confluència del 80%, la confluència necessària per començar la diferenciació a hepatòcits.

3.2.2. Diferenciació de iPSC-HSD17B13 a Hepatòcits

Quan les iPSCs van adquirir la confluència necessària, el medi de cultiu es va substituir per LdM, descrit en l'apartat 3.1.2, juntament amb els factors de creixement i citocines necessàries a dia 0 del protocol. Al llarg dels dies de diferenciació es van afegir diferents factors de creixement; 100ng/mL Activin A (Prepotech), 50ng/mL Wnt3A (Prepotech), 50ng/mL BMP4 (R&D Systems), 20ng/mL FGF1 (R&D Systems) i 20ng/mL HGF juntament amb 6mL de DMSO per mL de LdM. A més, per induir la sobreexpressió del gen d'interès, es va afegir a partir de dia 4 fins al final del protocol, 5mg/mL de doxiciclina (Doxi) (PanReac AppliChem).

Per portar a terme la diferenciació de iPSCs a hepatòcits es va seguir el protocol mostrat en la Figura 34 de l'apartat de resultats on s'indica els factors de creixements que s'han d'afegir cada dia del protocol. A més, la Taula 4 indica de manera detallada, els canvis de medi que s'han de realitzar cada dos dies així com els possibles anàlisis a realitzar per la caracterització de la diferenciació.

Taula 4. Esquema del protocol de diferenciació de iPSCs a hepatòcits indicant els canvis de medis i els anàlisis requerits al llarg dels 20 dies de protocol.

Dia	Tractament	Anàlisi
0	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 5µL/mL Activin A (stock 20ng/mL) + 5µL/mL Wnt3A (stock 10ng/mL) + 6mL/mL DMSO	Recollir un pou per expressió gènica
2	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 5µL/mL Activin (stock 20ng/mL) + 6mL/mL DMSO	N/A
4	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 5µL/mL BMP4 (stock 10ng/mL) + 6mL/mL DMSO +/- 5µL/mL Doxiciclina (stock 1mg/mL)	N/A
6	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 5µL/mL BMP4 (stock 10ng/mL) + 6mL/mL DMSO +/- 5µL/mL Doxiciclina (stock 1mg/mL)	Recollir un pou per expressió gènica
8	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL FGF1 (stock 10ng/mL) + 6mL/mL DMSO +/- 5µL/mL Doxiciclina (stock 1mg/mL)	N/A
10	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL FGF1 (stock 10ng/mL) + 6mL/mL DMSO +/- 5µL/mL Doxiciclina (stock 1mg/mL)	N/A
12	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL HGF (stock 10ng/mL) + 20mL/mL DMSO +/- 5µL/mL Doxiciclina (stock 1mg/mL)	Recollir un pou per expressió gènica
14	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL HGF (stock 10ng/mL) + 20mL/mL DMSO +/- 5µL/mL Doxiciclina (stock 1mg/mL)	N/A
16	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL HGF (stock 10ng/mL) + 20mL/mL DMSO +/- 5µL/mL Doxiciclina (stock 1mg/mL)	N/A
18	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL HGF (stock 10ng/mL) + 20mL/mL DMSO +/- 5µL/mL Doxiciclina (stock 1mg/mL)	N/A
20	Rentat amb DPBS (-/-) + LdM + 2µL/mL HGF (stock 10ng/mL) + 20mL/mL DMSO +/- 5µL/mL Doxiciclina (stock 1mg/mL)	Recollir un pou per expressió gènica

Al final de la diferenciació, els iPSC-Hep es van utilitzar per modelar *in vitro* la malaltia de fetge gras no alcohòlica.

3.2.3. Estimulació dels iPSC-Hep amb medi lipotòxic

La població final obtinguda de la diferenciació de les iPSC-HSD17B13 es va estimular amb un medi lipotòxic per tal de modelar *in vitro* la malaltia de fetge gras no alcohòlica. 24 hores abans de l'estimulació, els hepatòcits derivats es van cultivar amb el Medi amb 1% de FBS. Posteriorment, el cultiu es va tractar amb la combinació de Àcid Palmític (Sigma- Aldrich) i Àcid Oleic (Sigma-Aldrich) en proporció 2:1 diluït en PBS amb *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Sigma-Aldrich) al 5% durant 72 hores. Les cèl·lules es van recollir per avaluar per RT-qPCR l'expressió de marcadors inflamatoris i de dany hepatocitari.

4. AÏLLAMENT DE CÈL·LULES HEPÀTIQUES PRIMÀRIES

4.1. Aïllament de HSCs primàries

En aquest projecte es van aïllar HSCs primàries (pHSCs) de reseccions hepàtiques no-tumorals d'hepatectomies per càncer de còlon obtingudes pel departament d'hepatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

El teixit hepàtic es va processar mecànicament i es va digerir mitjançant dues solucions enzimàtiques subseqüents: la solució 1 composta de *Gey's Balanced Salt Solution* (GBSS) (Sigma) amb 3.15 mg/mL de *Pronase* (Roche), 0.38 mg/mL *Collagenase A* (Roche), 0.01 mg/mL *DNase 1* (Roche) i 1% P/S, i la solució 2 composta de GBSS amb 0.6mg/mL *Pronase*, 0.38 mg/mL *Collagenase A*, 0.01 mg/mL *DNase 1* i 1% P/S. El teixit hepàtic es va incubar amb cada solució de digestió durant 30 minuts a 37°C. Posteriorment, les diferents poblacions hepàtiques es van separar mitjançant un gradient de densitat del 9% *Nycodenz* (Sigma). La fracció de cèl·lules en suspensió es va seleccionar i es va plaquejar amb Medi d'Expansió per obtenir les pHSCs. El medi es va renovar cada dos dies fins a obtenir la confluència necessària per poder-les expandir. Les HSCs primàries es van utilitzar per l'estudi d'expressió gènica en la comparativa amb les HSCs derivades, i concretament, es van aïllar de quatre pacients diferents. En aquest estudi es van utilitzar les cèl·lules cultivades de fase 1 fins a 3.

4.2. Aïllament de macròfags hepàtics primaris

El teixit hepàtic no-tumoral i teixit cirròtic es van digerir mecànicament, i després mitjançant la incubació de la solució enzimàtica composta de GBSS, 0.2% *Pronase* i 2.5µg/mL *DNase 1*. Al cap de 1 hora de digestió a 37°C, es va realitzar la lisi d'eritròcits mitjançant la incubació del buffer *PharmaLyse* al 1X durant 5 minuts a 37°C. Posteriorment, les poblacions cel·lulars es van separar pel gradient de densitat de *Nycodenz* al 16% i es va recollir la banda de la interfase on els macròfags hepàtics es troben presents. Els macròfags es van plaquejar en *RPMI Glutamax* (Thermo Fisher Scientific), 10% FBS inactivat i 1% P/S, i l'endemà es va recollir el sobrenedant per afegir-lo en el cultiu de les HSCs diferenciades.

5. CO-CULTIU DE LES iPSC-HSCS AMB HEPATÒCITS

Les iPSC-HSCs es van co-cultivar amb diferents fonts d'hepatòcits per determinar el potencial d'aquestes cèl·lules en models *in vitro* multicel·lulars complexos. Les iPSC-HSCs de dia 12 es van dissociar seguint el protocol descrit a l'apartat 3.1.3 de material i mètodes. En el cas dels hepatòcits, el procés de congelació era específic de cada font cel·lular; les HepaRG® diferenciades es van descongelar a 37°C afegint el medi *HepaRG Thawing Medium Supplement* (Biopredic), la línia de HUH7 es va disgregar amb *Trypsin-EDTA 0.25%* i centrifugar a 300g durant 5 minuts, els hepatòcits primaris es van descongelar seguint el manuscrit de la companyia de Thermo Fisher Scientific i els hepatòcits derivats de iPSCs es van dissociar seguint el protocol descrit per les iPSC-HSCs (apartat 3.1.3 de material i mètodes).

Ambdues poblacions cel·lulars es van cultivar en diferents proporcions (2 iPSC-HSCs: 1 Hepatòcits i 2 Hepatòcits: 1 iPSC-HSCs) i en medi comercial de *HepaRG Serum-Free Induction Medium Supplement* (HFM) (Biopredic) i LdM. Es van plaquejar 2,000 i 4,000 cèl·lules a cada pou de la placa de 96 amb superfície no adherent (Greiner) i en cada gota de l'estratègia de *Hanging drop*. Les cèl·lules es van cultivar a 37°C amb agitador orbital o sense (80rpm) i al cap de 24 hores, la majoria de cèl·lules es van agrupar formant esferoides hepàtics. El medi es va canviar cada 48 hores.

6. ANÀLISI D'EXPRESSION GÈNICA

Les mostres de RNA de cèl·lules en cultiu es van obtenir mitjançant *RNAeasy Micro Kit* (Qiagen). El RNA es va retro-transcriure mitjançant el *High Capacity Complementary DNA Reverse-Transcription Kit* (Applied Biosystems) i posteriorment, l'expressió gènica es va avaluar mitjançant PCR quantitativa en temps real (RT-qPCR) en el *ABI 7900HT Real Time Cycler* (Applied Biosystems) utilitzant *SYBER Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) o *TaqMan FAST Universal PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific). L'expressió gènica de cada gen es va normalitzar amb el gen endogen GAPDH, i es va representar en $\Delta\Delta Ct$ o $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Els primers es van obtenir mitjançant *Integrated DNA Technologies* (IDT) o *TaqMan Probe* (Thermo Fisher Scientific). El llistat de primers es mostra en la Taula 5, 6 i 7.

Taula 5. Llistat de gens característics d'hepatòcits i els primers de la seqüència truncada de HSD17B13 (HSD17B13 T.S).

Gens	Forward	Reverse	Referència
ALB	TGGCACAATGAAGTGGGTAA	CTGAGCAAAGGCAATCAACA	IDT
CYP3a4	CCTCCCTGAAAGATTCAGC	TGAAGAAGTCCTCCTAAGCT	IDT
HNF4a	TGTACTCCTGCAGATTTAGCC	CTGTCCTCATAGCTTGACCT	IDT
ASGR1	-	-	Hs.PT.56a.203 92854.g (IDT)
SERPINA1	-	-	Hs.PT.58.201 3281 (IDT)
HSD17B13 T.S	TTCACCAAAAATCCAAGCAC	GCTGCTAACCTTCTGTAGTC	IDT

Taula 6. Llistat de gens característics de HSCs i del gen endogen GAPDH.

Gens	Forward	Reverse	Referència
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	IDT
GAPDH	-	-	Hs99999905_m1 (Thermo Fisher Scientific)
OCT4	GATGGCGTACTGTGGGCC	TGGGACTCCTCCGGGTTTTG	IDT
NANOG	-	-	Hs.PT.58.2148084 9 (IDT)
CD73	GGCACTATCTGGTTCACCGTGTA	AGGGCGTTCATGAAGTGCGCCA	IDT
P75NTR	-	-	Hs00609976_m1 (Thermo Fisher Scientific)
KDR	ACAACCAGACGGACAGTGGT	AGCCTTCAGATGCCACAGAC	IDT
NCAM	GATGGCGTACTGTGGGCC	GGTGTGGAAATGCTCTGGT	IDT
RELN	-	-	Hs01022646_m1 (Thermo Fisher Scientific)
PCDH7	-	-	Hs00941345_m1 (Thermo Fisher Scientific)
PDGFR β	-	-	Hs00182163_m1 (Thermo Fisher Scientific)
DES	AGGAACAGCAGGTCCAGGTA	AGAGCATCAATCTCGCAGGT	IDT
ALCAM	GATGGCGTACTGTGGGCC	GTTTAGATGGTTGCTTGAACAC	IDT
PDGFR α	AACCCTGCTGATGAAAGCAC	TCCTTTCTAGCATGGGGACA	IDT
LRAT	-	-	Hs00428109_m1 (Thermo Fisher Scientific)
ACTA2	-	-	Hs00909449_m1 (Thermo Fisher Scientific)
COL1 α 1	-	-	Hs00164004_m1 (Thermo Fisher Scientific)
RSPO3			Hs.PT.58.2082266 (IDT)
VIPR1			Hs.PT.58.2227902 0 (IDT)
DCN			Hs.PT.58.4030805 0 (IDT)
LHX2			Hs.PT.58.1932338 6 (IDT)
GFAP	GGATGGAGAGGTCATTAAGGA	GGTGAGTTTCTTGTTAGTTGGA	IDT
PPAR α	GATGGCGTACTGTGGG	CAACAGACAAATCACCATTCTG	IDT
SMAD7	-	-	HS00998193_m1 (Thermo Fisher Scientific)
LOX	-	-	Hs00178696_m1 (Thermo Fisher Scientific)

Taula 7. Llistat de gens relacionats amb inflamació hepàtica.

Gens	Forward	Reverse	Referència
MCP-1	-	-	Hs00234140_m1 (Thermo Fisher Scientific)
CCL20	-	-	Hs00355476_m1 (Thermo Fisher Scientific)
IL-6	-	-	Hs00985639_m1 (Thermo Fisher Scientific)
BAX	-	-	Hs00180269_m1 (Thermo Fisher Scientific)
CXCL8	-	-	HS00174103_m1 (Thermo Fisher Scientific)
TNF-a	-	-	HS00174128_m1 (Thermo Fisher Scientific)

7. TINCIÓ PER IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Les HSCs primàries i iPSC-HSCs a dia 12, pase 1 i pHSCs es van fixar amb un 4% de paraformaldehid (PFA) durant 15 minuts a temperatura ambient, i posteriorment, es van incubar amb els anticossos primaris a 4°C durant 12 hores. L'anticòs secundari es van afegir a una dilució de 1:500 durant 30 minuts, i per últim, els nuclis cel·lulars es van tenyir amb 1:100 *Hoechst 33342* (Thermo Fisher Scientific). Els anticossos primaris i secundaris juntament amb la dilució específica es mostren en la Taula 8.

Taula 8. Llistat d'anticossos primaris i secundaris utilitzats per l'assaig d'immunofluorescència en les iPSC-HSCs de dia 12, pase 1 i les pHSCs.

Anticossos	Dilució	Referència
PDGFR α	1:50	Abcam
PCDH7	1:100	Abcam
Vimentin	1:100	Leica Biosystems
RELN	1:100	Thermo Fisher Scientific
RSPO3	1:100	Thermo Fisher Scientific
VIPR1	1:100	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific

8. CITOMETRIA DE FLUX (FACS)

Per citometria de flux (FACS) es va avaluar per una banda, l'expressió de PDGFR β i Vitamina A en les HSCs diferenciades i en punts intermedis del protocol de diferenciació (Dia 0, 8 i 12). Per altra banda, es va analitzar l'expressió de GFP en les iPSC-HSD17B13 post-electroporació.

Per l'anàlisi de PDGFR β , les cèl·lules es van dissociar seguint el protocol descrit en l'apartat 3.1.3 de material i mètodes, i el pellet cel·lular es va resuspendre en 3mL de *DMEM Glutamax* fred i es va repartir 1mL en cada tub per dur a terme l'anàlisi d'autofluorescència, isotip i PDGFR β . Els tubs es va centrifugar a 300g durant 5 minuts a 4°C, es va resuspendre en 100 μ L de *FACS Buffer* compost de 2% FBS, 1% *Sodium Azide* (Sigma) i DPBS (-/-), juntament amb 1 μ L de cada anticòs, i es van incubar durant 30 minuts a temperatura ambient. Al finalitzar la incubació, les cèl·lules es van rentar amb DPBS (-/-) i posteriorment es va afegir 200 μ L de *FACS Buffer* per realitzar l'anàlisi de FACS. El llistat d'anticossos utilitzats es mostren en la Taula 9.

En el cas d'analitzar el percentatge de cèl·lules positives per Vitamina A, el processament va ser al mateix que per l'anàlisi de PDGFR β , però després de la centrifugació, el pellet es va resuspendre directament en 200 μ L de *FACS Buffer* i es avaluar l'autofluorescència exercida pel contingut de Vitamina A a la longitud d'ona de 350-450/50-A.

Per l'anàlisi d'expressió de GFP, les iPSCs nucleofectades es va disgregar seguint l'apartat 3.2.1 de materials i mètodes. Després de la centrifugació el pellet es va resuspendre en *FACS Buffer* i es va avaluar l'expressió de GFP. En aquest estudi, a més, es va analitzar l'expressió de GFP en iPSCs Sigma-FRT i Sigma iPSCs com a control positiu i negatiu.

Taula 9. Llistat d'anticossos utilitzats per l'anàlisi de l'expressió de PDGFR β a dia 0, 8 i 12 del protocol de diferenciació de iPSCs a HSCs.

Anticossos	Dilució	Referència
PE mouse anti-human CD140b clone 28D4 (PDGFR β)	1:100	BD PharMingen
PE mouse IgG2a, κ isotype control clone MOPC-173 (Isotype PE)	1:100	Biologend

9. SEQÜENCIACIÓ DE RNA DE SINGLE- CELL DE LES IPSC-HSCS

Per l'estudi de seqüenciació de RNA de *single-cell* (scRNA-seq) de la diferenciació de iPSCs a HSCs, es van seleccionar cèl·lules de dia 0, 4 i dia 12. Les cèl·lules es van disgregar seguint el protocol descrit a l'apartat 3.1.3 de materials i mètodes, i el pellet es va resuspendre amb 100µL de *FACS Buffer* juntament amb una dilució de 1:1000 de l'anticòs de viabilitat *Live/Dead* (Thermo Fisher Scientific). Després de la incubació de 20 minuts a 4°C, les cèl·lules es van centrifugar a 300g durant 5 minuts i es van resuspendre en PBS amb BSA al 0.05%. Les cèl·lules vives es van sortejar obtenint aproximadament 100,000 cèl·lules per cada punt de la diferenciació, després es van processar per l'anàlisi de *single-cell*.

Les mostres es van filtrar dues vegades amb filtres de 40µm (pluriSelect) per eliminar els agregats, i la concentració i viabilitat cel·lular es va quantificar amb *TC20™ Automated Cell Counter* (Bio-Rad Laboratories, S.A). Les cèl·lules es van processar amb *Gel Bead-in-Emulsion* per obtenir 6,000 cèl·lules totals per mostra. Les llibreries de seqüenciació de cDNA es van preparar utilitzant el *Chromium Next GEM Single Cell 3' v3.1 kit* (10X Genomics), i després el cDNA es va amplificar 12 cicles i la seva quantificació es va realitzar en un chip de *Agilent Bioanalyzer High Sensitivity chip* (Agilent Technologies). Per la preparació de les llibreries es va utilitzar 100µg de cDNA, i les llibreries es van indexar per PCR utilitzant *PN-220103 Chromium v7 Sample Index Plat*. La distribució de la mida i la concentració de les llibreries de cDNA 3' es van verificar amb el chip *Agilent Bioanalyzer High Sensitivity* (Agilent Technologies). Per últim es va realitzar la seqüenciació mitjançant *Illumina NovaSeq 6000* per obtenir aproximadament 40,000 lectures per cèl·lula.

Les dades es van processar mitjançant *Cell Ranger 5.0.0 de 10X Genomics* i es va alinear amb *GRCh38 Ensembl 98*, i les dades es van filtrar eliminant les cèl·lules que expressaven <200 gens o >20% de contingut mitocondrial (Figura 1 de l'Annex 2). Les dades es van importar a *Seurat 4.0.3* i van ser normalitzades per la integració de dades que es va fer amb els paràmetres *NormalizeData* i *ScaleData*. Per últim, la visualització es va realitzar amb *Uniform manifold approximation and projection* (UMAP) a partir de *Rstudio*.

La signatura gènica de cèl·lules pluripotents es va extreure de la base de dades de PanglaoDB publicada per Franzén et al., (2019) (231), i les signatures gèniques de les cèl·lules endotelials, mesotelials, mesenquimals i de HSCs, així com de cèl·lules estrellades pancreàtiques i cèl·lules estromals d'altres òrgans es van extreure de la base de dades de DescartesDB publicada en l'article Cao et al., (2021) (232). Concretament, per les signatures gèniques associades a les diferents poblacions estromals extretes de DescartesDB (232) es va calcular l'*enrichment score* amb la funció *AddModuleScore* de Seurat.

10. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Els resultats es van expressar amb la mitjana aritmètica i la desviació estàndard de la mitjana. Els resultats es van realitzar en una N=2, 3 o 4 experiments independents i amb duplicats o triplicats tècnics. L'anàlisi estadístic de l'expressió gènica dels resultats es van realitzar mitjançant el test de la t Student (t-test) no aparellada, i els valors de pvalor < 0.05 es van considerar significatius. A més, la representació dels resultats es va realitzar mitjançant el programa *GraphPad Prism 5.0*.

RESULTATS



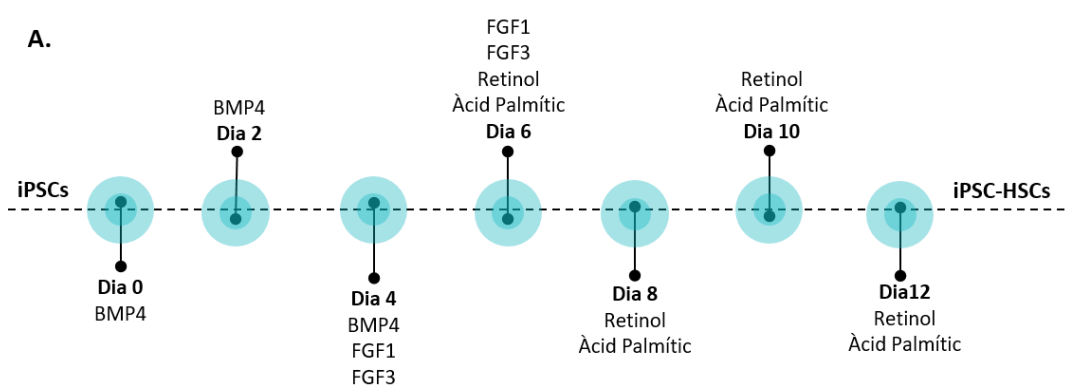
OBJECTIU 1: IMPLEMENTAR EL PROTOCOL DE DIFERENCIACIÓ DE iPSCS A CÈL·LULES ESTRELLADES HEPÀTIQUES I CARACTERITZAR LES CÈL·LULES OBTINGUDES

1. Implementació del protocol de diferenciació de iPSCs a HSCs

El primer objectiu d'aquesta tesi doctoral va ser la caracterització del protocol de diferenciació de iPSCs humanes a HSCs (iPSC-HSCs) per la seva utilització com a nova font cel·lular de HSCs pel modelatge *in vitro* de malalties hepàtiques i el cribratge de fàrmacs. Aquest protocol de diferenciació es basa en la subseqüent addició durant 12 dies, de factors de creixement i citocines importants pel desenvolupament embrionari i fetal del fetge, que ha estat publicat en Coll et al., (2018) (144) i Vallverdú et al., (2021) (145).

Quan les iPSCs adquirien una confluència del 70%, es va començar el protocol de diferenciació incubant les cèl·lules amb BMP4 durant 4 dies per la generació d'una població progenitora mesodèrmica. A dia 4 del protocol, es va afegir FGF1 i FGF3 juntament amb el BMP4, i a dia 6, es va eliminar el BMP4 per substituir-lo per un medicament en FGF1, FGF3, Retinol i Àcid Palmític per tal d'induir un fenotip mesenquimal i mesotelial. A dia 8, el cultiu cel·lular es va mantenir amb Retinol i Àcid Palmític fins al final de la diferenciació per induir la maduració i adquisició de les característiques de les HSCs humanes. En la Figura 1A es mostra l'esquema del protocol de diferenciació.

Al llarg de la diferenciació, el cultiu cel·lular va anar adquirint canvis morfològics passant de colònies pluripotents a un cultiu confluent, on les cèl·lules presentaven una morfologia arrodonida amb gotes lipídiques en el citoplasma a causa de l'emmagatzematge de Vitamina A (Figura 1B).



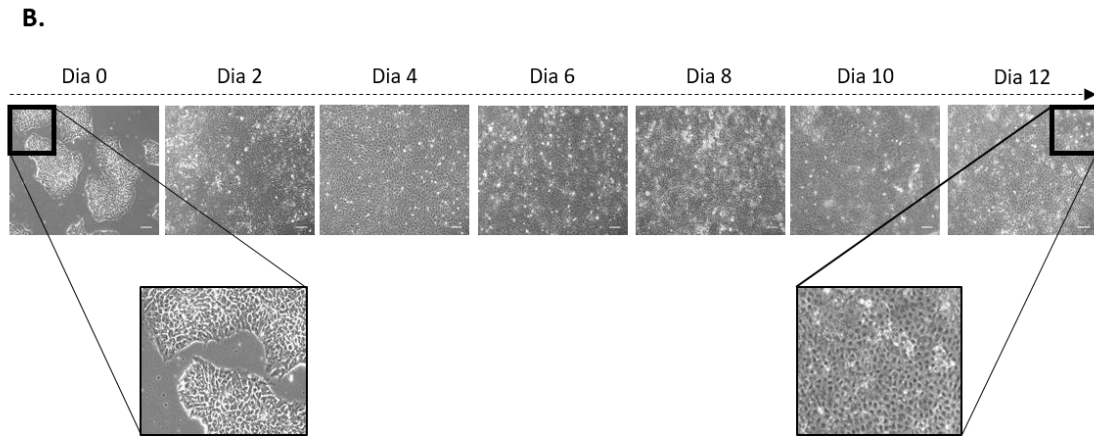


Figura 1. (A) Representació esquemàtica del protocol de diferenciació de iPSCs a HSCs indicant l'estimulació seqüencial de BMP4, FGF1, FGF3, Retinol i Àcid Palmític. (B) Imatges representatives de la morfologia i confluència cel·lular al llarg del protocol de diferenciació (Barra d'escala 100µm). Figura extreta de la publicació de Vallverdú et al., (2021) (145).

2. Caracterització cel·lular al llarg del protocol de diferenciació

Un cop definit el protocol, es va avaluar l'expressió gènica de marcadors relacionats amb el desenvolupament embrionari i marcadors característics de les HSCs, per tal de definir el fenotip cel·lular obtingut als diferents punts de la diferenciació.

Per començar, l'expressió dels marcadors de pluripotència com *OCT4* i *NANOG* disminuïa significativament al llarg del protocol de diferenciació indicant la pèrdua del fenotip de pluripotència (Figura 2A). D'altra banda, a dia 4 i 8 del protocol, les cèl·lules expressaven *KDR* i *CD73*, gens relacionats amb la inducció del llinatge mesodèrmic i l'obtenció de cèl·lules mesenquimals (233), (234). Aquests resultats anaven acompanyats de l'expressió, a partir de dia 4, de *P75NTR*, *ALCAM* i *DES*, gens descrits com essencials per la generació de cèl·lules mesotelials i submesotelials (108), (109), indicant l'obtenció d'aquest fenotip progenitor (Figura 2B). Per últim, l'expressió dels gens característics de HSCs augmentava progressivament al llarg de la diferenciació obtenint, en la majoria dels casos, la màxima expressió a dia 12 del protocol. La població cel·lular final mantenia l'expressió de *ALCAM* i *DES* (108), (109), presentava l'expressió de gens mesenquimals com *PDGFRβ* i *PDGFRα* (18), (235), i gens neuronals com *NCAM* i *P75NTR* (27). A més, a dia 12, les cèl·lules expressaven gens característics d'aquestes

cèl·lules no-parenquimals com *COL1α1*, *ACTA2*, *PCDH7*, *RELN*, *LRAT* i *DCN* (26), (30), (31) (Figura 2C).

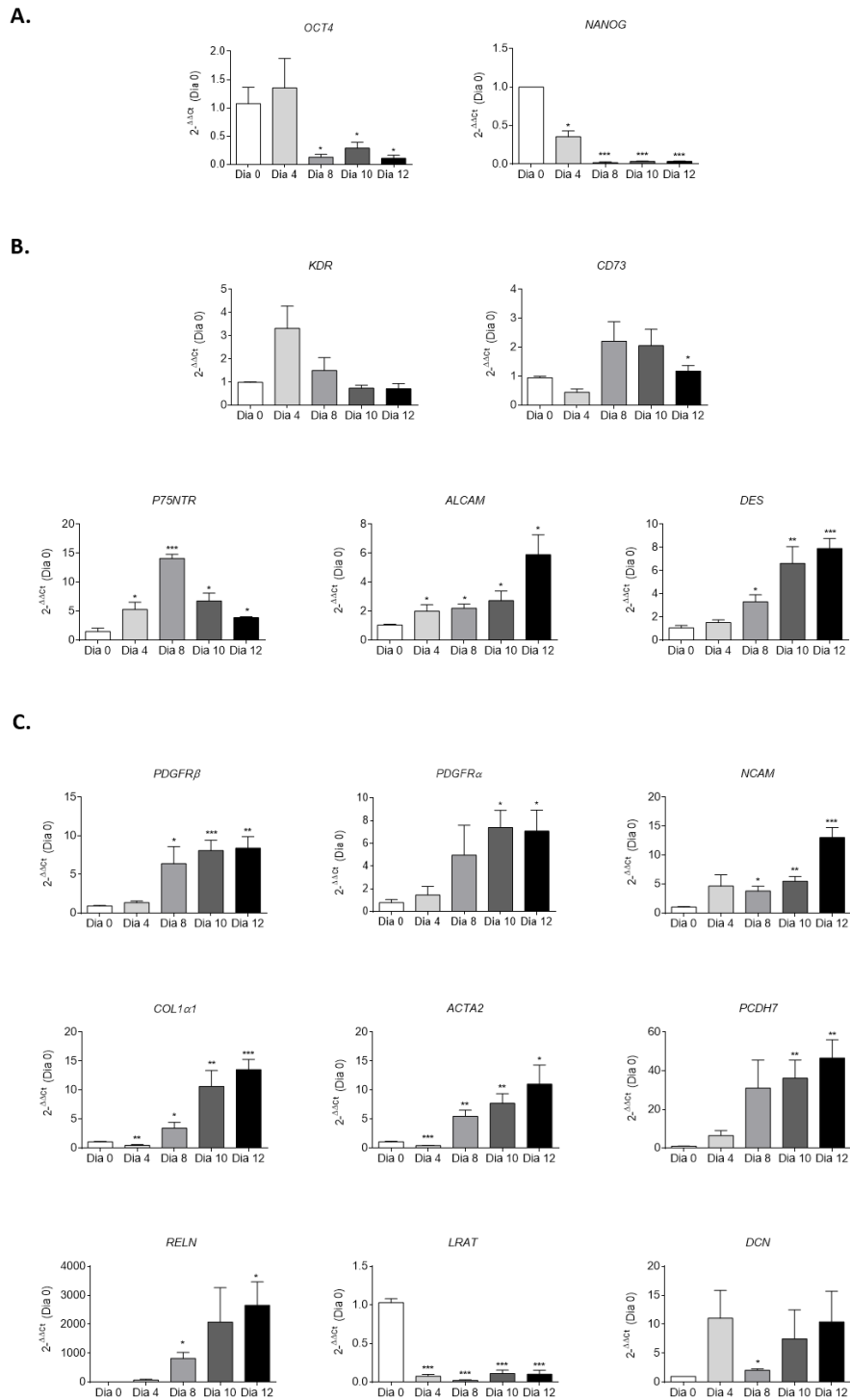
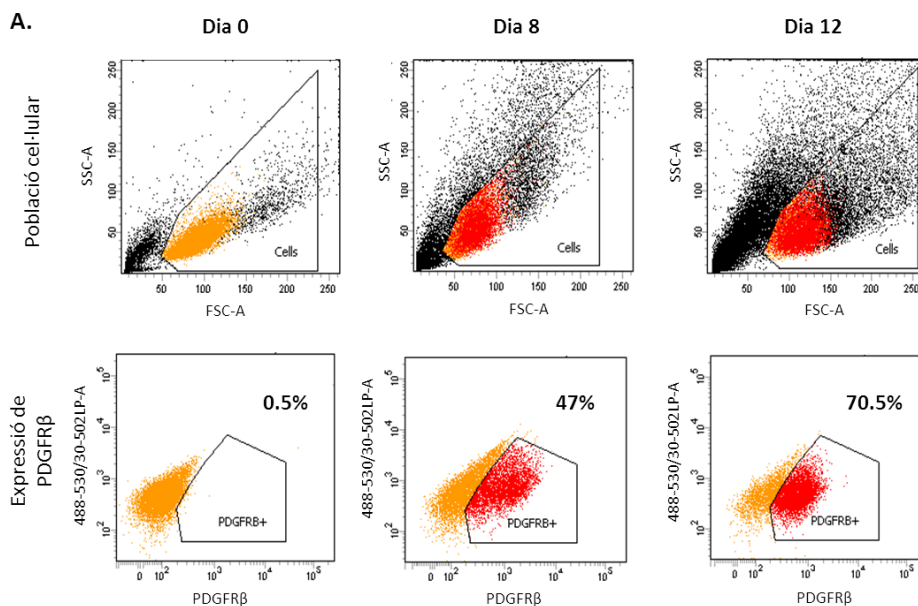


Figura 2. Expressió gènica de (A) marcadors de pluripotència (*OCT4* i *NANOG*), (B) marcadors mesenquimals i mesotelials (*KDR*, *CD73*, *P75NTR*, *ALCAM* i *DES*), i (C) marcadors de HSCs (*PDGFRβ*, *PDGFRα*, *NCAM*, *COL1α1*, *ACTA2*, *PCDH7*, *RELN*, *LRAT* i *DCN*) al llarg del protocol. Experiment realitzat en 3-5 diferenciacions independents. *p < 0.05 comparat amb dia 0 mitjançant t-test.

De manera paral·lela, es va avaluar per citometria de flux, el percentatge de cèl·lules positives per PDGFR β i Vitamina A. El PDGFR β s'ha descrit com un bon marcador de membrana de les HSCs (176), i l'acumulació de Vitamina A com a característica distintiva de les HSCs quiescents (72). Aquests anàlisis es van realitzar al llarg de la diferenciació per determinar el grau d'adquisició del fenotip de HSCs, i a més, monitoritzar l'eficiència de cada diferenciació i avaluar el rendiment del protocol descrit.

En la Figura 3A es mostra un diagrama representatiu de la població cel·lular total i del percentatge de cèl·lules positives per PDGFR β a dia 0, 8 i 12. Al principi del protocol, les cèl·lules no expressaven aquest marcador, mentre que a mesura que progressava la diferenciació, el nombre de cèl·lules positives per PDGFR β augmentava detectant un 47% a dia 8 i un 70.5% a dia 12. Normalment a dia 12, el percentatge de cèl·lules positives estava al voltant del 60% (un ranc d'entre 50-70%) i es va observar que aquelles diferenciacions amb un percentatge menor al 40% presentaven una menor expressió de marcadors de la població no-parenquimal.

D'altra banda, es va avaluar el percentatge de cèl·lules positives per l'emmagatzematge de Vitamina A detectada per autofluorescència. L'histograma representat en la Figura 3B indicava la presència d'un 85% de cèl·lules que contenen Vitamina A a dia 8 del protocol, i aquest percentatge incrementava arribant quasi al 100% a dia 12. Aquests resultats suggerien l'obtenció d'una població final amb característiques típiques de HSCs quiescents.



B.

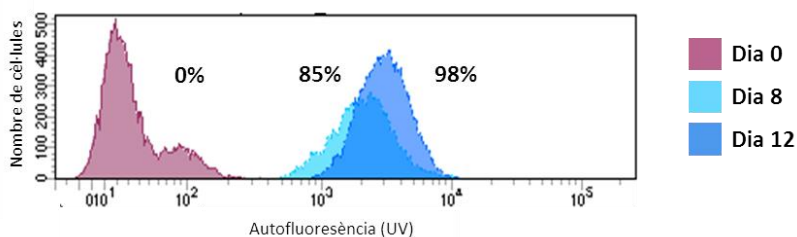


Figura 3. (A) Diagrama representatiu de la població total i del percentatge de cèl·lules positives per PDGFR β obtingudes a dia 0, 8 i 12 de la diferenciació analitzades per citometria de flux. (B) Histograma representatiu de l'anàlisi per citometria de flux del percentatge de cèl·lules positives per l'acumulació de Vitamina A a dia 0, 8 i 12 del protocol. Figura extreta de la publicació de Vallverdú et al., (2021) (145).

A part, es va voler determinar la robustesa del protocol de diferenciació. Per aquest motiu, es va avaluar l'expressió gènica de marcadors de HSCs i el percentatge de cèl·lules positives pel marcador de PDGFR β en diferenciacions de iPSCs a HSCs realitzades amb la línia comercial de iPSCs (Sigma iPSCs).

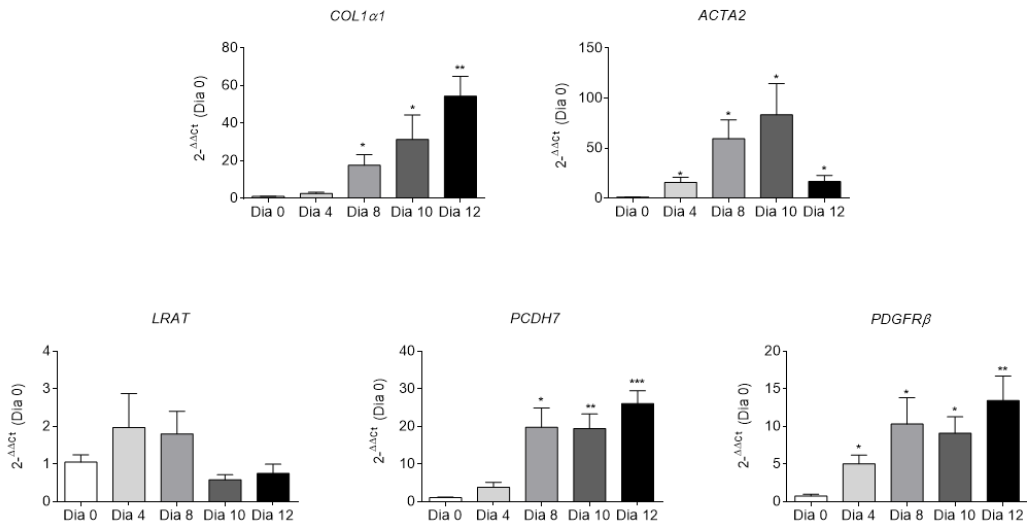
Com es pot observar en la Figura 4A, l'expressió de *COL1 α 1*, *ACTA2*, *LRAT*, *PCDH7* i *PDGFR β* augmentava a mesura que progressava la diferenciació, sent dia 12 el punt màxim d'expressió. A dia 12, les cèl·lules presentaven una major expressió de *COL1 α 1* i una menor expressió de *PCDH7* que les HSCs obtingudes de la línia de iPSCs BJ1 (Figura 2C), però, tot i això, la tendència d'expressió dels marcadors de HSCs era la mateixa.

D'altra banda, l'anàlisi del percentatge de cèl·lules positives per PDGFR β per citometria de flux mostrava que un 59% de cèl·lules de la població final eren positives per aquest marcador (Figura 4B). Aquest percentatge també s'obtenia en diferenciacions amb l'altra línia de iPSCs, fet que suggereix que aquest protocol de diferenciació es podria aplicar a diferents línies de iPSCs obtenint a punt final, cèl·lules amb característiques de HSCs.

En l'article publicat per Coll et al., (2018) es va demostrar que les HSCs no només es podien obtenir de diferents línies de iPSCs, sinó que també es podien generar de cèl·lules mare embrionàries humanes (144). A més, en els últims anys, diferents laboratoris han utilitzat aquest protocol de diferenciació per generar models *in vitro* complexos i han

obtingut resultats similars als nostres, demostrant l'alta robustesa d'aquest protocol (151), (152), (153).

A.



B.

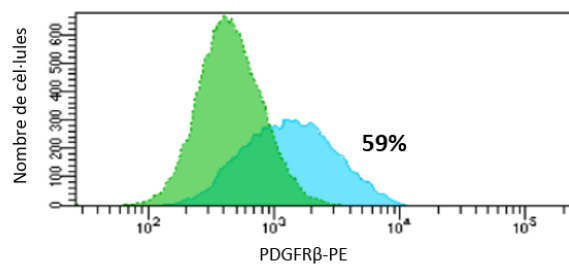


Figura 4. (A) Expressió gènica de *COL1α1*, *ACTA2*, *LRAT*, *PCDH7* i *PDGFRβ* a diferents dies del protocol de diferenciació a partir de la línia de iPSCs Sigma. Experiment realitzat en 4 diferenciacions independents. *p < 0.05 comparat amb dia 0 mitjançant t-test. (B) Diagrama representatiu del percentatge de cèl·lules positives per PDGFRβ de les HSCs obtingudes a partir de les iPSCs Sigma analitzades per citometria de flux.

3. Descripció de les poblacions obtingudes al llarg de la diferenciació mitjançant scRNA-seq

Per caracteritzar de manera més detallada el protocol de diferenciació, es va realitzar la seqüenciació de RNA de *single-cell* (scRNA-seq) de cèl·lules de dia 0, 4 i 12. A més, es van analitzar dues mostres a punt final de dues diferenciacions independents (12a i 12b) per determinar la variabilitat entre diferenciacions i poder avaluar l'heterogeneïtat de

les HSCs obtingudes a partir de les iPSCs. L'anàlisi de scRNA-seq ens permetria determinar les poblacions cel·lulars obtingudes al final i al llarg de la diferenciació.

Les diferenciacions utilitzades per l'anàlisi de scRNA-seq es van monitoritzar mitjançant l'expressió de PDGFR β , obtenint en ambdós casos, un percentatge del 75% de cèl·lules positives per aquest marcador al final de la diferenciació (Figura 5).

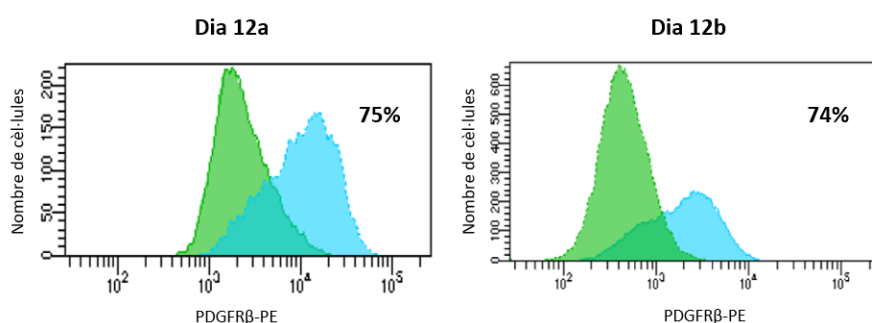


Figura 5. Histograma del percentatge de cèl·lules positives per PDGFR β a dia 12 de les dues diferenciacions utilitzades per l'anàlisi de scRNA-seq.

Per la seqüenciació de RNA de *single-cell*, es van obtenir cèl·lules de dia 0, 4, 12a i 12b, i es van processar en el *Gel Bead-in-Emulsion* obtenint 6,000 cèl·lules per mostra. Les cèl·lules lisades es van retrotranscriure amb els *Barcodes* (codi de barres) i es van amplificar obtenint la llibreria, que posteriorment es va seqüenciar mitjançant *Illumina NovaSeq 6000*. Els resultats de la seqüenciació es va anotar utilitzant GRCh38 Ensembl 98 i es van filtrar eliminant les cèl·lules amb <200 gens o >20% de contingut mitocondrial (Figura 1 de l'Annex 2). Els resultats es van visualitzar amb *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) per mostrar la distribució cel·lular. Un esquema representatiu del procés de scRNA-seq es mostra en la Figura 6.

En aquest experiment, es van seqüenciar 12,302 cèl·lules de dia 0 d'una diferenciació (*median number of unique gene (nGene) per cell* = 2,380 i *median unique molecular identifiers (UMI) counts per cell* = 7,079), 5,815 cèl·lules de dia 4 d'una diferenciació (*median nGene* = 3,591 i *median UMI* = 13,890), i 3,719 cèl·lules de dia 12 d'una diferenciació anomenada com 12a (*median nGene* = 4,063 i *median UMI* = 16,862) i

5,601 cèl·lules de dia 12 d'una altra diferenciació anomenada com 12b (*median nGene* = 2,964 i *median UMI* = 9,509).

Aquests resultats són preliminars i seran complementats amb l'anàlisi de mostres de dia 8 i 12 del protocol per tal d'extreure conclusions més robustes.

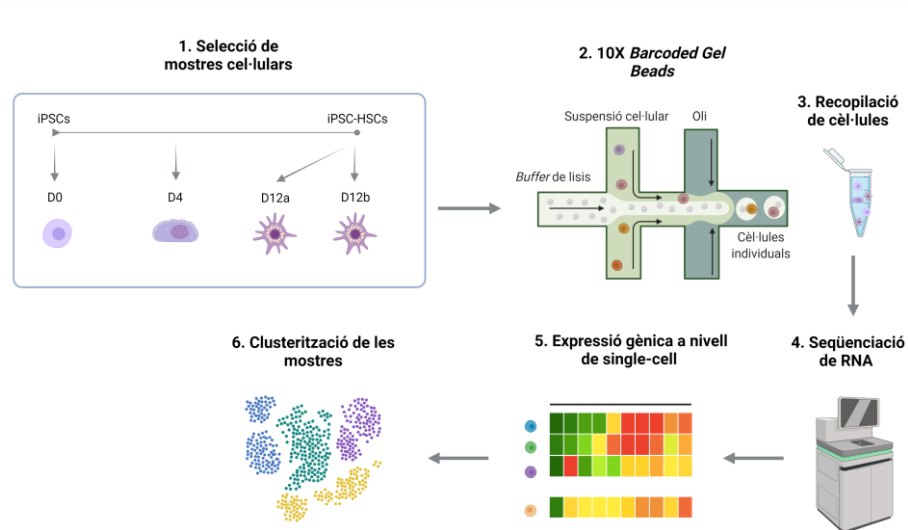


Figura 6. Esquema representatiu del procés de seqüenciació de RNA de *single-cell* de les cèl·lules de dia 0, 4 i 12 de la diferenciació.

3.1. Projecció general de la distribució cel·lular en la diferenciació

Els resultats obtinguts de scRNA-seq es van representar en UMAP per determinar la disposició cel·lular de les diferents mostres seqüenciades (Figura 7A). A dia 0 de la diferenciació, la majoria de cèl·lules es troben agrupades en un sol núvol, mentre que les cèl·lules de dia 4 es trobaven altament distribuïdes formant diferents agrupacions que podien estar associades a diferents graus de diferenciació cel·lular. Per últim, la majoria de cèl·lules de dia 12 es distribuïen principalment en dos clústers indicant una possible heterogeneïtat cel·lular de la població final. A més podíem observar que les mostres de dia 12a i 12b, tot i derivar de diferenciacions independents, presentaven la mateixa disposició cel·lular demostrant l'alta robustesa del protocol de diferenciació.

Posteriorment, totes les mostres es van agrupar en un mateix UMAP per determinar la distribució cel·lular al llarg dels dies de la diferenciació. Com es pot observar en la Figura 7B, la mostra de dia 0 de cèl·lules pluripotents (vermell) es separava completament de les cèl·lules de dia 12 (12a en blau i 12b en lila) formant dos clústers altament

diferenciats indicant que al llarg dels dies del protocol la majoria de cèl·lules de dia 0 es diferenciaven a un fenotip no-pluripotent. En canvi, les cèl·lules de dia 4 (verd) es distribuïen en tres zones; algunes es superposaven amb les cèl·lules de dia 0, altres formaven dues ramificacions que enllacen el clúster “indiferenciat” del clúster “diferenciat”, i d’altres que es localitzaven properes al clúster format de cèl·lules de dia 12.

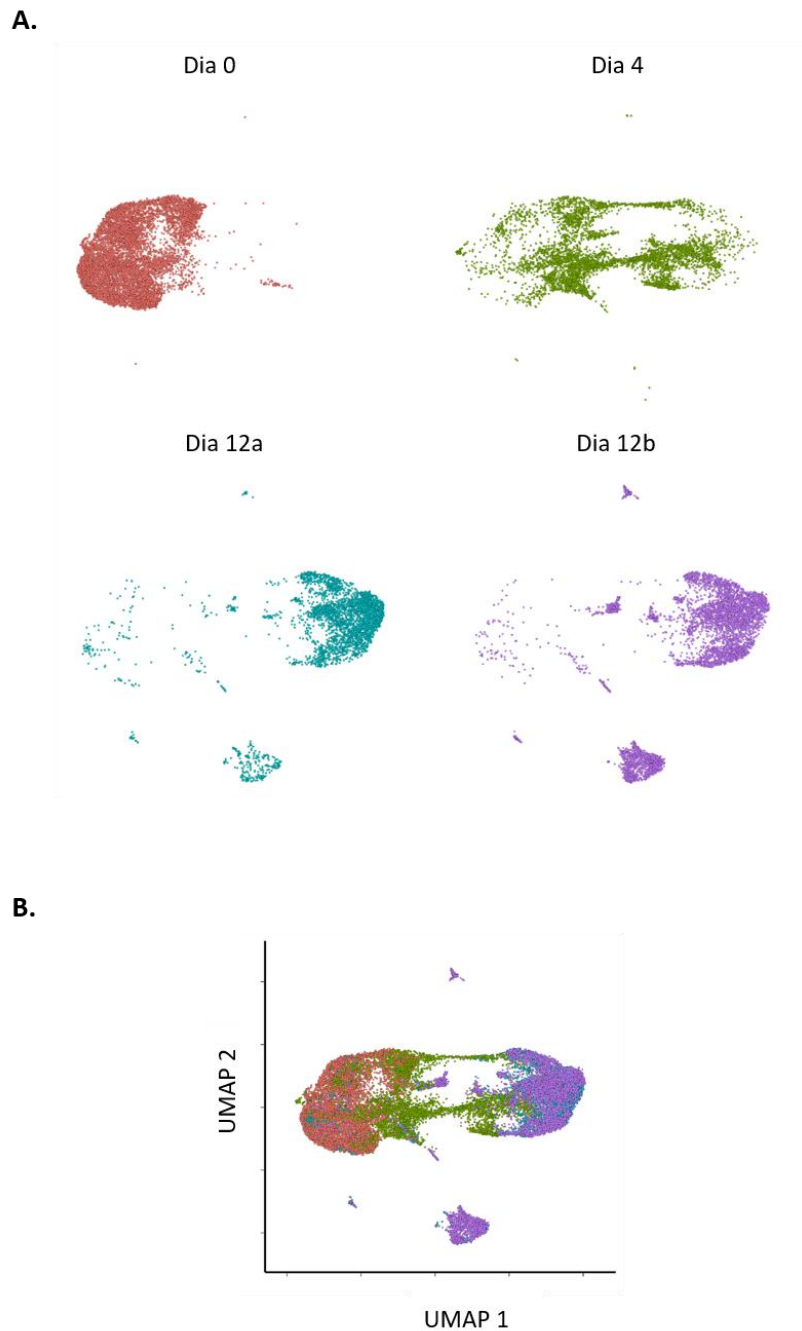


Figura 7. (A) Visualització de la distribució cel·lular en UMAP de les mostres de dia 0, 4, 12a i 12b. (B) Visualització de la distribució de les quatre mostres agrupades en un mateix UMAP.

3.2. Clusterització de les cèl·lules al llarg del protocol de diferenciació

Totes les cèl·lules seqüenciades es van agrupar en diferents clústers no supervisats en una resolució de 0.3 per analitzar l'heterogeneïtat cel·lular i identificar les subpoblacions cel·lulars que apareixien al llarg de la diferenciació. Les cèl·lules s'agrupaven en 13 clústers diferenciats, on els clústers 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 estaven compostos de més de 1,000 cèl·lules, mentre que els clústers 8, 9, 10, 11 i 12 corresponien a clústers més petits formats per menys de 1,000 cèl·lules (Figura 8A i 8B).

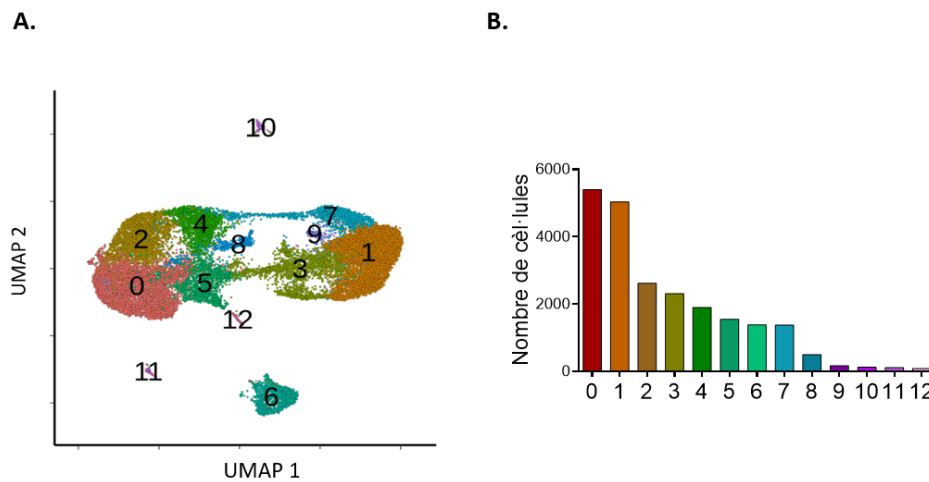


Figura 8. (A) Visualització en UMAP de les 13 subpoblacions cel·lular obtingudes de la seqüenciació de les mostres de dia 0, 4, 12a i 12b de la diferenciació de iPSCs a HSCs. (B) Representació gràfica del nombre de cèl·lules que formen cada clúster.

Les cèl·lules de dia 0 formaven principalment els clústers 0, 2 i 4, representant respectivament, un 90.16%, 88.03% i 73.96% del total de cèl·lules del clúster. En canvi les cèl·lules de dia 4 es trobaven més distribuïdes; el clúster 3 (77.2%), clúster 5 (85.69%), clúster 7 (35.75%) i el clúster 8 (42.94%). De fet, les cèl·lules de dia 4 s'agrupaven en clústers formats de cèl·lules de dia 0 (clúster 5) i cèl·lules del final de la diferenciació (clústers 3, 7 i 8) suggerint que en aquest dia del protocol es trobaven cèl·lules en diferents graus de diferenciació cel·lular. Per últim, les cèl·lules de dia 12 formaven els clústers 1, 6, 9, 10, 11 i 12. El clúster 1, compost de 45.20% de cèl·lules de dia 12a i 52.56% de cèl·lules de dia 12b, i el clúster 6 format per 15.53% de cèl·lules de dia 12a i 84.24% de cèl·lules de dia 12b, eren els dos principals clústers que formaven quasi el 80% del total de cèl·lules de punt final de la diferenciació (Figura 9). Per tant, aquests

resultats suggerien la presència de subpoblacions de cèl·lules indiferenciades de dia 0 com els clústers 0, 2 i 4, subpoblacions de cèl·lules en estat de transició fenotípica com els clústers 3, 5, 7 i 8, i cèl·lules més diferenciades com els clústers 1, 6, 9, 10, 11 i 12. Tot i això, per tal de poder determinar el fenotip específic de cada subpoblació, es va avaluar els processos biològics i gens diferencialment expressats de cada clúster, així com la seva associació amb signatures gèniques de cèl·lules implicades en el desenvolupament embrionari del fetge extreta de la base de dades de scRNA-seq de PanglaoDB publicada per Franzén et al., (2019) (231) i de DescartesDB publicada en l'article Cao et al., (2021) (232).

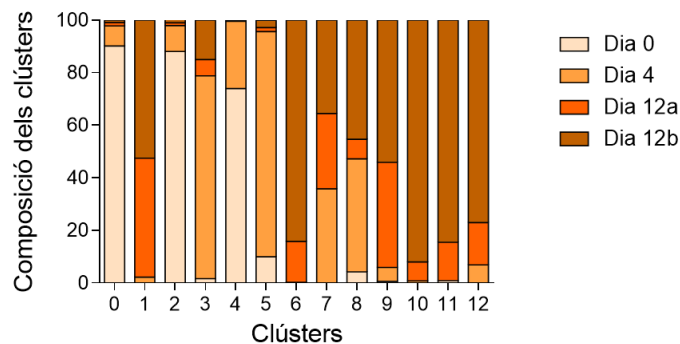
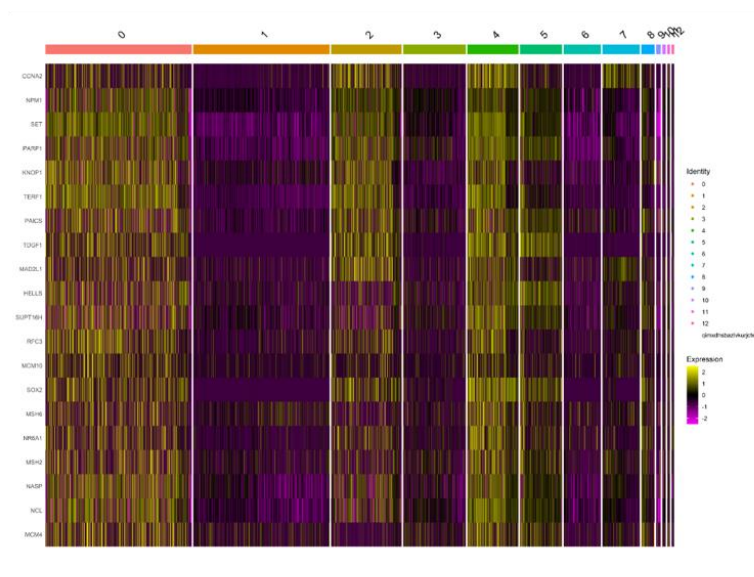


Figura 9. Composició cel·lular de les mostres de dia 0, 4, 12a i 12b en els 13 clústers identificats.

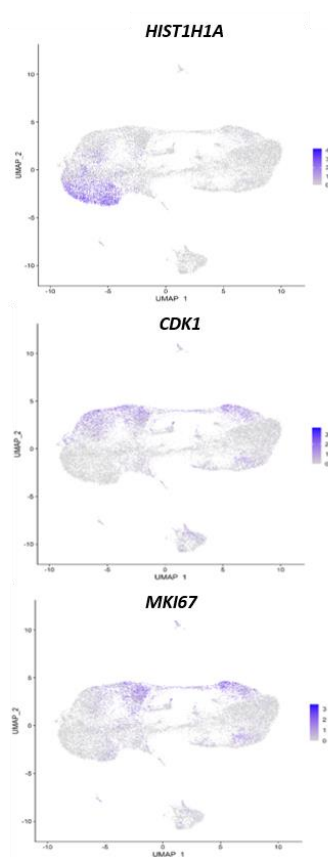
Els clústers 0, 2 i 4, principalment formats de cèl·lules de dia 0 (Figura 9), estaven associats a processos biològics relacionats amb la regulació del cicle cel·lular i divisió cel·lular (Figura 10C), i estaven enriquits en la signatura gènica de pluripotència extreta de la base de dades de PanglaoDB (231) (Figura 10A). El clúster 0 estava compost de cèl·lules que es trobaven en l'estadi G1/S del cicle cel·lular, estadi de creixement cel·lular i replicació del DNA, mentre que els clústers 2 i 4 es caracteritzaven per presentar cèl·lules en estadi G2/M, punt de control on les cèl·lules no comencen la mitosi sense haver acabat la replicació del DNA (Figura 10C). El clúster 0 expressava gens centrats en la regulació d'histones (*HIST1H1A* i *HIST1H4C*), el clúster 2 es caracteritzava per expressar ciclines (*CDK1*) i ubiquitines (*UBEC2*) associades al cicle cel·lular, i per últim el clúster 4, tot i preservar l'expressió de marcadors de pluripotència com *LIN2BA*, presentava l'expressió de gens de proliferació com *MKI67* (Figura 10B) (Figura 2 de l'Annex 2).

El clúster 5, tot i ser majoritari de cèl·lules de dia 4 (Figura 9), també presentava l'expressió de marcadors de pluripotència com *SOX2* i *POU5F1* (Figura 11B) (Figura 2 de l'Annex 2) i estava enriquit en la signatura gènica de pluripotència (Figura 10A). No obstant això, aquest clúster es diferenciava dels altres clústers de pluripotència per incloure cèl·lules que expressaven marcadors endotelials com *KDR* i *ADM* (Figura 11B) i per estar enriquit en la signatura gènica de cèl·lules endotelials extreta de la base de dades de DescartesDB (232) (Figura 11A). Així mateix, confirmant els resultats observats per expressió gènica, aquest clúster estava enriquit en processos biològics relacionats amb el cicle cel·lular com també en processos d'angiogènesis característics de cèl·lules endotelials (Figura 11C). Per tant, a dia 0 del protocol de diferenciació es trobaven tres poblacions pluripotents associades a diferents estadis del cicle cel·lular, i a dia 4, tot i preservar cèl·lules pluripotents, algunes cèl·lules es diferenciaven adquirint característiques de cèl·lules endotelials.

A.



B.



C.

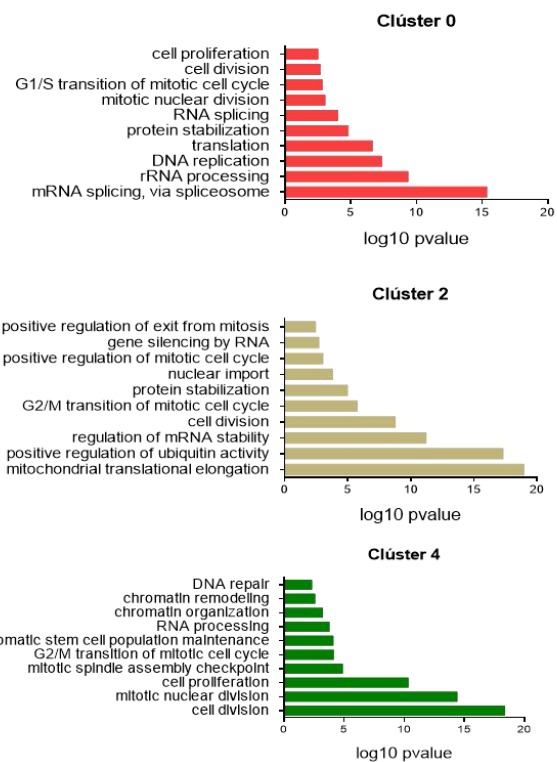
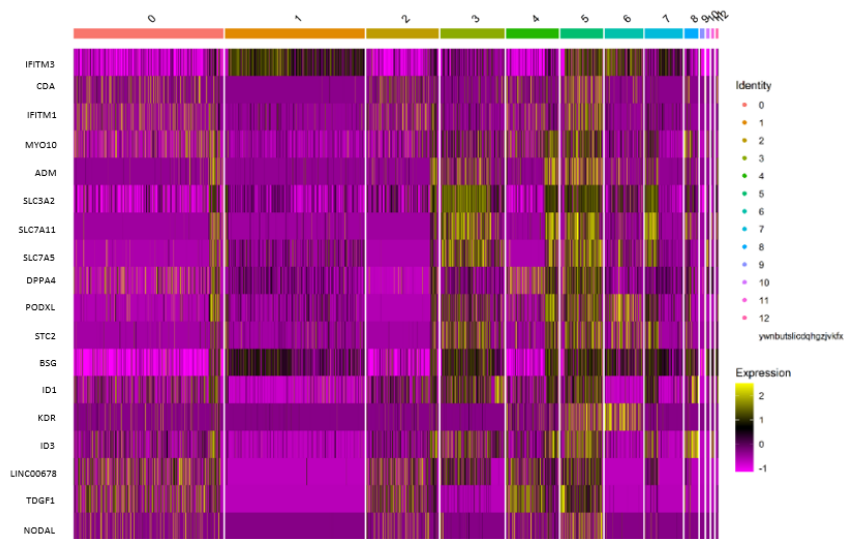
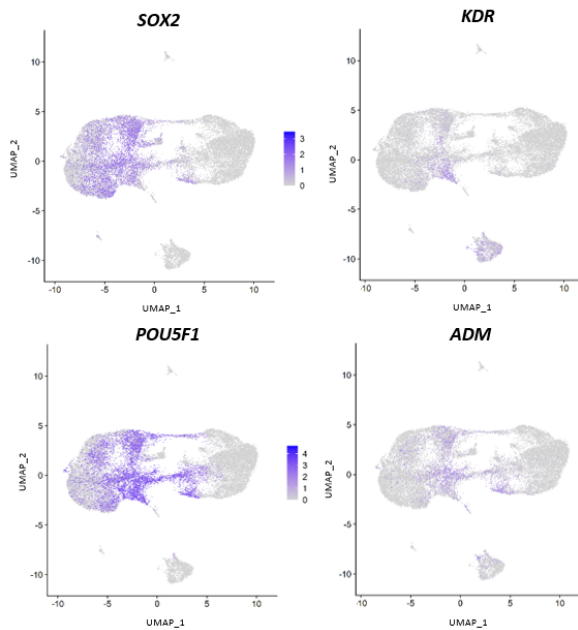


Figura 10. (A) Heatmap de la signatura gènica de cèl·lules pluripotents extreta de la base de dades de PanglaoDB (231) en els 13 clústers obtinguts en l'anàlisi de scRNA-seq. (B) Representació en UMAP de l'expressió de *HIST1H1A*, *CDK1* i *MKI67* en els 13 clústers. (C) Representació dels processos biològics significativament expressats en els clústers 0, 2 i 4. L'expressió gènica es representa en log10 pvalue.

A.



B.



C.

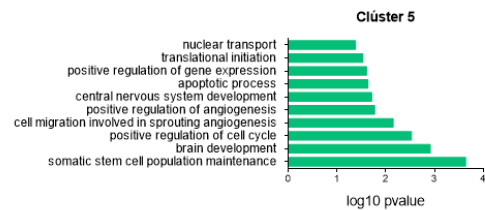


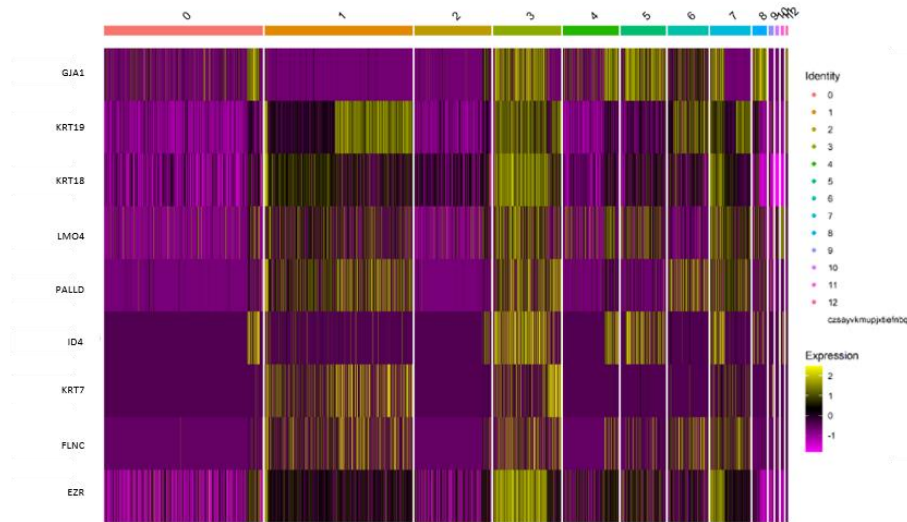
Figura 11. (A) Heatmap de la signatura gènica de cèl·lules endotelials extreta de la base de dades de DescartesDB (232) en els 13 clústers obtinguts en l'anàlisi de scRNA-seq. (B) Representació en UMAP de l'expressió de marcadors de cèl·lules pluripotents (*SOX2* i *POU5F1*) i cèl·lules endotelials (*KDR* i *ADM*) en els 13 clústers. (C) Representació dels processos biològics significativament expressats en el clúster 5. L'expressió gènica es representa en log₁₀ pvalue.

De manera similar, el clúster 3 format per cèl·lules de dia 4 (Figura 9), estava enriquit en la signatura gènica de cèl·lules endotelials (Figura 11A), però a diferència del clúster 5, aquesta població es trobava més enriquida en la signatura gènica de cèl·lules mesotelials

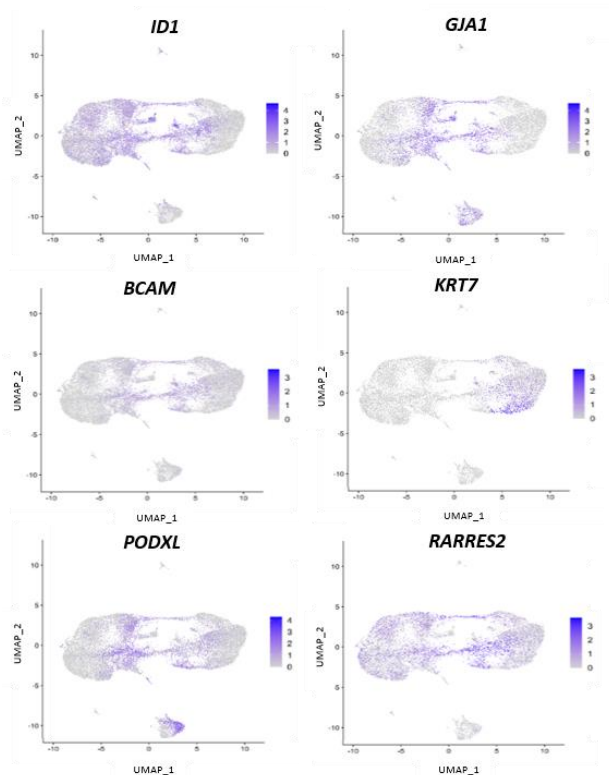
hepàtiques de la base de dades DescartesDB (232) (Figura 12A) i no de pluripotència (Figura 10A), fet que remarcava que es trobaven en un estadi de diferenciació superior. De fet, en el clúster 3 es podien observar cèl·lules amb característiques endotelials expressant *ID1*, *BCAM* i *PODXL* i d'altres amb característiques de cèl·lules mesotelials com *GJA1*, *KRT7* i *RARRES2* (Figura 12B) (Figura 2 de l'Annex 2). A més, els processos biològics d'aquesta població estaven associats a processos d'angiogènesis i de regulació de filaments d'actina, característiques de cèl·lules amb fenotip endotelial i mesotelial (Figura 12C).

El clúster 7 a diferència del clúster 3, estava compost d'un 40% de cèl·lules de dia 4 i d'un 60% de cèl·lules de dia 12 (Figura 9), i tot i presentar cèl·lules enriquides en la signatura gènica de cèl·lules endotelials i mesotelials hepàtiques de DescartesDB (232) (Figura 11A i 12A), presentava una subpoblació de cèl·lules de dia 12 amb un perfil mesenquimal similar als clústers 1 i 6 (Figura 13A). A més, la representació en UMAP identificava que les cèl·lules de dia 12 del clúster 7 expressaven gens mesenquimals com *VIM*, *LUM*, *FBLN1*, *ALCAM* i *COL1A1* (Figura 13B), mentre que les cèl·lules de dia 4 expressaven gens endotelials i mesotelials (Figura 11B i Figura 12B) (Figura 2 de l'Annex 2). A més, en aquest cas, els processos biològics més expressats corresponien a la proliferació mesenquimal i endotelial, i processos de regulació de la matriu extracel·lular (Figura 13C). Per tant, aquests resultats indicaven que a dia 4 del protocol hi havia una alta heterogeneïtat cel·lular, on es podien detectar cèl·lules amb un perfil pluripotent (clúster 5), cèl·lules endotelials (clústers 3 i 5), cèl·lules mesotelials (clúster 3 i 7) i cèl·lules en estadi de diferenciació mesenquimal (clúster 7). Aquest fet es podria donar a causa que els primers estadis de la diferenciació, les iPSCs es tracten amb BMP4, un factor present en el desenvolupament embrionari de diferents llinatges cel·lulars hepàtics (116), (117), (118), (119), (141). A part, aquests resultats ens indicaven que a partir de dia 4 la diferenciació cel·lular es produïa de manera progressiva i gradual generant clústers multifenotípics, i que per tant, el protocol de diferenciació s'hauria d'entendre com un mosaic on coexisteixen cèl·lules amb diferents graus de diferenciació.

A.



B.



C.

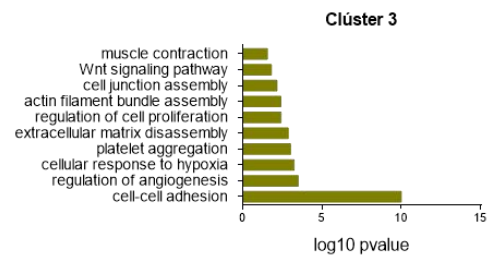
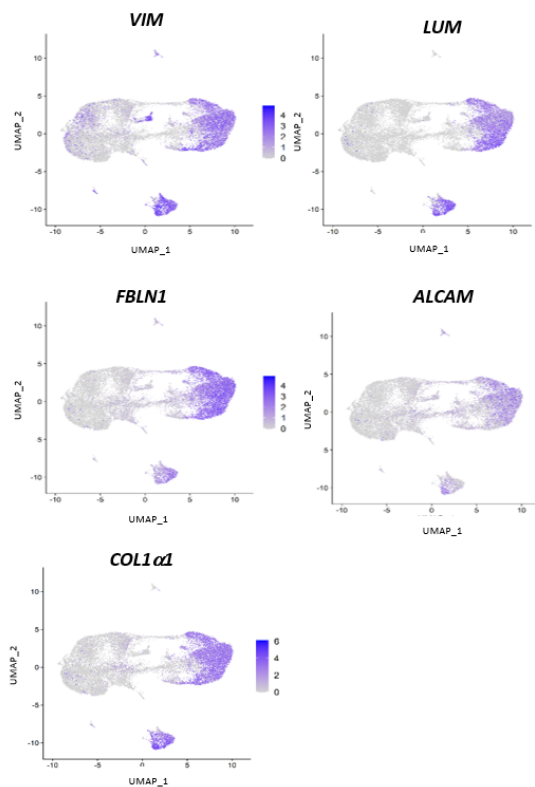


Figura 12. (A) Heatmap de la signatura gènica de cèl·lules mesotelials hepàtiques extreta de la base de dades de DescartesDB (232) en els 13 clústers obtinguts en l'anàlisi de scRNA-seq. (B) Representació en UMAP de l'expressió de marcadors de cèl·lules endotelials (*ID1*, *BCAM* i *PODXL*) i cèl·lules mesotelials (*GJA1*, *KRT7* i *RARRES2*) en els 13 clústers. (C) Representació dels processos biològics significativament expressats en el clúster 3. L'expressió gènica es representa en log10 pvalue.

A.



B.



C.

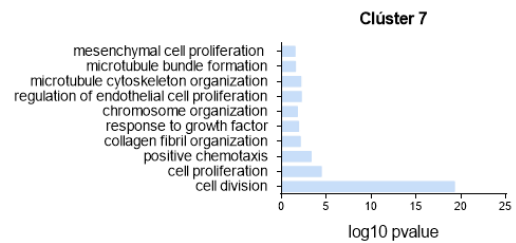


Figura 13. (A) Heatmap de la signatura gènica de cèl·lules mesenquimals extreta de la base de dades de DescartesDB (232) en els 13 clústers obtinguts en l'anàlisi de scRNA-seq. (B) Representació en UMAP de l'expressió de marcadors de cèl·lules mesenquimals com *VIM*, *LUM*, *FBLN1*, *ALCAM* i *COL1α1* en els 13 clústers. (C) Representació dels processos biològics significativament expressats en el clúster 7. L'expressió gènica es representa en log10 pvalue.

D'altra banda, les cèl·lules de dia 12 s'agrupaven majoritàriament en els clústers 1 i 6 formant el 80% del total de cèl·lules de punt final (Figura 9). Ambdós clústers es trobaven enriquets en la signatura gènica de cèl·lules mesotelials hepàtiques (Figura 12A) i de

cèl·lules mesenquimals (Figura 13A) extretes de la base de dades de DescartesDB (232). A més, els gens mesenquimals representats en la Figura 13B, es trobaven expressats en ambdues poblacions. Si ens centràvem en els processos biològics, el clúster 1 presentava activades les vies de senyalització de regulació dels compostos de la matriu extracel·lular, cicatrització del teixit, proliferació dels fibroblasts, entre d'altres (Figura 14B), i expressava gens relacionats amb les HSCs com *TGFBI*, *FBLN1* i *CTHRC1* (Figura 2 de l'Annex 2). El clúster 6 es caracteritzava per l'expressió de processos centrats en la regulació de la matriu extracel·lular i processos centrats en la vasculogènesis expressant *COL3 α 1*, *COL1 α 2*, *POSTN* i *TMEM33* (Figura 14B) (Figura 2 de l'Annex 2). Tot i que ambdues poblacions presentaven característiques de les HSCs, el clúster 6 es trobava més enriquit en la signatura gènica de HSCs de la base de dades de DescartesDB (232) que el clúster 1 (Figura 14A). Aquests resultats suggerien que a punt final de la diferenciació obteníem HSCs en diferents estats funcionals; el clúster 1 compost de cèl·lules estromals amb característiques més fibroblàstiques, i el clúster 6 format de cèl·lules amb un perfil d'expressió genica de HSCs.

Per últim, els clústers 8, 9, 10, 11 i 12 eren clústers formats majoritàriament per cèl·lules de dia 12 (Figura 9), però estaven formats per menys de 1,000 cèl·lules. El clúster 8 es caracteritzava per expressar *OTX2* i *CDH2*, gens involucrats en l'embriogènesi (Figura 2 de l'Annex 2), i per presentar activades vies del desenvolupament embrionari neuronal (Figura 15A). Les cèl·lules del clúster 9 expressaven gens característics de processos de la degradació de la matriu extracel·lular com metal·loproteinases (*ADAMTS6*) i integrines (*ITGB6*) (Figura 2 de l'Annex 2), i presentaven activats processos relacionats amb cèl·lules estromals i HSCs (Figura 15A). El clúster 10 estava associat principalment a vies de senyalització del desenvolupament embrionari neuronal expressant *SOX10* i *TFAP2B* (Figura 15A) (Figura 2 de l'Annex 2). Les cèl·lules del clúster 11 expressaven també processos biològics centrats en el desenvolupament neuronal, així com processos relacionats amb l'organització de la matriu necessaris per aquest procés (Figura 15A). Per últim, el clúster 12 estava relacionat amb l'expressió de gens de cèl·lules parenquimals com *AFP*, *APOA1* i *APOA2* (Figura 15B) (Figura 2 de l'Annex 2). A més, presentava activats processos biològics centrats en la regulació del colesterol,

lipoproteïnes i oxidació-reducció (Figura 15B) suggerint l'obtenció d'una petita població parenquimal.

Per tant, aquests resultats indicaven que la diferenciació, la qual s'inicia en un estadi de pluripotència, tal i com s'observa en els clústers 0, 2, 4 i 5, passa per un estadi de fenotip intermedi amb característiques d'endoteli (clústers 3, 5 i 7), mesotelial (clústers 3 i 7), diferenciant-se aquests últims en l'expressió de marcadors mesenquimals, característics del punt final del procés de diferenciació (clústers 1, 6, 7 i 9). Tot i això, s'obtenien també en aquesta diferenciació, clústers menys nombrosos amb fenotips no relacionats amb cèl·lules mesenquimals (clústers 8, 10, 11 i 12).

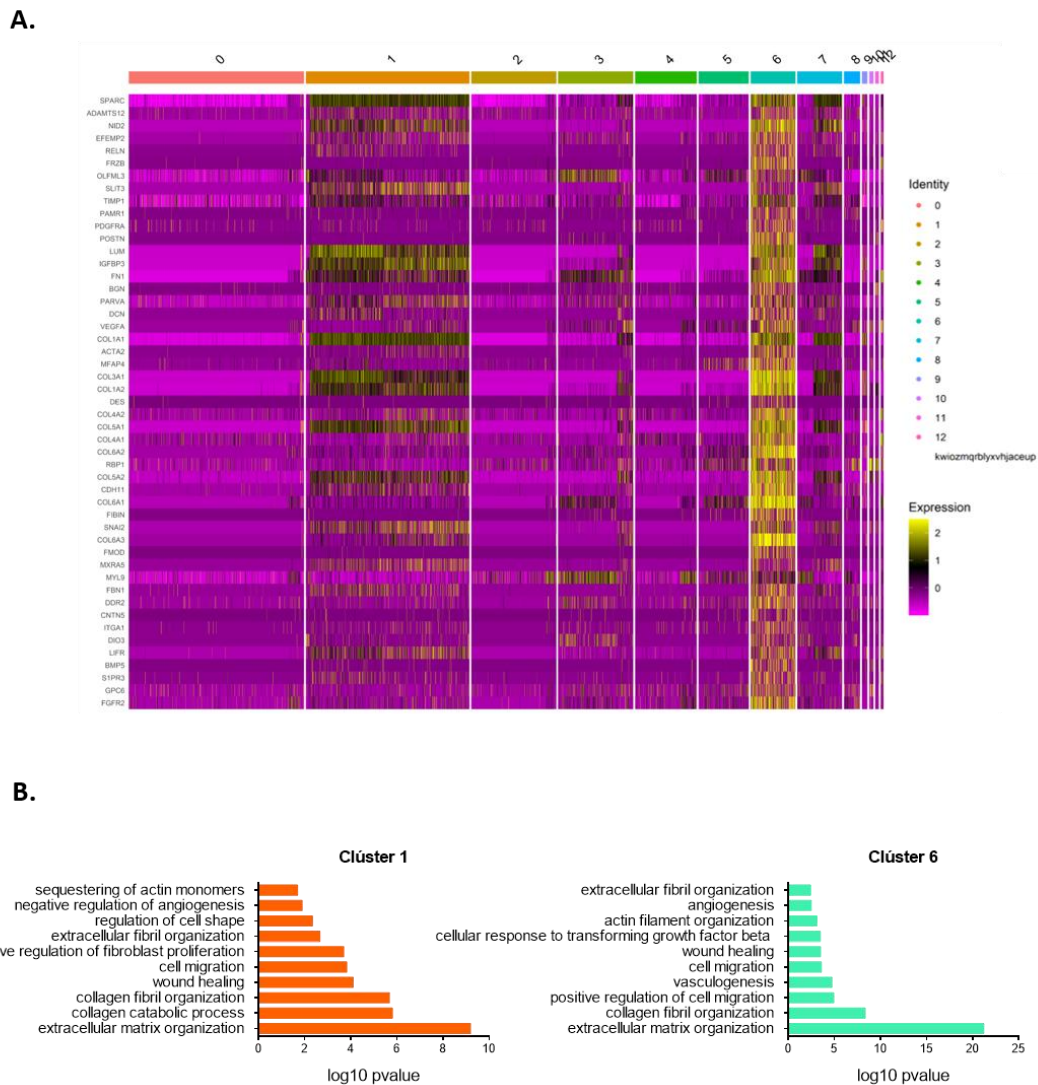


Figura 14. (A) Heatmap de la signatura gènica de cèl·lules HSCs extreta de la base de dades de DescartesDB (232) en els 13 clústers obtinguts en l'anàlisi de scRNA-seq. (B) Representació dels processos biològics significativament expressats en els clústers 1 i 6. L'expressió gènica es representa en log10 pvalue.

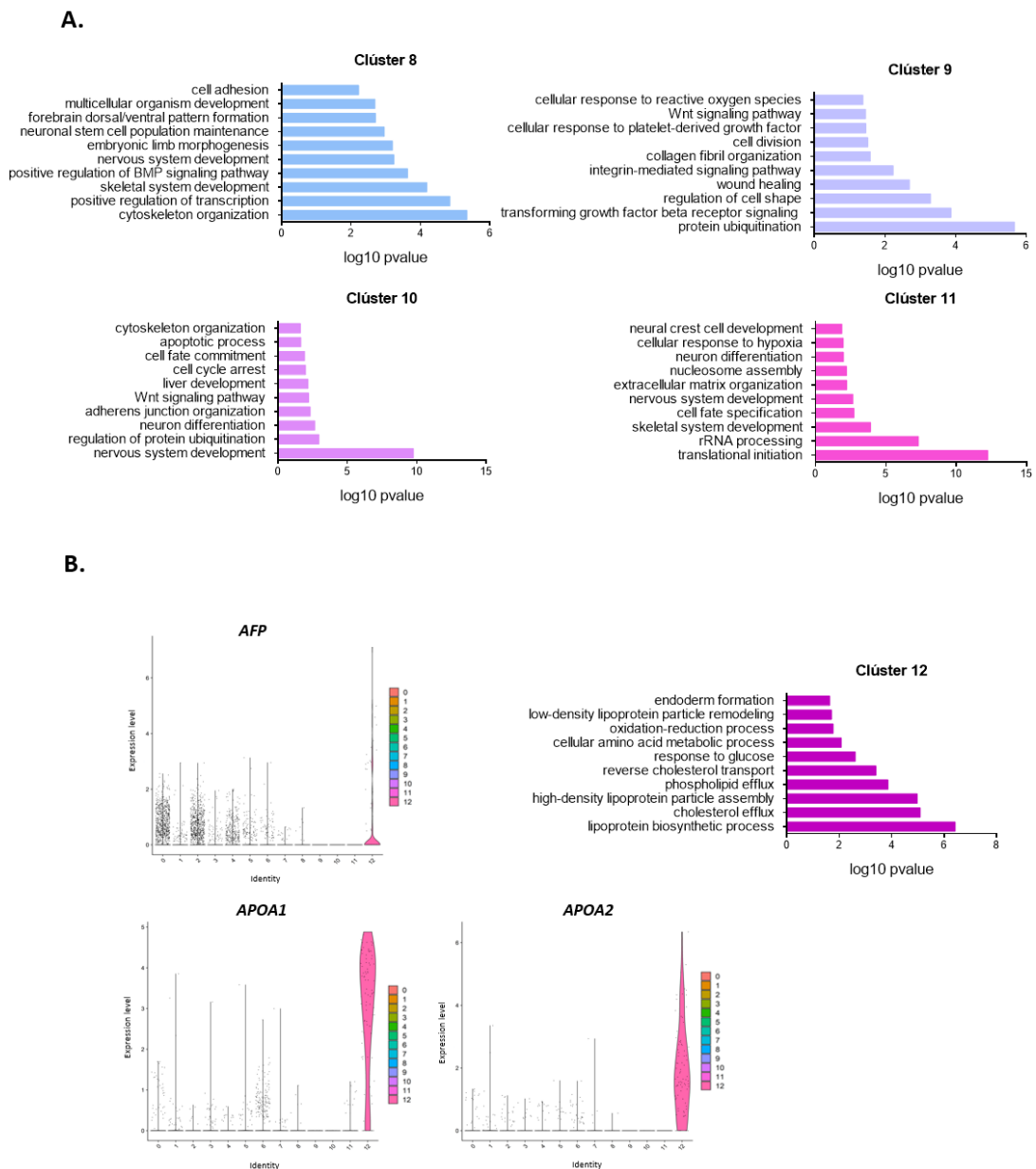


Figura 15. (A) Representació dels processos biològics significativament expressats en els clústers 8, 9, 10 i 11. L'expressió gènica es representa en \log_{10} pvalue. (B) Representació en *Violin plots* de l'expressió de marcadors d'hepatòcits com *AFP*, *APOA1* i *APOA2* en els 13 clústers, i representació dels processos biològics significativament expressats en el clúster 12. L'expressió gènica es representa en \log_{10} pvalue.

3.3. Heterogeneïtat de la població final

Es va voler avaluar si l'heterogeneïtat present a punt final, sobretot l'observada en els clústers 1 i 6, estava relacionada amb diferents fenotips de les HSCs. Actualment, les HSCs es consideren una població heterogènia amb una alta capacitat plàstica respecte al seu fenotip (236), i per aquest motiu, es va avaluar si aquesta heterogeneïtat podria

estar associada en les signatures gèniques de cèl·lules en estat regeneratiu, quimiotàctic i de cèl·lula presentadora d'antígens que poden adoptar les HSCs primàries (signatures gèniques extretes de DescartesDB (232)). Com es pot observar en la Figura 16, l'expressió dels quatre marcadors de regeneració es trobaven expressats en algunes cèl·lules del clúster 6, mentre que el clúster 1 no presentava l'expressió del gen *HGF*, considerat com a un clar inductor de la regeneració. D'altra banda, la majoria de gens característics de cèl·lula presentadora d'antígens es trobaven expressats en el clúster 1, mentre que l'expressió de gens quimiotàctics es distribuïen en ambdós clústers. Per tant, aquest anàlisi preliminar ens indicava que aquesta heterogeneïtat podria estar associada a un fenotip específic de les cèl·lules, i que a part d'haver-hi heterogeneïtat entre aquests dos clústers, cada un presenta cèl·lules amb diferent expressió gènica. Aquest fet reforça el concepte prèviament descrit que la diferenciació succeeix de manera gradual obtenint un mix poblacional a cada subpoblació.

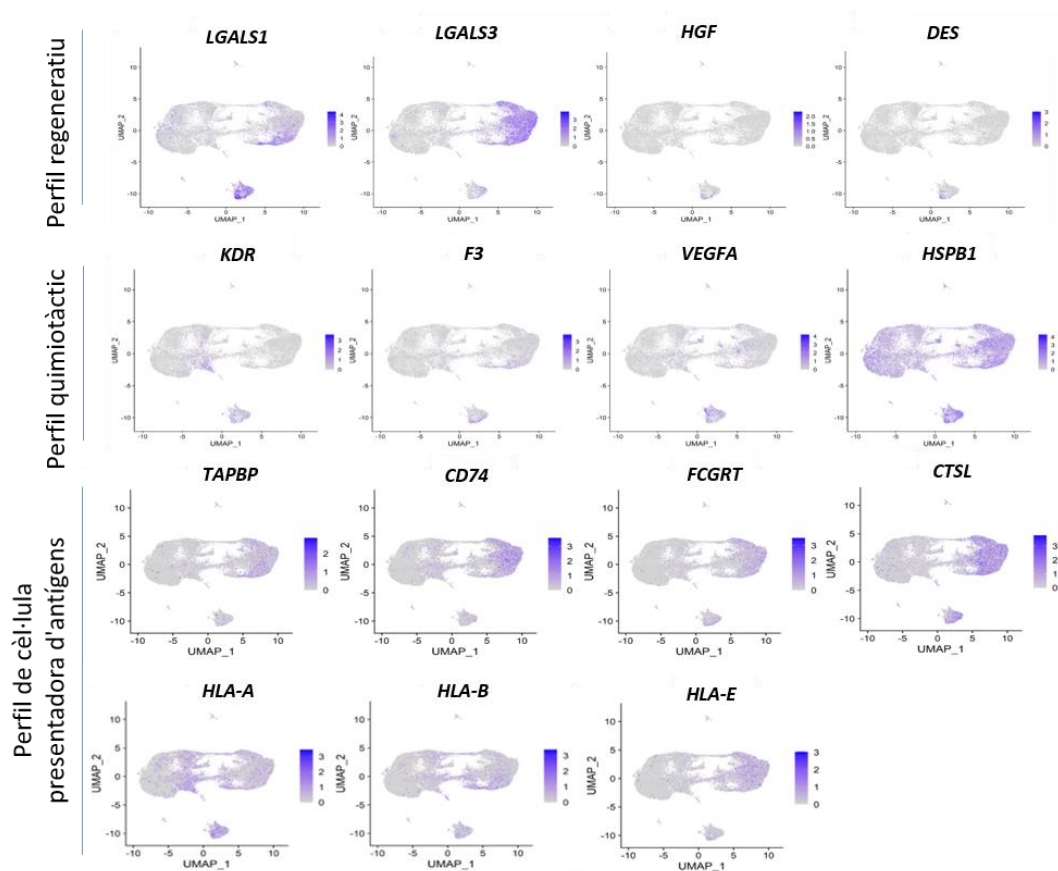


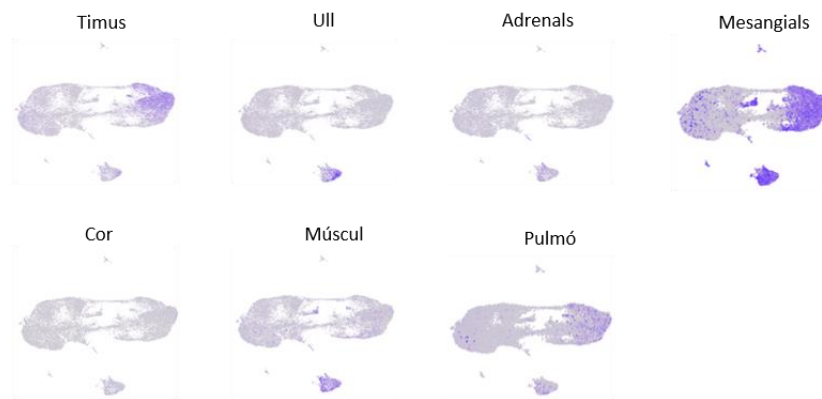
Figura 16. Representació en UMAP de les signatures gèniques del perfil de cèl·lula regenerativa, cèl·lula quimiotàctica i cèl·lula presentadora d'antígens extretra de la base de dades de DescartesDB (232).

3.4. Aplicació del protocol de diferenciació per la generació d'altres cèl·lules estromals

Per últim es va determinar si les cèl·lules resultants del protocol de diferenciació presentaven característiques comunes amb cèl·lules estromals d'altres òrgans, ja que recentment s'ha descrit que les HSCs en estadi fetal, compartien l'expressió de gens amb altres cèl·lules estromals (232). En aquest cas, es va avaluar les signatures gèniques de cèl·lules estromals de múscul, mesangials, adrenals, de cor, de pulmó, de timus i d'ull extremitats de la base de dades de DescartesDB (232). Com es pot observar en la Figura 17A, l'expressió d'aquestes signatures es localitzava només en els clústers de dia 12, mostrant diferències entre la població 1 i la 6. El clúster 1 estava enriquit en la signatura gènica del timus, pulmó i cèl·lules mesangials de ronyó, mentre que les cèl·lules del clúster 6 estaven associades a la signatura gènica de cèl·lules de l'ull, adrenals, de múscul i mesangials. L'única signatura gènica que compartien ambdues diferenciacions era la de cèl·lules mesangials i no expressaven els gens característics de les cèl·lules estromals de cor.

Seguint en la mateixa línia, es va observar que les HSCs diferenciades estaven enriquides en la signatura gènica de les cèl·lules estrellades pancreàtiques. De manera interessant, la signatura gènica es trobava sobreexpressada en el clúster 6 indicant que podria estar format de cèl·lules HSCs que compartien gens expressats també en les cèl·lules estrellades del pàncreas (Figura 17B). Aquests resultats indicaven la diferència d'expressió gènica entre les dues poblacions de dia 12 i suggerien que ajustant el protocol i dirigint-lo a una població específica, es podrien obtenir cèl·lules estromals d'altres òrgans.

A.



B.

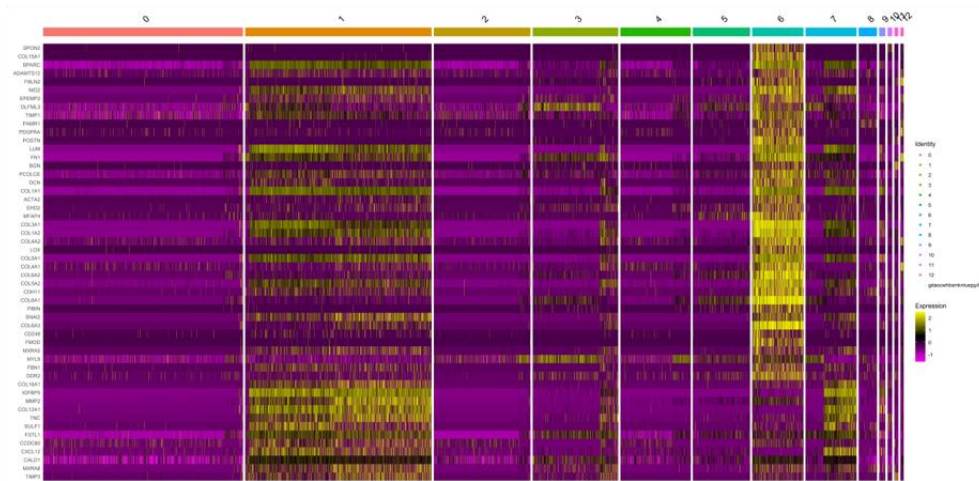


Figura 17. (A) Representació en UMAP de l'expressió de les signatures de cèl·lules estromals de timus, ull, adrenals, mesangials, de cor, múscul i pulmó extretes de la base de dades de DescartesDB (232). (B) Heatmap de la signatura gènica de cèl·lules estrellades pancreàtiques extreta de la base de dades de DescartesDB (232).

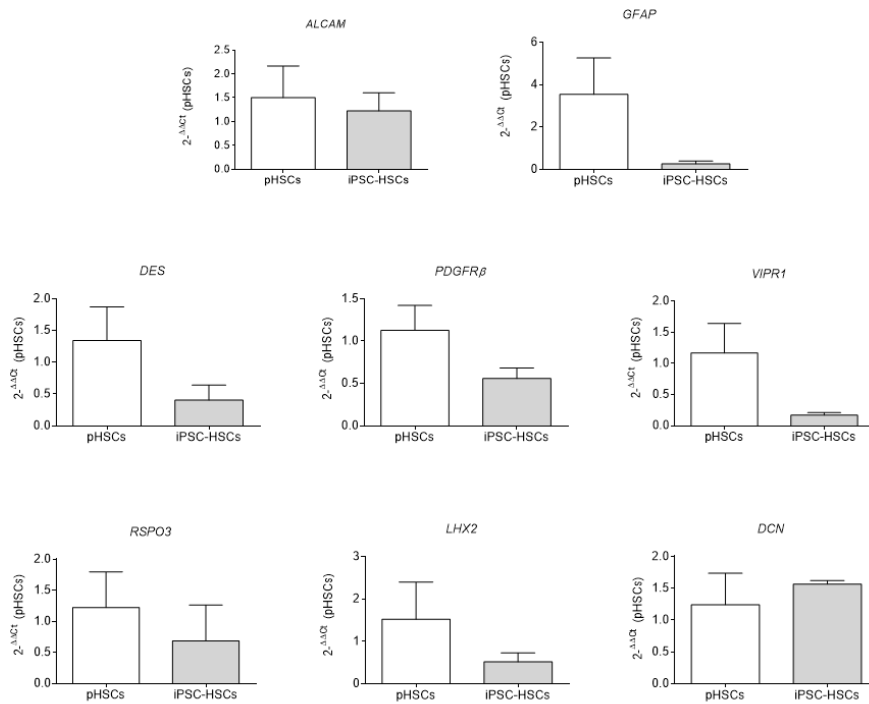
Per tant, mitjançant l'anàlisi de scRNA-seq es va poder determinar el possible fenotip de les cèl·lules obtingudes al llarg de la diferenciació, on les iPSCs es diferenciaven principalment a cèl·lules associades a un perfil mesotelial, endotelials i mesenquimal, i fins a obtenir cèl·lules amb característiques de HSCs. El fet de poder afegir altres mostres de punts intermedis de la diferenciació, com cèl·lules de dia 8, ens permetria realitzar l'estudi de *Pseudotime* i potencial de diferenciació, i d'aquesta manera poder determinar la trajectòria i les decisions de destí cel·lular que succeeixen en l'especificació del llinatge de les HSCs al llarg d'aquest protocol.

4. Caracterització de la població final

Després de la caracterització de les poblacions obtingudes al llarg de la diferenciació, es va caracteritzar la població final del protocol de diferenciació (iPSC-HSCs) per expressió gènica i proteica, i es va comparar amb les cèl·lules HSCs primàries aïllades (pHSCs), la principal font de HSCs utilitzada per estudis *in vitro*.

Primer de tot, es va avaluar per qPCR el nivell d'expressió gènica de marcadors de HSCs en les dues poblacions cel·lulars. Les iPSC-HSCs no presentaven diferències significatives en l'expressió d'alguns gens relacionats amb el fenotip de HSCs com *ALCAM*, *GFAP*, *DES*, *PDGFR β* , *VIPR1*, *RSPO3*, *LHX2* i *DCN* (26) (Figura 18A). No obstant això, l'expressió de *PCDH7*, *RELN*, *LRAT* i *PPAR γ* , gens relacionats amb la quiescència de les HSCs (26), era significativament major en les cèl·lules diferenciades que en les primàries. Seguint en aquesta línia, els marcadors d'activació com *COL1 α 1* i *ACTA2* (28), es trobaven menys expressats en les iPSC-HSCs (Figura 18B) suggerint que la població final de la diferenciació presentava un fenotip menys activat que les pHSCs cultivades.

A.



B.

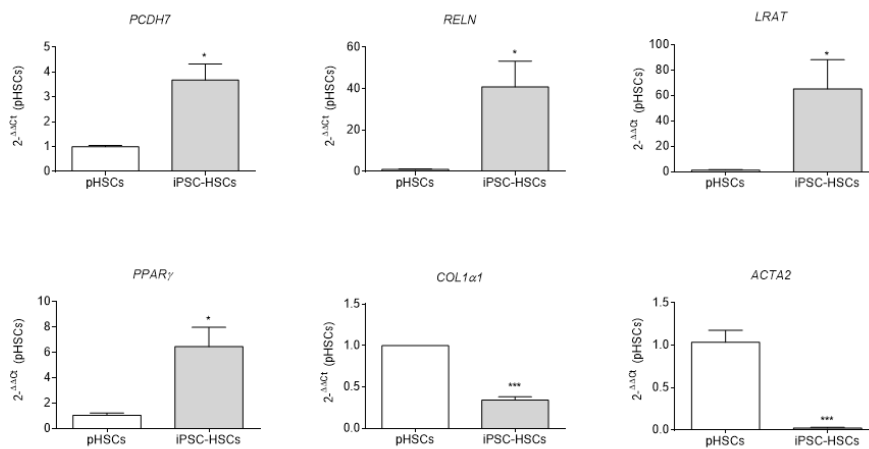


Figura 18. Expressió gènica de marcadors característics del (A) fenotip de HSCs (*ALCAM*, *GFAP*, *DES*, *PDGFRβ*, *VIPR1*, *RSPO3*, *LHX2* i *DCN*) i (B) marcadors de quiescència (*PCDH7*, *RELN*, *LRAT* i *PPARγ*) i d'activació (*COL1α1* i *ACTA2*) en les iPSC-HSCs i pHSCs. Experiment realitzat en 3-4 diferenciacions independents i pHSCs aïllades de 3-4 pacients diferents. * $p < 0.05$ comparat amb les pHSCs mitjançant t-test.

En segon lloc, es va analitzar per immunofluorescència l'expressió de *PDGFRβ* i *VIMENTIN*, dos marcadors de cèl·lules mesenquimals (26), així com l'expressió del gen

PCDH7 descrit com a gen específic de les HSCs primàries (30). Com es pot observar en la Figura 19, ambdues poblacions, tot i presentar una morfologia cel·lular diferent, expressaven a nivell proteic aquests marcadors. Les HSCs derivades de iPSCs tenien una morfologia més arrodonida, mentre que les pHSCs presentaven un fenotip més allargat que podria estar associat a la baixa confluència del cultiu i/o a un major estat d'activació. A part d'això, també es podia identificar que en les iPSC-HSCs el marcatge de PDGFR β , PCDH7 i VIMENTIN no era homogeni, suggerint que al final de la diferenciació les cèl·lules expressaven, a diferent grau, els marcadors característics de HSCs.

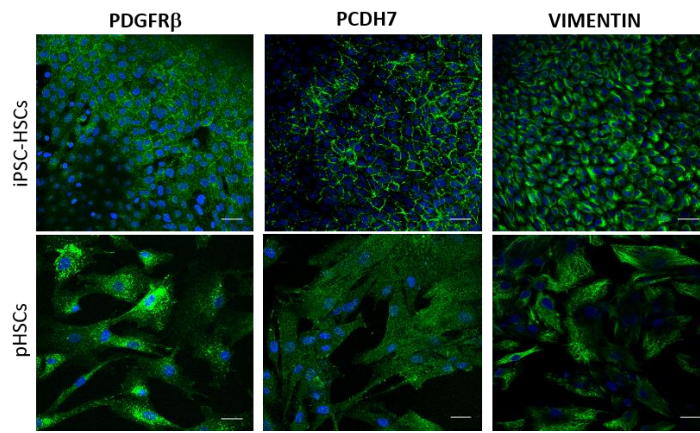


Figura 19. Imatges representatives d'immunofluorescències de PDGFR β , PCDH7 i VIMENTIN en les iPSC-HSCs i pHSCs. Imatges capturades en el microscopi confocal (Barra d'escala 100 μ m). Figura extreta i posteriorment modificada de la publicació de Vallverdú et al., (2021) (145).

En resum, aquest protocol de diferenciació, mitjançant la progressió de cèl·lules pluripotents a cèl·lules intermèdies, donaven lloc a cèl·lules amb característiques de HSCs. Aquestes iPSC-HSCs, tot i representar una població heterogènia, expressaven gens i proteïnes específiques de les HSCs al mateix nivell que les primàries. A més, aquestes cèl·lules presentaven un augment dels gens de quiescència i una disminució dels gens d'activació indicant un perfil menys activat que les pHSCs.

OBJECTIU 2: AVALUAR EL POTENCIAL ÚS DE LES CÈL·LULES ESTRELLADES HEPÀTIQUES DERIVADES DE IPSCS

El segon objectiu de la tesi doctoral contemplava avaluar la capacitat de les iPSC-HSCs per la realització de diferents assaigs *in vitro*, i d'aquesta manera, determinar el seu potencial com a nova font de HSCs. En primer lloc es va estudiar; 1) El potencial de les iPSC-HSCs per ser expandides i criopreservades, i a continuació, es va estudiar les diferents aplicacions *in vitro* que consistien en; 2) Resposta de les iPSC-HSCs a compostos pro-fibrogènics i pro-inflamatoris, 3) Ús de les iPSC-HSCs pel cribratge de fàrmacs anti-fibrogènics i 4) Co-cultiu de les iPSC-HSCs amb hepatòcits.

1. Expansió i criopreservació de les iPSC-HSCs

Es va avaluar si a punt final del protocol de diferenciació, les iPSC-HSCs es podien expandir o congelar per realitzar futurs assaigs *in vitro*. Per tal d'expandir les iPSC-HSCs, les cèl·lules es van plaquejar en una dilució 1:2 en Medi d'Expansió, i al cap de 2-3 dies adquirien una confluència del 70%. D'altra banda, les cèl·lules diferenciades es podien congelar i posteriorment plaquejar en una dilució 1:1 en Medi d'Expansió aconseguint la confluència requerida en 2-3 dies. Un esquema representatiu d'ambdós processos es mostra en la Figura 20A i 20B.

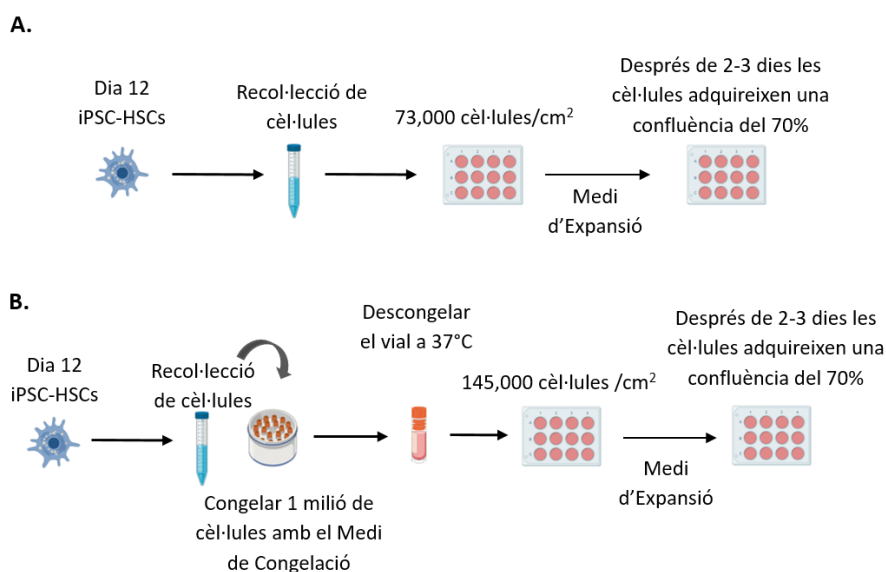


Figura 20. (A) Esquema del procés d'expansió de les iPSC-HSCs. (B) Esquema del procés de congelació/descongelació de les iPSC-HSCs. Figura extreta de la publicació de Vallverdú et al., (2021) (145).

En primer lloc es va estudiar si les iPSC-HSCs un cop passades i descongelades mantenen la morfologia i el fenotip cel·lular. Es va observar que les tres poblacions cel·lulars, iPSC-HSCs a dia 12, fase 1 i descongelades, presentaven una morfologia similar. Tot i això, les cèl·lules a fase 1 i descongelades tenien una mida cel·lular més gran a causa de la baixa confluència del cultiu i a l'adquisició d'un fenotip una mica més activat que les cèl·lules de dia 12 (Figura 21).

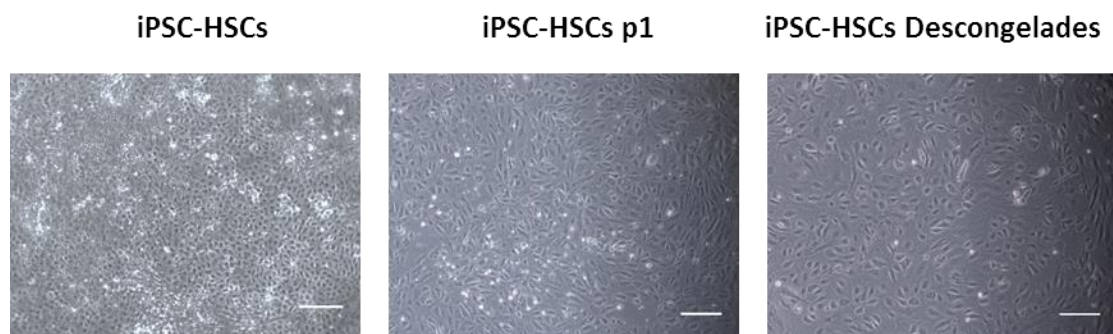


Figura 21. Imatges microscòpiques de les cèl·lules diferenciades a dia 12 (iPSC-HSCs), a fase 1 i descongelades (Barra d'escala 100µm). Figura extreta de la publicació de Vallverdú et al., (2021) (145).

A continuació es va avaluar la similitud de les diferents poblacions cel·lulars a nivell d'expressió gènica, proteica i funcional permetent determinar si el procés d'expansió i congelació afectava al manteniment del perfil de HSCs.

Primer de tot, es va avaluar l'expressió gènica dels principals marcadors de HSCs. En la Figura 22 es podia observar que les cèl·lules a fase 1 i descongelades presentaven un increment significatiu de l'expressió de *PCDH7* respecte a les cèl·lules de dia 12, però l'expressió d'altres marcadors característics de les HSCs com són *P75NTR*, *PDGFRβ* i *COL1α1* es mantia. D'altra banda, l'expressió del gen de quiescència *LRAT* era menor en les cèl·lules expandides i descongelades, mentre que l'expressió de marcadors d'activació com *ACTA2* i *LOX* era superior, tot i que només significatiu en el cas de les cèl·lules expandides. Aquests resultats indicaven que les iPSC-HSCs passades i descongelades mantenen el perfil d'expressió gènica característic de les HSCs, però suggerien que podien adquirir un fenotip més activat.

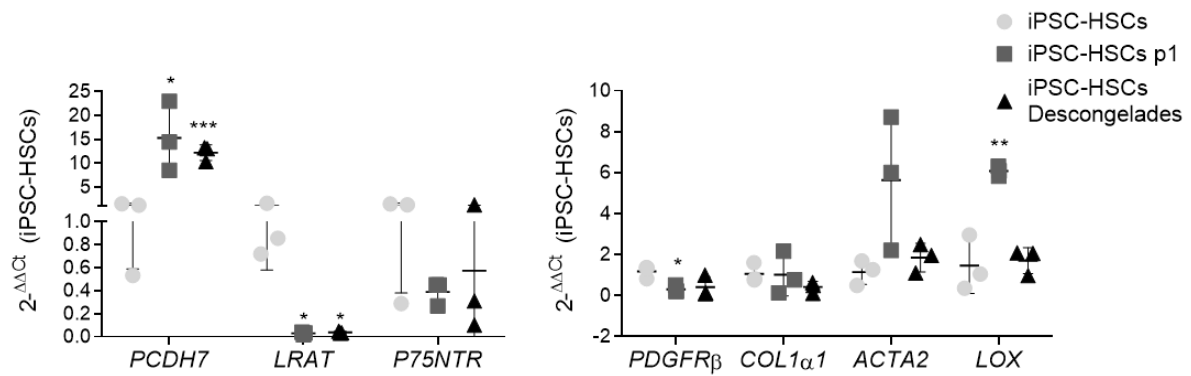


Figura 22. Expressió gènica de *PCDH7*, *LRAT*, *P75NTR*, *PDGFRβ*, *COL1α1*, *ACTA2* i *LOX* en les iPSC-HSCs a dia 12, iPSC-HSCs a pase 1 i iPSC-HSCs descongelades. Experiments realitzats en 3 diferenciacions independents. *p < 0.05 comparat amb iPSC-HSCs de dia 12 mitjançant t-test. Figura extreta de la publicació de Vallverdú et al., (2021) (145).

D'altra banda, l'expressió proteica dels marcadors de HSCs com RELN, RSP03 i VIPR1, (26), era similar en les iPSC-HSCs a dia 12 i les cèl·lules expandides a pase 1 (Figura 23). Tot i això, les immunofluorescències d'ambdós cultius cel·lulars indicaven l'existència de cèl·lules positives amb diferent grau d'expressió dels marcadors, així com de cèl·lules negatives per aquests. Els resultats suggerien la possible heterogeneïtat cel·lular prèviament observada en l'anàlisi de scRNA-seq i que podria estar associada al grau de diferenciació o maduresa de les iPSC-HSCs a dia 12 i pase 1.

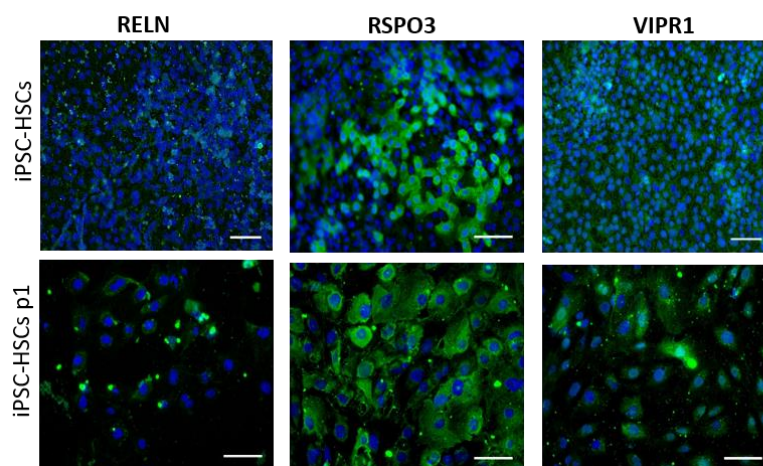


Figura 23. Imatges representatives de les immunofluorescències de RELN, RSP03 i VIPR1 en les iPSC-HSCs a dia 12 i expandides a pase 1 (Barra d'escala 100μm).

2. Estimulació de les iPSC-HSCs amb compostos pro-fibrogènics i pro-inflamatoris

Un cop descrit el perfil d'expressió de les iPSC-HSCs expandides i descongelades, es va avaluar si mantenien la capacitat de respondre envers un dany pro-fibrogènic i pro-inflamatori, una característica funcional prèviament descrita en les iPSC-HSCs (144). Les cèl·lules de dia 12, les iPSC-HSCs de fase 1 i descongelades, es van cultivar amb Medi d'Expansió, i un cop adquirida la confluència del 70%, es van estimular a diferents temps, amb agents pro-fibrogènics (TGF β) i pro-inflamatoris (*Lipopolysaccharide*, LPS i Sobrenedant de KCs primàries). Un esquema representatiu del procés d'estimulació es mostra en la Figura 24.

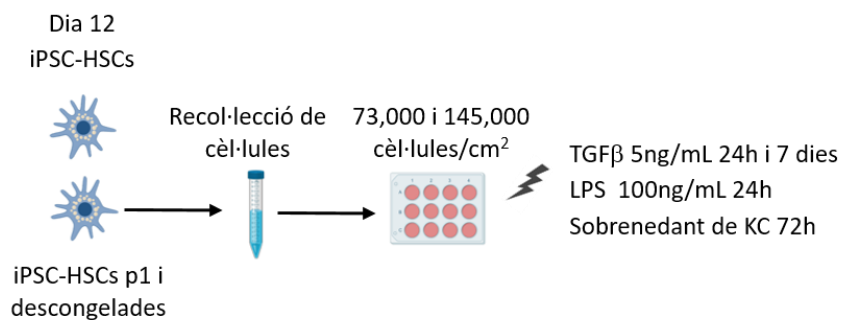


Figura 24. Esquema representatiu del procés d'estimulació de les iPSC-HSCs a dia 12, fase 1 i descongelades amb estímuls pro-fibrogènic (TGF β) durant 24 hores i 7 dies, i estímuls pro-inflamatoris; LPS durant 24 hores i sobrenedant de les cèl·lules de Kupffer durant 72 hores. Figura extreta i modificada de la publicació de Vallverdú et al., (2021) (145).

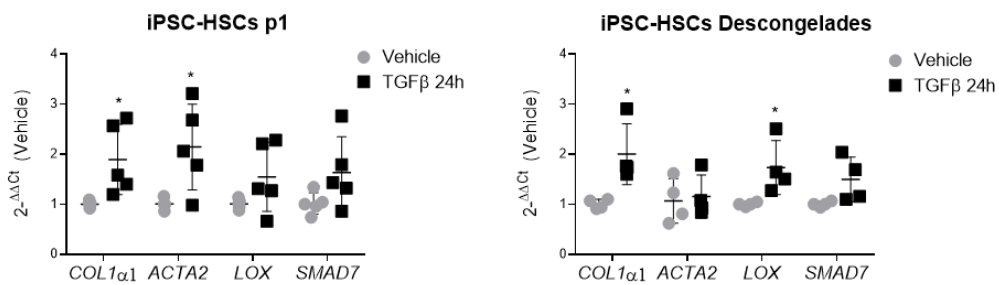
2.1. Resposta de les iPSC-HSCs a estímuls pro-fibrogènics

Per tal de determinar la capacitat de resposta de les iPSC-HSCs a fase 1 i descongelades a insults pro-fibrogènics, les cèl·lules es van tractar amb TGF β , la principal citocina pro-fibrogènica, durant 24 hores i 7 dies (51). En l'article publicat per Coll et al., (2018) es va demostrar que les cèl·lules a dia 12 s'activaven en estar exposades durant 24 hores a aquest estímul fibrogènic (144). Per tal de modelar un efecte més crònic, es va avaluar també, la seva capacitat de resposta a una estimulació de 7 dies.

Les iPSC-HSCs a fase 1 i descongelades estimulades amb TGF β (5ng/mL) durant 24 hores adquirien un fenotip activat incrementant significativament l'expressió dels marcadors

de *COL1α1*, *ACTA2* i *LOX*, i de manera no significativa *SMAD7* (Figura 25A). Tot i la modesta inducció de l'estat d'activació, el nivell d'expressió dels gens fibrogènics era similar a l'observat en les cèl·lules de dia 12 i les cèl·lules primàries (144). No obstant això, quan estaven exposades a TGFβ durant un període de temps més llarg, 7 dies, l'increment de l'expressió dels gens d'activació era superior a l'estimulació aguda (Figura 25B). Aquests resultats indicaven el potencial ús de les HSCs derivades de iPSCs per modelar *in vitro* la resposta fibrogènica aguda i crònica.

A.



B.

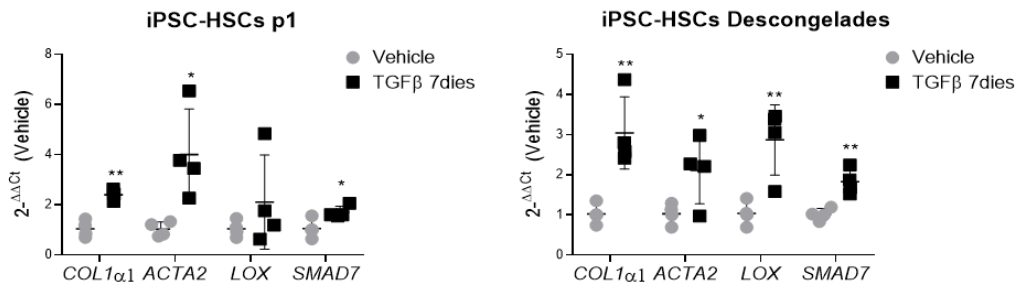


Figura 25. (A) Expressió gènica de *COL1α1*, *ACTA2*, *LOX* i *SMAD7* en iPSC-HSCs a pase 1 i descongelades tractades amb TGFβ (5ng/mL) durant 24 hores. Experiment realitzat en 4-5 diferenciacions independents. * $p < 0.05$ comparat amb les cèl·lules vehicle mitjançant t-test. (B) Expressió gènica de *COL1α1*, *ACTA2*, *LOX* i *SMAD7* en iPSC-HSCs a pase 1 i descongelades tractades amb TGFβ (5ng/mL) durant 7 dies. Experiment realitzat en 4 diferenciacions independents. * $p < 0.05$ comparat amb les cèl·lules vehicle mitjançant t-test. Figura extreta de la publicació de Vallverdú et al., (2021) (145).

2.2. Resposta de les iPSC-HSCs a estímuls pro-inflamatoris

Les iPSC-HSCs a fase 1 i descongelades es van tractar amb LPS per avaluar si mantenien la capacitat de resposta a factors pro-inflamatoris de forma similar a les iPSC-HSCs a dia 12 i les pHSCs (144) ,(237).

Com es mostra en la Figura 26A, les cèl·lules a fase 1, a l'estar exposades durant 24 hores amb LPS (100ng/mL), incrementaven de manera significativa l'expressió de *IL-6*, però no presentaven un increment significatiu de l'expressió de *MCP1* i *CCL20*. De manera similar, les iPSC-HSCs descongelades no variaven de manera significativa l'expressió de *CCL20*, *MCP1* i *IL-6* després del tractament de LPS (Figura 26B). Aquest fet podria estar associat a la gran variabilitat de resposta a aquest estímul, i per aquest motiu, les iPSC-HSCs es van exposar a un ambient inflamatori produït per les citocines secretades per les KCs.

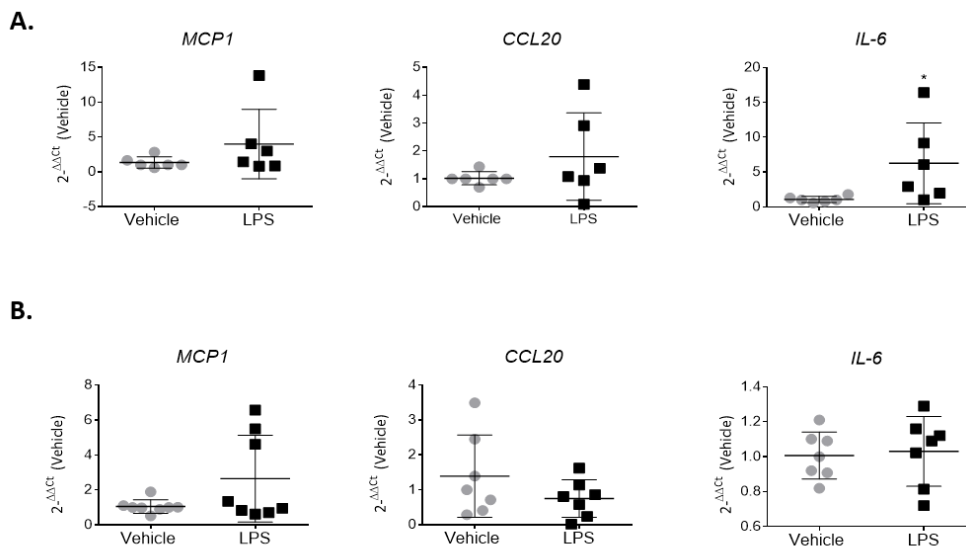


Figura 26. (A) Expressió gènica de *MCP1*, *CCL20* i *IL-6* en les iPSC-HSCs expandides fins a fase 1, i posteriorment tractades amb LPS (100ng/mL) durant 24 hores. Experiment realitzat en 3 diferenciacions independents. * $p < 0.05$ comparat amb les cèl·lules vehicle mitjançant t-test. (B) Expressió gènica de *MCP1*, *CCL20* i *IL-6* en les iPSC-HSCs descongelades tractades amb LPS (100ng/mL) durant 24 hores. Experiment realitzat en 4 diferenciacions independents. * $p < 0.05$ comparat amb les cèl·lules vehicle mitjançant t-test.

Així doncs, les iPSC-HSCs a fase 1 es van tractar durant 72 hores amb el sobrenedant de KCs aïllades de pacients “control” i cirròtics, per avaluar si les iPSC-HSCs cultivades en un ambient inflamatori eren capaces de respondre al dany induint l’expressió de gens inflamatoris i fibrogènics.

Les iPSC-HSCs tractades amb les dues condicions presentaven un increment de l’expressió de marcadors inflamatoris com *MCP1*, *CCL20* i *IL-6*, sent fins i tot major en les cèl·lules tractades amb el sobrenedant de les KCs cirròtiques (Figura 27A). D’altra banda, l’expressió d’alguns marcadors fibrogènics com *ACTA2*, *COL1 α 1* i *LOX* es mantenia o incrementava de manera no significativa (Figura 27B). Per tant, aquests resultats suggereien que tot i que les iPSC-HSCs podien respondre a estímuls pro-inflamatoris, la resposta de les iPSC-HSCs expandides i descongelades era limitada i menor que les cèl·lules primàries.

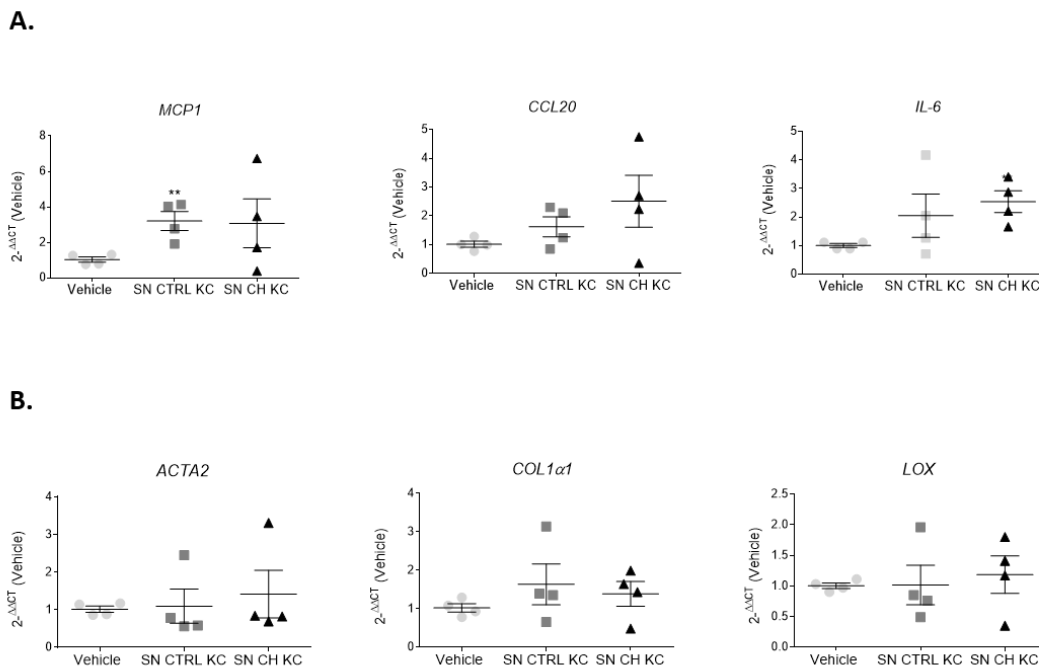


Figura 27. (A) Expressió gènica de marcadors inflamatoris (*MCP1*, *CCL20* i *IL-6*) en les iPSC-HSCs a fase 1 tractades amb el sobrenedant de KCs aïllades de pacients “controls” (SN CTRL KC) i de pacients cirròtics (SN CH KC) durant 72 hores. $p < 0.05$ comparat amb el vehicle que són les iPSC-HSCs cultivades amb el medi basal de les KCs (RPMI). (B) Expressió de marcadors fibrogènics (*ACTA2*, *COL1 α 1* i *LOX*) en iPSC-HSCs a fase 1 tractades amb el sobrenedant de KCs aïllades de pacients “controls” i cirròtics. Ambdós experiments s’han realitzat en 2 diferenciacions independents amb duplicats. * $p < 0.05$ comparat amb el vehicle que són les iPSC-HSCs cultivades amb el medi basal de les KCs (RPMI).

3. Ús de les iPSC-HSCs pel cribratge de fàrmacs anti-fibrogènics

En els últims anys, les línies cel·lulars i HSCs primàries han estat àmpliament utilitzada pel cribratge de fàrmacs anti-fibrogènics (238). Per aquest motiu, es va avaluar el potencial de les iPSC-HSCs pel cribratge de diferents fàrmacs que es troben en estadi d'assaig clínic.

Les iPSC-HSCs de fase 1 es van tractar amb tres compostos. En primer lloc, les iPSC-HSCs es van tractar amb Elafibranor (20uM), un agonista de PPAR α i PPAR δ utilitzat com a tractament per la malaltia grassa no alcohòlica (239), durant 24 hores. Les cèl·lules tractades presentaven una reducció significativa de l'expressió de *COL1 α 1*, *ACTA2* i *LOX* indicant l'efecte anti-fibrogènic d'aquest compost (Figura 28A).

A més, les iPSC-HSCs de fase 1 es van tractar amb dos compostos anti-fibrogènics estan desenvolupats com a possibles fàrmacs pel tractament de la malaltia de fetge gras no alcohòlica. Les cèl·lules es van exposar durant 24 hores i a tres concentracions diferents, i es va avaluar l'expressió gènica de marcadors d'activació de les HSCs. El compost GS-834356, un inhibidor de *Acetyl-CoA carboxylase* (ACCi), induïa una clara reducció de l'expressió de *ACTA2* en les tres concentracions, mentre que no hi havia canvis significatius en l'expressió dels altres dos marcadors fibrogènics, *COL1 α 1* i *LOX* (Figura 28B). D'altra banda, el segon compost, GS-836644, un inhibidor de *Glutaminase* (GLS1i) generava l'augment significatiu de *LOX*, però no presentava cap efecte en l'expressió de *COL1 α 1* i *ACTA2* (Figura 28C). Tots aquests resultats indicaven que les HSCs diferenciades podrien ser utilitzades pel cribratge d'alguns fàrmacs, però per tal de poder-ho confirmar, s'hauria d'augmentar el nombre de diferenciacions i fer una caracterització més exhaustiva del fenotip obtingut de les cèl·lules tractades.

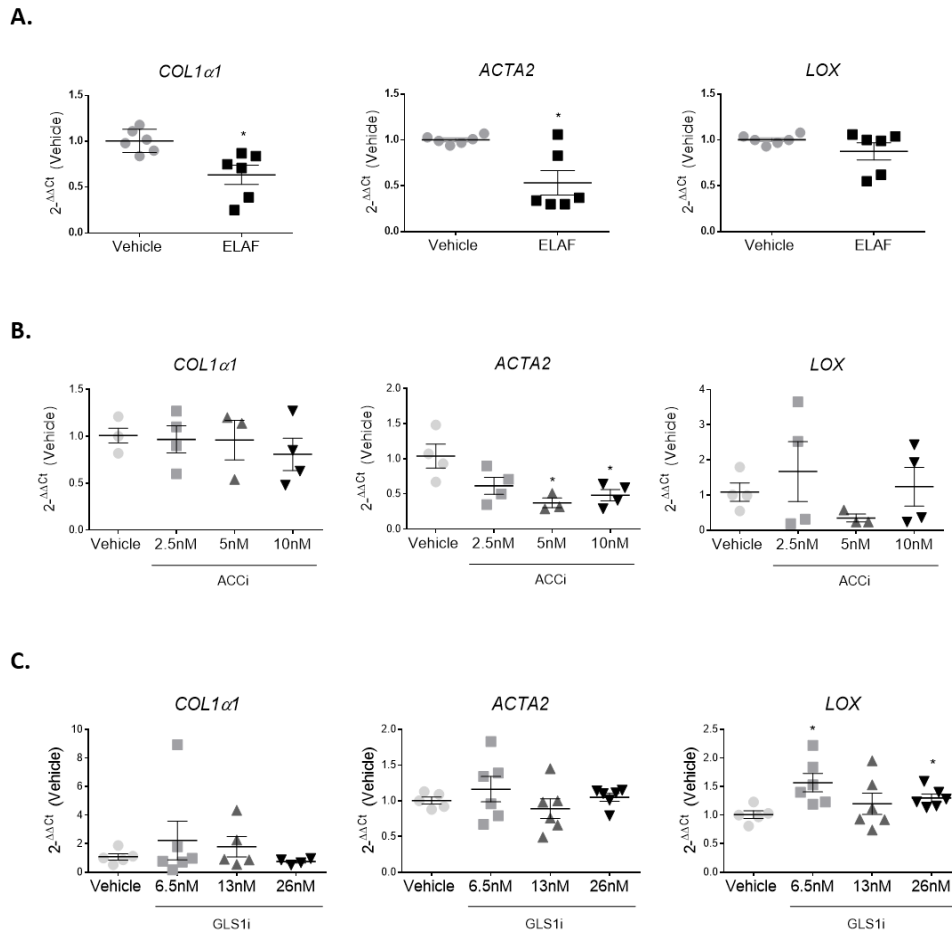


Figura 28. (A) Expressió gènica de *COL1α1*, *ACTA2* i *LOX* en iPSC-HSCs tractades amb 20uM de Elafibranor durant 24 hores. L'experiment s'ha realitzat en 3 diferenciacions independents. * $p < 0.05$ comparat amb el vehicle mitjançant t-test. (B) Expressió gènica de *COL1α1*, *ACTA2* i *LOX* en iPSC-HSCs a fase 1 tractades amb el compost GS-834356 (ACCi) a la concentració de 2.5nM, 5nM i 10nM. Experiment realitzat en 2 diferenciacions independents i duplicats. * $p < 0.05$ comparat amb el vehicle mitjançant t-test. (C) Expressió gènica de *COL1α1*, *ACTA2* i *LOX* en iPSC-HSCs a fase 1 tractades amb el compost GS-836644 (GLS1i) a la concentració de 6.5nM, 13nM i 26nM. Experiment realitzat en 2 diferenciacions independents i duplicats. * $p < 0.05$ comparat amb el vehicle mitjançant t-test.

4. Co-cultiu de les iPSC-HSCs amb hepatòcits

Un aspecte clau del modelatge de la malaltia *in vitro* és la realització de sistemes multicel·lulars en 3D. Per aquest motiu, es va avaluar si les HSCs derivades de iPSCs es podien co-cultivar amb diferents fonts cel·lulars d'hepatòcits, diferents estratègies de cultiu cel·lular en 3D, i diferent nombre i proporció de cèl·lules que el sistema descrit en la publicació de Coll et al., (2018) (144).

En aquest estudi es va demostrar la capacitat de les iPSC-HSCs en agrupar-se amb hepatòcits derivats de iPSCs, hepatòcits primaris i altres línies cel·lulars com les HUH7, així com en diferents estratègies com *Hanging drop* i en plaques no adherents amb agitació i sense, seguint la metodologia descrita en la Figura 29. A més, a l'incrementar el nombre de cèl·lules (4,000 cèl·lules/esferoide) i canviar les proporcions cel·lulars a 2 Hepatòcits: 1 HSC, en lloc de les condicions descrites en la publicació de Coll et al., (2018) (144) (2,000 cèl·lules/esferoide i 2 HSCs: 1 Hepatòcit), les cèl·lules mantien la capacitat de formar esferoides. Per tant, aquests resultats suggerien que les iPSC-HSCs podien ser utilitzades en una alta varietat de models *in vitro* complexos.

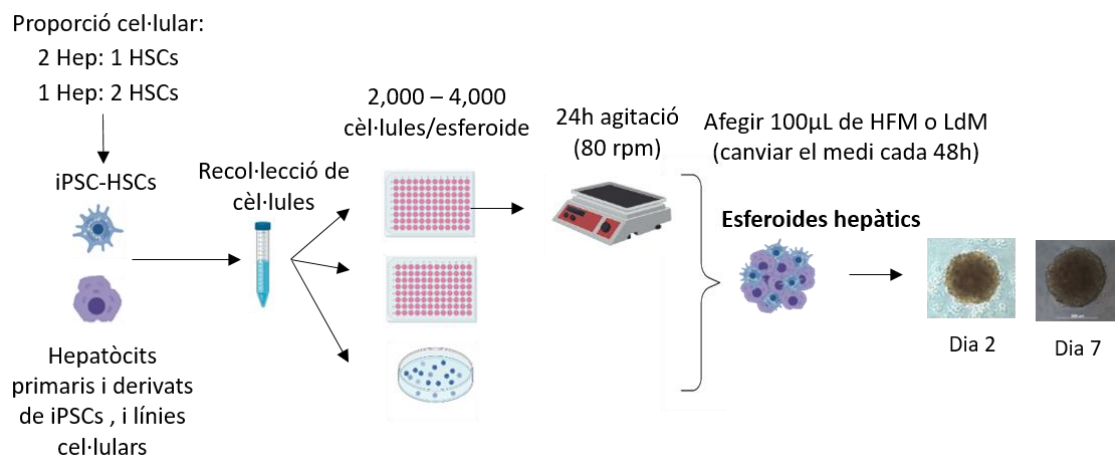


Figura 29. Esquema representatiu del procés de generació d'esferoides hepàtics de iPSC-HSCs amb hepatòcits primaris, línies cel·lulars (HUH7 i HepaRG) i derivats de iPSCs a diferents proporcions cel·lulars, nombre de cèl·lules per esferoide i estratègies de cultiu. Figura extreta i modificada de la publicació de Vallverdú et al., (2021) (145).

Per tant, les iPSC-HSCs es podien expandir i criopreservar mantenint el fenotip característic de les HSCs i la capacitat de resposta a estímuls pro-fibrogènics. A més, podien ser utilitzades pel cribratge de fàrmacs anti-fibrogènics, i es podien co-cultivar amb hepatòcits en diferents condicions de cultiu permetent sent aplicables en una gran diversitat d'estudis *in vitro*. Aquestes característiques posaven de manifest que les HSCs derivades de iPSCs podrien representar una nova font de HSCs per realitzar estudis *in vitro* pel modelatge de malalties hepàtiques i el cribratge de fàrmacs anti-fibrogènics.

OBJECTIU 3: DESENVOLUPAR UNA LÍNIA DE iPSCS AMB EL POLIMORFISME DE HSD17B13 PER TAL DE MODELAR IN VITRO LA MALALTIA HEPÀTICA

L'últim objectiu de la tesi doctoral comprenia la generació d'una línia de iPSCs que presentés la variant del gen HSD17B13, una proteïna truncada amb efecte protector en la progressió de les malalties hepàtiques cròniques (195), per estudiar *in vitro* el seu paper en la malaltia de fetge gras no alcohòlica.

1. Generació de la línia de iPSCs amb la variant del gen HSD17B13

Per generar una línia de iPSCs que presentés sobreexpressada la proteïna truncada de HSD17B13, es va utilitzar la línia de iPSCs Sigma-FRT que permetia l'intercanvi de la seqüència d'interès en el casset integrat en el locus AAVS1 del genoma de les iPSCs mitjançant la recombinació homòloga generada per enzims flipasa. Aquest sistema publicat per Ordovás et al., (2015) permetia expressar el transgèn de manera induïble i estable sense afectar el fenotip pluripotent de les iPSCs (229).

Com es mostra en la Figura 30, les iPSCs presentaven integrat el casset de recombinació en el primer intró del gen PPP1R12C considerat com a *Safe harbor*. El casset estava delimitat per les seqüències FRT que permetien la recombinació homòloga amb el casset del plasmidi HC3x, i a més, tenia integrat una seqüència de GFP i per la selecció negativa al afegir FIAU. D'altra banda, el plasmidi HC3x prèviament generat, presentava la seqüència truncada del gen HSD17B13 entre les seqüències FRT, la seqüència del gen de resistència a la Puomicina per la selecció positiva, i la seqüència m2rtTA per la inducció de l'expressió del gen d'interès en afegir doxiciclina.

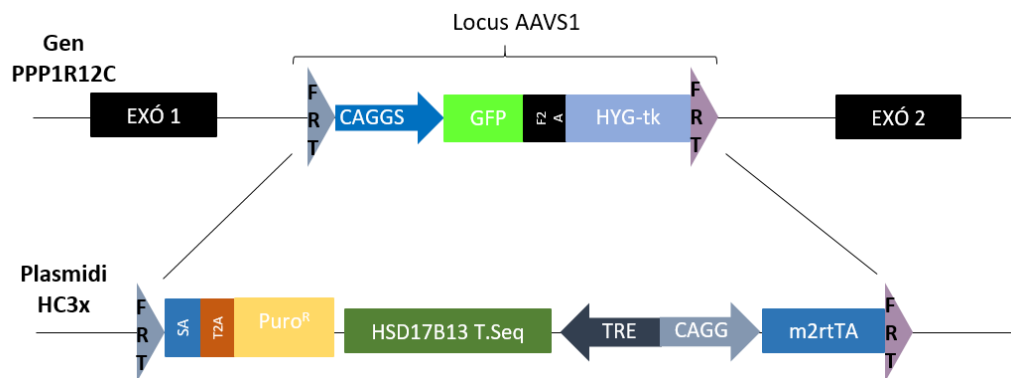


Figura 30. Representació del cassat present al gen PPP1R12C i el plasmidi HC3x, que mitjançant recombinació homòloga per enzims flipasa, permeten integrar la seqüència truncada de HSD17B13 en el genoma de les iPSCs.

Per tal de generar el plasmidi, primer de tot es va generar la seqüència truncada del gen HSD17B13 afegint el codó *stop* TGA a l'inici de l'exó 7 creant la ruptura del marc de lectura i produint la proteïna truncada. Posteriorment, es va digerir el plasmidi i la seqüència d'interès es va integrar mitjançant la lligació de Gibson. Un cop obtingut el plasmidi, es va transforar a bacteris competents, i es va realitzar la seqüenciació de Sanger seleccionant la colònia bacteriana que presentava una correcta clonació del plasmidi (Figura 3 de l'Annex 3). Les iPSCs es van nucleofectar amb el plasmidi i enzims flipasa, i es va realitzar la selecció positiva amb Puromicina i negativa amb Fiau.

Després de la selecció negativa, es va avaluar per citometria de flux l'expressió de GFP per determinar si s'havia produït la correcta recombinació. Com es pot veure en la Figura 31, les iPSC Sigma-FRT presentaven un marcatge positiu de GFP del 99.8%, mentre que les iPSCs obtingudes de la selecció positiva i negativa (iPSC-HSD17B13) perdien l'expressió de GFP fins a obtenir un percentatge del 0.01% similar a les Sigma iPSCs, una línia control. Aquests resultats indicaven la correcta recombinació i integració del cassat que contenia la seqüència truncada de HSD17B13, en el locus AAVS1 dels dos al·lels.

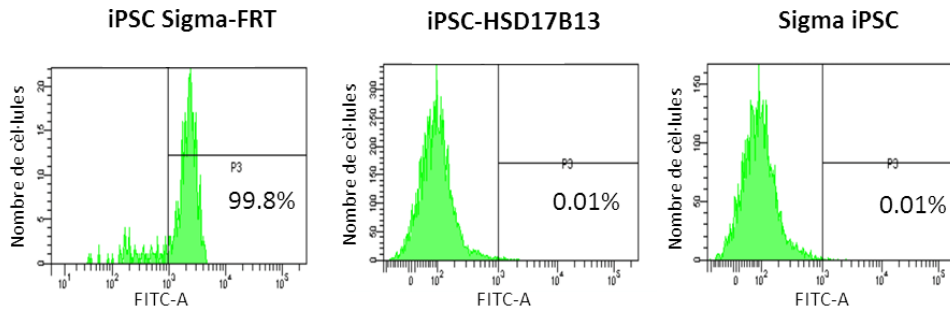


Figura 31. Diagrama representatiu de l'expressió de GFP en les iPSCs Sigma-FRT, iPSC-HSD17B13 i Sigma iPSCs avaluada per citometria de flux.

Posteriorment, les iPSC-HSD17B13 es van tractar durant 3 dies amb doxiciclina per avaluar l'eficiència de la inducció de l'expressió del casset integrat. Com es pot observar en la Figura 32, les cèl·lules tractades presentaven un increment de l'expressió gènica de la seqüència truncada de HSD17B13 (*HSD17B13 T.Seq*) de fins a 300 vegades més que les cèl·lules vehicle.

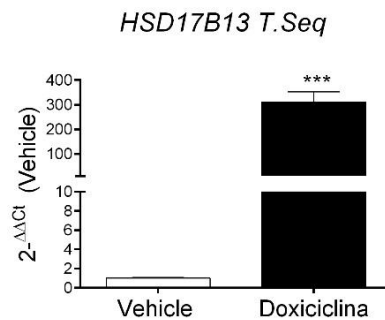


Figura 32. Expressió gènica de la seqüència truncada de HSD17B13 en les iPSC-HSD17B13 tractades amb doxiciclina durant 3 dies. Experiment realitzat en 3 iPSC-HSD17B13 a diferents passes. * $p < 0.05$ comparat amb les cèl·lules vehicle mitjançant t-test.

2. Expressió del gen HSD17B13 en iPSCs, HSCs i hepatòcits primaris

S'ha descrit que el gen HSD17B13 es troba expressat en hepatòcits (195), però es desconeix la seva expressió en HSCs i iPSCs. Per aquest motiu, es va avaluar el nivell d'expressió del gen HSD17B13 en aquestes tres poblacions cel·lulars. Els resultats indicaven una baixa expressió del gen en iPSCs, mentre que els hepatòcits l'expressaven a un alt nivell. En el cas de les HSCs primàries, no es va detectar l'expressió del gen

d'interès (Figura 33). A més, es va avaluar la seva expressió en diferents passes de les HSCs per determinar si el grau d'expressió depenia de l'activació cel·lular, però l'expressió continuava sent nul·la.

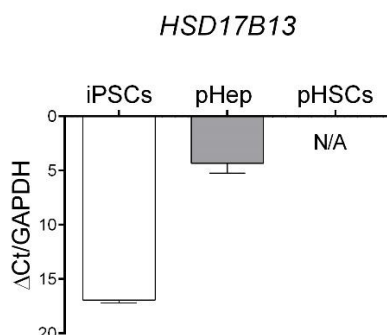


Figura 33. Expressió gènica de HSD17B13 en iPSC, hepatòcits i HSCs primàries. Experiment realitzat en una n=2 de cada mostra i expressat en nivell d'expressió ($\Delta\Delta Ct$ en comparació al gen endogen GAPDH).

3. Sobreexpressió de la variant HSD17B13 en hepatòcits derivats de iPSCs

Un cop generada la línia de iPSCs amb la integració de la seqüència truncada del gen HSD17B13, les cèl·lules es van diferenciar a hepatòcits i HSCs.

Per l'obtenció d'hepatòcits a partir de iPSCs es va seguir el protocol publicat per Roelandt et al., (2010) i Roelandt et al., (2013) que consistia en cultivar les iPSCs amb diferents factors de creixement relacionats amb el desenvolupament embrionari de la població parenquimal hepàtica durant 20 dies (118), (119). Concretament, quan les iPSCs adquirien una confluència del 80%, el Medi E8 es va substituir per LdM amb Wnt3A i Activin A, i al cap de dos dies, es va eliminar el Wnt3A i es va mantenir l'Activin A per induir la diferenciació a endoderma definitiu. A dia 4 del protocol, es va afegir BMP4 fins a dia 8 que es va substituir per FGF1 obtenint una població similar a l'hepatoblast. Finalment, a dia 12 es va afegir HGF fins a dia 20 per la generació d'una població amb característiques d'hepatòcits humans anomenats com iPSC-Hep. Per la sobreexpressió de la seqüència truncada de HSD17B13, es va afegir doxiciclina (Doxi) a dia 4 i es va mantenir fins al final del protocol. Un esquema representatiu del protocol de diferenciació es mostra en la Figura 34.

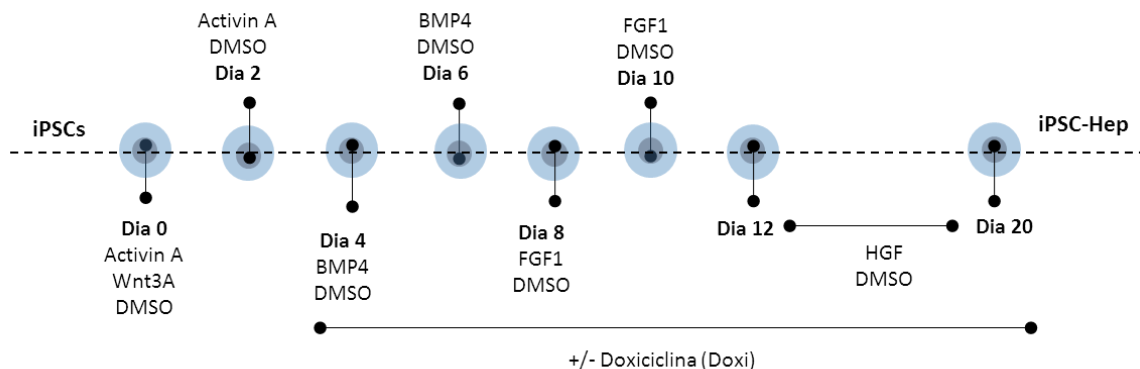


Figura 34. Esquema del protocol de diferenciació de iPSCs a hepatòcits indicant les citocines i factors de creixement utilitzats durant els 20 dies del protocol; Activin A, Wnt3A, BMP4, FGF1, HGF, DMSO. A partir de dia 4 fins al final de la diferenciació, les cèl·lules es tractaven amb doxiciclina (Doxi) per induir la sobreexpressió del gen d'interès.

Un cop establert el protocol, primer de tot es va avaluar si la sobreexpressió de la seqüència truncada de HSD17B13 incrementava a partir de dia 4 i es mantenia fins a punt final de la diferenciació. Com es pot observar a la Figura 35, les cèl·lules tractades amb doxiciclina presentaven un augment de l'expressió gènica de la seqüència truncada de HSD17B13. Concretament, a dia 6 del protocol es detectava un augment, però no significatiu, de l'expressió de la variant que disminuïa al llarg de la diferenciació, detectant-se a punt final fins a 50 vegades més expressat que les cèl·lules sense tractar. Aquest resultat indicava que amb el tractament de doxiciclina hi havia una gran inducció de l'expressió del gen d'interès.

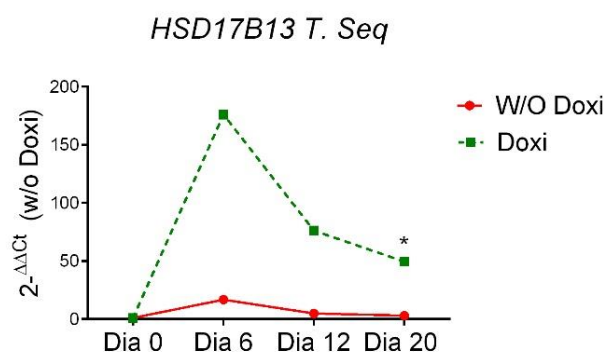


Figura 35. Expressió gènica de la seqüència truncada de HSD17B13 (HSD17B13 T.Seq) a dia 0, 6, 12 i 20 de la diferenciació a hepatòcits sense el tractament de doxiciclina (W/O Doxi, línia vermella) i amb tractament de doxiciclina (Doxi, línia verda) a partir de dia 4. Experiment realitzat en 2 diferenciacions independents. *p < 0.05 comparat amb dia 0 de cada diferenciació corresponent mitjançant t-test.

Després de la validació del sistema d'inducció de l'expressió del transgèn, es va analitzar l'expressió gènica de marcadors característics d'hepatòcits a diferents dies del cultiu amb doxiciclina i sense. D'aquesta manera es va avaluar si la sobreexpressió de la variant HSD17B13 tenia algun efecte en el procés de diferenciació de cèl·lules mare a hepatòcits i/o en la maduració de la població final obtinguda.

El nivell d'expressió dels principals marcadors d'hepatòcits com *ALB*, *CYP3A4*, *HNF4 α* , *SERPINA1* i *ASGR1* era similar entre la diferenciació amb estimulació de doxiciclina i sense. El nivell d'expressió dels 5 marcadors augmentava al llarg de la diferenciació, sent la població final, el punt de màxima d'expressió (Figura 36). Per tant, aquests resultats indicaven que mitjançant aquest protocol de diferenciació s'obtenia cèl·lules amb un perfil d'expressió gènica característic de la població parenquimal, i que a punt final de la diferenciació, els iPSC-Hep amb la variant mantenien l'expressió dels marcadors d'hepatòcits. A més, aquests resultats suggerien que el polimorfisme de HSD17B13 no tenia cap efecte en la diferenciació d'endoderma definitiu fins a hepatòcits.

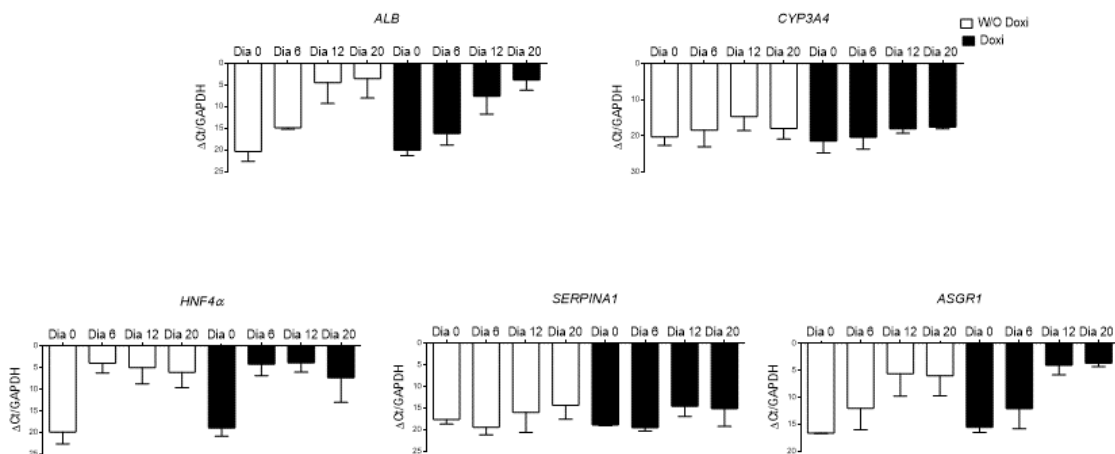


Figura 36. Expressió gènica de *ALB*, *CYP3A4*, *HNF4 α* , *SERPINA1* i *ASGR1* a diferents dies del protocol de diferenciació de iPSCs a hepatòcits sense el tractament de doxiciclina (W/O Doxi, barres blanques) i amb doxiciclina (Doxi, barres negres) a partir de dia 4. Experiment realitzat en 2 diferenciacions independents i expressat en nivell d'expressió ($\Delta\Delta$ Ct en comparació al gen endogen GAPDH).

4. Estimulació d'hepatòcits derivats de iPSC-HSD17B13 amb medi lipotòxic per modelar *in vitro* la malaltia de fetge gras no alcohòlica.

Com a prova de concepte, es va avaluar si la presència de la seqüència truncada de HSD17B13 tenia un efecte protector en hepatòcits exposats a un dany lipotòxic. Per aquest motiu, els iPSC-Heps amb doxiciclina i sense, es van estimular amb Àcid Palmític i Àcid Oleic a una proporció 2:1 durant 72 hores per induir un estadi d'estatòsi i inflamació, dos factors característics de la malaltia de fetge gras no alcohòlica (214), (215).

Com es pot observar a la Figura 37, els iPSC-Hep sense la sobreexpressió de la seqüència truncada de HSD17B13 (W/O Doxi) presentaven un augment dels marcadors d'inflamació (*CXCL8*, *IL-6* i *TNF- α*) així com del gen apoptòtic *BAX* després de l'estimulació amb el medi lipotòxic (FFA, *Free fatty acids*). No obstant, els hepatòcits amb la variant de HSD17B13 (Doxi) presentaven una tendència a la disminució de l'expressió de *IL-6*, *CXCL8* i *TNF- α* indicant el seu possible paper protector envers una situació d'esteatosi i inflamació hepàtica. Aquest estudi es va realitzar en dues diferenciacions independents amb triplicats, i al presentar una gran variabilitat de resposta, s'hauria d'incrementar el nombre de diferenciacions per poder extreure una conclusió més robusta. A més, es podrien realitzar estudis més complexos com el cocultiu d'aquests hepatòcits amb HSCs, i determinar l'efecte protector envers el desenvolupament de la fibrosi hepàtica mediada per les HSCs.

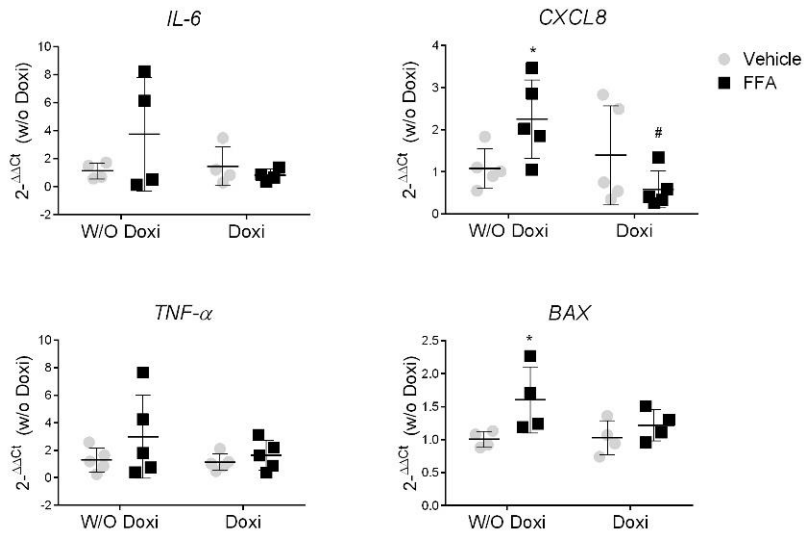


Figura 37. Expressió gènica de *IL-6*, *CXCL8*, *TNF- α* i *BAX* en hepatòcits derivats de iPSCs amb la sobreexpressió de la seqüència truncada de HSD17B13 (Doxi) i sense la sobreexpressió (W/O Doxi) estimulats amb medi lipotòxic (FFA) durant 72 hores. Experiment realitzat en 2 diferenciacions independents i triplicats. *p < 0.05 comparat amb les cèl·lules vehicle mitjançant t-test. #p < 0.05 comparats els iPSC-Heps W/O Doxi i els iPSC-Heps Doxi estimulats amb FFA mitjançant t-test.

5. Sobreexpressió de HSD17B13 en HSCs derivades de iPSCs

Tot i que les HSCs que havíem analitzat no presentaven l'expressió de HSD17B13, no es podia descartar que en situacions patogèniques es doni l'expressió d'aquesta proteïna en aquesta població no-parenquimal. Per tant, es va avaluar quin impacte podria tenir l'expressió de la seqüència truncada de HSD17B13 en les HSCs. Per fer-ho, les iPSCs es van diferenciar a HSCs seguint el protocol descrit pel nostre grup, Coll et al., (2018) (144) i Vallverdú et al., (2021) (145), amb l'única diferència que a dia 4 es va afegir la doxiciclina per induir la sobreexpressió de la seqüència truncada de HSD17B13. Tal i com es va observar en els hepatòcits derivats de iPSCs, les HSCs diferenciades tractades amb doxiciclina augmentaven l'expressió de HSD17B13 T.Seq, sent a dia 12 del protocol, 20 vegades superior que les iPSC-HSCs controls (Figura 38). Aquests resultats suggerien que el sistema de recombinació homòloga mitjançant enzims flipasa, era una bona estratègia per sobreexpressar gens d'interès i generar cèl·lules diferenciades amb l'expressió estable d'un gen concret.

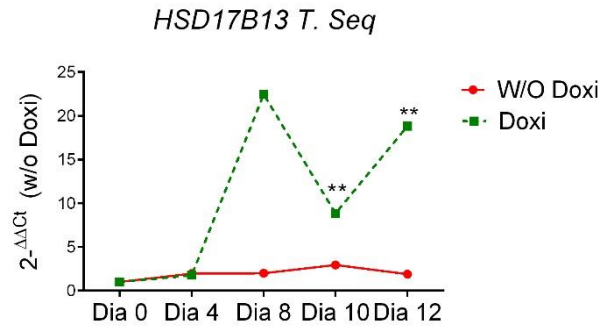


Figura 38. Expressió gènica de la seqüència truncada de HSD17B13 (HSD17B13 T.Seq) a dia 0, 4, 8, 10 i 12 de la diferenciació de iPSCs a HSCs sense el tractament de doxiciclina (W/O Doxi, línia vermella) i amb tractament de doxiciclina (Doxi, línia verda) a partir de dia 4. Experiment realitzat en 2 diferenciacions independents. * $p < 0.05$ comparat amb dia 0 de cada diferenciació mitjançant t-test.

Seguidament es va avaluar l'expressió d'alguns gens característics de les HSCs a diferents punts de la diferenciació amb doxiciclina i sense. Com es pot observar a la Figura 39, el nivell d'expressió de *PDGFRβ*, *LRAT*, *PCDH7* i *RELN* augmentava en ambdós condicions de manera semblant, suggerint que la sobreexpressió de la variant de HSD17B13 no tenia un efecte directe en el desenvolupament embrionari de les HSCs. A més, si ens fixavem en la població final, s'observava que les iPSC-HSCs amb la modificació genètica expressaven els gens característics de HSCs al mateix nivell que les cèl·lules controls, indicant que la variant no tenia cap efecte en la maduració i/o l'activació de les HSCs obtingudes a punt final de la diferenciació.

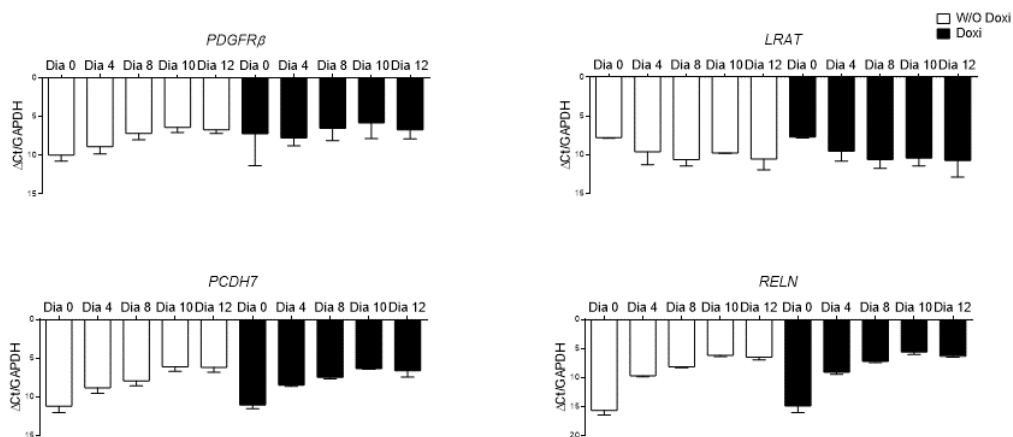


Figura 39. Expressió gènica de *PDGFRβ*, *LRAT*, *PCDH7* i *RELN* a diferents dies del protocol de diferenciació de iPSCs a HSCs sense el tractament de doxiciclina (W/O Doxi, barres blanques) i amb doxiciclina (Doxi, barres negres) a partir de dia 4. Experiment realitzat en 2 diferenciacions independents i expressat en nivell d'expressió ($\Delta\Delta C_t$ en comparació al gen endogen GAPDH).

Aquests resultats suggereixen que les iPSCs representen una bona eina per modelar *in vitro* l'efecte de polimorfismes associats a malalties hepàtiques. En aquest cas, el sistema de recombinació homòloga mediada per enzims flipasa, permetia introduir, de manera estable, la seqüència truncada de HSD17B13 en el genoma de les iPSCs, i poder-les diferenciar a hepatòcits i HSCs. Ambdues poblacions hepàtiques, tot i presentar la sobreexpressió de la variant, mantenien el seu perfil d'expressió gènica. A més, els hepatòcits, a l'estar tractats amb un medi lipotòxic, presentaven un menor dany inflamatori i hepatocitari que els hepatòcits controls suggerint la reproducció *in vitro* de l'efecte protector de la variant. Tot i això, aquests resultats són preliminars i es requeriria un estudi més exhaustiu incorporant assaigs funcionals i models *in vitro* complexos per determinar els mecanismes d'aquest efecte protector.

DISCUSSIÓ



En aquesta tesi doctoral s'ha demostrat el potencial de les cèl·lules derivades de iPSCs pel modelatge *in vitro* de la fisiologia i fisiopatologia hepàtica. Primer de tot, s'ha caracteritzat el protocol de diferenciació de les iPSCs a cèl·lules estrellades hepàtiques (iPSC-HSCs), s'han avaluat les aplicacions de les HSCs diferenciades, i per últim, s'ha generat una línia de iPSCs amb la variant genètica del gen HSD17B13 per modelar *in vitro* la malaltia de fetge gras no alcohòlica. A més, la caracterització a nivell de scRNA-seq que s'està duent a terme de les iPSC-HSCs, mostra el seu potencial per estudiar la plasticitat de les diferents poblacions de HSCs i identificar per quins mecanismes moleculars adopten el seu fenotip i funcionalitat.

El protocol de diferenciació de les iPSCs a HSCs permet obtenir en 12 dies, una població final amb característiques similars a les HSCs primàries, les cèl·lules de referència pel modelatge *in vitro* de la fibrosi hepàtica i cribratge de fàrmacs anti-fibrogènics. En els últims anys s'han generat altres protocols per l'obtenció de HSCs o cèl·lules mesenquimals basats en diferenciacions dirigides o protocols de co-diferenciació (154), (155), (156). Aquests estan enfocats a generar cèl·lules mesenquimals per induir la maduració de la població parenquimal en una situació de co-cultiu. Tot i ser útils per modelar *in vitro* la fisiologia i les malalties hepàtiques, el grau de caracterització de les HSCs diferenciades és molt limitat impeding la comparació directa d'aquests protocols amb el nostre, i dificultant la seva aplicació en certs assaigs *in vitro*.

El nostre protocol de diferenciació es basa en l'estimulació de les iPSCs amb factors implicats en el desenvolupament de cèl·lules mesenquimals/mesotelials com són la família de BMPs (146), (147) i els factors de creixement FGFs (148), (149), (150), (240), i posteriorment, l'addició de factors implicats en la maduració de les HSCs com són l'Àcid Palmític i el Retinol (108), (109). L'estudi d'expressió gènica va mostrar clarament que al llarg dels 12 dies de la diferenciació, els marcadors de pluripotència disminueixen, mentre que els marcadors característics de les HSCs augmentaven. A més, vam identificar que les cèl·lules a dia 4-8 del protocol expressaven gens mesenquimals i mesotelials/submesotelials. Aquests resultats concordaven amb resultats previs del grup on es descrivia l'obtenció a dia 4 d'una població KDR⁺ NCAM⁺, mentre que a dia 8 s'obtenien poblacions ALCAM⁺ P7NTR⁺ / ALCAM⁺ DES⁺ (144). De manera similar, l'anàlisi de seqüenciació de RNA de *single-cell* de mostres de dia 0, 4 i 12, va mostrar l'adquisició

de poblacions mesotelials i mesenquimals a punts intermedis del protocol, dues poblacions descrites en el desenvolupament embrionari i en l'especificació del llinatge cel·lular de les HSCs en estudis en models animals (108), (109). Aquests resultats suggerien que la diferenciació de les iPSC-HSCs podria passar per un estadi intermedi de cèl·lules immadures que correspondria a etapes del desenvolupament embrionari de les HSCs, i per tant, que el protocol mimetitzava, fins a cert punt, algunes de les fases del desenvolupament.

Un dels estudis d'aquesta tesi doctoral que està aportant més informació al protocol de diferenciació, però també a la fisiologia de les HSCs, és l'estudi de scRNA-seq. Aquest estudi s'està portant a terme i els primers resultats obtinguts s'han inclòs en aquesta tesi doctoral. Com era d'esperar, l'anàlisi de scRNA-seq va identificar que les cèl·lules de dia 0 eren cèl·lules pluripotents que s'agrupaven en tres clústers diferenciats per l'estadi de cicle cel·lular en el qual es trobaven les cèl·lules. Tot i això, els tres estaven enriquits en la signatura gènica de pluripotència extreta de la base de dades de PanglaoDB (231) apuntant que en l'inici de la diferenciació les cèl·lules tenien un fenotip homogeni. Aquesta signatura de pluripotència es trobava enriquida en les mostres de dia 0, però també en alguna població de dia 4 (clúster 5), i era absent en les cèl·lules de dia 12, demostrant que la pluripotència es perdia al llarg de la diferenciació cel·lular. Aquesta homogeneïtat fenotípica evolucionava a una heterogeneïtat cel·lular observada tant a dia 4 com a dia 12 del protocol, on es va detectar un alt nombre de subpoblacions.

Pel que fa a les cèl·lules avaluades de dia 4, es trobaven classificades principalment en quatre estadis fenotípics; cèl·lules pluripotents (clúster 5), cèl·lules endotelials (clústers 3, 5 i 7), cèl·lules mesotelials (clústers 3 i 7) i cèl·lules mesenquimals (clúster 7). Les cèl·lules pluripotents del clúster 5 es localitzaven en el UMAP properes a les cèl·lules pluripotents de dia 0, mentre que les cèl·lules mesotelials dels clústers 3 i 7 es situaven entremig de les cèl·lules indiferenciades i les cèl·lules diferenciades. Aquests dos clústers mesotelials es distingien pel grau de diferenciació, sent el clúster 3 cèl·lules mesotelials amb l'expressió d'alguns gens endotelials, mentre que el clúster 7, tot i preservar el perfil mesotelial i endotelial, tenien cèl·lules amb un fenotip mesenquimal. Concretament, les cèl·lules del clúster 7 amb el perfil endotelial corresponien a aquelles cèl·lules de dia 4, mentre que les cèl·lules mesenquimals eren aquelles presents a dia 12

del protocol de diferenciació. El fet de tenir a dia 4 poblacions tant amb un perfil mesodèrmic com endodèrmic podria estar causat pel fet que les cèl·lules, en aquest punt del protocol, estaven tractades només amb BMP4, un factor de creixement essencial pel desenvolupament embrionari de cèl·lules de diferents capes germinals (116), (117), (118), (119), (141), (142). A més, s'ha descrit que les cèl·lules mesenquimals, a part de derivar d'una població mesotelial del *STM* (108), (109) poden derivar d'una població meso-endotelial progenitora bipotent amb la capacitat de donar lloc a cèl·lules mesenquimals i endotelials (242). Per tant, aquest protocol de diferenciació podria estar mimetitzant la diferenciació d'una població progenitora meso-endotelial a cèl·lules mesenquimals, però per tal de poder-ho confirmar, es necessitaria realitzar una major caracterització de scRNA-seq del protocol de diferenciació.

Per últim, les cèl·lules que vam obtenir al final de la diferenciació eren principalment HSCs i s'agrupaven, majoritàriament, en dues subpoblacions que estaven enriquides en processos biològics característics de les HSCs i cèl·lules estromals, com la regulació de la matriu extracel·lular, vasculogènesis, organització del citoesquelet, producció de col·lagen, entre d'altres. Aquesta divergència a punt final podria estar associada a l'obtenció d'una població amb característiques gèniques clares de HSCs del fetge perquè estava enriquida en la signatura gènica de HSCs de DescartesDB (232) (cèl·lules del clúster 6), i l'altra població correspondria a cèl·lules amb un fenotip de fibroblast amb característiques estromals més genèriques i no tan especificades a HSCs que podria estar associat al grau de maduració (clúster 1). A més, és especialment interessant veure que les iPSC-HSCs de punt final mostraven un enriquiment en les signatures de cèl·lules estromals d'altres òrgans, com les cèl·lules estromals de ronyó, pulmó i timus, i per tant, això implicava que introduint algunes modificacions al protocol de diferenciació de iPSCs utilitzat, es podria generar cèl·lules estromals d'altres òrgans que derivessin de cèl·lules mesotelials.

Aquests resultats de scRNA-seq de diferents punts del protocol indicaven que l'obtenció de les poblacions cel·lulars en un procés de diferenciació *in vitro* es produïa de manera gradual i progressiva generant clústers multifenotípics. Per aquest motiu, la diferenciació de iPSCs a HSCs s'ha d'entendre com un mosaic, on els diferents clústers

presenten diferents graus de diferenciació i diferents perfils d'expressió gènica. Per entendre aquests processos de diferenciació, seria interessant integrar cèl·lules d'un altre punt intermedi, com són les cèl·lules de dia 8, perquè permetria realitzar un estudi de *pseudotime* i de potencial de diferenciació. Aquests anàlisis ajudarien a entendre la trajectòria, les poblacions intermèdies i les decisions de destí cel·lular que succeeixen al llarg del protocol de diferenciació. A més, es podria determinar si aquesta heterogeneïtat de dia 4 correlaciona amb l'heterogeneïtat de la població final, sent un clúster de dia 4 específic per la generació de iPSC-HSCs amb un fenotip concret, o simplement aquesta heterogeneïtat es dona en les últimes etapes de la diferenciació estant associada a l'estat de maduració cel·lular *in vitro*.

Durant molts anys les HSCs s'han considerat una població homogènia distribuïda en els sinusoides hepàtics amb la capacitat d'activar-se a miofibroblast en una situació de dany hepàtic (26). Tot i això, publicacions recents en models animals han identificat l'existència de la zonació i l'heterogeneïtat de les HSCs tant en una situació fisiològica com patològica (18), (33), (62), (66), (67), (68) i han descrit poblacions amb funcions immunoreguladores i inflamatòries, fibrogèniques i proliferatives. Com hem comentat anteriorment, en el protocol de diferenciació es van obtenir, a punt final, dos perfils cel·lulars diferents que podrien explicar l'heterogeneïtat observada en les immunofluorescències de marcadors de HSCs realitzades en les iPSC-HSCs de dia 12 i de fase 1. És interessant determinar si aquesta diversitat fenotípica estava associada a la recapitulació *in vitro* de la zonació portal-central descrita per Dobie et al., (2019) (18), al grau de diferenciació o maduració cel·lular, a un fenotip quiescent-activat, o simplement a la plasticitat de les HSCs ja present en la fisiologia hepàtica. La signatura gènica de les HSCs portals i centrals no estava enriquida en cap subpoblació cel·lular (dades no mostrades) suggerint que possiblement aquesta diferenciació no reflectia la zonació descrita en el model animal (18). Per altra banda, tampoc es va observar diferències significatives en les signatures gèniques de HSCs quiescents, activades i globals publicades per Zhang et al., (2016) (30) (dades no mostrades). Per tant, aquesta heterogeneïtat podria estar causada pel grau de diferenciació cel·lular i/o directament reflectia la variabilitat de les HSCs existent en l'homeòstasi de l'òrgan.

En els últims anys el paradigma basat en que les HSCs es classificaven en estat quiescent, activat o inactivat està canviant. La tendència actual es centra en la possibilitat que en l'homeòstasi hepàtica hi ha la presència de HSCs en diferents perfils genètics que contribueixen en diferents processos com la regeneració, la fibrosi o la immunomodulació hepàtica, i per tant, els conceptes anteriors quedarien obsolets, doncs no contemplarien els fenotípics híbrids o intermedis de les HSCs (236). Els resultats de la signatura gènica de cèl·lules quimiotàctiques, regeneratives i presentadores d'antígens identificaven l'existència de grups cel·lulars dins de cada clúster enriquits per aquestes signatures gèniques. Tot i això, aquests estudis preliminars no ens permetien detectar si el clúster 1 i 6 de les iPSC-HSCs corresponien a cèl·lules amb un perfil funcional específic, però, la possibilitat d'estar obtenint HSCs amb diferents perfils d'expressió gènica mitjançant el protocol de diferenciació, ens permetria indagar en aquesta plasticitat cel·lular de les HSCs poc estudiada actualment.

Per resoldre el dubte de si aquestes subpoblacions simulen l'heterogeneïtat present en l'òrgan, pensem afegir a l'anàlisi, dades de scRNA-seq de cèl·lules primàries humanes en col·laboració amb el Dr. Henderson de la Universitat d'Edinburgh. Serà molt interessant avaluar les diferències amb les iPSC-HSCs i determinar les poblacions funcionals detectades en les cèl·lules primàries humanes. A més, poder-nos plantejar la inclusió de cèl·lules estimulades amb agents fibrogènics com pot ser el TGF β , ens permetria determinar si aquesta heterogeneïtat de les iPSC-HSCs es manté en una situació de dany o si apareixen noves poblacions cel·lulars associades a diferents estats d'activació. Així doncs, l'expansió de la caracterització de l'anàlisi de *single-cell* ens permetria determinar l'origen embrionari de la possible heterogeneïtat de les HSCs en situació fisiològica, i per tant avaluar la plasticitat d'aquestes, no només en la progressió i regressió del dany, sinó també en situació d'homeòstasi.

La utilització de la tecnologia de seqüenciació de RNA de *single-cell* amb la combinació de l'eina de les iPSCs permet estudiar el desenvolupament embrionari humà de les HSCs identificant les poblacions progenitores de les HSCs, així com les vies de senyalització activades al llarg de la diferenciació. Moltes vegades, vies expressades en el desenvolupament embrionari es reactiven en una situació patològica, i per tant, la identificació d'aquestes permetria estudiar possibles dianes terapèutiques. Aquest fet

podria estar succeint amb l'activació de les HSCs, i per tant, entendre els processos i vies de senyalització d'activació al llarg de la diferenciació, ens permetria també, dirigir aquest protocol a l'obtenció de HSCs amb un fenotip transcriptòmic concret i poder establir models *in vitro* de HSCs funcionals per processos hepàtics concrets.

Les dades de caracterització de la diferenciació de les iPSC-HSCs ens van mostrar la gran quantitat d'aplicacions que aquest protocol pot tenir. No obstant, per tal de demostrar que les iPSC-HSCs poden ser una font cel·lular de HSCs per assaigs *in vitro*, era necessari quantificar fins a quins punt les iPSC-HSCs presentaven el fenotip i les respostes específiques de les HSCs primàries.

Els resultats obtinguts amb la caracterització fenotípica indicaven que les iPSC-HSCs són similars a les HSCs primàries (pHSCs), ja que expressen marcadors mesenquimals i neuronals característics de les HSCs (26). Tot i això, les cèl·lules diferenciades no són idèntiques, perquè presenten una major expressió de gens de quiescència com *RELN*, *LRAT* i *PPAR γ* , i una menor expressió de gens d'activació com *COL1 α 1* i *ACTA2*. Aquests resultats confirmaven els resultats obtinguts en la publicació de Coll et al., (2018), on mitjançant un anàlisi transcriptòmic s'identificava que les iPSC-HSCs presentaven un perfil d'expressió gènica entre les cèl·lules quiescents procedents de pacients "control" i les cèl·lules activades procedents de pacients cirròtics (anomenades com activades *in vivo*) i pacients "control" cultivades en plàstic (anomenades com activades *in vitro*) (144). Aquestes dades suggerien que les HSCs diferenciades es podrien utilitzar per generar sistemes *in vitro* que mimetitzessin millor característiques quiescents de les HSCs. Tenir un fenotip quiescent és essencial pels assaigs *in vitro* de la fibrosi hepàtica, perquè els models actuals de HSCs primàries i línies cel·lulars a l'estar activades, no permeten recapitular tots els processos activats en la resposta a situacions de dany hepàtic. Tot i això, cal tenir en compte que les iPSC-HSCs, al derivar de iPSCs, poden presentar diferències d'expressió d'algunes vies de senyalització, i que tot i estar menys activades que les HSCs primàries, presenten cert grau d'activació que pot afectar en alguns estudis *in vitro*.

Una de les característiques clau de les iPSC-HSCs per la seva utilització *in vitro*, és la seva capacitat d'expandir-se fins a fase 4 i de criopreservar-se (144). Els estudis d'expressió

gènica indicaven que les iPSC-HSCs passades i criopreservades, tot i mantenir l'expressió de marcadors de HSCs, presentaven un augment de l'expressió d'alguns gens fibrogènics suggerint l'adquisició d'un fenotip una mica més activat que les cèl·lules de dia 12. A més, les cèl·lules expandides i criopreservades conservaven la capacitat de respondre a estímuls fibrogènics tant aguts com crònics indicant la seva aplicabilitat en assaigs *in vitro* a curt i llarg termini per l'estudi de la fibrosi hepàtica. D'altra banda, la resposta inflamatòria de les dues poblacions cel·lulars era molt limitada i variable entre diferenciacions. De fet, en la publicació de Coll et al., (2018) ja es va observar que la resposta inflamatòria de les iPSC-HSCs era menor a les cèl·lules primàries (144), suggerint que la població final de la diferenciació presentava alguna divergència en l'expressió de vies de senyalització implicades en la resposta de factors inflamatoris com és el LPS. De la mateixa manera, quan les cèl·lules es cultivaven en un ambient inflamatori provinent del sobrenedant de cèl·lules de Kupffer de pacients "control" i pacients cirròtics, l'activació de gens inflamatoris i fibrogènics era modesta reforçant la idea anterior. Per tant, els iPSC-HSCs es podien expandir i criopreservar mantenint el fenotip característic de HSCs i preservant la capacitat de resposta a insults fibrogènics.

A part de la utilització de les HSCs diferenciades pel modelatge *in vitro* de la fibrosi i inflamació hepàtica, es va avaluar el potencial ús d'aquestes cèl·lules pel cribratge de fàrmacs anti-fibrogènics. Les HSCs diferenciades tenien la capacitat de respondre alguns compostos anti-fibrogènics, com Elafibranor que es troba actualment en assaig clínic per malalties hepàtiques (239), indicant la seva possible aplicació per assaigs *in vitro* de toxicologia. Actualment, les HSCs primàries i línies cel·lulars són les fonts cel·lulars de referència, però el fet de poder utilitzar cèl·lules derivades de iPSCs permetria generar sistema *in vitro* que preservessin els polimorfismes i mutacions genètiques dels pacients realitzant el cribratge de fàrmacs des d'un punt de vista més personalitzat.

Un altre aspecte important de les iPSC-HSCs és que no només es poden utilitzar pel modelatge hepàtic en 2D, sinó que es poden cultivar amb altres tipus cel·lulars hepàtics generant models *in vitro* més complexos per mimetitzar la fisiologia de l'òrgan. Vam observar que les iPSC-HSCs es podien cultivar amb línies cel·lulars d'hepatòcits, hepatòcits derivats de iPSCs i primaris, i que es podien cultivar en diferents estratègies com la tècnica de *Hanging drop* i cultiu de plaques no adherents amb agitació o sense, i

diferent nombre i proporció de cèl·lules per esferoide. A més, en aquests últims anys s'han publicat articles de diferents grups utilitzant les HSCs obtingudes d'aquest protocol per establir diferents sistemes *in vitro* multicel·lulars basats en el co-cultiu de les iPSC-HSCs amb hepatoblasts, cèl·lules endotelials i Kupffers en hidrogels o bioreactors (151), (152), (153). En alguns d'aquests casos, la generació de les HSCs es realitzava a partir de diferents línies de iPSCs, i tot hi haver d'ajustar la confluència inicial, el nivell d'expressió de marcadors de HSCs de la població final era similar. Tots aquests fets demostraven l'alta robustesa del protocol de diferenciació, així com l'àmplia aplicabilitat d'aquestes cèl·lules pel modelatge *in vitro*.

Per tant, les iPSC-HSCs es poden expandir, criopreservar, co-cultivar i estimular per modelar *in vitro* la fisiologia i fisiopatologia hepàtica. Totes aquestes característiques plantegen el fet de poder establir les HSCs diferenciades com a nova font cel·lular de HSCs comercials. Com a prova de concepte, es va realitzar assaigs d'escalabilitat i congelació/descongelació. Vam observar que el protocol de diferenciació es podia realitzar en un flasc de T75 mantenint l'expressió gènica de marcadors de HSCs, i a més, es podien congelar en diferents medis de congelació. En molts casos, la criopreservació de cèl·lules derivades de iPSCs es realitza a punts intermedis de la diferenciació (243), obligant, un cop descongelades, a cultivar-les amb els factors i medis específics de la diferenciació. No obstant això, les iPSC-HSCs al congelar-se a punt final de la diferenciació i amb un medi de congelació estàndard, facilita el cultiu de les cèl·lules sent similar a l'utilitzat per les línies cel·lulars. El fet que les cèl·lules derivin de iPSCs permetria generar de manera il·limitada HSCs substituint l'escassetat de les cèl·lules primàries. Tots aquests aspectes sumats als avantatges que tenen les cèl·lules derivades de iPSCs respecte les primàries; poder-se generar a partir de cèl·lules adultes de pacients específics o permetre la modificació gènica, reforcaven la idea que les cèl·lules derivades de iPSCs poden representar una bona font cel·lular amb interès comercial.

En els últims anys s'han implementat moltes tecnologies d'edició gènica per les iPSCs que permeten modificar els gens d'interès per estudiar els mecanismes implicats en la progressió i/o regressió de la patologia, així com per corregir gens causals de patologies per posteriorment utilitzar les cèl·lules com a teràpia cel·lular personalitzada. Així doncs,

aquestes eines ens permetien generar iPSCs per estudiar el paper de mutacions o polimorfismes associats en la progressió de les malalties hepàtiques.

En aquesta tesi doctoral es va demostrar que la generació d'una línia de iPSCs amb la sobreexpressió de la variant del gen HSD17B13 permetia generar cèl·lules hepàtiques que mantenien aquesta alteració genètica i posteriorment es podien utilitzar per establir models *in vitro* amb el factor hereditari. Concretament, amb el sistema de recombinació homòloga d'enzims flipasa (229) es podia introduir la seqüència d'interès i induir la seva expressió mitjançant el tractament amb doxiciclina. Aquest sistema doncs, permetia seleccionar el moment de la sobreexpressió del gen d'interès permetent estudiar el seu paper al llarg del desenvolupament embrionari o l'especificació d'un llinatge cel·lular humà, així com la seva funcionalitat en la cèl·lula adulta obtinguda de la diferenciació.

La línia de iPSCs obtinguda del sistema de recombinació presentava integrat en els dos al·lels la seqüència truncada del gen HSD17B13, i quan es tractava amb doxiciclina l'expressió d'aquest augmentava fins a 300 vegades més. A més, les iPSCs modificades genèticament mantenien les característiques pluripotents i es podien diferenciar tant a hepatòcits com HSCs preservant el seu perfil d'expressió gènica. Aquest resultat suggeria que la variant de HSD17B13 no té cap efecte en el desenvolupament embrionari d'aquestes poblacions hepàtiques, però s'hauria d'augmentar el nombre de diferenciacions i realitzar estudis més robusts per poder-ho confirmar. D'altra banda, els hepatòcits que expressaven la variant del gen, presentaven la reducció de marcadors d'inflamació i de dany hepatocitari després d'estar tractats amb medi lipotòxic. Aquests resultats suggereien que es podria modelar l'efecte d'un polimorfisme *in vitro*, i que en aquest cas, es podia mimetitzar l'efecte protector de la variant de HSD17B13 en la malaltia de fetge gras no alcohòlica, tal i com està descrit en mostres de pacients (195), (208), (209), (210), (211), (212). A més, els hepatòcits derivats de iPSC-HSD17B13 es podrien utilitzar per modelar altres malalties hepàtiques associades a la variant, com la malaltia alcohòlica hepàtica i el carcinoma hepatocel·lular, i avaluar si aquesta estratègia seria vàlida per estudiar la susceptibilitat de malalties hepàtiques entre pacients amb l'alteració genètica i sense, i crear sistemes *in vitro* més personalitzats pel cribratge de fàrmacs. A part, aquest sistema es podria millorar incorporant altres tipus cel·lulars

hepàtics per mimetitzar la resposta a malalties hepàtiques complexes, i realitzar, de manera més precisa, assaigs de toxicitat i d'efectes adversos a fàrmacs.

De fet, el gen HSD17B13 actualment es considera una diana terapèutica atractiva, ja que la seva acció protectora de la proteïna truncada està associada a la pèrdua de funcionalitat (195), i per tant, inhibint l'expressió del gen es podria generar l'efecte terapèutic a diferents malalties hepàtiques cròniques. A més, l'efecte hepatoprotector és present en diferents grups ètnics i diferents etiologies de la malaltia, i la deficiència de HSD17B13 no genera cap efecte perjudicial en aquests pacients, sent poc probable que pugui generar efectes adversos. Per tant, poder establir una línia de iPSCs amb un polimorfisme concret, en aquest cas, la variant de HSD17B13, permetria generar cèl·lules hepàtiques amb factors hereditaris específics i d'aquesta manera poder mimetitzar factors de risc importants per la progressió de les malalties hepàtiques *in vitro*.

Els resultats d'aquesta tesi doctoral han permès per una banda, identificar els processos i poblacions intermèdies obtingudes al llarg del protocol de diferenciació aportant informació clau per avançar en el coneixement del desenvolupament embrionari de HSCs humanes. A més, l'heterogeneïtat de les iPSC-HSCs ha permès destacar la gran plasticitat d'aquesta població mesenquimal recapitulant *in vitro*, els possibles fenotips de les HSCs present en l'homeòstasi de l'òrgan. Per altra banda, l'optimització de punts claus com la criopreservació, expansió i co-cultiu de les HSCs diferenciades, ha permès plantejar les iPSC-HSCs com una possible font cel·lular comercial. I per últim, la generació d'una línia de iPSCs amb la variant de HSD17B13 ha demostrat el potencial de les iPSCs per generar models *in vitro* de cèl·lules amb factors hereditaris específics pel modelatge *in vitro* de les malalties hepàtiques i el cribatge de fàrmacs.

CONCLUSIONS



Les principals conclusions d'aquesta tesi doctoral són:

1. El protocol de diferenciació de iPSCs a HSCs mimetitzava alguns estadis del desenvolupament embrionari de les HSCs descrit en models animals, on les iPSCs es diferencien a cèl·lules mesotelials i mesenquimals a dia 4, i evolucionen a cèl·lules amb característiques de HSCs a dia 12.
2. Les iPSC-HSCs és una població heterogènia amb diferents subpoblacions que poden reflectir els diferents fenotips presents en les HSCs del fetge.
3. Les iPSC-HSCs passades i descongeades, tot i presentar un major grau d'activació, mantenen el perfil d'expressió gènica de les iPSC-HSCs a dia 12 i tenen la capacitat de respondre a estímuls pro-fibrogènics aguts i crònics, mentre que presenten una capacitat limitada a respondre estímuls pro-inflamatoris.
4. Les iPSC-HSCs es poden co-cultivar amb diferents cèl·lules hepàtiques i diferents estratègies de cultiu per generar models *in vitro* complexos.
5. Les iPSC-HSCs es poden utilitzar com a font cel·lular de HSCs pel cribratge de compostos anti-fibrogènics.
6. Les iPSCs es poden modificar genèticament amb el sistema de recombinació homòloga per enzims flipasa per estudiar el paper de polimorfismes associats a la progressió de malalties hepàtiques.
7. La línia de iPSCs que integra la seqüència truncada del gen HSD17B13 es pot diferenciar a hepatòcits i a HSCs mantenint el seu perfil d'expressió gènica.
8. Els hepatòcits que presenten la sobreexpressió de HSD17B13 tenen un menor dany hepatocitari i inflamació que les hepatòcits control en el tractament amb medi lipotòxic.

Per tant, les HSCs diferenciades de iPSCs representen una font cel·lular pel modelatge *in vitro* de malalties hepàtiques, i les iPSCs representen una bona eina per generar models *in vitro* modificats genèticament per estudiar el paper de polimorfismes associats a malalties hepàtiques.

BIBLIOGRAFIA



1. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Current Biology*. 2017.
2. Kullak-Ublick GA, Andrade RJ, Merz M, End P, Benesic A, Gerbes AL, et al. Drug-induced liver injury: Recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut*. 2017.
3. Kuna L, Bozic I, Kizivat T, Bojanic K, Mrso M, Kralj E, et al. Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) – Current Issues and Future Perspectives. *Curr Drug Metab*. 2018.
4. Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver International*. 2018.
5. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*. 2019.
6. Jadlowiec CC, Taner T. Liver transplantation: Current status and challenges. *World J Gastroenterol*. 2016.
7. Sakiyama R, Blau BJ, Miki T. Clinical translation of bioartificial liver support systems with human pluripotent stem cell-derived hepatic cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2017.
8. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet*. 2002.
9. Nicolas CT, Wang Y, Nyberg SL. Cell therapy in chronic liver disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2016.
10. Forbes SJ, Gupta S, Dhawan A. Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. *Journal of Hepatology*. 2015.
11. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2000.
12. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of Toxicology*. 2013.
13. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. 2017.
14. Ruoß M, Vosough M, Königsrainer A, Nadalin S, Wagner S, Sajadian S, et al. Towards improved hepatocyte cultures: Progress and limitations. *Food and Chemical Toxicology*. 2020.
15. Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S. Liver architecture, cell

- function, and disease. *Seminars in Immunopathology*. 2009.
16. Gebhardt R, Matz-Soja M. Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014.
 17. Stanger BZ. Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annu Rev Physiol*. 2015.
 18. Dobie R, Wilson-Kanamori JR, Henderson BEP, Smith JR, Matchett KP, Portman JR, et al. Single-Cell Transcriptomics Uncovers Zonation of Function in the Mesenchyme during Liver Fibrosis. *Cell Rep*. 2019.
 19. MacParland SA, Liu JC, Ma XZ, Innes BT, Bartczak AM, Gage BK, et al. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun*. 2018.
 20. Aizarani N, Saviano A, Sagar, Mailly L, Durand S, Herman JS, et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature*. 2019.
 21. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Development (Cambridge)*. 2015.
 22. Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biology*. 2017.
 23. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2017.
 24. Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2017.
 25. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013.
 26. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008.
 27. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2017.
 28. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2017.
 29. Kluwe J, Wongsiriroj N, Troeger JS, Gwak GY, Dapito DH, Pradere JP, et al. Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis. *Gut*. 2011.
 30. Zhang DY, Goossens N, Guo J, Tsai MC, Chou HI, Altunkaynak C, et al. A hepatic stellate cell gene expression signature associated with outcomes in hepatitis C cirrhosis and hepatocellular carcinoma after curative resection. *Gut*. 2016.

31. Kobold D, Grundmann A, Piscaglia F, Eisenbach C, Neubauer K, Steffgen J, et al. Expression of reelin in hepatic stellate cells and during hepatic tissue repair: A novel marker for the differentiation of HSC from other liver myofibroblasts. *J Hepatol.* 2002.
32. Liu X, Xu J, Rosenthal S, Zhang L Juan, McCubbin R, Meshgin N, et al. Identification of Lineage-Specific Transcription Factors That Prevent Activation of Hepatic Stellate Cells and Promote Fibrosis Resolution. *Gastroenterology.* 2020.
33. Ramachandran P, Dobie R, Wilson-Kanamori JR, Dora EF, Henderson BEP, Luu NT, et al. Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level. *Nature.* 2019.
34. Lua I, Li Y, Zagory JA, Wang KS, French SW, Sévigny J, et al. Characterization of hepatic stellate cells, portal fibroblasts, and mesothelial cells in normal and fibrotic livers. *J Hepatol.* 2016.
35. Wells RG. The portal fibroblast: Not just a poor man's stellate cell. *Gastroenterology.* 2014.
36. Kumar A, D'Souza SS, Moskvin O V., Toh H, Wang B, Zhang J, et al. Specification and Diversification of Pericytes and Smooth Muscle Cells from Mesenchymoangioblasts. *Cell Rep.* 2017.
37. Senoo H, Kojima N, Sato M. Vitamin A-Storing Cells (Stellate Cells). *Vitamins and Hormones.* 2007.
38. Schwabe RF, Tabas I, Pajvani UB. Mechanisms of Fibrosis Development in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2020.
39. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011.
40. Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012.
41. Taura K, Miura K, Iwaisako K, Ö Sterreicher CH, Kodama Y, Penz-Ö Sterreicher M, et al. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology.* 2010.
42. Chu AS, Diaz R, Hui JJ, Yanger K, Zong Y, Alpini G, et al. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology.* 2011.
43. Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, et al. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol.* 2006.
44. Li Y, Wang J, Asahina K. Mesothelial cells give rise to hepatic stellate cells and myofibroblasts via mesothelial-mesenchymal transition in liver injury. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A. 2013.
45. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014.
 46. Nishio T, Hu R, Koyama Y, Liang S, Rosenthal SB, Yamamoto G, et al. Activated hepatic stellate cells and portal fibroblasts contribute to cholestatic liver fibrosis in MDR2 knockout mice. *J Hepatol*. 2019.
 47. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun*. 2013.
 48. Kitto LJ, Henderson NC. Hepatic Stellate Cell Regulation of Liver Regeneration and Repair. *Hepatol Commun*. 2021.
 49. Cai X, Wang J, Wang J, Zhou Q, Yang B, He Q, et al. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: New insights into therapy. *Pharmacological Research*. 2020.
 50. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005.
 51. Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker AN. TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells*. 2019.
 52. Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. TGF- β /SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2016.
 53. Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2012.
 54. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*. 2009.
 55. Jin X, Aimaiti Y, Chen Z, Wang W, Li D. Hepatic stellate cells promote angiogenesis via the TGF- β 1-Jagged1/VEGFA axis. *Exp Cell Res*. 2018.
 56. Liu X, Xu J, Brenner D a, Kisseleva T. Reversibility of Liver Fibrosis and Inactivation of Fibrogenic Myofibroblasts. *Curr Pathobiol Rep*. 2013.
 57. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998.
 58. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell*. 2008.
 59. Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology*. 2012.

60. Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2006.
61. El Taghdouini A, Najimi M, Sancho-Bru P, Sokal E, van Grunsven LA. In vitro reversion of activated primary human hepatic stellate cells. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2015.
62. Rosenthal SB, Liu X, Ganguly S, Dhar D, Pasillas MP, Ricciardelli E, et al. Heterogeneity of hepatic stellate cells in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatology*. 2021.
63. Ramachandran P, Matchett KP, Dobie R, Wilson-Kanamori JR, Henderson NC. Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2020.
64. Segal JM, Kent D, Wesche DJ, Ng SS, Serra M, Oulès B, et al. Single cell analysis of human foetal liver captures the transcriptional profile of hepatobiliary hybrid progenitors. *Nat Commun*. 2019.
65. Wang S, Tang XT, Lin M, Yuan J, Peng YJ, Yin X, et al. Perivenous stellate cells are the main source of myofibroblasts and cancer-associated-fibroblasts formed after chronic liver injuries. *Hepatology*. 2021.
66. Krenkel O, Hundertmark J, Ritz T, Weiskirchen R, Tacke F. Single Cell RNA Sequencing Identifies Subsets of Hepatic Stellate Cells and Myofibroblasts in Liver Fibrosis. *Cells*. 2019.
67. Terkelsen MK, Bendixen SM, Hansen D, Scott EAH, Moeller AF, Nielsen R, et al. Transcriptional Dynamics of Hepatic Sinusoid-Associated Cells After Liver Injury. *Hepatology*. 2020.
68. Payen Valéry L, Arnaud L, Niki AS, Megan C, Latifa K, Manon D, et al. Single-cell RNA sequencing of human liver reveals hepatic stellate cell heterogeneity. *JHEP Reports*. 2021.
69. Wake K, Sato T. Intralobular heterogeneity of perisinusoidal stellate cells in porcine liver. *Cell Tissue Res*. 1993.
70. D'Ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, Berk PD, Rippe RA, Blaner WS. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage. *PLoS One*. 2011.
71. Friedman SL, Rockey DC, McGuire RF, Maher JJ, Boyles JK, Yamasaki G. Isolated hepatic lipocytes and kupffer cells from normal human liver: Morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology*. 1992.
72. Matsuura T, Nagamori S, Fujise K, Hasumura S, Homma S, Sujino H, et al. Retinol transport in cultured fat-storing cells of rat liver. Quantitative analysis by anchored cell analysis and sorting system. *Lab Invest*. 1989.
73. Sancho-Bru P, Bataller R, Gasull X, Colmenero J, Khurdayan V, Gual A, et al.

- Genomic and functional characterization of stellate cells isolated from human cirrhotic livers. *J Hepatol.* 2005.
74. Shang L, Hosseini M, Liu X, Kisseleva T, Brenner DA. Human hepatic stellate cell isolation and characterization. *Journal of Gastroenterology.* 2018.
 75. Castell J V., Jover R, Martínez-Jiménez CP, Gómez-Lechón MJ. Hepatocyte cell lines: Their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology.* 2006.
 76. Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: New tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut.* 2005.
 77. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy.* 2019.
 78. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981.
 79. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998.
 80. King NMP, Perrin J. Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Research and Therapy.* 2014.
 81. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006.
 82. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 1998.
 83. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003.
 84. Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development.* 2005.
 85. Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood.* 2005.
 86. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007.
 87. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Japan*

- Acad Ser B Phys Biol Sci. 2009.
88. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, et al. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009.
 89. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010.
 90. Kim D, Kim CH, Moon J II, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell*. 2009.
 91. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007.
 92. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*. 2008.
 93. GURDON JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*. 1962.
 94. Waddington CH. The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. With an appendix by H. Kacser. *Strateg genes A Discuss*. 1957.
 95. Sieweke MH. Waddington's valleys and captain cook's islands. *Cell Stem Cell*. 2015.
 96. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016.
 97. Fiorotto R, Amenduni M, Mariotti V, Fabris L, Spirli C, Strazzabosco M. Liver diseases in the dish: iPSC and organoids as a new approach to modeling liver diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2019.
 98. Zorn. *Liver Development*. StemBook. 2008.
 99. Yang L, Li LC, Lamaoqiezhong, Wang X, Wang WH, Wang YC, et al. The contributions of mesoderm-derived cells in liver development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2019.
 100. Ober EA, Lemaigre FP. Development of the liver: Insights into organ and tissue morphogenesis. *Journal of Hepatology*. 2018.
 101. Thompson WL, Takebe T. Human liver model systems in a dish. *Dev Growth Differ*. 2021.
 102. Ferretti E, Hadjantonakis AK. Mesoderm specification and diversification: from

- single cells to emergent tissues. *Current Opinion in Cell Biology*. 2019.
103. Delgado I, Carrasco M, Cano E, Carmona R, García-Carbonero R, Marín-Gómez LM, et al. GATA4 loss in the septum transversum mesenchyme promotes liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2014.
 104. Enzan H, Himeno H, Hiroi M, Kiyoku H, Saibara T, Onishi S. Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the ito cells. *Microsc Res Tech*. 1997.
 105. Kalinichenko V V., Zhou Y, Bhattacharyya D, Kim W, Shin B, Bambal K, et al. Haploinsufficiency of the mouse forkhead box f1 gene causes defects in gall bladder development. *J Biol Chem*. 2002.
 106. Kolterud Å, Wandzioch E, Carlsson L. Lhx2 is expressed in the septum transversum mesenchyme that becomes an integral part of the liver and the formation of these cells is independent of functional Lhx2. *Gene Expr Patterns*. 2004.
 107. Cassiman D, Barlow A, Vander Borgh S, Libbrecht L, Pachnis V. Hepatic stellate cells do not derive from the neural crest. *J Hepatol*. 2006.
 108. Asahina K, Zhou B, Pu WT, Tsukamoto H. Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *Hepatology*. 2011.
 109. Asahina K, Tsai SY, Li P, Ishii M, Maxson RE, Socov HM, et al. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology*. 2009.
 110. Ijpenberg A, Pérez-Pomares JM, Guadix JA, Carmona R, Portillo-Sánchez V, Macías D, et al. Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev Biol*. 2007.
 111. Loo CKC, Wu XJ. Origin of stellate cells from submesothelial cells in a developing human liver. *Liver Int*. 2008.
 112. Lotto J, Drissler S, Cullum R, Wei W, Setty M, Bell EM, et al. Single-Cell Transcriptomics Reveals Early Emergence of Liver Parenchymal and Non-parenchymal Cell Lineages. *Cell*. 2020.
 113. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*. 2008.
 114. Que J, Wilm B, Hasegawa H, Wang F, Bader D, Hogan BLM. Mesothelium contributes to vascular smooth muscle and mesenchyme during lung development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008.
 115. Winters NI, Thomason RT, Bader DM. Identification of a novel developmental mechanism in the generation of mesothelia. *Dev*. 2012.

116. Sancho-Bru P, Roelandt P, Narain N, Pauwelyn K, Notelaers T, Shimizu T, et al. Directed differentiation of murine-induced pluripotent stem cells to functional hepatocyte-like cells. *J Hepatol*. 2011.
117. Hannan NRF, Segeritz CP, Touboul T, Vallier L. Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2013.
118. Roelandt P, Pauwelyn KA, Sancho-Bru P, Subramanian K, Bose B, Ordovas L, et al. Human embryonic and rat adult stem cells with primitive endoderm-like phenotype can be fated to definitive endoderm, and finally hepatocyte-like cells. *PLoS One*. 2010.
119. Roelandt P, Vanhove J, Verfaillie C. Directed differentiation of pluripotent stem cells to functional hepatocytes. In: *Methods in Molecular Biology*. 2013.
120. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol*. 2005.
121. Teo AKK, Ali Y, Wong KY, Chipperfield H, Sadasivam A, Poobalan Y, et al. Activin and BMP4 synergistically promote formation of definitive endoderm in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2012.
122. Touboul T, Chen S, To CC, Mora-Castilla S, Sabatini K, Tukey RH, et al. Stage-specific regulation of the WNT/ β -catenin pathway enhances differentiation of hESCs into hepatocytes. *J Hepatol*. 2016.
123. Ameri J, Ståhlberg A, Pedersen J, Johansson JK, Johannesson MM, Artner I, et al. FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner. *Stem Cells*. 2010.
124. Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2011.
125. Kamiya A, Kojima N, Kinoshita T, Sakai Y, Miyajima A. Maturation of fetal hepatocytes in vitro by extracellular matrices and oncostatin M: Induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology*. 2002.
126. Baxter M, Withey S, Harrison S, Segeritz CP, Zhang F, Atkinson-Dell R, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol*. 2015.
127. Godoy P, Schmidt-Heck W, Natarajan K, Lucendo-Villarín B, Szkolnicka D, Asplund A, et al. Gene networks and transcription factor motifs defining the differentiation of stem cells into hepatocyte-like cells. *J Hepatol*. 2015.
128. Takeishi K, Collin de l'Hortet A, Wang Y, Handa K, Guzman-Lepe J, Matsubara K, et al. Assembly and Function of a Bioengineered Human Liver for Transplantation Generated Solely from Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep*. 2020.

129. Boon R, Kumar M, Tricot T, Elia I, Ordovas L, Jacobs F, et al. Amino acid levels determine metabolism and CYP450 function of hepatocytes and hepatoma cell lines. *Nat Commun.* 2020.
130. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials.* 2013.
131. Gieseck RL, Hannan NRF, Bort R, Hanley NA, Drake RAL, Cameron GWW, et al. Maturation of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes by 3D-culture. *PLoS One.* 2014.
132. Berger DR, Ware BR, Davidson MD, Allsup SR, Khetani SR. Enhancing the functional maturity of induced pluripotent stem cell-derived human hepatocytes by controlled presentation of cell-cell interactions in vitro. *Hepatology.* 2015.
133. Nagamoto Y, Tashiro K, Takayama K, Ohashi K, Kawabata K, Sakurai F, et al. The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials.* 2012.
134. Chen C, Soto-Gutierrez A, Baptista PM, Spee B. Biotechnology Challenges to In Vitro Maturation of Hepatic Stem Cells. *Gastroenterology.* 2018.
135. Dianat N, Dubois-Pot-Schneider H, Steichen C, Desterke C, Leclerc P, Raveux A, et al. Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells. *Hepatology.* 2014.
136. De Assuncao TM, Sun Y, Jalan-Sakrikar N, Drinane MC, Huang BQ, Li Y, et al. Development and characterization of human-induced pluripotent stem cell-derived cholangiocytes. *Lab Investig.* 2015.
137. Ogawa M, Ogawa S, Bear CE, Ahmadi S, Chin S, Li B, et al. Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2015.
138. Sampaziotis F, De Brito MC, Madrigal P, Bertero A, Saeb-Parsy K, Soares FAC, et al. Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation. *Nat Biotechnol.* 2015.
139. Tasnim F, Xing J, Huang X, Mo S, Wei X, Tan MH, et al. Generation of mature kupffer cells from human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials.* 2019.
140. Du C, Narayanan K, Leong MF, Wan ACA. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes and endothelial cells in multi-component hydrogel fibers for liver tissue engineering. *Biomaterials.* 2014.
141. Gage BK, Liu JC, Innes BT, MacParland SA, McGilvray ID, Bader GD, et al. Generation of Functional Liver Sinusoidal Endothelial Cells from Human Pluripotent Stem-Cell-Derived Venous Angioblasts. *Cell Stem Cell.* 2020.
142. Kouji Y, Kido T, Ito T, Oyama H, Chen SW, Katou Y, et al. An In Vitro Human Liver

- Model by iPSC-Derived Parenchymal and Non-parenchymal Cells. *Stem Cell Reports*. 2017.
143. Wilson HK, Canfield SG, Shusta E V., Palecek SP. Concise review: Tissue-specific microvascular endothelial cells derived from human Pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2014.
 144. Coll M, Perea L, Boon R, Leite SB, Vallverdú J, Mannaerts I, et al. Generation of Hepatic Stellate Cells from Human Pluripotent Stem Cells Enables In Vitro Modeling of Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell*. 2018.
 145. Vallverdú J, Martínez García de la Torre RA, Mannaerts I, Verhulst S, Smout A, Coll M, et al. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells to hepatic stellate cells. *Nature Protocols*. 2021.
 146. Richter A, Valdimarsdottir L, Hrafnkelsdottir HE, Runarsson JF, Omarsdottir AR, Oostwaard DW Van, et al. BMP4 promotes EMT and mesodermal commitment in human embryonic stem cells via SLUG and MSX2. *Stem Cells*. 2014.
 147. Evseenko D, Zhu Y, Schenke-Layland K, Kuo J, Latour B, Ge S, et al. Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2010.
 148. Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, Rossant J. *fgfr-1* is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev*. 1994.
 149. Dorey K, Amaya E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development*. 2010.
 150. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton D, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000.
 151. Kumar M, Toprakhisar B, Haele M Van, Antoranz A, Boon R, Chesnais F, et al. A fully defined pluripotent stem cell derived multi-liver-cell model for steatohepatitis and fibrosis. *bioRxiv*. 2020.
 152. Lucendo-Villarin B, Meseguer-Ripolles J, Drew J, Fischer L, Ma E, Flint O, et al. Development of a cost-effective automated platform to produce human liver spheroids for basic and applied research. *Biofabrication*. 2020.
 153. Meseguer-Ripolles J, Kasarinaite A, Lucendo-Villarin B, Hay DC. Protocol for automated production of human stem cell derived liver spheres. *STAR Protoc*. 2021.
 154. Miyoshi M, Kakinuma S, Kamiya A, Tsunoda T, Tsuchiya J, Sato A, et al. LIM homeobox 2 promotes interaction between human iPS-derived hepatic progenitors and iPS-derived hepatic stellate-like cells. *Sci Rep*. 2019.
 155. Kouji Y, Kido T, Ito T, Oyama H, Chen SW, Katou Y, et al. An In Vitro Human Liver

- Model by iPSC-Derived Parenchymal and Non-parenchymal Cells. *Stem Cell Reports*. 2017.
156. Ouchi R, Togo S, Kimura M, Shinozawa T, Koido M, Koike H, et al. Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Cell Metab*. 2019.
 157. Thompson WL, Takebe T. Generation of multi-cellular human liver organoids from pluripotent stem cells. In: *Methods in Cell Biology*. 2020.
 158. Shinozawa T, Kimura M, Cai Y, Saiki N, Yoneyama Y, Ouchi R, et al. High-Fidelity Drug-Induced Liver Injury Screen Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Gastroenterology*. 2021.
 159. Pettinato G, Lehoux S, Ramanathan R, Salem MM, He LX, Muse O, et al. Generation of fully functional hepatocyte-like organoids from human induced pluripotent stem cells mixed with Endothelial Cells. *Sci Rep*. 2019.
 160. Takebe T, Zhang R-R, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, et al. Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nat Protoc*. 2014.
 161. Takebe T, Sekine K, Kimura M, Yoshizawa E, Ayano S, Koido M, et al. Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep*. 2017.
 162. Guan Y, Xu D, Garfin PM, Ehmer U, Hurwitz M, Enns G, et al. Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases. *JCI insight*. 2017.
 163. Ramli MN Bin, Lim YS, Koe CT, Demircioglu D, Tng W, Gonzales KAU, et al. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids as Models of Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020.
 164. Freyer N, Knöspel F, Strahl N, Amini L, Schrade P, Bachmann S, et al. Hepatic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells in a Perfused Three-Dimensional Multicompartment Bioreactor. *Biores Open Access*. 2016.
 165. Kehtari M, Zeynali B, Soleimani M, Kabiri M, Seyedjafari E. Fabrication of a co-culture micro-bioreactor device for efficient hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol*. 2018.
 166. Ma X, Qu X, Zhu W, Li YS, Yuan S, Zhang H, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016.
 167. Lorvellec M, Pellegata AF, Maestri A, Turchetta C, Alvarez Mediavilla E, Shibuya S, et al. An In Vitro Whole-Organ Liver Engineering for Testing of Genetic Therapies. *iScience*. 2020.
 168. Collin de l'Hortet A, Takeishi K, Guzman-Lepe J, Morita K, Achreja A, Popovic B,

- et al. Generation of Human Fatty Livers Using Custom-Engineered Induced Pluripotent Stem Cells with Modifiable SIRT1 Metabolism. *Cell Metab.* 2019.
169. van Grunsven LA. 3D in vitro models of liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2017.
 170. Müller FA, Sturla SJ. Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Toxicology.* 2019.
 171. Ellis EL, Mann DA. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *Journal of Hepatology.* 2012.
 172. Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, Gaça MDA, Georges PC, Sackey B, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2011.
 173. Perea L, Coll M, Sancho-Bru P. Assessment of liver fibrotic insults in vitro. In: *Methods in Molecular Biology.* 2015.
 174. Leite SB, Roosens T, El Taghdouini A, Mannaerts I, Smout AJ, Najimi M, et al. Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro. *Biomaterials.* 2016.
 175. Schuppan D, Ashfaq-Khan M, Yang AT, Kim YO. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix Biology.* 2018.
 176. Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, et al. Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med.* 2013.
 177. Chen Z, Jain A, Liu H, Zhao Z, Cheng K. Targeted drug delivery to hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2019.
 178. Ibrahim SA, Mohamed MZ, El-Tahawy NF, Abdelrahman AM. Antifibrotic effects of bezafibrate and pioglitazone against thioacetamide-induced liver fibrosis in albino rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2021.
 179. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells.* 2020.
 180. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology.* 2018.
 181. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Second Leading Etiology of Liver Disease Among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States. *Gastroenterology.* 2015
 182. Krawczyk M, Bonfrate L, Portincasa P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010.

183. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Paired-Biopsy Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2015.
184. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*. 2018.
185. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016.
186. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *Journal of Hepatology*. 2018.
187. Loomba R, Schork N, Chen CH, Bettencourt R, Bhatt A, Ang B, et al. Heritability of Hepatic Fibrosis and Steatosis Based on a Prospective Twin Study. *Gastroenterology*. 2015.
188. Makkonen J, Pietiläinen KH, Rissanen A, Kaprio J, Yki-Järvinen H. Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol: A study in monozygotic and dizygotic twins. *J Hepatol*. 2009.
189. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008.
190. Dongiovanni P, Donati B, Fares R, Lombardi R, Mancina RM, Romeo S, et al. PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease. 2013.
191. Liu YL, Reeves HL, Burt AD, Tiniakos D, McPherson S, Leathart JBS, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun*. 2014.
192. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2014.
193. Buch S, Stickel F, Trépo E, Way M, Herrmann A, Nischalke HD, et al. A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat Genet*. 2015.
194. Thangapandi VR, Knittelfelder O, Brosch M, Patsenker E, Vvedenskaya O, Buch S, et al. Loss of hepatic Mboat7 leads to liver fibrosis. *Gut*. 2021.
195. Abul-Husn NS, Cheng X, Li AH, Xin Y, Schurmann C, Stevis P, et al. A Protein-Truncating HSD17B13 Variant and Protection from Chronic Liver Disease. *N Engl J Med*. 2018.
196. Nobili V, Alisi A, Valenti L, Miele L, Feldstein AE, Alkhoury N. NAFLD in children: new genes, new diagnostic modalities and new drugs. *Nature Reviews*

- Gastroenterology and Hepatology. 2019.
197. Tsachaki M, Odermatt A. Subcellular localization and membrane topology of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2019.
 198. Moeller G, Adamski J. Multifunctionality of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. In: *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006.
 199. Liu S, Huang C, Li D, Ren W, Zhang H, Qi M, et al. Molecular cloning and expression analysis of a new gene for short-chain dehydrogenase/reductase 9. *Acta Biochim Pol*. 2007.
 200. Horiguchi Y, Araki M, Motojima K. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 13 is a liver-specific lipid droplet-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008.
 201. Yokoi Y, Horiguchi Y, Araki M, Motojima K. Regulated expression by PPAR α and unique localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 11 protein in mouse intestine and liver. *FEBS J*. 2007.
 202. Ma Y, Karki S, Brown PM, Lin DD, Podszun MC, Zhou W, et al. Characterization of essential domains in HSD17B13 for cellular localization and enzymatic activity. *J Lipid Res*. 2020.
 203. Ma Y, Belyaeva O V., Brown PM, Fujita K, Valles K, Karki S, et al. 17-Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase 13 Is a Hepatic Retinol Dehydrogenase Associated With Histological Features of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2019.
 204. Su W, Wang Y, Jia X, Wu W, Li N, Tian X, et al. Comparative proteomic study reveals 17 β -HSD13 as a pathogenic protein in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014.
 205. Su W, Peng J, Li S, Dai YB, Wang CJ, Xu H, et al. Liver X receptor α induces 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-13 expression through SREBP-1c. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2017.
 206. Yang J, Trépo E, Nahon P, Cao Q, Moreno C, Letouzé E, et al. A 17-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 13 Variant Protects From Hepatocellular Carcinoma Development in Alcoholic Liver Disease. *Hepatology*. 2019.
 207. Ferenci P, Pfeiffenberger J, Stättermayer AF, Stauber RE, Willheim C, Weiss KH, et al. HSD17B13 truncated variant is associated with a mild hepatic phenotype in Wilson's Disease. *JHEP Reports*. 2019.
 208. Stickel F, Lutz P, Buch S, Nischalke HD, Silva I, Rausch V, et al. Genetic Variation in HSD17B13 Reduces the Risk of Developing Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in Alcohol Misusers. *Hepatology*. 2020.
 209. Gellert-Kristensen H, Nordestgaard BG, Tybjærg-Hansen A, Stender S. High Risk

- of Fatty Liver Disease Amplifies the Alanine Transaminase–Lowering Effect of a HSD17B13 Variant. *Hepatology*. 2020.
210. About F, Abel L, Cobat A. HCV-Associated Liver Fibrosis and HSD17B13 . *N Engl J Med*. 2018.
 211. Carlsson B, Lindén D, Brolén G, Liljeblad M, Bjursell M, Romeo S, et al. Review article: the emerging role of genetics in precision medicine for patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2020.
 212. Wang P, Wu CX, Li Y, Shen N. HSD17B13 rs72613567 protects against liver diseases and histological progression of nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020.
 213. Chambers JC, Zhang W, Sehmi JS, Li X, Wass MN, Van der Harst P, et al. Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nat Genet*. 2011.
 214. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact*. 2007.
 215. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009.
 216. Suurmond CAE, Lasli S, van den Dolder FW, Ung A, Kim HJ, Bandaru P, et al. In Vitro Human Liver Model of Nonalcoholic Steatohepatitis by Coculturing Hepatocytes, Endothelial Cells, and Kupffer Cells. *Adv Healthc Mater*. 2019.
 217. Pingitore P, Sasidharan K, Ekstrand M, Prill S, Lindén D, Romeo S. Human multilineage 3D spheroids as a model of liver steatosis and fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2019.
 218. Feaver RE, Cole BK, Lawson MJ, Hoang SA, Marukian S, Blackman BR, et al. Development of an in vitro human liver system for interrogating nonalcoholic steatohepatitis. *JCI Insight*. 2016.
 219. Kostrzewski T, Maraver P, Ouro-Gnao L, Levi A, Snow S, Miedzik A, et al. A Microphysiological System for Studying Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun*. 2020.
 220. Cho HJ, Kim HJ, Lee KJ, Lasli S, Ung A, Hoffman T, et al. Bioengineered Multicellular Liver Microtissues for Modeling Advanced Hepatic Fibrosis Driven Through Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Small*. 2021.
 221. Lasli S, Kim HJ, Lee KJ, Suurmond CAE, Goudie M, Bandaru P, et al. A Human Liver-on-a-Chip Platform for Modeling Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Adv Biosyst*. 2019.

222. Freag MS, Namgung B, Reyna Fernandez ME, Gherardi E, Sengupta S, Jang HL. Human Nonalcoholic Steatohepatitis on a Chip. *Hepatol Commun*. 2021.
223. Pingitore P, Dongiovanni P, Motta BM, Meroni M, Lepore SM, Mancina RM, et al. PNPLA3 overexpression results in reduction of proteins predisposing to fibrosis. *Hum Mol Genet*. 2016 .
224. Graffmann N, Bohndorf M, Ncube A, Wruck W, Kashofer K, Zatloukal K, et al. Establishment and characterization of an iPSC line from a 58 years old high grade patient with nonalcoholic fatty liver disease (70% steatosis) with homozygous wildtype PNPLA3 genotype. *Stem Cell Res*. 2018.
225. Tilson SG, Morell CM, Lenaerts A, Park SB, Hu Z, Jenkins B, et al. Modelling PNPLA3-Associated Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology*. 2021.
226. Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, Dekelver RC, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2009.
227. Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*. 2011.
228. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013.
229. Ordovás L, Boon R, Pistoni M, Chen Y, Wolfs E, Guo W, et al. Efficient recombinase-mediated cassette exchange in hPSCs to study the hepatocyte lineage reveals AAVS1 locus-mediated transgene inhibition. *Stem Cell Reports*. 2015.
230. Smith JR, Maguire S, Davis LA, Alexander M, Yang F, Chandran S, et al. Robust, Persistent Transgene Expression in Human Embryonic Stem Cells Is Achieved with AAVS1-Targeted Integration. *Stem Cells*. 2008.
231. Franzén O, Gan LM, Björkegren JLM. PanglaoDB: A web server for exploration of mouse and human single-cell RNA sequencing data. *Database*. 2019.
232. Cao J, O'Day DR, Pliner HA, Kingsley PD, Deng M, Daza RM, et al. A human cell atlas of fetal gene expression. *Science*. 2020.
233. Goldman O, Han S, Sourrisseau M, Dziedzic N, Hamou W, Corneo B, et al. KDR identifies a conserved human and murine hepatic progenitor and instructs early liver development. *Cell Stem Cell*. 2013.
234. Schmelzer E, McKeel DT, Gerlach JC. Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells from Different Tissues and Their Membrane Encasement for Prospective Transplantation Therapies. *Biomed Res Int*. 2019.
235. Kikuchi A, Monga SP. PDGFR α in liver pathophysiology: Emerging roles in

- development, regeneration, fibrosis, and cancer. *Gene Expression*. 2015.
236. Trivedi P, Wang S, Friedman SL. The Power of Plasticity—Metabolic Regulation of Hepatic Stellate Cells. *Cell Metabolism*. 2021.
 237. Chen M, Liu J, Yang W, Ling W. Lipopolysaccharide mediates hepatic stellate cell activation by regulating autophagy and retinoic acid signaling. *Autophagy*. 2017.
 238. Aoudjehane L, Boelle PY, Bisch G, Delelo R, Paye F, Scatton O, et al. Development of an in vitro model to test antifibrotic drugs on primary human liver myofibroblasts. *Lab Investig*. 2016.
 239. Westerouen Van Meeteren MJ, Drenth JPH, Tjwa ETTL. Elafibranor: a potential drug for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Expert Opin Investig Drugs*. 2020.
 240. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KSR, Chase L, Lakshmipathy U, et al. PDGF, tgf- 2. And FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (mscs): Transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and ost. *Blood*. 2008.
 241. Wang Y, Yu X, Chen E, Li L. Liver-derived human mesenchymal stem cells: A novel therapeutic source for liver diseases. *Stem Cell Research and Therapy*. 2016.
 242. Shafiee A, Patel J, Hutmacher DW, Fisk NM, Khosrotehrani K. Meso-Endothelial Bipotent Progenitors from Human Placenta Display Distinct Molecular and Cellular Identity. *Stem Cell Reports*. 2018.
 243. Takayama K, Akita N, Mimura N, Akahira R, Taniguchi Y, Ikeda M, et al. Generation of safe and therapeutically effective human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells for regenerative medicine. *Hepatol Commun*. 2017.

ANNEX





Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells to hepatic stellate cells

Julia Vallverdú^{1,5}, Raquel A. Martínez García de la Torre^{1,5}, Inge Mannaerts², Stefaan Verhulst², Ayla Smout², Mar Coll^{1,3}, Silvia Ariño¹, Teresa Rubio-Tomás¹, Beatriz Aguilar-Bravo¹, Celia Martínez-Sánchez¹, Delia Blaya¹, Catherine M. Verfaillie^{4,6}✉, Leo A. van Grunsven^{2,6}✉ and Pau Sancho-Bru^{1,3,6}✉

Hepatic stellate cells (HSCs) are nonparenchymal liver cells responsible for extracellular matrix homeostasis and are the main cells involved in the development of liver fibrosis following injury. The lack of reliable sources of HSCs has hence limited the development of complex in vitro systems to model liver diseases and toxicity. Here we describe a protocol to differentiate human induced pluripotent stem cells (iPSCs) into hepatic stellate cells (iPSC-HSCs). The protocol is based on the addition of several growth factors important for liver development sequentially over 12 d. iPSC-HSCs present phenotypic and functional characteristics of primary HSCs and can be expanded or frozen and used to perform high-throughput in vitro studies. We also describe how to coculture iPSC-HSCs with hepatocytes, which self-assemble into three-dimensional (3D) hepatic spheroids. This protocol enables the generation of HSC-like cells for in vitro modeling and drug screening studies.

Introduction

The liver is a complex organ containing not only hepatocytes—parenchymal cells that are the main cell type of the organ—but also nonparenchymal cells, including hepatic stellate cells (HSCs), Kupffer cells (liver macrophages) and liver sinusoidal endothelial cells (LSECs). Although hepatocytes exert the main metabolic and synthetic functions of the liver, nonparenchymal cells are essential for maintaining the structure, homeostasis and function of the organ, as well as enabling adequate response to tissue injury and inflammation¹.

HSCs are located in the space of Disse among hepatocytes and LSECs. In healthy liver, HSCs are in a quiescent state, which is characterized by low proliferative and metabolic activity. In the quiescent state, they participate in the homeostasis of the extracellular matrix (ECM) and store retinyl esters in their cytoplasmic lipid droplets². When the liver is injured, HSCs become activated, acquire a myofibroblast phenotype and participate in the wound-healing response of the tissue^{1,3}. If damage is acute or limited, the phenotype of HSCs can revert to a quiescent state, or they die by apoptosis or by natural killer cell activity⁴. However, when damage persists, activated HSCs become proliferative and contractile, secrete proinflammatory and profibrogenic cytokines and increase the production of ECM components, thus becoming the main cell type responsible for the development of liver fibrosis³.

The need for nonparenchymal cells in biomedical and biotechnological applications is increasing with the development of new complex in vitro systems to study liver toxicity and disease modeling, as well as the generation of liver devices containing parenchymal and nonparenchymal cells^{5,6}. Currently, the most reliable source of human HSCs is primary HSCs, which can be obtained from human liver resections. Shortcomings, however, include the complexity of the isolation process, the shortage of healthy livers and the high variability among donors. Moreover, the use of primary HSCs is hampered by their limited proliferative capacity and rapid activation when seeded in culture plates, far beyond the activation state of HSCs in fibrotic livers^{7,8}. As an alternative to primary cultures, cell

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. ²Liver Cell Biology research group, Faculty of Medicine and Pharmacy, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels, Belgium. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain. ⁴Stem Cell Institute Leuven, Leuven, Belgium. ⁵These authors contributed equally: Julia Vallverdú, Raquel A. Martínez García de la Torre. ⁶These authors jointly supervised this work: Catherine M. Verfaillie, Leo A. van Grunsven, Pau Sancho-Bru.

✉e-mail: catherine.verfaillie@kuleuven.be; lvgrunsv@vub.be; psancho@clinic.cat

lines such as LX-2 have been used to study liver fibrosis *in vitro*, but they have an intrinsic activated phenotype, and their genetic profiles differ from those of primary HSCs^{9,10}.

Recently, several papers have described the differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) to hepatocyte- and cholangiocyte-like cells^{11–13}; however, these did not produce non-parenchymal cells. We recently generated HSC-like cells from human iPSCs (iPSC-HSCs) and used this method to produce 2D and 3D culture models of fibrosis and drug toxicity¹⁴. In this protocol, we provide additional details of how to differentiate human iPSC to HSC-like cells and coculture these cells with hepatocytes to generate hepatic spheroids.

Development of the protocol

While little is known about the embryonic development of HSCs in humans, studies in animal models have provided important information regarding the origin of fetal HSCs. On day E9.5 of mouse embryogenesis, mesenchymal cells derived from mesoderm, which are situated in the septum transversum mesenchyme, differentiate to mesothelial cells. At day E11.5, these cells migrate to the liver surface, generating fetal HSCs and perivascular mesenchymal cells^{15,16}. However, the cytokines and factors implicated in the differentiation of HSCs are not well defined. We developed a differentiation protocol based on the addition of several growth factors that have been described to play an important role during embryonic and fetal liver development. Bone morphogenetic proteins (BMPs), which belong to the transforming growth factor-beta (TGF β) family, induce differentiation of embryonic stem cells to a mesodermal state¹⁷. In the early stages of mouse embryogenesis (day E9.5), a member of the TGF β family, BMP4, is highly expressed in the septum transversum mesenchyme. Evseenko et al. demonstrated that BMP4 is required for the generation of a multipotent mesoderm progenitor population from human ESCs¹⁸. We therefore stimulated iPSCs with BMP4 to start our differentiation protocol, to induce the development of a mesodermal precursor state.

Other factors, such as fibroblast growth factor (FGF) family members, are involved in mesoderm induction. The presence of FGFs induces differentiation of iPSCs to hepatic progenitor cells, and FGFs have been shown to be involved in the proliferation and expansion of mesenchymal stem cells^{19,20}. In mouse models, FGF1 plays an important role during gastrulation, showing that homozygous mutant embryos for the FGF1 receptor develop an aberrant mesodermal pattern during gastrulation²¹. Other authors demonstrated that FGF3 is also necessary during the first stages of early mesoderm induction^{22,23}. Therefore, we added FGF1 and FGF3 at day 4 of culture to further enhance mesoderm formation.

As a final stage, we cultured cells with palmitic acid and retinol to promote HSC differentiation, maturation and retinyl ester accumulation, an important characteristic of primary HSCs^{24,25}. As described by Asahina et al., activated leukocyte cell adhesion molecule-positive (ALCAM⁺) cells were able to differentiate to HSCs when treated with retinol and palmitic acid¹⁶. The important role of retinol for HSC development was also described by Ijpenberg et al., who demonstrated that depletion of Raldh2, a factor related to retinol metabolism, impaired the differentiation of HSCs in mice²⁶.

Comparison with other methods

The main sources of HSCs that are currently used are primary cells obtained from human liver resections and commercial cell lines (LX-2). However, they present some limitations, such as the difficulty of isolation and expansion of primary HSCs and, for cell lines, an overactivated phenotype^{7–10}. The use of HSCs derived from iPSCs has several advantages. The main advantage is that iPSCs can be expanded extensively, allowing the generation of large numbers of progeny for high-throughput *in vitro* assays. Moreover, obtaining HSCs from multiple different patient-specific iPSCs can enable their use in personalized medicine strategies²⁷.

Alternative approaches have also been reported to generate HSC-like cells from iPSCs. Kouji et al. described the generation of ALCAM⁺ progenitor HSCs from human iPSCs. These progenitor HSCs were able to sustain hepatic progenitor cell maturation in a coculture system²⁸. Moreover, ALCAM⁺ progenitor HSC-like cells could be expanded and further differentiated to mature HSC-like cells following inhibition of the Rho signaling pathway. Miyoshi et al. obtained HSC-like cells that stored vitamin A following 6 d of differentiation. When exposed to fibrogenic stimuli, the resulting HSC-like cells developed an activated phenotype. The maturation of the HSC progeny could be enhanced by coculturing with iPSC-derived hepatic progenitor cells²⁹. Cells obtained following these strategies also promoted hepatocyte maturation in coculture studies, and thus, alternative approaches can be used to model liver physiology and diseases^{30,31}.

Following a different experimental approach, Ouchi et al. generated HSC-like cells by codifferentiating parenchymal and nonparenchymal cells from PSCs. These complex organoids were composed of hepatocytes, HSCs and Kupffer cells coderived from human PSCs. The differentiation protocol recapitulates liver bud formation, and 31% of the resulting cells express HSC markers. This approach allows direct generation of liver organoids without the need to optimize the coculture and results in the production of a multicellular liver model fully derived from PSCs³².

As in the first two studies^{28,29}, our approach¹⁴ is based on a directed differentiation protocol to obtain a HSC-like cell population. Although the other studies used similar factors, such as BMP4 or FGFs, to induce differentiation, timing and culture conditions are different, and the extent of characterization of the resulting cells varies between them. In our protocol, the option to passage and cryopreserve iPSC-HSCs adds flexibility to downstream experimental designs. Thus, direct comparison of the methodologies is challenging, and it cannot yet be determined whether a particular methodology is better. Direct side-by-side comparison and better characterization of the phenotype and function of the final population of cells are required to determine the best procedure to obtain HSC-like cells from iPSCs.

Applications of HSCs derived from iPSCs

iPSC-HSCs have the potential to be used in multiple applications. They represent a new source of HSC-like cells that can be used to evaluate the role of HSCs in wound healing, and in fibrogenic and inflammatory responses. The differentiated cells can be aggregated with hepatocyte cell lines, and thus, cell–cell interactions can be modeled that might facilitate the understanding of liver physiology and enable the development of in vitro models of chronic liver diseases. In addition, iPSC-HSCs can be used for toxicity assays, drug screening and discovery in both 2D and 3D systems. Additionally, this differentiation protocol could be adapted to facilitate the generation of pericytes from other organs. Finally, the differentiation part of the protocol may facilitate the study of human embryonic development of HSCs. Since iPSCs can be genetically modified, iPSC-HSCs can also be used to study the role of specific genes in human liver development and disease^{30,31}.

Limitations of our protocol

Although mesenchymal and mesothelial markers are expressed progressively during the differentiation of iPSCs¹⁴, greater knowledge of the process might enable the protocol to be further optimized and better determine whether the differentiation is similar to the development of human HSCs that occurs in the embryo. Despite the fact that iPSC-HSCs present a similar phenotype and functionality to primary HSCs, at the end of the protocol we obtain a mix of cells with different degrees of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR β) expression.

Although differentiated cells are transcriptionally less activated than cultured primary HSCs, they show higher expression of activation markers than do quiescent primary HSCs, indicating that iPSC-HSCs have to some extent an activated phenotype¹⁴. Moreover, passaging or thawing iPSC-HSCs enhances their activation phenotype. For these reasons, the iPSC-HSCs generated via this protocol are not suitable as a model of completely quiescent HSCs. Therefore, further studies that modify or provide an alternative protocol are required if less activated iPSC-HSCs are needed, particularly for passage and cryopreserved cells.

Experimental design

We have optimized the concentration of cytokines and reagents, as well as the timing of the procedure, to obtain HSC-like cells derived from human iPSCs. The procedure begins by describing the thaw and maintenance of iPSCs (Steps 1–8). The preparation of iPSCs for induction of differentiation is described in Steps 9–17. Induction of iPSCs differentiation toward HSC-like cells, which takes 12 d, is described in Steps 18–25. At the end of the differentiation, iPSC-HSCs can be expanded, cryopreserved, stimulated, or cocultured with hepatocytes to form spheroids (described from Step 26 onward).

iPSCs are seeded at 15,000 cells per cm² in a 12-well plate coated with growth-factor reduced matrigel (Matrigel) and are maintained in Essential 8 Medium (E8 medium). Once iPSCs achieve 70% confluence, the liver differentiation medium (LdM) together with the different sequential growth factors is added to induce differentiation, according to Table 1.

Mesodermal induction is initiated by adding BMP4 until day 4 of differentiation. This is associated with a decreased expression of pluripotency markers such as octamer-binding transcription factor 4

Table 1 | Scheme of the differentiation protocol indicating all the medium changes

Day	Treatment	Analysis
0	LdM + 2 μ L of BMP4 per mL of LdM	Collect one well for qPCR analysis, two for PDGFR β FACS analysis and one for vitamin A FACS analysis
2	LdM + 2 μ L of BMP4 per mL of LdM	NA
4	LdM + 2 μ L of BMP4 + 2 μ L of FGF1 + 2 μ L of FGF3 per mL of LdM	Collect one well for qPCR analysis
6	LdM + 2 μ L of FGF1 + 2 μ L of FGF3 + 1 μ L retinol + 1 μ L palmitic acid per mL of LdM	NA
8	LdM + 1 μ L retinol + 1 μ L palmitic acid per mL of LdM	Collect one well for qPCR analysis, two for PDGFR β FACS analysis and one for vitamin A FACS analysis
10	LdM + 1 μ L retinol + 1 μ L palmitic acid per mL of LdM	Collect one well for qPCR
12	LdM + 1 μ L retinol + 1 μ L palmitic acid per mL of LdM	Collect one well for qPCR analysis, two for PDGFR β FACS analysis and one for vitamin A FACS analysis

At each medium change, cells should first be washed with DPBS (–/–).

(*OCT4*)¹⁴. On day 4 of differentiation, FGF1 and FGF3 are added together with BMP4. On day 6, BMP4 is removed and cells are cultured in retinol and palmitic acid medium, also containing FGF1 and FGF3, to promote a mesenchymal and mesothelial phenotype, which is characterized by the expression of platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFR α*), ecto-5'-nucleotidase (*CD73*) and neurotrophin receptor p75 (*P75NTR*)^{14,33,34}. On day 8, FGF1 and FGF3 are removed and the culture is maintained in medium containing only retinol and palmitic acid until day 12 to promote expression of HSCs markers, such as *PDGFR β* , protocadherin 7 (*PCHD7*) and collagen type 1, alpha 1 (*COL1 α 1*) among others¹⁴. A schematic representation of the differentiation protocol and representative images of cell confluence and morphology changes are shown in Fig. 1a. As shown by Coll et al., transcriptomic, phenotypic and functional characterization of iPSC-HSCs demonstrated that HSCs derived from iPSCs mimic the primary cell phenotype and properties¹⁴.

We recommend monitoring differentiation efficiency by flow cytometry (FACS) analysis of *PDGFR β* expression and vitamin A incorporation (described in Box 1) at various time points during differentiation (Fig. 2a). We suggest evaluating the expression of the main HSC markers by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and immunofluorescence, as shown in Fig. 1b and Fig. 2c, respectively. Appropriate markers to compare derived cells with hepatocytes, quiescent and fibrogenic HSCs, are detailed in Table 2. Details of the methods, primers and antibodies we used can be found in Tables 3 and 4. For further technical details, see the manufacturer's instructions.

At the end of differentiation, 500,000–600,000 iPSC-HSCs are usually present in each well of a 12-well plate. Differentiated cells can be expanded, cryopreserved, stimulated, or cocultured with hepatocytes to model liver fibrosis in vitro following the schemes shown in Fig. 3a. Additional assays, such as inflammatory stimulation and toxicity studies that have been successfully undertaken using the cells generated, are described in Coll et al.¹⁴. Two different human iPSCs lines, BJ1 (made in house and used in this study) and from Sigma, have been successfully differentiated in two different laboratories, and both showed similar gene expression patterns³⁵. This differentiation protocol can also be used in embryonic cell lines such as H9, demonstrating the robustness of the protocol^{14,35}. It is also inexpensive and has a shorter differentiation time (only 12 d) than that for the differentiation protocols of other hepatic cell types, such as hepatocytes or cholangiocytes^{11–13}.

Procedure

FACS analysis of *PDGFR β*

▲ CRITICAL Program the centrifuge at 4 °C. Warm trypsin-EDTA 0.25% and medium containing 10% FBS before starting.

- 1 Detach cells from two wells as described in Step 26A(i–iii).
- 2 Resuspend cells in 3 mL of cold DMEM Glutamax, and place 1 mL in each of three FACS tubes for analysis of autofluorescence, isotype and *PDGFR β* .

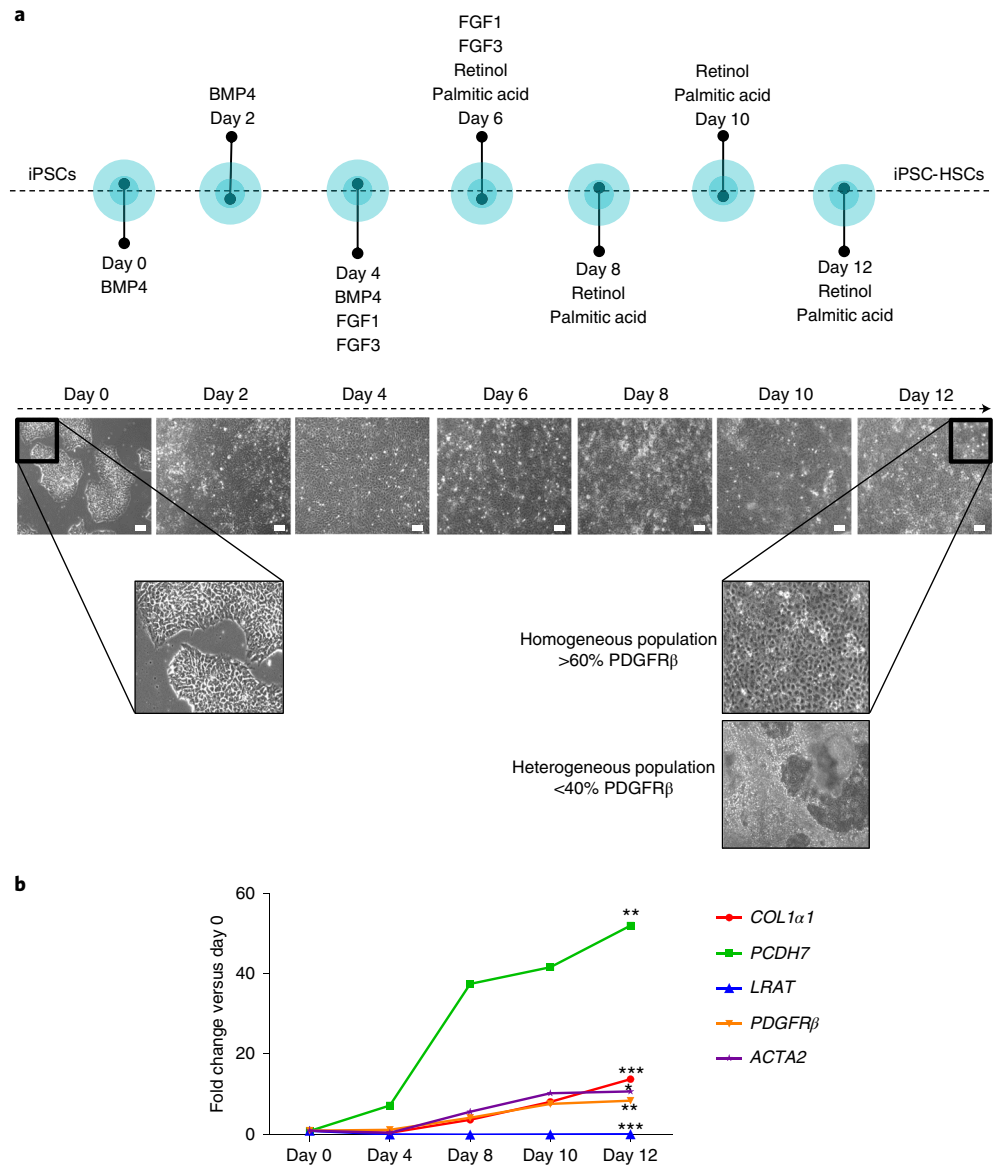


Fig. 1 | Time course of the 12-d differentiation protocol. a, Schematic representation indicating which growth factors and cytokines (BMP4, FGF1, FGF3, retinol and palmitic acid) are included at different timepoints. Microscopy images show the changes in cell morphology observed during differentiation. Scale bars, 100 μ m. Homogeneous and heterogeneous final populations are shown as representative images of good and poor differentiation. **b**, Gene expression of *COL1 α 1*, *PCDH7*, *LRAT*, *PDGFR β* and *ACTA2* assayed by qPCR in samples taken on days 0, 4, 8, 10, and 12 of the differentiation protocol. qPCR was undertaken following the manufacturer’s instructions and using the materials and reagents detailed in Table 3. Experiment performed in five independent differentiations. * $P < 0.05$ compared with day 0 by *t*-test.

- 3 Add DPBS (–/–) to the top of each tube to wash the cells.
- 4 Centrifuge at 300g for 5 min at 4 °C.
- 5 Discard the supernatant and add 100 μ L of cold FACS buffer to each tube. Resuspend cells and, in dark conditions, add 1 μ L of each antibody to isotype and PDGFR β tubes.
▲ CRITICAL STEP The final volume of antibodies will depend on the cell concentration. For this analysis, we optimized two wells of a 12-well plate at the end of differentiation (~340,000 cells) and found the best dilution to be 1:100.
- 6 Incubate for 30 min at RT under photoprotected conditions. At the end of the incubation, add DPBS (–/–) to the top of the tube to wash the cells.
- 7 Centrifuge at 300g for 5 min at 4 °C.

Box 1 | Flow cytometry analysis of PDGFR β and vitamin A across differentiation ● Timing 1 h 30 min**Additional materials required for flow cytometry****Antibodies and reagents**

- PE mouse anti-human CD140b clone 28D4 (BD PharMingen, cat. no. 558821 RRID: [AB_397132](#))
- PE mouse IgG2a, κ isotype control clone MOPC-173 (Biolegend, cat. no. 400214 RRID: [AB_326460](#))
- FACs tubes (BD Biosciences, cat. no. 352052)
- Sodium azide Natriumazid (Sigma, cat. no. S2002)
- MACS SmartStrainer (100 μ m) (Milteny Biotec, cat. no. 130-098-463)
- FACS buffer: 2% FBS, 1% sodium azide and DPBS (-/-). Filter the solution with a 0.22 μ m filter. Once prepared, keep it at 4 °C for up to 2 months.

Equipment

- FACSCanto II cytometer and GACSDiva software (BD Biosciences)
- BD FACSDiva software (BD PharMingen, <http://www.bdbiosciences.com/us/home>)

- 8 Discard the supernatant and resuspend cells in 200 μ L of FACS buffer and perform FACS analysis. Follow the gate strategy described in Fig. 2a to analyze the percentage of PDGFR β -positive cell population.

▲ **CRITICAL STEP** When detaching cells, Matrigel can also be released. Filter the final solution with a cell strainer of 100 μ m to avoid Matrigel obstructing the cytometer.

Flow Cytometry analysis of vitamin A

▲ **CRITICAL** Warm trypsin-EDTA 0.25% and medium containing 10% FBS before starting.

- 1 Detach one well of cells as described in Step 26A(i–iii).
- 2 After centrifugation at 300g for 5 min at 4 °C, remove and discard the supernatant.
- 3 Add DPBS (-/-) to the top of the tube to wash cells.
- 4 Centrifuge at 300g for 5 min at 4 °C.
- 5 Discard the supernatant and resuspend cells in 200 μ L of FACS buffer. Transfer cell suspension to a FACS tube.
- 6 As for PDGFR β FACS analysis, select the singlet population by SSC-A and FSC-A. Detect vitamin A storage positive cells by assessing cells that are autofluorescent at 350–450/50-A, as autofluorescence at this wavelength is an indication that cells contain vitamin A. Figure 2b shows the percentage of vitamin A storage positive cells typically obtained on days 0, 8 and 12 of the differentiation. iPSCs cells can be run as a negative control for autofluorescence.

Expertise needed to implement this protocol

Any student or postdoctoral fellow with iPSCs culture experience can use this protocol. All equipment is standard to most cell culture facilities, and reagents can be purchased from standard scientific companies.

Materials**Reagents****Biological reagents****iPSC**

We have successfully used the human BJ1 iPSC line that was generated in the laboratory of Catherine Verfaillie, from human fibroblast (ATCC CRL-252228; RRID: [CVCL_3653](#)). The results shown here are from that line³⁶.

Differentiated HepaRG cells

We use HPR116215-TA08 purchased from Biopredic (RRID: [CVCL_9720](#)) **! CAUTION** The cell lines used should be regularly checked to ensure they are authentic and are not infected with mycoplasma. We authenticate iPSC by evaluating pluripotency markers by gene expression, FACS and immunofluorescence, formation of embryoid bodies and single-nucleotide polymorphism profiling. **! CAUTION** iPSCs research should always be conducted in accordance with all relevant governmental and institutional guidelines and regulations, depending on each country.

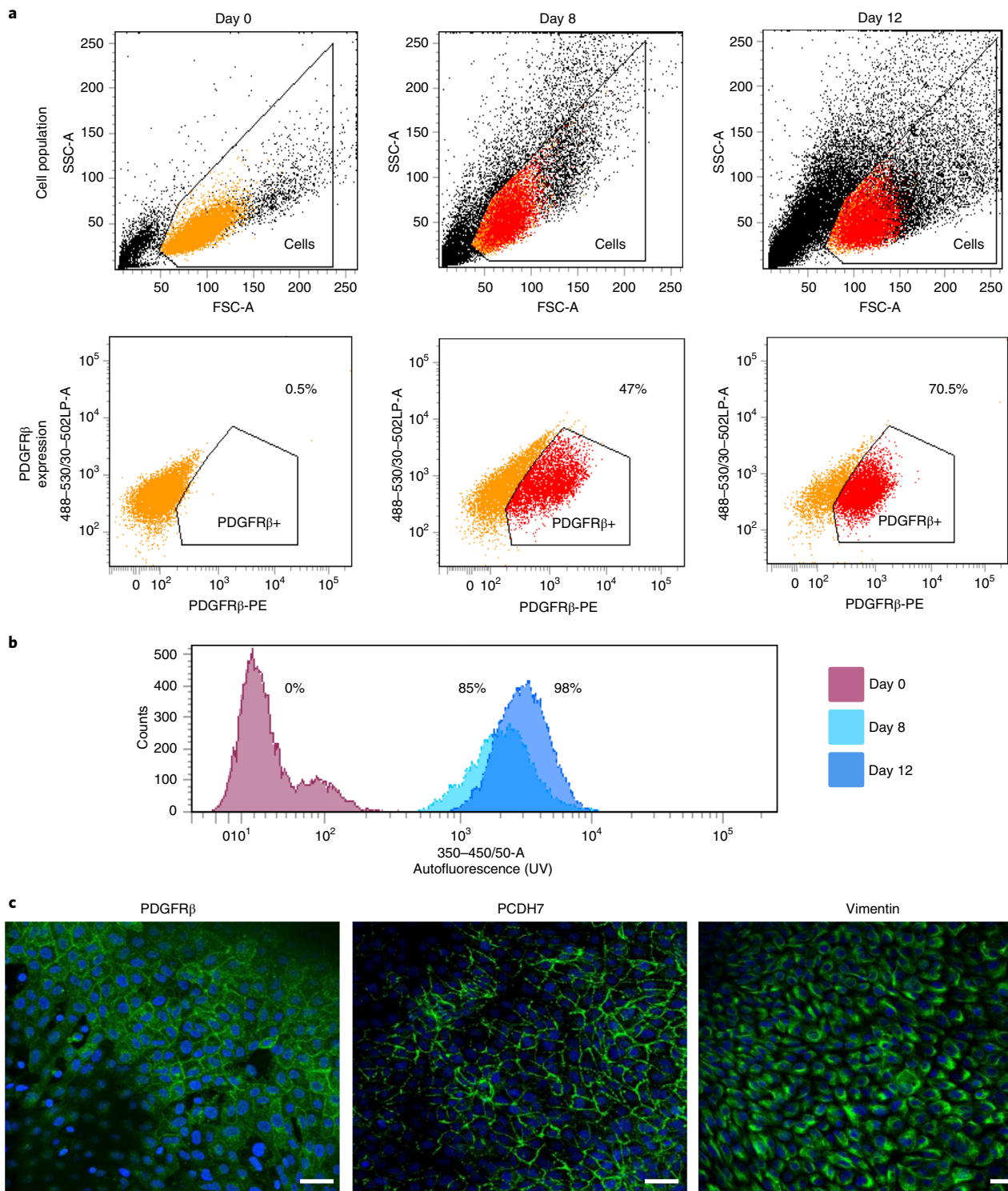


Fig. 2 | Characterization of iPSCs differentiation to HSC-like cells. **a**, Representative flow cytometry plots of total cell population and PDGFR β -positive cells on days 0, 8 and 12 of the differentiation. PDGFR β antibody and isotype antibody were used in a 1:100 dilution as indicated in Box 1. **b**, Representative histogram of flow cytometry analysis of the expression of vitamin A at days 0, 8 and 12 as indicated in Box 1. **c**, Representative immunofluorescence confocal images of PDGFR β , PCDH7 and vimentin in iPSC-HSCs at day 12. Details of the antibodies used are given in Table 4. PDGFR β antibody was used at a 1:50 dilution, PCDH7 antibody was used at a 1:100 dilution, vimentin antibody was used at a 1:100 dilution, and Hoechst (blue) was used at a 1:2000 dilution. Secondary antibodies (goat anti-mouse and donkey anti-rabbit) were used at a final dilution of 1:500. Scale bars, 100 μ m.

Table 2 | Main hepatocytes, quiescent and fibrogenic HSC markers used for gene expression analysis

Hepatocytes	Quiescent HSCs	Fibrogenic HSCs
<i>Albumin</i>	<i>LRAT</i>	<i>LOXL2</i>
<i>CYP3A4</i>	<i>PPARγ</i>	<i>COL1α1</i>
<i>GSTA1</i>	<i>SPARCL</i>	<i>COL3α1</i>
<i>SLCO1B1</i>	<i>PDGFRβ</i>	<i>ACTA2</i>
	<i>PCDH7</i>	<i>PDGFRβ</i>
		<i>PCDH7</i>

Table 3 | Additional materials we use for qPCR analysis

Oligonucleotides	Reference	Company
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>PCDH7</i>	Hs00941345_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>LRAT</i>	Hs00428109_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>SMAD7</i>	Hs00178696_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>LOX</i>	Hs00184700_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>ACTA2</i>	Hs00909449_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>COL1α1</i>	Hs00164004_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>PDGFRβ</i>	Hs00182163_m1	Thermo Fisher Scientific
<i>P75NTR</i>	Hs00609976_m1	Thermo Fisher Scientific
Other reagents		
RNeasy Micro Kit	Cat. no. 74004	QIAGEN
High-capacity cDNA reverse transcription kit	Cat. no. 4368813	Applied Biosystems
TaqMan Fast Advanced Master Mix	Cat. no. 4444556	Thermo Fisher Scientific
TaqMan gene expression assay	Cat. no. 4351372	Thermo Fisher Scientific
Equipment		
PTC-100 programmable thermal controller	Cat. no. 78299-1	MJ Research, INC
Applied Biosystems 7900HT fast real-time PCR system	Cat. no. 4329001	Applied Biosystems

Coating reagents

- Vitronectin (VTN-N) recombinant human protein, truncated (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A14700)
- Corning Matrigel Growth Factor Reduced (GFR) basement membrane matrix, LDEV-free (Cultek, cat. no. 356230)

Cell culture medium

- Essential 8 Medium (E8 medium; Thermo Fisher Scientific, cat. no. A1517001)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), low glucose, pyruvate (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 31885)
- DMEM, high glucose, GlutaMAX supplement, pyruvate (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 31966)
- MCDB 201 medium (Sigma, cat. no. M66770)
- L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate (L-ascorbic acid) (Sigma, cat. no. A8960)
- Insulin-transferrin-selenium 100 \times (ITS-G; Invitrogen, cat. no. 41400045)
- Linoleic acid-albumin from bovine serum albumin (LA-BSA; Sigma, cat. no. L9530)
- 2-Mercaptoethanol (50 mM) (Invitrogen, cat. no. 31350)
- Dexamethasone (Sigma, cat. no. D1756)
- Penicillin–streptomycin mixture (P/S; LONZA, cat. no. 17-603E)

Table 4 | Additional materials we use for immunofluorescence analysis

Antibodies	Reference	Company
Recombinant Anti-PDGFR beta antibody [Y92] - C-terminal	Cat. no. ab32570 (RRID: AB_777165)	Abcam
Anti-PCDH7 antibody [OTI2G6]	Cat. no. ab139274 (RRID: AB_2868608)	Abcam
Novocastra Liquid Mouse Monoclonal Antibody Vimentin	Cat. no. NCL-VIM-V9 (RRID: AB_442141)	Leica Biosystems
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Cat. no. A-11001 (RRID: AB_2534088)	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Cat. no. 711-545-152 (RRID: AB_2313584)	Jackson Immuno Research
Hoechst 33342, trihydrochloride, trihydrate - 10 mg mL ⁻¹	Cat. no. H3570 (RRID: AB_2868610)	Thermo Fisher Scientific
Other reagents		
Formaldehyde solution 4%, buffered, pH 6.9	Cat. no. 100496	Millipore Corporation
Equipment		
Laser scanning confocal spectral high-speed multiphoton microscope	TCS SP8 MP	Leica
Fiji ImageJ	https://imagej.net/Using_Fiji	Fiji

- HepaRG thawing medium supplement (HTM; Biopredic, cat. no. ADD670049)
- HepaRG serum-free induction medium supplement (HFM; Biopredic, cat. no. ADD650036)
- Gibco fetal bovine serum, qualified, One Shot format (FBS; Life Technologies, cat. no. A3160802)

Cytokines

- Bone morphogenic protein (BMP4; R&D, cat. no. 314-BP-010)
- Fibroblast growth factor 1 (FGF1; R&D, cat. no. 232-FA-025)
- Fibroblast growth factor 3 (FGF3; R&D, cat. no. 1206-F3-025)
- Retinol (Sigma, cat. no. R7632-100MG)
- Palmitic acid (Sigma, cat. no. P0500)

Other reagents

- UltraPure 0.5 M EDTA (Life Technologies, cat. no. 15575-020)
- Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) without calcium/magnesium; DPBS (-/-) (LONZA, no. BE17-515F)
- Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (trypsin; Thermo Fisher Scientific, cat. no. 25200056)
- TGF-beta 1 human recombinant (TGFβ; Peprotech, cat. no. AF-100-21C)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, cat. no. 5879-100mL)
- 10× PBS buffer 4 L OmniPur (Calbiochem-Merck, cat. no. 6505-OP)
- Absolute ethanol for molecular biology (Panreac Quimica, cat. no. A8075.1000)
- 2-Propanol (Panreac Quimica, cat. no. 8710901212)
- Chloridric acid 35% (AGROVIN, cat. no. 141019)
- Bovine serum albumin (BSA; Sigma, cat. no. A8806)
- Citric acid 99% (Sigma, cat. no. C0759)

Equipment

- Orbital cell shaker suited for use in cell culture incubator (Infors Celltron benchtop shaker for CO₂ incubator Ø 25 mm, cat. no. INF69222)
- Integra Viaflo assist base unit (Integra, cat. no. 4500)
- Corning LSE vortex mixer with standard tube head, 230V, EU Plug (Corning, cat. no. 6776)
- Milli-Q water purification system (Millipore, cat. no. 7003/7005)
- Pipetboy Acu Classic (Cultek, cat. no. 39155000)
- Serologic tips pipettes of 5 mL, 10 mL and 25 mL (Cultek, cat. no. 4487, cat. no. 4488 and cat. no. 4489)
- Pipette tips: 10 µL, 100 µL, 200 µL and 1,000 µL (Eppendorf, cat. nos. 0030078500, 0030078543, 0030078837 and 0030077571)

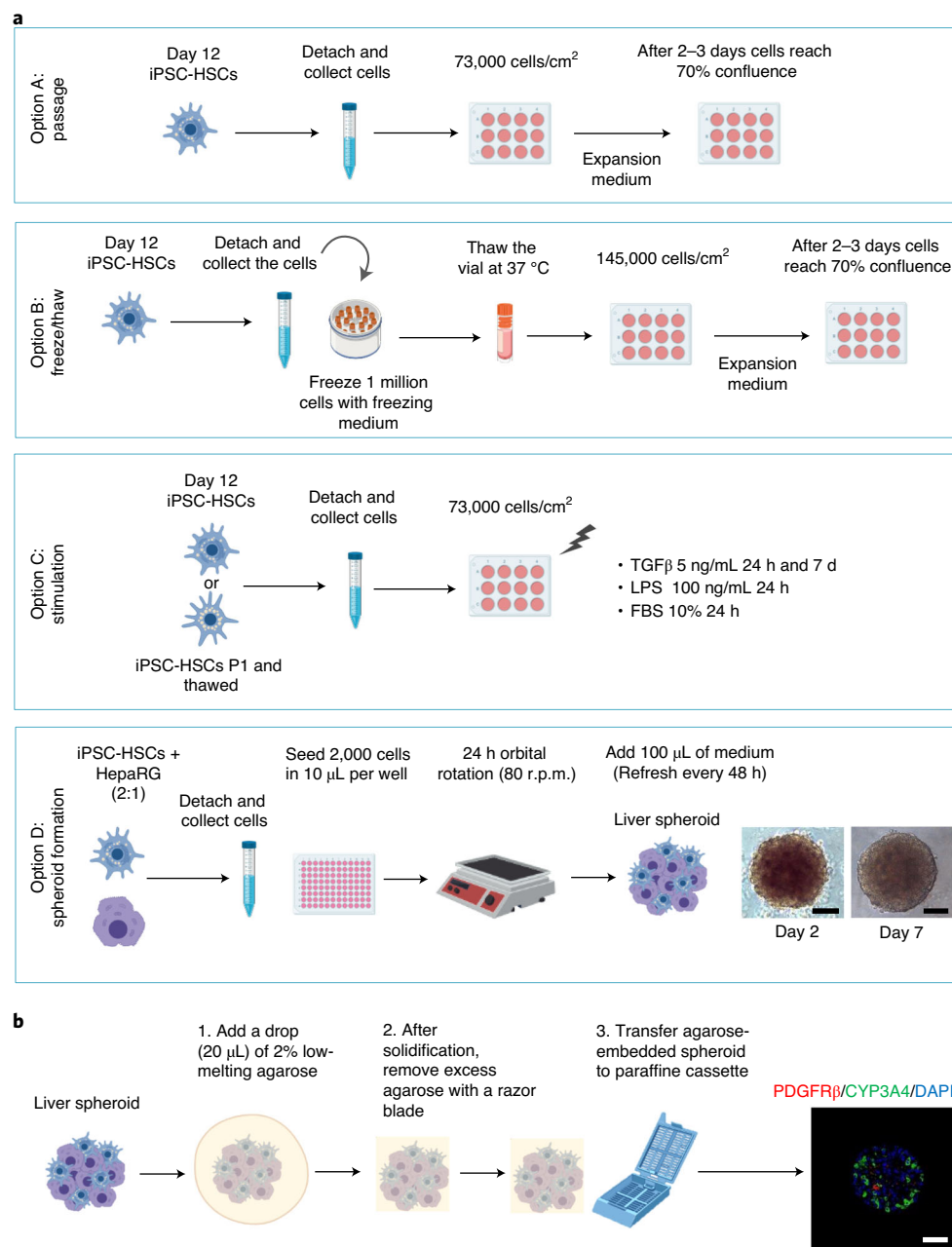


Fig. 3 | Scheme of the downstream assays with iPSC-HSCs. **a**, Schematic representations of the different downstream assays that can be undertaken at the end of the differentiation (Step 26). Option A: subculture and expansion of iPSC-HSCs. Option B: freezing and thawing iPSC-HSCs. Option C: stimulation of iPSC-HSCs. Option D: spheroid formation. Scale bar, 100 μm. **b**, Schematic process of spheroid embedding used for immunofluorescence analysis of spheroids for PDGFRβ antibody used in a 1:50 dilution, CYP3A4 antibody used in a 1:100 dilution and DAPI (mounted DAPI containing medium) staining. Scale bar, 100 μm. For more technical information, see Box 2.

- 10 μL graduated filter tip (sterile) (StarLab, cat. no. S1121-3810)
- CLEARLine filter tips racked sterile 100 μL (DDBiolab, cat. no. 036060CL)
- 200 μL and 1,000 μL filter tips (Labclinics, cat. nos. LAB200ULFNL and LAB1000ULFNL)
- 8-channel INTEGRA Viaflo electronic pipettes 10–300 μL and 50–1,250 μL (Integracat. no. 4623, cat. no. 4624)
- Tissue culture test plates 6 wells (TPP_Reactiva, cat. no. 92006)
- Tissue culture test plates 12 wells (TPP_Reactiva, cat. no. 92012)
- Microplate 96 well, ps, clear, sterile, u-bottom, cell-repellent surface (Greiner-Bio, cat. no. 650970)

- Stericup and Steritop vacuum-driven sterile filters (Merck, cat. no. SCGVU05RE)
- Falcon 15 mL and 50 mL tubes (Corning, cat. nos. 15430791 and 10604551)
- Eppendorf tubes 1.5 mL pyrogen free, RNase free (STARLAB, cat. no. S1615-5510)
- Acrodisc syringe filters with supor membrane 0.2 μm (Pall Life Sciences, cat. no. PN4612)
- BD Plastipak syringe Luer 20 mL 300613 (BD Plastipack, cat. no. 300613)
- Mr. Frosty freezing container (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 5100-0001)
- Cryogenic vials (Greiner CRYOS.S, cat. no. 121263)

Software

- ZEN Lite from ZEISS Microscopy (ZEISS, <https://www.zeiss.com/microscopy/us/products/microscope-software/zen-lite.html>)
- GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, <http://www.graphpad.com/>)

Reagent setup

Vitronectin-coated six-well plates

To coat a six-well plate, thaw a 60 μL aliquot and dilute it in 6 mL of sterile DPBS without calcium and magnesium DBPS (–/–) to give a final concentration of vitronectin of 1% (vol/vol). Resuspend, add 1 mL to each well, move the plate gently to spread the solution evenly across the well and incubate the plate at room temperature (RT; 20 °C) for 1 h or at 37 °C for 20–30 min before seeding the cells. Coated plates can alternatively be stored wrapped in parafilm at 4 °C for a maximum of 1 week. Before use, aspirate and discard excess vitronectin solution and wash the wells once with DPBS (–/–).

Matrigel-coated 12-well plates

To coat a 12-well plate, resuspend a 120 μL Matrigel aliquot in 6 mL ice-cold DMEM, low glucose, pyruvate (DMEM), to give a final Matrigel concentration of 2% (vol/vol). Add 500 μL of the solution to each well, move the plate gently to spread the solution evenly across the well and incubate the plate at RT for 1 h or at 37 °C for 20–30 min before seeding the cells. Alternatively, coated plates can be stored wrapped in parafilm at 4 °C for a maximum of 1 week. Before use, aspirate and discard excess Matrigel solution and wash the wells once with DPBS (–/–). **▲ CRITICAL** Matrigel should be kept under cold conditions (on ice) during the whole process to avoid spontaneous polymerization.

Essential 8 Medium (E8 medium)

To prepare 500 mL of complete E8 medium, add 10 mL of Essential 8 Supplement (50 \times) to 490 mL of E8 medium. E8 medium supplemented medium can be stored at 2–8 °C for up to 2 weeks, according to the manufacturer's instructions.

0.5 mM EDTA

Dissolve 50 μL of UltraPure 0.5 M EDTA, pH 8, in 50 mL of DPBS (–/–) and filter with a 0.22 μm filter. EDTA should be stored at RT. Diluted EDTA can be stored at 2–8 °C for up to 6 months.

MCDB

Dissolve 8.85 g of MCDB in 500 mL of MilliQ water. Stir with magnetic bar for 10–20 min, and adjust the pH to 7.2. Filter the solution with a 0.22 μm filter. Store the dry powder medium at 2–8 °C. Once the solution is made, store it at 2–8 °C for up to 1 month.

Dexamethasone

Dissolve 5 mg in 1 mL of pure ethanol to obtain a 5,000 ng μL^{-1} stock solution. Dilute the stock dexamethasone solution to a final working concentration of 98 ng μL^{-1} in MilliQ water. Filter the solution with a 0.22 μm filter. Stock solution should be stored at –20 °C. The working solution is stable at 4 °C for up to 1 month, according to the manufacturer's instructions.

BMP4

Reconstitute the vial (10 μg) in 1 mL of 4 mM HCl containing 0.1% (wt/vol) BSA to obtain a final concentration of 10 ng μL^{-1} . Powdered cytokine can be stored for up to 12 months at –20 °C to –70 °C. After reconstitution, it can be stored for 1 month at 2–8 °C and for longer storage (3 months) at –70 °C, according to the manufacturer's instructions.

FGF1

Reconstitute the vial (25 µg) in 2.5 mL of DPBS (-/-) containing 0.1% (wt/vol) BSA to obtain a final concentration of 10 ng µL⁻¹. Powdered cytokine can be stored for up to 12 months at -20 °C to -70 °C. After reconstitution, it can be stored for 1 month at 2–8 °C and for longer storage (3 months) at -70 °C, according to the manufacturer's instructions.

FGF3

Reconstitute the vial (25 µg) in 2.5 mL of DPBS (-/-) containing 0.1% (wt/vol) BSA to obtain a final concentration of 10 ng µL⁻¹. Powder cytokine can be stored for up to 12 months at -20 °C to -70 °C. After reconstitution, it can be stored for 1 month at 2–8 °C and for longer storage (3 months) at -70 °C, according to the manufacturer's instructions.

Retinol

Reconstitute the vial (100 mg) in 0.348 mL of pure ethanol to obtain a stock solution of 1 M under dark conditions. Filter the solution with a 0.22 µm filter. Dilute it in pure ethanol to a final working concentration of 5 mM. Retinol is stable for up to 1 year at -20 °C. Once diluted, it should be stored in dark conditions at -70 °C, according to the manufacturer's instructions.

Palmitic acid

Dissolve 25.643 mg of palmitic acid in 1 mL of pure ethanol to obtain a final concentration of 0.1 M. Filter the solution with a 0.22 µm filter. Vortex the solution vigorously to dissolve it. Powder palmitic acid should be stored at RT. Working solution should be stored at -20 °C to -70 °C for up to 1 month.

TGF-β

Resuspend the vial (2 µg) in 1 mL of 10 mM citric acid at pH 3, filter the solution using a 0.22 µm filter and prepare aliquots at a final concentration of 2,000 ng mL⁻¹. Store TGF-β at -20 °C and after reconstitution at -70 °C for 3 months.

L-Ascorbic acid

Dissolve 1.45 g of L-ascorbic acid in 500 mL PBS 1× to obtain a 10 mM solution. Stir with magnetic bar for 10–20 min in dark conditions and filter with a 0.22 µm filter. L-Ascorbic acid should be stored at -20 °C for up to 2 years, according to the manufacturer's instructions.

LdM

To prepare a final volume of 500 mL, add 285 mL DMEM low glucose (can be stored at 2–8 °C for up to 12 months from date of manufacture), 200 mL of MCDB, 5 mL of P/S (store at -10 °C to -20 °C up to the expiry date according to the manufacturer's instructions), 5 mL of L-ascorbic acid, 1.25 mL of ITS-G (store at 2–8 °C for up to 2 years), 1.25 mL of LA-BSA (can be stored at 2–8 °C for up to 2 years), 0.5 mL of 2-mercaptoethanol (can be stored at 2–8 °C for up to the expiry date according to the manufacturer's instructions) and 2 mL of dexamethasone (working solution). Filter the solution with a 0.22 µm filter. This prepared medium can be maintained at 4 °C for 1 month.

Freezing medium

80% FBS (can be stored at 2–8 °C up to the expiry date) and 20% DMSO (store at RT). Filter the solution with a 0.22 µm filter.

Expansion medium

DMEM Glutamax (can be stored at 2–8 °C for up to 12 months from date of manufacture), 10% FBS and 1% P/S. Filter the solution with a 0.22 µm filter.

Low FBS medium

DMEM Glutamax, 1% FBS and 1% P/S. Filter the solution with a 0.22 µm filter.

Thawing differentiated HepaRG cells ● Timing 20 min

▲ **CRITICAL** Prewarm the HepaRG thawing medium supplement (HTM) in a 37 °C water bath.

- 1 Pipette 9 mL of prewarmed HTM into a sterile tube.
- 2 Under the laminar flow hood, briefly twist the cap of the cryovial a quarter turn (do not open it completely) to release the internal pressure and then close it again.

- 3 Quickly transfer the cryovial to a water bath set at 37 °C. Do not submerge it completely, and be careful not to allow water to penetrate the cap.
- 4 Aseptically transfer the ‘semi’-thawed HepaRG cell suspension into the tube containing 9 mL of the prewarmed HTM.
- 5 Rinse out the cryovial once with ~1 mL of HTM, and return the resulting suspension to the tube.
- 6 Centrifuge the differentiated HepaRG cell suspension for 3 min at 500g at RT.
- 7 Aspirate the supernatant, and resuspend the differentiated HepaRG cell pellet gently with HTM in 5 mL. **▲ CRITICAL STEP** Do not try to dissociate any large clusters of cells.

Procedure

Maintenance of human iPSCs ● Timing 3–4 d (15 min for plating cells)

▲ CRITICAL E8 medium should be warmed at RT prior to thawing the cells. Keep the vitronectin-coated plate inside the incubator for a minimum of 20 min before seeding the cells. Ensure that the water bath is at 37 °C before starting the procedure.

- 1 Thaw the cells at 37 °C by swirling the cryovial in a water bath. When only a small ice crystal remains, which is usually after 1–2 min, take the cryovial out of the water bath.
- 2 Spray the cryovial with ethanol and place it in the laminar flow hood.
- 3 Add 0.5 mL of warmed E8 medium in the cryovial, and transfer the cells into a 15 mL conical tube containing 9.5 mL of E8 medium.
- 4 Centrifuge cell suspension at 300g for 5 min at RT.
- 5 Meanwhile, wash the vitronectin-coated six-well plate with DPBS (–/–).
- 6 Remove the supernatant, and resuspend cells in 2 mL of E8 medium. Pipette carefully as it is important to maintain cell clusters. Transfer the cell suspension to one well.
? TROUBLESHOOTING
- 7 Incubate cells at 37 °C and replace medium daily with fresh E8 medium.
? TROUBLESHOOTING
- 8 When cells reach 70% confluence, move to next step to disaggregate the colonies.
? TROUBLESHOOTING

Preparation of human iPSCs for HSC differentiation ● Timing 1–3 d (15 min for plating cells)

▲ CRITICAL One well of undifferentiated iPSCs must be expanded into a full 6-well plate to have enough cells to start a 12-well plate differentiation. To expand iPSCs, cells have to be detached following Steps 9–12.

▲ CRITICAL Coat 12-well plate with Matrigel before starting iPSC differentiation. Incubate the plate at 37 °C for at least 20 min before seeding the cells. Also, warm E8 medium and EDTA solution at RT.

- 9 Remove E8 medium from cells and rinse the wells with DPBS (–/–) to wash them.
- 10 Remove DPBS (–/–) and add 1 mL of EDTA 0.5 mM to each well. Wait 1–2 min at 37 °C or 2–3 min at RT.
- 11 Check the cell colonies under the microscope. Colonies should start to detach.
- 12 Aspirate and discard EDTA. Add 1 mL of E8 medium to each well, and disrupt the cell colonies by gently pipetting the medium several times using a 1 mL pipette. Collect the cell suspension in a 15 mL tube.
- 13 Wash the Matrigel-coated plate with DPBS (–/–).
- 14 Count the cells collected in the 15 mL tube. Plate cells at a density of 15,000 cells per cm² in E8 medium.
▲ CRITICAL 720,000 iPSCs are usually obtained from 1.5 wells of a six-well plate at 70% confluence but can differ between iPSC cell lines.
? TROUBLESHOOTING
- 15 Move the plate to distribute the cells homogeneously.
- 16 Keep the cells in the incubator.
- 17 Change the medium daily to fresh E8 medium until the culture reaches 70% confluency (this usually takes 1–2 d). Then go on to the next step to start the differentiation protocol.
? TROUBLESHOOTING

iPSC differentiation to HSCs ● Timing 12 d for complete the differentiation (10 min for medium change)

▲ **CRITICAL STEP** Prepare the corresponding media to the day of differentiation before starting culture work and warm it up at RT or 37 °C. Medium changes should be performed every 48 h as detailed in Table 1.

18 Remove and discard E8 medium, and wash cells once with DPBS (–/–).

▲ **CRITICAL STEP** Washing is important to remove any remaining E8 medium.

19 Add LdM supplemented with 2 µL per mL of medium of BMP4 stock solution (10 ng µL⁻¹). This is considered day 0 of differentiation. To characterize the cells at the start of differentiation, we recommend you follow the analyses described in Box 1 for flow cytometry analysis and Table 3 for qPCR. Use one well for qPCR analysis, two wells for flow cytometry analysis of PDGFRβ, and one well for flow cytometry analysis of vitamin A.

20 On day 2, remove and discard medium, wash cells with DPBS (–/–) and add LdM supplemented with 2 µL of BMP4 stock solution (10 ng µL⁻¹) per mL of LdM.

21 On day 4, remove and discard medium, wash the cells with DPBS (–/–) and add LdM supplemented with 2 µL of BMP4, 2 µL of FGF1 and 2 µL of FGF3 stock solutions (10 ng µL⁻¹) per mL of LdM. We recommend you use one well of cells for qPCR analysis (Table 3).

▲ **CRITICAL** On day 4, the wells should be completely confluent.

22 On day 6, remove and discard medium, wash cells with DPBS (–/–) and add LdM containing 2 µL of FGF1 and 2 µL of FGF3 stock solutions (10 ng µL⁻¹), 1 µL of retinol working solution (5 mM) and 1 µL of palmitic acid stock solution (0.1 M) per mL of LdM.

▲ **CRITICAL** Palmitic acid is difficult to dilute, and therefore, the stock solution might precipitate. Vortex the solution before use.

23 On day 8, remove and discard the medium, wash cells with DPBS (–/–) and add LdM supplemented with 1 µL of retinol working solution (5 mM) and 1 µL of palmitic acid stock solution (0.1 M) per mL of LdM. We recommend you use one well for qPCR analysis (Table 3) and another three wells for FACS analysis to check the expression of PDGFRβ and presence of vitamin A as described in Box 1.

▲ **CRITICAL STEP** Around 50% and 90% of cells should express PDGFRβ and contain vitamin A, respectively. If the expression of PDGFRβ is less than 25%, do not continue with the differentiation.

24 On day 10, remove and discard the medium, wash cells with DPBS (–/–) and add LdM supplemented with 1 µL of retinol working solution (5 mM) and 1 µL of palmitic acid stock solution (0.1 M) per mL of LdM. We recommend you process one well for qPCR analysis (Table 3).

▲ **CRITICAL** The cell population should have a more homogeneous morphology compared with previous days, and lipid droplets should be visible by viewing the culture under the microscope using a 10× objective.

25 On day 12, iPSC-HSCs should have been obtained and can be used in downstream assays, as described in the next step. We also recommend one well of cells be used for qPCR analysis (Table 3) and two for PDGFRβ FACS analysis and one for vitamin A analysis as described in Box 1. At day 12, supernatant can be collected to perform ELISA analysis if required.

▲ **CRITICAL STEP** Around 60% of iPSC-HSCs should be positive for PDGFRβ. Close to 100% of cells should contain vitamin A.

▲ **CRITICAL** At the end of the differentiation, each well should contain 500,000–600,000 cells.

▲ **CRITICAL** Gene expression assays and immunofluorescence procedures for further characterization of the differentiation are explained in Tables 3 and 4. For more information about technical details, see the manufacturer's instructions.

▲ **CRITICAL** Be aware that iPSC-HSCs are not quiescent and show some degree of activation, and therefore their activation state could potentially limit downstream applications.

■ **PAUSE POINT** iPSC-HSCs can be incubated in the same plate until day 14 without further changes. However, we recommend to use them on day 12. Cells maintained in the same plate for more than 14 d start to detach and die.

? TROUBLESHOOTING**Downstream assays that can be undertaken with iPSC-HSCs**

26 The iPSC-HSCs can now be used in a variety of ways. Follow Option A to subculture and expand iPSC-HSCs. Follow Option B to freeze and subsequently thaw iPSC-HSCs. Follow Option C to stimulate iPSC-HSCs. Follow Option D to coculture with hepatocytes and form spheroids.

(A) **Subculture and expansion of iPSC-HSCs** ● **Timing 2–3 d (10 min for cell passage)**

▲ **CRITICAL** A new 12-well plate coated with Matrigel should be used to expand iPSC-HSCs. Depending on the experiments to be performed, other plate types can be used. Incubate it at 37 °C for a minimum of 20 min before seeding cells. Warm the expansion medium and trypsin-EDTA 0.25% at 37 °C or RT before use.

(i) Remove and discard medium, incubate iPSC-HSCs with DPBS (–/–) for 1 min at RT, remove, and add 0.5 mL of trypsin-EDTA 0.25% to each well. Incubate cells at 37 °C for 2–3 min to detach.

▲ **CRITICAL STEP** Differentiated iPSC-HSCs are strongly attached to the Matrigel-coated plate as they secrete ECM proteins. Therefore, dissociation with trypsin might take longer than is usual for iPSCs. If cells are detached before day 8 or 10 of differentiation, dissociation times tend to be shorter (1–2 min at 37 °C). If the percentage of PDGFRβ-positive cells is less than 60%, dissociation might take longer.

(ii) Check the cells under a microscope and, when cells start detaching, add 0.5 mL per well of medium containing 10% FBS to stop the reaction. Collect the cells by gently pipetting the medium.

▲ **CRITICAL STEP** When detaching cells, Matrigel can also be released. If so, carefully remove it.

? **TROUBLESHOOTING**

(iii) Centrifuge at 300g for 5 min at RT.

(iv) During the centrifugation, wash the Matrigel precoated 12-well plate with DPBS (–/–).

(v) After centrifugation, aspirate the supernatant and add an appropriate volume of expansion medium. Usually, a cell split ratio of 1:2 for the first passage in a 12-well plate enables seeding of 73,000 cells per cm². The split ratio should be adapted according to the plate type and the number of wells being used.

(vi) Seed the cell suspension in the Matrigel-coated plate, move the plate to distribute cells homogeneously and place it in the incubator.

(vii) Discard and replace the medium the day after seeding and subsequently every other day with fresh expansion medium.

? **TROUBLESHOOTING**

(viii) After 2–3 d the wells should be ~70% confluent. They can be used for in vitro studies or expanded and passaged for a total of three passages.

▲ **CRITICAL** Passaging iPSC-HSCs promote cell activation, which could potentially limit downstream applications.

▲ **CRITICAL STEP** Passaged iPSC-HSCs can be seeded without a Matrigel coating for in vitro studies of HSC activation.

(B) **Freezing and thawing iPSC-HSCs** ● **Timing 2–3 d to obtain a confluent culture postthaw (30 min to freeze and 20 min to thaw)**

▲ **CRITICAL** Prepare the freezing medium and store it at 4 °C. It should be cold when added to the cell suspension. Warm trypsin-EDTA 0.25% and medium containing FBS at RT or 37 °C. Program the centrifuge at 4 °C.

(i) **Freezing:** remove and discard medium, incubate iPSC-HSCs with DPBS (–/–) for 1 min at RT, remove, and add 0.5 mL of trypsin-EDTA 0.25% to each well. Incubate cells at 37 °C for 2–3 min to detach.

▲ **CRITICAL STEP** Differentiated iPSC-HSCs are strongly attached to the Matrigel-coated plate as they secrete ECM proteins. Therefore, dissociation with trypsin might take longer than is usual for iPSCs.

(ii) Check the cells under a microscope and, when cells start detaching, add 0.5 mL per well of medium containing 10% FBS to stop the reaction. Collect the cells by gently pipetting the medium.

▲ **CRITICAL STEP** When detaching cells, Matrigel can also be released. If so, carefully remove it.

(iii) Count the collected cells.

▲ **CRITICAL STEP** Two wells of the 12-well plate should contain 1 million iPSC-HSCs, which is usually sufficient for one cryovial.

(iv) Centrifuge the cells at 300g for 5 min at 4 °C.

(v) Discard the supernatant and resuspend the cells with the corresponding volume of freezing medium to give a final concentration of 1 million iPSC-HSCs per mL of medium. Add 1 mL cell suspension per cryovial.

- (vi) Place the cryovials rapidly into a cryofreezing container, and keep overnight at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - (vii) After 24 h, transfer the cryovial to a liquid nitrogen tank for long-term storage.
 - **PAUSE POINT** Cells can be stored in liquid nitrogen.
 - (viii) **Thawing:** incubate plate precoated with Matrigel at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at least 20 min, and also warm the expansion medium. Ensure the water bath is at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ before moving to the next step. Thaw a cryovial of cells in the $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath. When only an ice crystal remains, take the cryovial out of the bath and spray it with ethanol before placing it into the hood.
 - (ix) Add 0.5 mL warmed expansion medium to the cryovial, and transfer the cells to a 15 mL tube containing 9.5 mL of the same medium.
 - ▲ **CRITICAL** After thawing, cell viability should be $\sim 70\%$.
 - (x) Centrifuge cells at 300g for 5 min at RT.
 - (xi) Meanwhile, wash the Matrigel-coated plate with DPBS (-/-).
 - (xii) After centrifugation, aspirate the supernatant, resuspend cells with the corresponding volume of expansion medium to plate 145,000 cells per cm^2 . (As one million cells were frozen per cryovial, approximately, one cryovial should be split across two wells of a 12-well plate.) Move the plate gently to distribute cells homogeneously.
 - (xiii) Incubate the cells at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - (xiv) After 24 h, discard and replace with expansion medium.
 - ? **TROUBLESHOOTING**
 - (xv) Replace medium every 48 h until cells reach 70% confluence (this usually occurs after 2–3 d). Cells are now ready to be used for further studies.
- (C) **Stimulation of iPSC-HSCs** ● **Timing 24 h or 7 d of stimulation (15 min for medium change)**
- ▲ **CRITICAL** Passaged or thawed iPSC-HSCs at 70% confluence can be used.
 - ▲ **CRITICAL** Low FBS medium should be warmed before use.
 - (i) Remove medium, and replace it with Low FBS medium.
 - (ii) After 24 h incubation in Low FBS medium, aspirate and discard the medium and incubate with Low FBS medium containing TGF β at 2.5 μL of the stock solution per mL (final concentration of 5 ng mL^{-1}).
 - ▲ **CRITICAL** Inflammatory assays can be performed by lipopolysaccharide (LPS) stimulation instead of TGF β stimuli. Incubate the cells for 24 h with a final LPS concentration of 100 ng mL^{-1} as described in Coll et al.¹⁴.
 - (iii) After 24 h or 7 d of stimulation, remove medium and harvest RNA from iPSC-HSCs for activation analysis (Table 3).
 - ▲ **CRITICAL** For chronic TGF β stimulation, change medium every other day.
 - ▲ **CRITICAL** As a positive control for the activation of iPSC-HSCs, cells can be compared with primary HSCs. Also, passaged cells can be used as a positive control for the activation.
- (D) **Spheroid formation** ● **Timing 21 d for the complete formation and stabilization of the culture (1 h for seeding cells and 10 min for medium refreshment every 48 h)**
- ▲ **CRITICAL** Differentiated HepaRG cells are also required, thawed immediately prior to starting this section following the procedure described in the Materials section (Thawing differentiated HepaRG cells). For iPSC-HSCs detachment, warm up trypsin-EDTA 0.25% and medium containing FBS at RT or $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - (i) **Spheroid formation:** fill the outer wells of a cell-repellent 96-well microplate with 100 μL of DPBS (-/-) supplemented with P/S, to prevent medium evaporation during culture.
 - (ii) Remove and discard medium, incubate iPSC-HSCs with DPBS (-/-) for 1 min at RT, remove, and add 0.5 mL of trypsin-EDTA 0.25% to each well. Incubate cells at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2–3 min to detach.
 - ▲ **CRITICAL STEP** Differentiated iPSC-HSCs are strongly attached to the Matrigel-coated plate as they secrete ECM proteins. Therefore, dissociation with the trypsin might take longer than is usual for iPSCs. If cells are detached before day 8 or 10 of differentiation, dissociation times tend to be shorter (1–2 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$).
 - (iii) Check the cells under a microscope and, when cells start detaching, add 0.5 mL per well of medium containing 10% FBS to stop the reaction. Collect the cells by gently pipetting the medium.
 - ▲ **CRITICAL STEP** When detaching cells, Matrigel can also be released, if so, carefully remove it.

Box 2 | Immunostaining of the liver spheroids ● Timing 2 h

Procedure

Fixing spheroids

- 1 Remove medium (keep for ELISA analysis if desired) from the wells, and wash spheroids twice with DPBS (-/-).
- 2 Add 100 μ L of 4% formaldehyde solution (formalin) to fix spheroids, and incubate 8 min at RT.
- 3 Dispose of formalin waste according to institutional disposal instructions, and wash spheroids three times with PBS 1 \times .
▲ CRITICAL STEP Fixed spheroids can be stored in PBS 1 \times at 4 $^{\circ}$ C for several weeks. Spheroids can be used for whole spheroid staining (conditions need to be optimized for each antibody) or can be further processed for paraffin embedding and sectioning as described in the next step.

? TROUBLESHOOTING

Embed spheroids in paraffin

- 4 Transfer three to six fixed spheroids per condition to a microscope slide, placing them close together. Remove as much PBS 1 \times as possible.
- 5 Carefully add a drop of \sim 20 μ L of 2% low-melting-point agarose on top of the spheroids and leave to solidify. This should not take more than 1 min.
▲ CRITICAL Aim to keep the spheroids in one plane. This will allow staining, imaging and quantification of the spheroids at the same time.
- 6 Use a razor blade to remove excess agarose and cut into a square shape. Gently slide the agarose cube with spheroids into a paraffin embedding cassette.
- 7 Use a benchtop tissue processor to embed the spheroids in paraffin. Cut paraffin sections of 3–7 μ m with a microtome according to Fig. 3b.

- (iv) Centrifuge at 300g for 5 min at RT.
- (v) Mix HepaRG and iPSC-HSCs in a 1:2 ratio to give a volume of 2,000 cells total per 10 μ L HFM medium. Allow an extra \sim 10% cell mix to compensate for loss of cells and medium when using a multichannel pipette for seeding.
- (vi) Carefully seed 10 μ L of cell suspension mix in the center of each well of the microplate. The hydrophobic properties of the plate ensure that drop integrity is maintained during seeding and after starting the shaker in Step viii.
▲ CRITICAL The use of an electronic multichannel pipette is recommended to obtain uniform spheroids.
- (vii) Incubate the plate for 15–30 min in a cell culture incubator to allow cells to settle at the bottom of the wells.
- (viii) Place the plates on an orbital shaker suited for use in a cell culture incubator at 80 r.p.m. for 24 h.
- (ix) The day after, most cells should be aggregated, forming spheroids.
▲ CRITICAL STEP If a large volume of cells was seeded in Step vi, more time will be needed for cells to form aggregates. Add 100 μ L of HepaRG serum-free induction medium supplement (HFM) culture medium, and place the plates back on the orbital shaker inside the incubator.
? TROUBLESHOOTING
- (x) Replace 90% of the HFM medium after 24 h. Subsequently replace 90% of the medium in the culture every 48 h. Follow Box 2 if you wish to fix and stain the coculture at any point during the culture.
▲ CRITICAL STEP Medium refreshing must be done with precision to avoid aspiration and loss of samples. Ideally, medium change is done using an electronic multichannel 1,000 μ L pipette. The medium is removed by placing the pipette tip at the medium–air interface at low aspiration speed, and fresh medium is added at the lowest dispensing speed to the side of the well.
▲ CRITICAL After 7–14 d in culture, there should be increased hepatocyte activity due to the presence of the iPSC-HSCs¹⁴. From this time point onward, fibrosis or toxicity studies can be started as shown in Coll et al.¹⁴. Cultures can be maintained for at least 21 d with both cell types present and functional. For longer culture periods, replenish the DPBS (-/-) with P/S in the outer wells to minimize evaporation of the medium in outer wells containing spheroids.
▲ CRITICAL Guidance on how to carry out analysis of gene expression or immunofluorescence of liver spheroids can be found in refs.¹⁴ and ³⁷, Tables 2–4, Fig. 3b and Box 2.
? TROUBLESHOOTING

Troubleshooting

See Table 5 for troubleshooting guidance. Figure 1a shows examples of the morphology of cells on day 12 following successful and poor differentiations.

Table 5 Troubleshooting table			
Step	Problem	Possible reasons	Solutions
6	Cells stay as single cells or colonies do not grow	The growth rate of different cell lines can vary, as can the growth rate following cryopreservation	Incubate iPSCs for an additional day and/or adjust initial seeding density. Ensure that cell pipetting is done carefully so cell clusters are maintained. Be sure to thaw cells correctly, and do not overheat the cryovial
7	iPSCs die	Cell contamination might be impacting iPSC culture. Also, the number of cells plated or the number of colonies that have been plated can affect cell growth	Check the incubator and the reagents used. E8 medium can be supplemented with antibiotics such as P/S at a 1:1000 dilution without affecting cell growth
8	Colonies become elongated instead of rounded	The cells might be starting to differentiate and lose pluripotent characteristics	A new cryovial of iPSCs should be thawed. Note that this can happen with the addition of cold E8 medium, which can induce cell stress
14	Cells do not attach to the Matrigel-coated plate	Matrigel concentration might not be correct. Matrigel might not have been prepared in cold conditions. Plate was prepared more than 5 d ago	Check the Matrigel concentration and expiry date, and prepare the coating in cold conditions. It is also critical to ensure uniform Matrigel distribution. Ensure the correct number of iPSCs are plated and that they are viable
17	Cells do not grow sufficiently at 1–2 d of culture	Low concentration of plated cells or quality of the iPSCs. Sometimes this occurs because the Matrigel coating was not prepared correctly	Check plating cell number, quality of iPSCs and the concentration, lot and expiration of reagents. Ensure that the Matrigel-coated plate is correctly prepared and Matrigel evenly distributed across the plate
25	iPSC-HSCs differentiate suboptimally	The confluence of the cells was not ~60–70% at the start of differentiation. The Matrigel coating was not prepared correctly	Check the quality of iPSCs and the confluence as well as the distribution of the cells when starting the differentiation. It is important to move the plate after cell seeding to avoid cell accumulation in the center of the well. Growth factors and cytokines should not be stored at 4 °C for more than 1 week
26A(ii)	Differentiated cells do not detach from the culture plate	The differentiated cells might produce more ECM proteins, which can impact detaching efficiency	Check the quality of the trypsin used. Increase the time of exposure if there is a lot of ECM in the well, and be sure to pipette the medium several times across the entire well to collect the maximum number of cells. It is important to wash the cells with DPBS (-/-) for 1 min before the addition of trypsin
26A(vii)	Cells do not attach or do not grow	PDGFR β expression is lower than 60%. Matrigel coating was not prepared correctly. Cells were incubated for more than 5 min with trypsin	Ensure medium is warmed before plating cells. Check the number of cells plated, and check cells are expressing PDGFR β
26B(xiv)	Thawed cells do not grow well	The quality of the differentiation can affect the thawing process. Low viability before freezing the cells can affect the thawing efficiency. Also, exposure to DMSO at RT for too long can affect cell viability	Before freezing cells, check the quality of the differentiation by assessing the percentage of PDGFR β -positive cells. Check cell viability when freezing and thawing cells. Count the number of frozen cells. Transfer the cryovials from the -80 °C freezer to a liquid nitrogen tank 24 h after freezing. After freezing, ensure a sufficient number of cells is plated. We recommend plating one vial in two wells of a 12-well plate
26D(ix)	Less than 90% of cells are integrated in a round spheroid after 24 h in culture	The quality of the differentiation can affect the capacity to form spheroids. Also, check the viability before seeding cells	If the cells do not form spheroids after 24 h in culture, the culture should be abandoned
26D(x)	Spheroids are absent	Small spheroids can be aspirated when changing medium	Carefully perform 50% medium changes, and check the pipette when aspirating. Add fresh medium carefully to the wall of the wells
Box 2	Spheroid staining is heterogeneous	Staining intensity depends on the depth of the spheroid and can vary among spheroids	Multiple spheroids need to be analyzed per condition and, preferentially, multiple sections per condition need to be stained

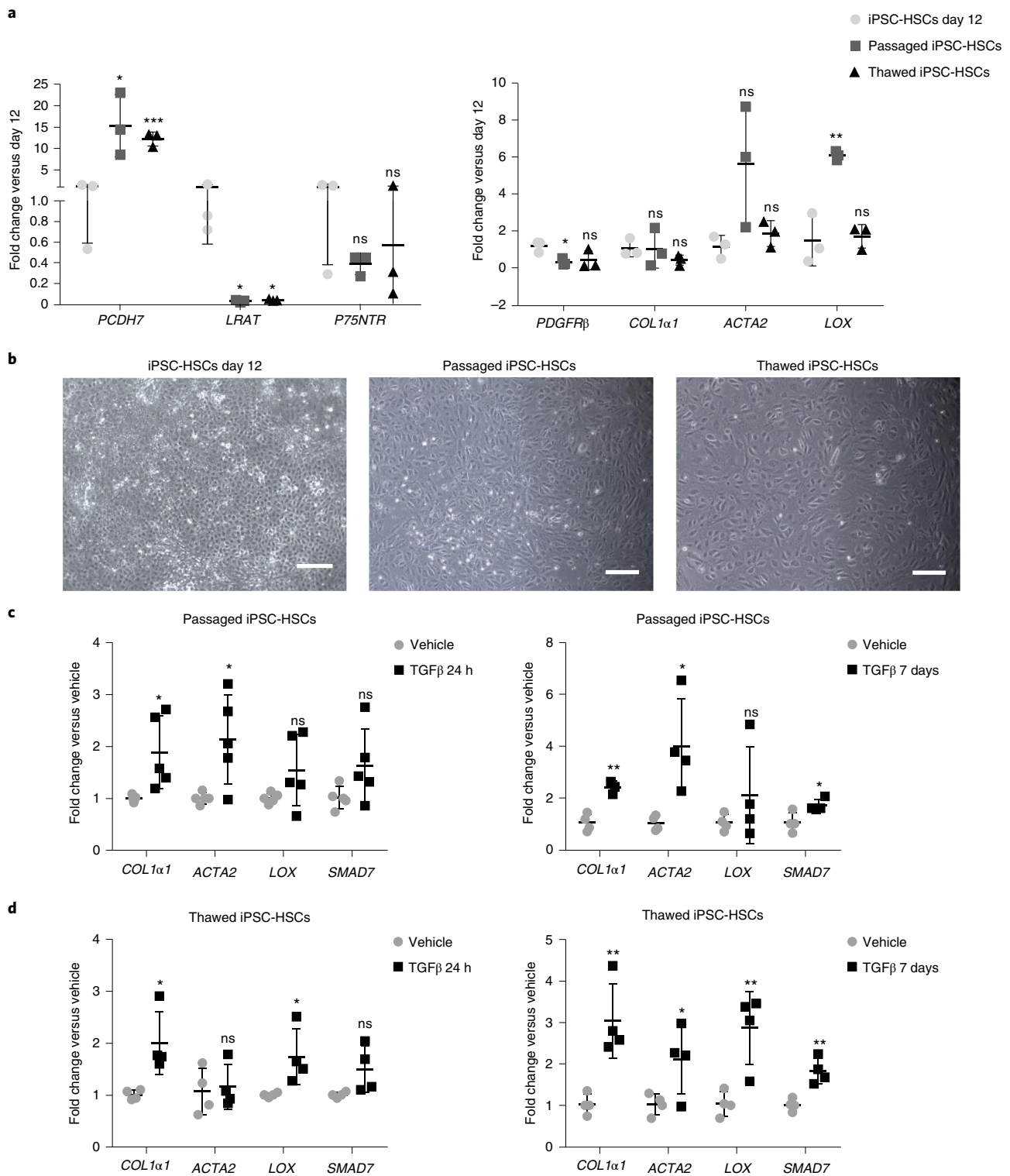


Fig. 4 | Passage and thawed iPSC-HSCs characterization and stimulation. **a**, Gene expression of *PCDH7*, *LRAT*, *P75NTR*, *PDGFRβ*, *COL1α1*, *ACTA2* and *LOX* in iPSC-HSCs passage 1 and thawed iPSC-HSCs compared with cells at day 12. qPCR was undertaken following the manufacturer’s instructions and using the materials and reagents detailed in Table 3. Experiments were performed using three independent differentiations. **P* < 0.05 compared with iPSC-HSCs at day 12 by *t*-test. **b**, Bright-field microscopy images of iPSC-HSCs morphology at day 12, passage 1 and thawed cells. Scale bar, 100 μm. **c**, Gene expression analysis of *COL1α1*, *ACTA2*, *LOX* and *SMAD7* in passaged iPSC-HSCs after 24 h or 7 d of TGFβ stimuli (5 ng mL⁻¹), as detailed in Step 26C(ii). qPCR was undertaken following the manufacturer’s instructions and using the materials and reagents detailed in Table 3. Experiments were performed using five and four independent differentiations. **P* < 0.05 compared with vehicle by *t*-test. **d**, Gene expression analysis of *COL1α1*, *ACTA2*, *LOX* and *SMAD7* in thawed iPSC-HSCs after 24 h or 7 d of TGFβ stimuli (5 ng mL⁻¹). qPCR was undertaken following the manufacturer’s instructions and using the materials and reagents detailed in Table 3. Experiment were performed using four independent differentiations. **P* < 0.05 compared with vehicle by *t*-test.

Anticipated results

Differentiation can be started when iPSCs plated on Matrigel-coated 12-well plate reach 70% confluence. After ~4 d of differentiation, cells should be 100% confluent (Fig. 1a).

At day 12, the percentage of PDGFR β should be ~60–70%, while in undifferentiated cells (day 0) less than 1% of cells are PDGFR β positive and ~50% of cells are PDGFR β positive at day 8 (Fig. 2a). The majority (98%) of the day 12 progeny contain vitamin A, detected by autofluorescence measurement, again consistent with the acquisition of an HSC-like cell phenotype (Fig. 2b). The presence of vitamin A can also be detected in more than 85% of cells at day 8, whereas at day 0 autofluorescence is not seen. Lipid droplets should be visible under a 10 \times magnification microscope. In addition, the gene expression of HSC markers such as *COL1 α 1*, *PCDH7*, *PDGFR β* , and actin alpha 2 smooth muscle (*ACTA2*) increases during differentiation, whereas lecithin retinol acyltransferase (*LRAT*) expression is maintained, indicative of acquisition of an HSC phenotype (Fig. 1b and Table 3). Consistent with the gene expression, day 12 iPSC-HSCs stain positive for PDGFR β , PCDH7 and vimentin, detected by immunofluorescence using the antibodies listed in Table 4 (Fig. 2c).

iPSC-HSCs can be split and cultured with expansion medium, seeding 73,000 cells per cm². In addition, iPSC-HSCs progeny can be cryopreserved by freezing 1 million cells and thawing afterward in expansion medium, seeding 145,000 cells per cm². Once cells are 70% confluent, they can then be used for further assays. Although there are differences in the expression of some activation markers, passaged iPSC-HSCs and thawed iPSC-HSCs maintain an HSC-like morphology and the expression of constitutive markers such as PCDH7 (Fig. 4a,b). Be aware that passaged and thawed cells differ from the final population of the differentiation and are more activated. It is important to take into account the activation state of iPSC-HSCs when designing the studies, particularly those aiming at evaluating quiescent HSCs function.

As shown in Fig. 4c,d, passaged and thawed iPSC-HSCs stimulated with TGF β for 24 h become activated, with significantly increased expression of activation markers, such as *COL1 α 1*, *ACTA2* and lysyl oxidase (*LOX*) and nonsignificantly SMAD family member 7 (*SMAD7*). Although modest, the induction of activation and fibrogenic genes is comparable to the differentiated cells at day 12 and primary HSCs¹⁴. However, when they are exposed to TGF β for a longer period of time (7 d), expression of HSC activation markers further increases, indicating their potential use for chronic injury modeling. In addition, differentiated cells express proinflammatory genes in response to mediators such as LPS¹⁴. For qPCR analysis, reference Table 3.

Differentiated cells can also be cocultured at a ratio of 2:1 (iPSC-HSCs:HepaRG) with hepatocyte cell lines to generate multicellular spheroids. As shown in Fig. 3a, complete cell aggregation occurs on days 2–3, and the spheroids can be maintained 21 d for long-term in vitro studies. Under this condition, iPSC-HSCs present a reduced activation phenotype and hepatocytes maintain their metabolic profile during, at least, 21 d of culture. Further data can be found in Coll et al.¹⁴, which describes how treatment of iPSC-HSCs-HepaRG spheroids with TGF β , thioacetamide and acetaminophen induced expression of HSC activation markers and secretion of procollagen type I.

Altogether, these results indicate that the protocol presented here is efficient, as a large fraction of iPSC-HSCs express PDGFR β , contain vitamin A and express the main markers of HSCs, quite closely mimicking cultured primary HSCs. Moreover, they represent a source of iPSC-HSCs to perform in vitro fibrogenic, inflammation and toxicity assays, under acute and chronic insults. In addition, the possibility of culturing iPSC-HSCs in 3D cocultures allows the generation of complex in vitro systems and the study of cell–cell interactions in liver spheroids.

Reporting Summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The authors declare that all data supporting the findings of this study are available within the paper. Source data are provided with this paper.

References

1. Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol.* <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246> (2011).
2. Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007> (2008).
3. Mederacke, I. et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/ncomms3823> (2013).
4. Issa, R. et al. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* <https://doi.org/10.1136/gut.48.4.548> (2001).
5. van Grunsven, L. A. 3D in vitro models of liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.004> (2017).
6. Lauschke, V. M. et al. Novel 3D culture systems for studies of human liver function and assessments of the hepatotoxicity of drugs and drug candidates. *Chem. Res. Toxicol.* <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00150> (2016).
7. Sancho-Bru, P. et al. Genomic and functional characterization of stellate cells isolated from human cirrhotic livers. *J. Hepatol.* <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.02.035> (2005).
8. Perea, L., Coll, M. & Sancho-Bru, P. Assessment of liver fibrotic insults in vitro. in *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (eds. Vinken, M. & Rogiers, V.) 391–401 (Springer, 2015). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_30
9. Xu, L. et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* <https://doi.org/10.1136/gut.2004.042127> (2005).
10. Herrmann, J., Gressner, A. M. & Weiskirchen, R. Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J. Cell. Mol. Med.* <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00060.x> (2007).
11. Nishio, M. et al. Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. *Cell. Rep.* <https://doi.org/10.1089/cell.2011.0064> (2018).
12. Takebe, T. et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* <https://doi.org/10.1038/nature12271> (2013).
13. Sancho-Bru, P. et al. Directed differentiation of murine-induced pluripotent stem cells to functional hepatocyte-like cells. *J. Hepatol.* <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.014> (2011).
14. Coll, M. et al. Generation of hepatic stellate cells from human pluripotent stem cells enables in vitro modeling of liver fibrosis. *Cell Stem Cell* <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.027> (2018).
15. Asahina, K., Zhou, B., Pu, W. T. & Tsukamoto, H. Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *Hepatology* <https://doi.org/10.1002/hep.24119> (2011).
16. Asahina, K. et al. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology* <https://doi.org/10.1002/hep.24119> (2009).
17. Richter, A. et al. BMP4 promotes EMT and mesodermal commitment in human embryonic stem cells via SLUG and MSX2. *Stem Cells* <https://doi.org/10.1002/stem.1592> (2014).
18. Evseenko, D. et al. Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* <https://doi.org/10.1073/pnas.1002077107> (2010).
19. Ng, F. et al. PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-103697> (2008).
20. Wang, Y., Yu, X., Chen, E. & Li, L. Liver-derived human mesenchymal stem cells: A novel therapeutic source for liver diseases. *Stem Cell Res. Ther.* <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0330-3> (2016).
21. Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemeyer, M. & Rossant, J. fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev.* <https://doi.org/10.1101/gad.8.24.3032> (1994).
22. Dorey, K. & Amaya, E. FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* <https://doi.org/10.1242/dev.037689> (2010).
23. Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. & Benvenisty, N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* <https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11307> (2000).
24. El Taghdouini, A. et al. In vitro reversion of activated primary human hepatic stellate cells. *Fibrogenesis Tissue Repair* <https://doi.org/10.1186/s13069-015-0031-z> (2015).
25. Senoo, H. et al. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative—past, present and future. *Cell Biol. Int.* <https://doi.org/10.1042/Cbi20100321> (2010).
26. Ippenber, A. et al. Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.014> (2007).
27. Chun, Y. S., Byun, K. & Lee, B. Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anat. Cell Biol.* <https://doi.org/10.5115/acb.2011.44.4.245> (2011).
28. Kou, Y. et al. An in vitro human liver model by iPSC-derived parenchymal and non-parenchymal cells. *Stem Cell Rep.* <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.06.010> (2017).

29. Miyoshi, M. et al. LIM homeobox 2 promotes interaction between human iPSC-derived hepatic progenitors and iPSC-derived hepatic stellate-like cells. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37430-9> (2019).
30. Lee, U. E. & Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.02.005> (2011).
31. Dongiovanni, P., Anstee, Q. & Valenti, L. Genetic predisposition in NAFLD and NASH: impact on severity of liver disease and response to treatment. *Curr. Pharm. Des.* <https://doi.org/10.2174/13816128113199990381> (2013).
32. Ouchi, R. et al. Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids. *Cell Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.007> (2019).
33. Farahani, R. M. & Xaymardan, M. Platelet-derived growth factor receptor alpha as a marker of mesenchymal stem cells in development and stem cell biology. *Stem Cells Int.* <https://doi.org/10.1155/2015/362753> (2015).
34. Ullah, I., Subbarao, R. B. & Rho, G. J. Human mesenchymal stem cells—current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* <https://doi.org/10.1042/BSR20150025> (2015).
35. Kumar, M. et al. A fully defined pluripotent stem cell derived multi-liver-cell model for steatohepatitis and fibrosis. Preprint at *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.09.03.280883> (2020).
36. Ordovás, L. et al. Efficient recombinase-mediated cassette exchange in hPSCs to study the hepatocyte lineage reveals AAVS1 locus-mediated transgene inhibition. *Stem Cell Rep.* <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.09.004> (2015).
37. Leite, S. B. et al. Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro. *Biomaterials* <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.026> (2016).

Acknowledgements

This work was performed in Center Esther Koplowitz and Vrije Universiteit Brussel. We thank the Advanced Optical Microscopy Unit from the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona for their support with the confocal image technique. We are indebted to the Cytomics Unit of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) for flow cytometry analysis. Figures were created using [BioRender.com](https://www.biorender.com). P.S.-B. is supported by the Fondo de Investigación Sanitaria Carlos III, cofinanced by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Unión Europea, 'Una manera de hacer Europa' (FIS PI20/00765, PI17/00673), DTS18/00088, COST Action H2020 PRO-EURO-DILI-NET CA17112 and Miguel Servet (CPII16/00041) to P.S.-B., PFIS (FI18/00215) to R.M. and APIF to J.V. MC FIS (PI18/00862). I.M. is supported by an FWO-V post-doctoral fellowship (12N5419 N) and S.V. is supported by an FWO-V postdoctoral fellowship (1243121N). L.A.v.G is supported by FWO projects G042719N, FWO-SBO-S001121 'iPSC-LiMiC' and a 'Wetenschappelijk Fonds Willy Gepts' grant from the Vrije Universiteit Brussel. C.M.V. is supported by FWO-G0D9917N; IWT-140045, HILIM-3D; FWO-SBO-S001121, iPSC-LiMiC and the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement 681002 (EU-ToxRisk).

Author contributions

J.V. and R.A.M. equally contributed to the optimization of expansion and freezing processes, characterization of the cells and drafting the manuscript. I.M. and A.S. performed the 3D spheroid experiments, and S.V. and A.S. carried out parallel iPSC differentiations using a different iPSC line (not included in the manuscript). M.C. participated in the differentiation protocol design and reviewed the manuscript. S.A., T.R.-T., B.A.-B., C.M.-S. and D.B., participated in the differentiation protocol process. C.M.V. contributed to the design of the iPSCs differentiation protocol and reviewed the manuscript. L.A.v.G. guided the iPSC and spheroid studies in Brussels and critically reviewed the manuscript. P.S.-B. designed and supervised the study and critically reviewed the manuscript.

Competing interests

M.C., C.M.V. and P.S.-B. have a patent application PCT/EP2016/079464, and L.A.v.G. has a patent application PCT/EP2015/062551.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00509-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.M.V., L.A.v.G. or P.S.-B.

Peer review information *Nature Protocols* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 8 April 2020; Accepted: 21 January 2021;

Published online: 16 April 2021

Related links

Key reference using this protocol

Coll, M. et al. *Cell Stem Cell* **23**, 101–113.e7 (2018): <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.027>

Reporting Summary

Nature Research wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Research policies, see our [Editorial Policies](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

Statistics

For all statistical analyses, confirm that the following items are present in the figure legend, table legend, main text, or Methods section.

n/a Confirmed

- | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | The exact sample size (n) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | A statement on whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided
<i>Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.</i> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | A description of all covariates tested |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | A full description of the statistical parameters including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals) |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | For null hypothesis testing, the test statistic (e.g. F , t , r) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and P value noted
<i>Give P values as exact values whenever suitable.</i> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's d , Pearson's r), indicating how they were calculated |

Our web collection on [statistics for biologists](#) contains articles on many of the points above.

Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

Data collection

Data analysis

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors and reviewers. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Research [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A list of figures that have associated raw data
- A description of any restrictions on data availability

Field-specific reporting

Please select the one below that is the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

- Life sciences Behavioural & social sciences Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://www.nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size	No sample size calculation was performed and three or more independent differentiations were used.
Data exclusions	No data were excluded for the analysis.
Replication	All attempts of replication were successful and for each differentiation we have replicates.
Randomization	N/A
Blinding	N/A

Reporting for specific materials, systems and methods

We require information from authors about some types of materials, experimental systems and methods used in many studies. Here, indicate whether each material, system or method listed is relevant to your study. If you are not sure if a list item applies to your research, read the appropriate section before selecting a response.

Materials & experimental systems

- | | |
|-------------------------------------|---|
| n/a | Included in the study |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> Antibodies |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> Eukaryotic cell lines |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> Palaeontology and archaeology |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> Animals and other organisms |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> Human research participants |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> Clinical data |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> Dual use research of concern |

Methods

- | | |
|-------------------------------------|--|
| n/a | Included in the study |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> ChIP-seq |
| <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> Flow cytometry |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> MRI-based neuroimaging |

Antibodies

Antibodies used

PE Mouse Anti-Human CD140b Clone 28D4 (BD PharMingen, Cat#558821). RRID: AB_397132
 PE Mouse IgG2a, Isotype Control Clone MOPC-173 (Biolegend, Cat#400214). RRID: AB_326460
 Recombinant Anti-PDGFR beta antibody [Y92] - C-terminal (Abcam, Cat#ab32570). RRID: AB_777165
 Anti-PCDH7 antibody [OTI2G6] (Abcam, Cat#ab139274). RRID: AB_2868608
 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Cat#A-11001). RRID: AB_2534088
 Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research, Cat#711-545-152). RRID: AB_2313584

Validation

PE Mouse Anti-Human CD140b Clone 28D4 Human (QC Testing) Application Flow cytometry (Routinely Tested) provided by the manufacturer website.
 In addition, iPSC-HSCs can be co-cultured with hepatocyte cell lines, such as HepaRGs, obtaining complex 3D spheroids¹⁴. Here in this protocol a ratio of 2:1 (iPSC-HSCs-HepaRG) was used to form liver spheroids following Leite et al (2016) and Figure 3A. This ratio allows to maintain iPSC-HSCs in a less activated state. A different cell ratio may be reacquired according to the final objective of the investigators. Spheroids can be characterized by immunostaining and gene expression analysis of both cell types (Table 5 and 6) and, as discussed in the Anticipated Results section can be used in assays looking at liver fibrosis, inflammation and toxicity (Table 3).
 PE Mouse IgG2a, Isotype Control Clone MOPC-173 Mouse conjugated with PE, Flow Cytometry (Quality tested) provided by the manufacturer website.
 Recombinant Anti-PDGFR beta antibody [Y92] - C-terminal (Human, host in rabbit) suitable for IHC-Fr, Flow Cyt, IHC-FoFr, WB, IHC-P, ICC/IF, IP, IHC-FrFl applications provided by manufacturer website.
 Anti-PCDH7 antibody [OTI2G6] (Human, host in mouse) suitable for WB, IHC-P and ICC/IF provided by manufacturer website.
 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (target mouse, host in goat) suitable for Flow Cytometry, ICC, IF, IHC F, IHC P, WB and IHC provided by manufacturer website.
 Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (target rabbit, host in donkey) polyclonal antibody suitable for ELISA, FACS, IFIHC and WB provided by manufacturer website.

Eukaryotic cell lines

Policy information about [cell lines](#)

Cell line source(s)	Human BJ1 iPSCs line: The BJ1 line is generated in Catherine Verfaillie's Lab, from fibroblast cell line (ATCC® CRL-2522™, 28). Made in house cell line. Details on how to generate this cell line is described in Ordovas L et al (2015). Differentiated HepaRG cells: HPR116215-TA08 purchased from Biopredic.
Authentication	Human BJ1 iPSCs line was authenticated following the established stem cells characterization procedures (evaluate pluripotency markers by gene expression, FACS and IF, formation of EBs, SNP profiling). HepaRG were purchased and no authentication procedure was performed.
Mycoplasma contamination	iPSC Cell line tested negatively for mycoplasma contamination.
Commonly misidentified lines (See ICLAC register)	N/A

Flow Cytometry

Plots

Confirm that:

- The axis labels state the marker and fluorochrome used (e.g. CD4-FITC).
- The axis scales are clearly visible. Include numbers along axes only for bottom left plot of group (a 'group' is an analysis of identical markers).
- All plots are contour plots with outliers or pseudocolor plots.
- A numerical value for number of cells or percentage (with statistics) is provided.

Methodology

Sample preparation	Once the differentiation is finished, wash iPSC-HSCs with DPBS (-/-) for 1min, remove it and add 0.5mL of Trypsin-EDTA 0.25% to each well. Incubate cells at 37°C during 2-3min in order to detach them. Check the cells under microscopy and when cells start detaching, add an equal amount of medium containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS) as trypsin solution in order to stop the reaction. Collect the cells by gently pipetting the medium. Centrifuge at 300g for 5min at RT. After centrifugation, resuspend cells in 3mL of cold DMEM Glutamax and distribute them in 3 FACS tubes: Autofluorescence, Isotype and PDGFRb. Add DPBS (-/-) to each tube in order to wash the cells. Centrifuge at 300g for 5min at 4°C. Discard the supernatant and add 100uL of cold FACS Buffer to each tube. Resuspend cells and add 1uL of each antibody to Isotype and PDGFRb tubes. Incubate for 30min at RT under photo-protected conditions. At the end of the incubation add DPBS (-/-) to wash the cells. Centrifuge at 300g for 5min at 4°C. Discard the supernatant and resuspend cells in 200uL of FACS Buffer and perform FACS analysis.
Instrument	FACSCanto II Cytometer
Software	BD FACS DIVA
Cell population abundance	After the differentiation, 60% of the cells are positive for PDGFRb.
Gating strategy	Comparison between SSCA vs FSCA to find our interest population. Use 488-530/30-502LP-A vs PDGFRb-PE to locate the positive fraction of the population.

- Tick this box to confirm that a figure exemplifying the gating strategy is provided in the Supplementary Information.

ANNEX OBJECTIU 2: AVALUAR EL POTENCIAL ÚS DE LES CÈL·LULES ESTRELLADES HEPÀTIQUES DERIVADES DE IPSCS

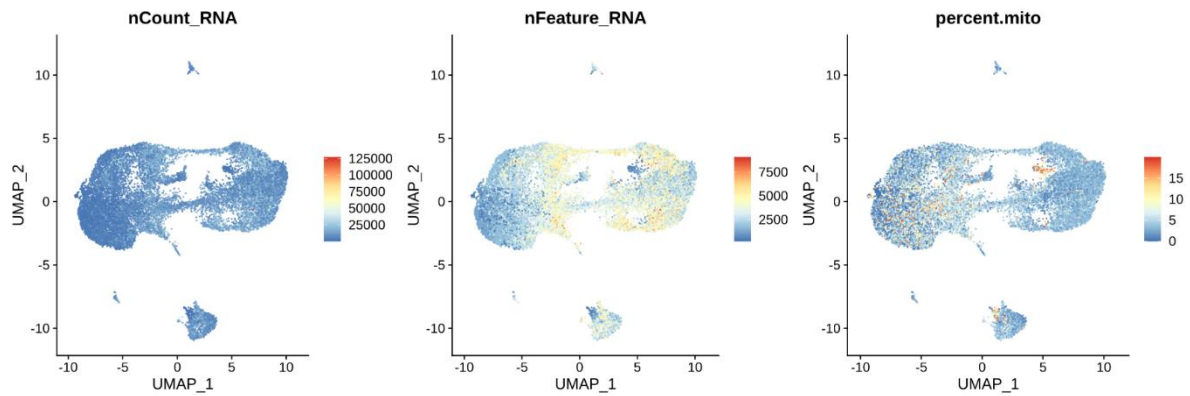


Figura 1 de l'Annex 2. UMAPs del procés de controls de qualitat de les dades seqüenciades de dia 0, 4, 12a i 12b. Control de qualitat de nombre de RNA (nCounts_RNA), de gens (nFeature_RNA) i percentatge de contingut mitocondrial (percent.mito) on el contingut de RNA està entre 25,000-50,000, el nombre de gens és superior a 200 i les cèl·lules obtingudes tenen menys del 20% de contingut de mitocondrial.

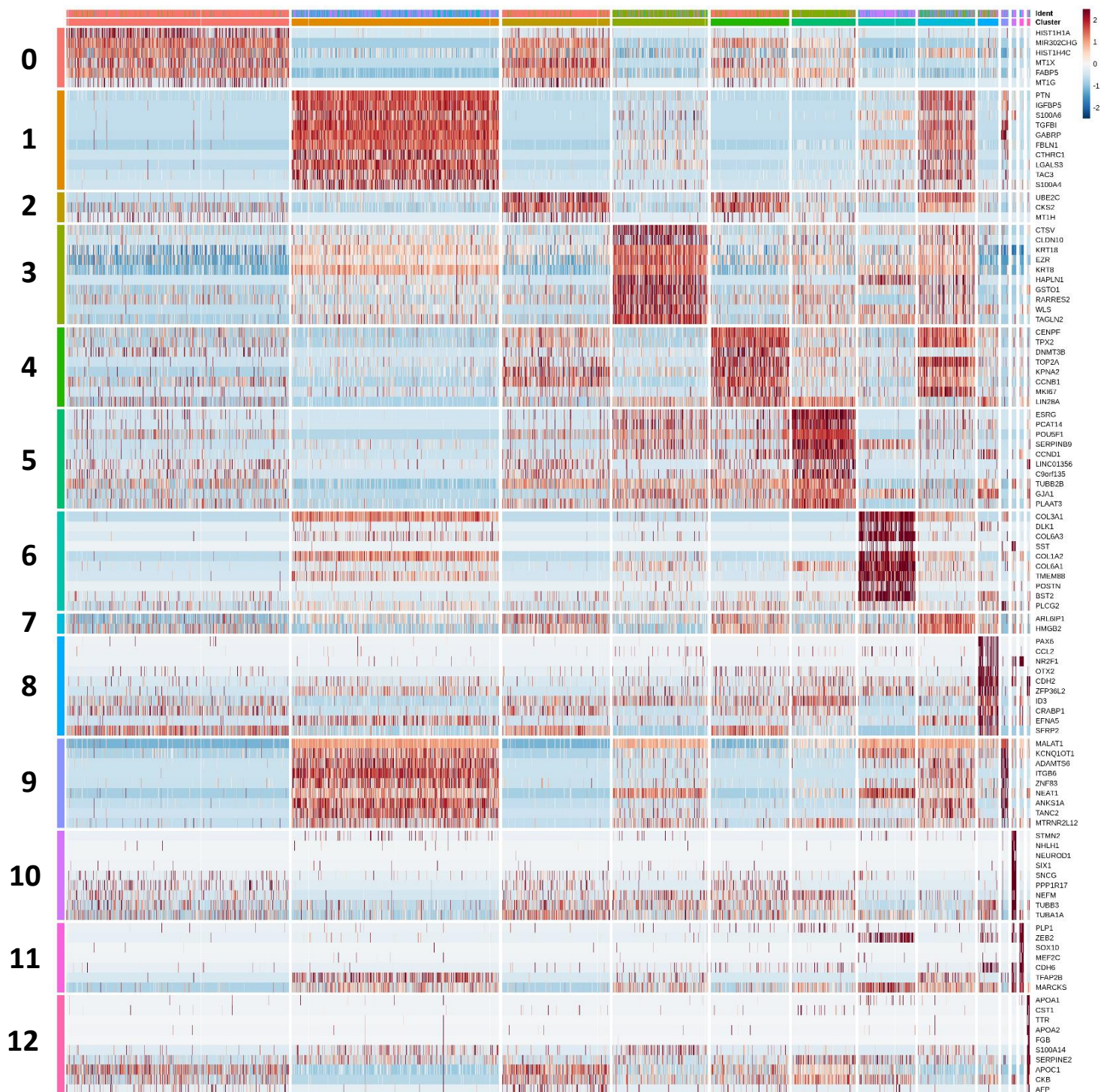


Figura 2 de l'Annex 3. Heatmap dels gens més expressats en el 13 clústers identificats en l'anàlisi de scRNA-seq de la diferenciació de iPSCs a HSCs.

**ANNEX OBJECTIU 3: DESENVOLUPAR UNA LÍNIA DE IPSC AMB EL POLIMORFISME DE
HSD17B13 PER TAL DE MODELAR IN VITRO LA MALALTIA HEPÀTICA**

ATGAACATCATCCTAGAAATCCTTCTGCTTCTGATCACCATCATCTACTCCTACTTGGAGTCGTTGGTGA
AGTTTTTCATTCTCAGAGGAGAAAATCTGTGGCTGGGGAGATTGTTCTCATTACTGGAGCTGGGCATG
GAATAGGCAGGCAGACTACTTATGAATTTGCAAACGACAGAGCATATTGGTTCTGTGGGATATTAAT
AAGCGCGGTGTGGAGGAACTGCAGCTGAGTGCCGAAAAGTGGCGTCACTGCGCATGCGTATGTGG
TAGACTGCAGCAACAGAGAAGAGATCTATCGCTCTCTAAATCAGGTGAAGAAAGAAGTGGGTGATGTA
ACAATCGTGGTGAATAATGCTGGGACAGTATATCCAGCCGATCTTCTCAGCACCAAGGATGAAGAGAT
TACCAAGACATTTGAGGTCAACATCCTAGGACATTTTTGGATCACAAAAGCACTTCTCCATCGATGATG
GAGAGAAATCATGGCCACATCGTCACAGTGGCTTCAGTGTGCGGCCACGAAGGGATTCTTACCTCATC
CCATATTGTTCCAGCAAATTTGCCGCTGTTGGCTTTCACAGAGGTCTGACATCAGAACTTCAGGCCTTGG
GAAAACTGGTATCAAACCTCATGTCTCTGCCAGTTTTTGTGAATACTGGGTTACCAAAAAATCCAA
GCACAAGATTATGGCCTGTATTGGAGACAGATGAAGTCGTAAGAAGTCTGATAGATGGAATACTTACC
AATAAGAAAATGATTTTTGTTCCATCGTATATCAATATCTTTCTGAGACTACAGAAGGTTAGCAGCTGA

Figura 1 de l'Annex 3. Seqüència truncada de HSD17B13 amb la inserció del codó *stop* TGA

gtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataacc
tgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagatgagattcaacattccgtgtcgccttattccctttttgcggcattttgctt
cctgtttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctc
aacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattat
ccgtattgacgcgggcaaggaactcggtcgcgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaa
catcttacggatggcatgacagtaagagaattatgagtgctgccataacatgagtgataaactgcggcaactacttctgacaac
gatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatg
aagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactactac
tctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccttccggctggctggtt
tattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctccgctatcgtagt
tatctacagcaggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaa
ctgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgatttaaaacttatttttaattaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataat
ctcatgacaaaaatccctaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttt
tctgcgctaactctgctgcttgcacaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactctttttccg
aaggtaactggcttcagcagagcgcagatacacaataactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagca
ccgctacatacctcgtctgctaactcgttaccagtggtgctgcccagtgccgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgat

agttaccgataaggcgcagcggctcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactga
gatacctacagcgtgagctatgagaaaagccacgcttcccgaagggagaaaaggcggacaggtatccggtaaagcggcaggggtcgg
acaggagagcgcacgagggagcttccaggggaaacgcttggtatctttatagtctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcg
atTTTTgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgcccagcaacgcccctttttacggttcttgcccttttgctggcctttg
ctcacatgcttttctcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcttttgagtgagctgataccgctcggcgagccgaacg
accgagcgcagcagtgagtgagcgggaagcgggaagagcggccaatacgaacccgctctccccgcgcttgccgattcattaat
gcagctggcagcagaggtttccgactggaaagcgggagtgagcgaacgcaattaatgtgagttagctactcattaggcacccca
ggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtggaattgtgagcggataacaattcacacaggaaacagctatgacatgattac
gccaagcgcgaattaaccctcactaaaggaacaaaagctggagctccaccggtggagagcagagccaggaaccctgtaggg
aaggggcaggagagccaggggcatgagatggtggacgaggaagggggacaggaagcctgagcgcctctcctgggcttgccaagga
ctcaaaccagaagcccagagcagggccttagggaagcgggaccctgctcctgggaggaggaatatgtccagatagcactggggact
cttaaggaaagaaggtaggagaaagagaaagggagtagaggcggccacgacctggtgaacacctaggacgaccattctcaciaa
gggagttttcacacggacacccccctcctcaccacagccctgccaggacggggctggctactggccttatctcacaggtaaaactgac
gcacggaggaacaataaattggggactagaaaggtgaagagccaaagttagaactcaggaccaactattctgattttgtttcca
aactgcttctccttgggaagtgaaggaagctgcagcaccaggatcagtgaacgcaccagacagccgctcagagcagctcaggt
tctgggagagggtagcgcaggggtggccactgagaaccgggcaggtcacgcatcccccttccctccccccccctgccaagctctcct
cccaggatctctctgctccatcgaagcaaaccttagaggttctggcaaggagagagatggctccaggaatgggggtgtgtcacca
gataaggaatctgcctaacaggaggtgggggttagaccaatcagggagactaggaaggaggagcctaaggatggggctttctgt
cacciaatctgtccctagtagcggccgcGAAGTTCCTATACTttctagaGAATAGGAACTTCTGCATTTGAAcctag
agcccaccgcatcccagcatgctgctattgtcttccaatcctccccctgctgtcctgccccaccacccccagaatagaatgaca
cctactcagacaatgcgatgcaatttctcattttattaggaaggacagtgaggatggcacctccagggtcaaggaaggcaggggg
aggggcaaacacagatggctggcaactagaaggcacagtcgaggcactagttaaccggggagcatgtcaaggtcaaaatcgtcaa
gagcgtcagcaggcagcatcaaggtcaaagtcgtcaagggcatcggctgggagcatgtctaagtcaaaatcgtcaagggcgtcggc
cggccccgctttcgacttttagctgtttctccaggccacatatgattagtccaggccgaaaaggaaggcaggttcggctccctgccc
gtcgaacagctcaattgcttctcagaagtgggggcatagaatcgggtgtaggtgtctcttcttcttttctacttgatgctcctgttc
ctcaatacgcagcccagtgtaaagtggcccacggcggacagagcgtacagtgcttctccagggagaagccttctgacacaggaac
gcgagctgattttcagggtttctactgtttctgttggggcgggtccgagatgacttttagccccgtcgcgatgtgagaggagagcac
agcgggaatgacttggcgttctccgcagaaagtcttccatgactcgccttccagggggcagaagtgggtatgatgctgtccagcatct
cgattggcagggcatcagcagggcccgttcttctcacgtgccagtacagggtaggctgtcaactcccagcttttgagcaggtttcct
tgtctcaggccttcgataccgactccattgagtaattccagagcgcctttatgactttgcttcttccagcttagacatCAATTGgta
TACGTATGCATatttaaatGAATTCCTTTGCCAAAATGATGAGACAGCACAAATAACCAGCACGTTGCCAGG
AGCTGTAGGAAAAAGAAGAAGGCATGAACATGGTTAGCAGAGGCTCTAGAGCCGCCGGTACACGCC
AGAAGCCGAACCCCGCCTGCCCGTCCCCCGAAGGCAGCCGTCCCCCGCGGACAGCCCCGAGGC
TGGAGAGGGAGAAGGGGACGGCGGCGGCGACGCACGAAGGCCCTCCCCGCCATTTCTTCTCTGC
CGGCGCCGACCGCTTCCCCCGCGCCGCTAGAGGGGGTGCGGCGGCGCCTCCAGATTTGCGTCC

GCACAGATTTGGGACAAAGGAAGTCCCTGCGCCCTCTCGCACGATTACCATAAAAGGCAATGGCTGCG
GCTCGCCGCGCCTCGACAGCCGCCGGCGCTCCGGGGGCCGCCGCGCCCTCCCCGAGCCCTCCCCGG
CCCCGAGGCGGCCCGCCCCGCCGGCACCCCCACCTGCCGCCACCCCCGCCGGCACGGCGAGCCCC
GCGCCACGCCCCGTACGGAGCCCCGCACCCGAAGCCGGGCCGTGCTCAGCAACTCGGGGAGGGGGGT
GCAGGGGGGGTTGCAGCCCGACCGACGCGCCACACCCCCTGCTCACCCCCCACGCACACACCCCGC
ACGCAGCCTTTGTTCCCTCGCAGCCCCCCCCGCACCGCGGGGCACCGCCCCGGCCGCGCTCCCCTCG
CGCACACTGCGGAGCGCACAAAGCCCCGCGCCGCGCCCGCAGCGCTCACAGCCGCCGGGCAGCGCGG
AGCCGCACGCGGGCTCCCCACGCACACACACGCACGCACCCCCGAGCCGCTCCCCCGCACAAA
GGGCCCTCCCGGAGCCCCTCAAGGCTTTCACGCAGCCACAGAAAAGAAACAAGCCGTCATTAACCAA
GCGTAATTACAGCCGGAGGAGAAGGGCCGTCCCGCCGCTCACCTGTGGGAGTAACGCGGTACAGTC
AGAGCCGGGGCGGGCGGCGGAGGCGGGCGGGAGCGGGGCACGGGGCGAAGGCAGCGCGCAGC
GACTCCCGCCCGCCGCGGCTTCGCTTTTTATAGGGCCGCCCGCCGCCCTCGCCATAAAAGGAAA
CTTTCGGAGCGCGCCGCTCTGATTGGCTGCCGCCACCTCTCCGCTCGCCCCGCCCGCCCTCGCCC
CGCCCCGCCCGCCTGGCGCGGCCCCCCCCCCCCCCCCCGCCCCATCGCTGCACAAAATAATTA AAAA
ATAAATAAATACAAAATTGGGGGTGGGGAGGGGGGGGAGATGGGGAGAGTGAAGCAGAACGTGGG
GCTCACCTCGACCATCATGGTAATAGCGATGACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCA
TAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCCAGGCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTAC
TTGGCATATGATACACTTGATGTACTGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAATACTCCACCCATTGACGTCA
ATGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCATTATTGACGTCAATGGGCGGGGGTCTGT
GGGCGGTGAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGCGGAACTCCATATATGGGCTATGAA
CTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAATAACTAGCTAGTCAATAATCAATGTGCGACGATGATGCTGTA
CAActgaAACtttTCGAAGgtccgaggttctagacgagtttactccctatcagtgatagagaacgatgtcgagtttactccctatca
gtgatagagaacgatgtcgagtttactccctatcagtgatagagaacgatgtcgagtttactccctatcagtgatagagaacgatgtc
gagtttactccctatcagtgatagagaacgatgtcgagtttactccctatcagtgatagagaacgatgtcgaggttagcggtgtacggtg
ggaggcctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcttaagGCCACCATGAACATCATCCTAGAAATCCTTC
TGCTTCTGATCACCATCATCTACTCTACTTGGAGTCGTTGGTGAAGTTTTTCATTCTCAGAGGAGAAA
ATCTGTGGCTGGGGAGATTGTTCTCATTACTGGAGCTGGGCATGGAATAGGCAGGCAGACTACTTATG
AATTTGCAAACGACAGAGCATATTGGTTCTGTGGGATATTAATAAGCGCGGTGTGGAGGAAACTGCA
GCTGAGTGCCGAAAACACTAGGCGTCACTGCGCATGCGTATGTGGTAGACTGCAGCAACAGAGAAGAGA
TCTATCGCTCTCTAAATCAGGTGAAGAAAGAAGTGGGTGATGTAACAATCGTGGTGAATAATGCTGGG
ACAGTATATCCAGCCGATCTTCTCAGCACCAAGGATGAAGAGATTACCAAGACATTTGAGGTCAACATC
CTAGGACATTTTTGGATCACAAAAGCACTTCTCCATCGATGATGGAGAGAAATCATGGCCACATCGTC
ACAGTGGCTTCAGTGTGCGGCCACGAAGGGATTCTTACCTCATCCCATATTGTTCCAGCAAATTTGCC
GCTGTTGGCTTTCACAGAGGTCTGACATCAGAACTTCAGGCCTTGGGAAAAACTGGTATCAAAACCTCA
TGCTCTGCCAGTTTTTGTGAATACTGGGTTACCAAAAATCCAAGCACAAGATTATGGCCTGTATTGG

AGACAGATGAAGTCGTAAGAAGTCTGATAGATGGAATACTTACCAATAAGAAAATGATTTTTGTTCCAT
CGTATATCAATATCTTTCTGAGACTACAGAAGGTTAGCAGCTGAACGCGTGGGGGAGGCTAACTGAAA
CACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCA
CGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATAACCCACC
GAGACCCATTGGGGCCAATACGCCGCGTTTCTTCTTTTCCCACCCACCCCAAGTTCGGGTGAA
GGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCTCGAGTgctattgtcttccaatcctc
ccccttgtctctgccccacccccacccccagaatagaatgacacctactcagacaatgcatgcaatttctcattttattaggaaagg
acagtgggagtgccaccttcagggtcaaggaaggcacgggggaggggcaaacaacagatggctggcaactagaaggcacagtcca
ggctgatcagcgggttaaaccgggacctctagagtcgggtgggctcggggcggggtcgggggctggcggggccgccccgggtggcttc
ggctggagccatggggtcgtgctccttctggctgggctcgggctcgtggggcggggTCAggcaccgggcttggggtcatgca
ccagggtgcggtccttcgggcacctcagctcggcggtgacggtgaagccgagccgctcgtagaaggggaggttgcggggcgcgga
ggctccaggaaggcgggacccccggcgctcggccgctccactccggggagcacgacggcgctcccagacccttgcctggtgg
tcgggagagacgccgagtgccaggaaccacggggctccttgggccggtcggcgccaggaggccttcatctgttctgctgcgcg
ccagccgggaaccgctcaactcggccatgacgcgggccgatctcggcgaacaccgccccgcttcgacgctctccggcgtggtccagacc
gccaccgcgcgccgtcgtccgacccacaccttgcgatgtcgagcccgacgcgctgaggaagagttcttcagctcggtagcccg
ctcgtatggcggtccgggtcgaaggttggcgctggcggggtagtcggcgaacgcgcgggcgagggtgctacggccccgggggac
gtcgtcggggtggcagggcgaccgtgggcttactcggctCATtctgagcctaggccgggattctcctccacgtcaccgcatgta
gaagacttctctgccctctccgctgccagatctgaggccCTgtgggaggaagagaagaggtcaggccGAAGTTCCTATACTatt
tgaaGAATAGGAACCTCaagcttccccactgtggggtggaggggacagataaaaagtaccagaaccagagccacattaaccg
gccctgggaatataaggtgggtcccagctcggggacacaggatccctggaggcagcaaatgctgtctgaagtggacataggggccc
gggttggaggaagaagactagctgagctctcgaccctggaagatgcatgacagggggtggaagagctagcacagactagaga
ggtaagggggtaggggagctgccccaaatgaaaggagtgagaggtgacccgaatccacaggagaacgggggttccaggcaaaaga
agcaagaggatggagaggtggctaaagccagggagacggggtacttgggggttgtccagaaaacggtgatgatgaggcctacaag
aaggggagggcgggacgcaagggagacatccgtcggagaaggccatcctaagaaacgagagatggcacaggccccagaaggagaa
ggaaaagggaaaccagcgagtgaagacggcatggggttgggtgaggaggagagatgcccggagaggaccagacacggggagg
atccgctcagaggacatcacgtggtgacgcccagagaaggaagtgtccggaagagcatccttgggcagcaacacagcagagagc
aaggggaagaggagtgagggaagacggaaacctgaaggaggcggcaggggaaggatctgggcccagccgtagaggtgaccagggc
acaagctgcagacagaaaagcggcacaggcccaggggagagaatgctggtcagagaaagcaggtaccaattcgcctatagtgagt
cgtattacgcgctcactggcctgcttttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcgttaccacctaattcgccttgcagcacatcc
cccttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgccttccaacagttgagcagcctgaatggcgaatgggacgcg
ccctgtagcggcgattaagcgcggcggtgtggtggttacgcgacgctgaccgctacacttgcagcgcctagcggcctcctttc
gcttcttcccttcttctcgccacgttcgggcttccccgtcaagctctaatacgggggctcccttaggggtccgatttagtcttac
ggcacctcgacccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctgatagacggttttgcctttgacgttga
gtccacgttcttaatagtgactcttgttcaaactggaacaacactcaaccctatctcggcttattctttgattataagggattttgcc
gatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaaaaaatataacgcgaatttaaaaaatattaacgcttacaatttag

Figura 2 de l'Annex 3. Seqüència del plasmidi HC3x amb la seqüència truncada de HSD17B13 integrada.

```

Query 1   CATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCCACGC 60
          |||
Sbjct 8   CATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCCACGC 67

Query 61  GTTCAGCTGCTAACCTTCTGTAGTCTCAGAAAGATATTGATATACGATGGAAACAAAAATC 120
          |||
Sbjct 68  GTTCAGCTGCTAACCTTCTGTAGTCTCAGAAAGATATTGATATACGATGGAAACAAAAATC 127

Query 121 ATTTTCTTATTGGTAAGTATTCATCTATCAGACTTCTTACGACTTCATCTGTCTCCAAT 180
          |||
Sbjct 128 ATTTTCTTATTGGTAAGTATTCATCTATCAGACTTCTTACGACTTCATCTGTCTCCAAT 187

Query 181 ACAGGCCATAATCTTGTGCTTGGATTTTTGGTGAACCCAGTATTCACAAAAACTGGGCAG 240
          |||
Sbjct 188 ACAGGCCATAATCTTGTGCTTGGATTTTTGGTGAACCCAGTATTCACAAAAACTGGGCAG 247

Query 241 AGACATGAGGTTTTGATACCAGTTTTTCCCAAGGCCTGAAGTTCTGATGTCAGACCTCTG 300
          |||
Sbjct 248 AGACATGAGGTTTTGATACCAGTTTTTCCCAAGGCCTGAAGTTCTGATGTCAGACCTCTG 307

Query 301 TGAAAGCCAACAGCGGCAAAATTTGCTGGAACAATATGGGATGAGGTAAGGAATCCCTTCG 360
          |||
Sbjct 308 TGAAAGCCAACAGCGGCAAAATTTGCTGGAACAATATGGGATGAGGTAAGGAATCCCTTCG 367

Query 361 TGGCCGCACACTGAAGCCACTGTGACGATGTGGCCATGATTTCTCTCCATCATCGATGGA 420
          |||
Sbjct 368 TGGCCGCACACTGAAGCCACTGTGACGATGTGGCCATGATTTCTCTCCATCATCGATGGA 427

Query 421 AGAAGTGCTTTTGTGATCCAAAAATGCCTAGGATGTTGACCTCAAATGCTTGGTAATC 480
          |||
Sbjct 428 AGAAGTGCTTTTGTGATCCAAAAATGCCTAGGATGTTGACCTCAAATGCTTGGTAATC 487

Query 481 TCTTCATCCTTGGTGCTGAGAAGATCGGCTGGATATACTGTCCCAGCATTATTCACCACG 540
          |||
Sbjct 488 TCTTCATCCTTGGTGCTGAGAAGATCGGCTGGATATACTGTCCCAGCATTATTCACCACG 547

Query 541 ATTGTTACATCACCACACTTCTTTCTTCCACTGATTTAGAGAGCGATAGATCTTTCTCTG 600
          |||
Sbjct 548 ATTGTTACATCACCACACTTCTTTCTTCCACTGATTTAGAGAGCGATAGATCTTTCTCTG 607

Query 601 TTGCTGCAGTCTACCACATACGCATGCGCAGTGACGCCCTAGTTTTCGGCACTCAGCTGCA 660
          |||
Sbjct 608 TTGCTGCAGTCTACCACATACGCATGCGCAGTGACGCCCTAGTTTTCGGCACTCAGCTGCA 667

Query 661 GTTTCCTCCACACCGCGCTTATTAATATCCACAGAACCAATATGCTCTGTCGTTTTGCA 720
          |||
Sbjct 668 GTTTCCTCCACACCGCGCTTATTAATATCCACAGAACCAATATGCTCTGTCGTTTTGCA 727

Query 721 AATTCATAAGTAGTCTGCCTGCCTATTCCATGCCAGCTCCAGTAATGAGAACAATCTCC 780
          |||
Sbjct 728 AATTCATAAGTAGTCTGCCTGCCTATTCCATGCCAGCTCCAGTAATGAGAACAATCTCC 787

Query 781 CCAGCCACAGATTTTCTCCTCTGAGGAATGAAAAACTTCACCAACGACTCCCAGTAGGAG 840
          |||
Sbjct 788 CCAGCCACAGATTTTCTCCTCTGAGGAATGAAAAACTTCACCAACGACTCCAAGTAGGAG 847

Query 841 TAGATGATGG-TGATCAGAA-GCA 862
          |||
Sbjct 848 TAGATGATGGGTGATCAGAAAGCA 871

```

Figura 3 de l'Annex 3. Resultat de Blast del plasmidi del clon 1 seqüenciades per Sanger que contenia incorporada la seqüència truncada de HSD17B13.