



**Universidad
Europea VALENCIA**

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

Facultad de Ciencias de la Salud

Grado en Biotecnología

Trabajo Fin de Grado

Curso 2021-2025

**Estudio del impacto del PFOA sobre la
hepatotoxicidad de amoxicilina-
clavulánico y azatioprina en
hepatocitos humanos**

Autor

Beseler León, Carla

Tutor

Tutor externo: Dra. Moreno Torres, Marta

Tutor interno: Dr. Martínez Montañés, Fernando

Valencia, 2025

Estudio del impacto del PFOA sobre la hepatotoxicidad de amoxicilina- clavulánico y azatioprina en hepatocitos humanos

Trabajo Final de Grado, presentado por:

Beseler León, Carla

Tutorizado por:

Tutor externo: Dra. Moreno Torres, Marta

Tutor interno: Dr. Martínez Montañés, Fernando

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

VALENCIA

CURSO 2021-2025

En primer lugar, quería agradecer al grupo de investigación de la Unidad Mixta Hepatología Experimental de la Dra. Marta Moreno Torres por la oportunidad de poder trabajar en un ambiente tan cooperativo y profesional, además de haberme hecho sentir bienvenida desde el primer momento. Especialmente, quiero agradecer a Polina Soluyanova y a Erika Moro por acompañarme y guiarme en todas las técnicas, haciendo mucho menos pesados los tiempos de espera.

También agradecer al Dr. Fernando Martínez Montañés por tutorizarme y guiarme en el proceso de escritura del manuscrito, además de por ser un profesor que facilita y ameniza cualquier temario. Asimismo, me gustaría mencionar a la Dra. Cristina Solana Manrique porque gran parte de mi base técnica es por ella y por brindarme un verano con moscas bastante entretenido.

Por último, me gustaría poder dedicar este TFG a mi familia.

A mis padres por haberme brindado la oportunidad de estudiar algo que realmente me gusta y haberme podido encontrar a mí misma y una motivación por una disciplina tan bonita como es la Biotecnología, en un momento en el que no parecía que fuera a encontrarme nunca.

A mi iaia y a mi abuela, porque nunca se acuerdan de lo que estudio, pero siguen igual de orgullosas de mí.

A Raúl, porque acompañarme y cuidarme en una época tan estresante de mi vida es para valientes, y ojalá me pueda seguir acompañando en muchísimas épocas más.

Y, por supuesto, a mi hermana Andrea por haberme escuchado y apoyado en todo momento, recordándome día sí día también mis capacidades y ayudándome a convertirme en la persona que soy hoy en día.

Índice de contenidos

-	Introducción	
○	<i>Drug-Induced Liver Injury</i>	pág. 1
○	Medicamentos implicados en el DILI:	
▪	Amoxicilina con ácido clavulánico	pág. 3
▪	Azatioprina	pág. 4
○	Contaminantes ambientales implicados en el iDILI: PFOA	pág. 5
○	Justificación de la investigación	pág. 6
-	Hipótesis	pág. 6
-	Objetivos	pág. 6
-	Material y métodos	
○	Cultivo celular	pág. 7
○	Reactivos	pág. 9
○	Equipamiento	pág. 10
○	Ensayo MTT	pág. 11
○	Protocolo de análisis de la expresión génica	
▪	Extracción RNA	pág. 11
▪	<i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)	pág. 11
▪	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (qPCR)	pág. 12
○	Análisis estadístico	pág. 14
-	Resultados	
○	Ensayo de viabilidad mitocondrial de células tratadas con PFOA y AMOX, AMOX/CLAV o CLAV	pág. 15
○	Ensayo de viabilidad mitocondrial de células tratadas con PFOA y AZA ..	pág. 17
○	Análisis de la expresión génica	pág. 22
-	Discusión	pág. 27
-	Conclusiones	pág. 29
-	Bibliografía	pág. 30

Índice de tablas:

- **Tabla 1.** Nombres de los genes junto con sus *primers* y su amplicón. pág. 10
- **Tabla 2.** Master Mix necesaria para la realización de la RT-PCR. pág. 12
- **Tabla 3.** Master Mix necesaria para la realización de la qPCR. pág. 13
- **Tabla 4.** Tratamientos celulares de PFOA, PFOA con AMOX, AMOX/CLAV y CLAV en placa de 96 pocillos. pág. 16
- **Tabla 5.** Tratamientos celulares de PFOA 0'26mM, PFOA 0'59mM, CLAV 0'7mM y CLAV 2mM el análisis de la expresión génica. pág. 23

Índice de figuras:

- **Figura 1.** Esquema de los distintos factores implicados en el iDILI. pág. 2
- **Figura 2.** Estructura de la molécula de los beta-lactámicos de amoxicilina y ampicilina. pág. 3
- **Figura 3.** Estructura molecular del ácido perfluorooctanoico (PFOA). pág. 5
- **Figura 4.** Hepatocitos *upcyte*® en expansión bajo microscopio óptico de contraste de fases. pág. 8
- **Figura 5.** Gráficos representativos de la viabilidad celular a distintas concentraciones de PFOA y sus combinaciones con AMOX, AMOX/CLAV y CLAV. pág. 17
- **Figura 6.** Curva de viabilidad obteniendo las 5 concentraciones más representativas de AZA. pág. 18
- **Figura 7.** Curva de viabilidad celular con concentraciones de AZA con un rango de 15 μ M a 2000 μ M. pág. 18
- **Figura 8.** Gráficos de viabilidad con PFOA para obtener el threshold de la concentración (THR, 800 μ M). pág. 19
- **Figura 9.** Esquema de tratamiento y pretratamiento de AZA y PFOA (AGUDO, CAMBIO MEDIO y MISMO MEDIO). pág. 20
- **Figura 10.** Distribución del ensayo de viabilidad con AZA y PFOA en placas de 96 pocillos. pág. 21
- **Figura 11.** Gráficos representativos de la viabilidad celular con pretratamientos y tratamiento agudo de PFOA junto con AZA. pág. 21
- **Figura 12.** Análisis de la expresión de los genes *TXNRD1* y *AKR1B10*. pág. 24
- **Figura 13.** Análisis de la expresión de los genes *GCLC* y *GCLM*. pág. 25
- **Figura 14.** Análisis de la expresión de los genes *GPX2* y *GSR*. pág. 26
- **Figura 15.** Análisis de la expresión del gen *FGF19*. pág. 27

Listado de símbolos y siglas

- **ADR:** *Adverse Drug Reactions*
- **ALT:** Alanina aminotransferasa
- **AMOX:** Amoxicilina
- **AMOX/CLAV:** Amoxicilina asociada con ácido clavulánico
- **AMP:** Ampicilina
- **ARE:** *Antioxidant Response Elements*
- **AST:** Aspartato aminotransferasa
- **AZA:** Azatioprina
- **BSA:** *Bovine Serum Albumine*
- **CLAV:** Ácido clavulánico
- **DAMPs:** *Damage-Associated Molecular Patterns*
- **DM:** *Differential Medium*
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **ECH:** Engelbreth-Holm-Swarn
- **EICH:** Enfermedad del Injerto Contra el Huésped
- **GM:** *Growth Medium*
- **GSH:** Glutación reducido
- **GSSG:** Glutación oxidado
- **IBD:** *Inflammatory Bowel Disease*
- **IL-6:** Interleucinas 6
- **KEAP1:** *Kelch-Like ECH-Associated Protein*
- **LC:** *Liver Control*
- **LDH:** Lactato deshidrogenasa
- **NAFLD:** *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*
- **NRF2:** *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
- **OSM:** Oncostatina M
- **PBP:** *Penicillin-Binding Protein*
- **PFAS:** *Per- and polyfluoroalkyl substances*
- **PFOA:** Ácido perfluorooctanoico
- **ROS:** *Reactive Oxygen Species*

Resumen y palabras clave:

El daño hepático inducido por fármacos (DILI, de sus siglas en inglés) forma parte de las Reacciones Adversas a Medicamentos (*Adverse Drug Reactions* (ADR) de sus siglas en inglés) hepáticas causadas por síntomas inesperados a dosis usuales y terapéuticas, destacando el DILI idiosincrático (iDILI). Tiene principalmente tres tipos de patrones de daño, colestásico, hepatocelular y mixto. La incidencia de esta patología se encuentra en aumento, siendo de suma importancia la farmacovigilancia tras la liberación de un nuevo fármaco al mercado. En este trabajo, se han estudiado varios fármacos con mayor incidencia en el iDILI, como la amoxicilina asociada con ácido clavulánico y la azatioprina. La susceptibilidad a DILI puede verse afectada por otros factores involucrados como la exposición a determinados contaminantes ambientales, como el ácido perfluorooctanoico (PFOA), que generen un daño hepatotóxico o sensibilicen los hepatocitos de manera adicional, pudiendo empeorar el daño al administrarse el fármaco. El objetivo principal de este estudio es observar si el uso concomitante de amoxicilina y ácido clavulánico o la azatioprina con una exposición al contaminante PFOA tiene un efecto hepatotóxico aditivo en hepatocitos humanos. Para ello, realizamos diversos ensayos de viabilidad empleando PFOA tanto con amoxicilina-clavulánico como con azatioprina en hepatocitos humanos *upcyte*®. Concretamente, en el caso de PFOA con azatioprina, realizamos un pretratamiento previo del contaminante para simular de manera más fiel a la realidad la exposición continua a la que está sometida la población. Además, en el caso de PFOA con el ácido clavulánico, analizamos genes involucrados en la síntesis del glutatión de la ruta NRF2 de defensa ante estrés oxidativo, debido a que de manera individual ambos compuestos eran capaces de generar este estrés en el hepatocito. Hemos podido concluir que hay un efecto sinérgico en el uso conjunto de PFOA con amoxicilina y ácido clavulánico, afectando en mayor medida la viabilidad celular, además de observar una mayor susceptibilidad a la azatioprina en aquellos hepatocitos expuestos al tratamiento con PFOA. Finalmente, en el análisis de expresión génica se observaron genes sobreexpresados al aplicar el tratamiento de PFOA combinado con ácido clavulánico en comparación a los hepatocitos tratados con los compuestos de manera individual.

Palabras clave: DILI (Drug-Induced Liver Injury), iDILI (Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury), ácido clavulánico, amoxicilina, azatioprina, ácido perfluorooctanoico (PFOA), hepatocitos humanos, hepatotoxicidad, contaminantes persistentes.

Abstract and keywords:

Drug-Induced Liver Injury (DILI) is a subset of hepatic Adverse Drug Reactions (ADR) caused by unexpected symptoms at usual and therapeutic dosage, with idiosyncratic DILI (iDILI) standing out. There are three main patterns of liver damage associated with DILI: cholestatic, hepatocellular and mixed. The incidence of this condition is increasing, highlighting the importance of pharmacovigilance following the release of a new drug to the market. In this study, several drugs with a higher incidence of iDILI were examined, such as amoxicillin combined with clavulanic acid and azathioprine. Susceptibility to DILI can also be influenced by additional factors, including exposure to certain environmental contaminants, such as perfluorooctanoic acid (PFOA), which may induce hepatotoxic damage or sensitize hepatocytes, potentially worsening the injury when the drug is administered. The main objective of this study is to assess whether the concomitant use of amoxicillin with clavulanic acid or azathioprine, alongside exposure to the pollutant PFOA exerts an additive hepatotoxic effect on human hepatocytes. To this end, we conducted several viability assays using PFOA in combination with amoxicillin-clavulanate or azathioprine in *upcyte*® human hepatocytes. Specifically, in the case of PFOA with azathioprine, a pre-treatment protocol was employed to more accurately mimic the chronic exposure experienced by human populations. Additionally, for the combination of PFOA with clavulanic acid, we also analysed the expression of genes involved in glutathione synthesis through the NRF2 oxidative stress response pathway, since both compounds individually could induce oxidative stress in hepatocytes. Our results demonstrate a synergistic effect when PFOA is co-administered with amoxicillin combined with clavulanic acid, significantly reducing cell viability. Additionally, pre-exposure to PFOA increased the susceptibility of hepatocytes to azathioprine. Finally, gene expression analysis revealed overexpression of certain genes when cells were treated with both PFOA and clavulanic acid compared to cells treated with each compound individually.

Keywords: DILI (Drug-Induced Liver Injury), iDILI (Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury), clavulanic acid, amoxicillin, azathioprine, perfluorooctanoic acid (PFOA), human hepatocytes, hepatotoxicity, persistent pollutants.

1. Introducción

1.1 *Drug-Induced Liver Injury*

El daño hepático inducido por fármacos (DILI por sus siglas en inglés, *Drug-Induced Liver Injury*) forma parte de reacciones adversas provocadas por medicamentos (ADR, *Adverse Drug Reactions*) (Hoofnagle & Björnsson, 2019). Actualmente, el DILI representa la mayor causa de trasplante de hígado y el motivo predominante de fallo agudo hepático en Estados Unidos y Europa (H. K. Björnsson & Björnsson, 2022; Moreno-Torres et al., 2022; Russmann et al., 2009).

La incidencia y la morbilidad de la enfermedad están en crecimiento debido a la aparición y uso de nuevos fármacos, mayor esperanza de vida, polimedicación en edades avanzadas y la amplia extensión de medicinas alternativas accesibles y sin receta, incluyendo productos herbales. Además, es la manifestación más común de hepatotoxicidad asociada a los fármacos, siendo un problema de salud pública en aumento (Moreno-Torres et al., 2022).

En el DILI encontramos principalmente tres tipos de patrones de daño: hepatocelular, colestásico y mixto.

- El primero se caracteriza por una necrosis de las células hepáticas, liberación de transaminasas ALT y AST y de lactato deshidrogenasa (LDH) pero una estasis biliar leve.
- El daño colestásico está asociado a una disfunción de la producción biliar y reflujo con estasis biliar.
- Por último, el daño mixto comparte características de ambos fenotipos de la enfermedad y es típico en muchos fármacos, siendo el patrón más común de DILI. Es muy poco frecuente en casos de enfermedad hepática aguda (Moreno-Torres et al., 2022).

Esencialmente, encontramos dos tipos de DILI, el DILI intrínseco o el DILI idiosincrático (iDILI).

El DILI intrínseco es causado por fármacos que causan mayoritariamente daño hepatocelular (derivando en patrones de necrosis celular) y, en menor medida, puede causar daño colestásico o mixto; mediante mecanismos definidos de manera predecible debido a la dosis administrada. Gracias a la predictibilidad del daño hepatotóxico en relación con el fármaco y/o la dosis administrada en estos casos, la identificación de estos compuestos en etapas muy tempranas del desarrollo de los fármacos resulta más sencilla (Moreno-Torres et al., 2022).

Aunque la mayor parte de las ADR son dependientes de la dosis administrada o intrínsecas, el 10-15% de estas reacciones son no dependientes de dosis, lo que se conoce como toxicidad idiosincrática (iDILI). Esta toxicidad está causada por factores como los fármacos, hierbas medicinales u otros xenobióticos capaces de causar disfunciones hepáticas (Moreno-Torres et al., 2022).

En reacciones de tipo iDILI el daño se origina por razones relacionadas con los fenotipos individuales, causando que el evento sea impredecible, poco común y no siempre relacionado con la dosis administrada, la ruta metabólica afectada o la duración del tratamiento farmacológico. Hay diversos factores que pueden estar implicados en el proceso del daño hepático característico del iDILI como es la susceptibilidad génica y la exposición a contaminantes ambientales que puedan causar daño hepático. También puede tener una implicación la microbiota de la persona y la metabolización propia de los fármacos, así como comorbilidades asociadas (Moreno-Torres et al., 2024).

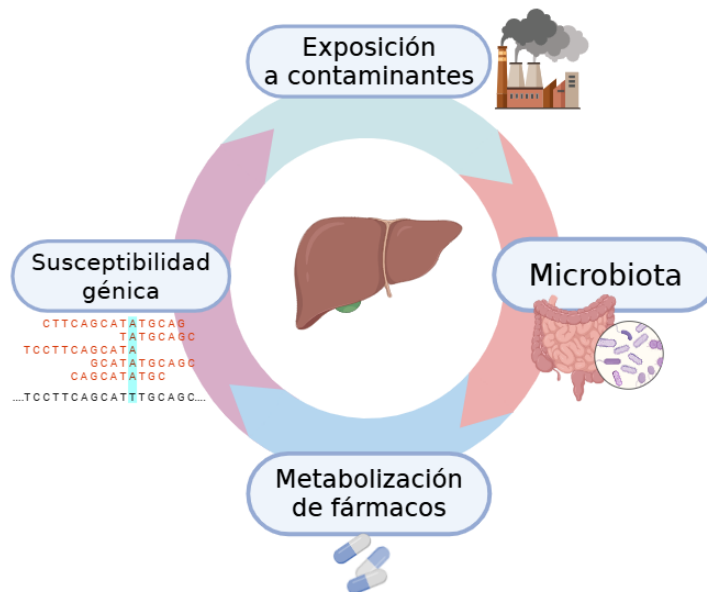


Figura 1. Esquema de los distintos factores implicados en el iDILI, tales como la exposición a contaminantes ambientales persistentes, la microbiota, la metabolización de fármacos y la susceptibilidad génica individual. Creado con Biorender.com.

A pesar de los exhaustivos ensayos preclínicos y clínicos realizados con anterioridad al lanzamiento al mercado de un nuevo fármaco, es imposible poder asegurar al 100% la seguridad y los efectos adversos asociados a un fármaco recién aprobado, de ahí la importancia de la farmacovigilancia asociada a estos procedimientos (Grant & Rockey, 2012; Moreno-Torres et al., 2022). Debido a que el DILI es una de las causas más frecuentes e inesperadas del cese del desarrollo farmacológico, son necesarias las acciones adicionales regulatorias post-márketing y retirada del mercado; siendo de suma importancia el diagnóstico temprano de hepatotoxicidad de los nuevos fármacos para la industria farmacéutica (Moreno-Torres et al., 2022).

Actualmente, pese a la gran cantidad de recursos destinados a la investigación y desarrollo de *screenings* de toxicidad, éstos aún no están centrados en el desarrollo de herramientas diagnósticas eficaces y precisas que permitan predecir el iDILI (Hosack et al., 2023; Moreno-Torres et al., 2022).

1.2 Medicamentos implicados en el iDILI: amoxicilina-clavulánico y azatioprina

1.2.1 Amoxicilina con ácido clavulánico

La amoxicilina es un antibiótico beta-lactámico altamente empleado en la población. Su mecanismo de acción bactericida consiste en la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana mediante la unión irreversible del anillo beta-lactámico a la PBP (*penicillin-binding protein*) (Huttner et al., 2020). Este grupo de antibióticos fueron descubiertos en el año 1929 por Alexander Fleming, considerándose un hito histórico en medicina y causando una revolución en las prácticas clínicas a la hora de tratar infecciones bacterianas en los años 40 (Tooke et al., 2019). Gracias al grupo hidroxilo añadido a la molécula original de la ampicilina, la amoxicilina es mucho más liposoluble; además, tiene una mayor biodisponibilidad y duración del efecto, pudiendo reforzar la respuesta bactericida en comparación con la molécula original (Huttner et al., 2020).

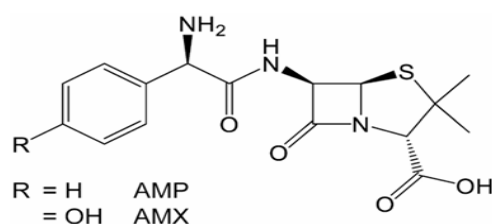


Figura 2. Estructura de los beta-lactámicos, donde R (Residue) es H (hidrógeno) en la molécula de la ampicilina (AMP) y es OH (grupo hidroxilo) en la molécula de la amoxicilina (AMX) (Suzuki et al., 2022).

Debido al elevado uso de los beta-lactámicos desde su descubrimiento, las bacterias han sido capaces de desarrollar distintos mecanismos de resistencia. Estrategias como una reducción en la permeabilidad de su pared y membrana celular, una modificación en el sitio de unión de las PBP (por mutagénesis o por la expresión de PBPs alternativas) o incluso aumento de sistemas de flujo para expulsar al medio todos aquellos compuestos que sean dañinos para la propia bacteria; han causado una disminución en la eficiencia de los beta-lactámicos (Tooke et al., 2019).

Como consecuencia del aumento de resistencias y la capacidad de las bacterias de acostumbrarse y de encontrar nuevos mecanismos, surgió la necesidad de reforzar los antibióticos tanto mediante síntesis químicas (obteniendo la amoxicilina) como mediante adyuvantes para camuflar o facilitar la entrada del compuesto (Huttner et al., 2020).

Uno de los adyuvantes más utilizados es el ácido clavulánico, que fue descubierto como producto del organismo *Streptomyces clavuligerus*, el cual fue aislado y observado con capacidad de resistencia a las beta-lactamasas. Es una molécula análoga de la estructura básica de la penicilina, con la sustitución de un oxígeno por un azufre. Observaron que era un compuesto activo contra un gran espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero,

en comparación a otros antibióticos, su actividad era relativamente baja siendo poco útil administrado por sí solo. Esto causó la necesidad de co-formularlo con otros antibióticos susceptibles a las beta-lactamasas para poder reforzar la respuesta bactericida y retrasar la aparición tan elevada de resistencias bacterianas (Saudagar et al., 2008).

Aunque en ciertos metaanálisis más antiguos no se haya podido comprobar eficientemente la relación entre la amoxicilina y ácido clavulánico con el DILI (Ferrer et al., 2016), en los últimos años sí se ha conseguido demostrar la correlación de la enfermedad con el antibiótico (Moreno-Torres et al., 2024). Además, su uso está contraindicado en pacientes de edad avanzada y en aquellos que tengan alguna alteración hepática crónica (Saudagar et al., 2008).

En la gran mayoría de estudios de DILI, la amoxicilina asociada al ácido clavulánico es el medicamento más común de daño hepático, destacando su importancia en la enfermedad al ser el fármaco líder implicado en la aparición de DILI en España de los años 1995 a 2018 (E. S. Björnsson, 2017; H. K. Björnsson & Björnsson, 2022). El daño hepático más común causado es el daño colestásico o mixto, con una latencia en su aparición de unos 15 a 30 días desde el inicio del tratamiento (Björnsson, 2017). Asimismo, se han descrito ciertas características clínicas y bioquímicas similares del tratamiento de amoxicilina sola en comparación de la amoxicilina asociada al ácido clavulánico pudiendo indicar un daño causado por la amoxicilina, como sucede con otras penicilinas o cefalosporinas (Petrov et al., 2021).

Sin embargo, se han encontrado otros estudios donde el ácido clavulánico era el compuesto responsable del daño hepatotóxico, dentro del tratamiento de amoxicilina con clavulánico, en comparación de los casos reportados en pacientes donde únicamente se le había administrado amoxicilina (De Abajo et al., 2004; Petrov et al., 2021). A pesar de no encontrarse completamente dilucidado el mecanismo por el cual genera estos daños, el ácido clavulánico tiene mayor relación e incidencia con el iDILI en comparación a la amoxicilina (Román-Sagüillo et al., 2024).

Cabe destacar que en otros inhibidores de las beta-lactamasas (como puedan ser tazobactam o subactam) no se han encontrado evidencias de que causen un daño hepático similar; en cambio, el ácido clavulánico asociado a otras penicilinas sí causa un patrón hepatotóxico similar al causado junto con la amoxicilina (Petrov et al., 2021).

1.2.2 Azatioprina

Otro medicamento con elevada incidencia en el DILI es la azatioprina (Matsuo et al., 2014). La azatioprina es el profármaco de la 6-mercaptopurina, empleada como tratamiento inmunosupresor de primera línea en individuos con enfermedades autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal dependiente de esteroides (o de sus siglas en inglés, *steroid-dependent Inflammatory Bowel Disease, IBD*) o en la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) (Frank Wolf et al., 2023).

Debido a su analogía con las purinas, inhibe la producción de DNA e induce sus efectos principalmente en células con ratios elevados de proliferación, como los linfocitos B y T (Chavez-Alvarez et al., 2020).

Aun así, su ventana terapéutica se encuentra limitada debido a la alta incidencia relacionada con ADRs como hepatotoxicidad, supresión de la médula ósea y síntomas gastrointestinales; estando relacionada con la hepatotoxicidad encontrada en el 2% de los pacientes con artritis reumatoide y artritis psoriásica. Además, debido a su conversión hepática en 6-mercaptopurina, genera la activación de la ruta Xantina Oxidasa que es una fuente activa de ROS, derivando en la hepatotoxicidad caracterizada. A parte de esta activación, genera una respuesta inflamatoria por una infiltración de neutrófilos y de Patrones Moleculares Asociados al Daño (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns*) causando un mayor daño hepatotóxico (Matsuo et al., 2014).

1.3 Contaminantes ambientales implicados en el iDILI: PFOA

Las sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas (PFAS, *per- and polyfluoroalkyl substances*) son contaminantes ambientales empleados principalmente en industria para recubrimientos de objetos de uso doméstico. Concretamente, el ácido perfluorooctanoico (PFOA) se encuentra en varios productos, como envases alimentarios o en el recubrimiento de teflón de las sartenes antiadherentes (Gou et al., 2024; Sajid & Ilyas, 2017). Debido a la persistencia de estos contaminantes por su capacidad acumulativa y alta resistencia y estabilidad frente a la degradación (Roth et al., 2021), se ha demostrado su asociación con diversas alteraciones fisiológicas, incluyendo la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*); pero no se ha conseguido dilucidar el mecanismo por el cual lo causa (Gou et al., 2024). Además, mediante la exposición de PFOA en modelos murinos se ha conseguido relacionar un patrón de daño hepático a parte de una activación de rutas de estrés oxidativo e inflamatorias (Roth et al., 2021).

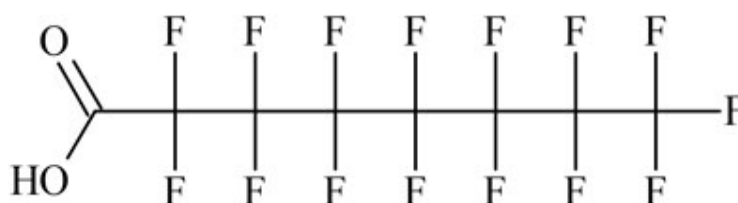


Figura 3. Estructura molecular del ácido perfluorooctanoico (PFOA) lineal (Richard et al., 2022).

Debido a la relación de estos fármacos con el DILI y la capacidad del PFOA de inducir un daño hepatotóxico, cabe la posibilidad de que una presencia acumulativa del contaminante

en hepatocitos; además del uso de alguno de estos fármacos como tratamiento agudo, sea capaz de generar un daño hepático mayor que el esperado por los compuestos de manera individual.

1.4 Justificación de la investigación

El iDILI representa un desafío clínico significativo debido a la imprevisibilidad de la lesión y la complejidad de establecer una relación causal directa (H. K. Björnsson & Björnsson, 2022; Moreno-Torres et al., 2022). Fármacos como la amoxicilina-clavulánico y la azatioprina han mostrado una elevada incidencia en el daño hepático (E. S. Björnsson, 2017; H. K. Björnsson & Björnsson, 2022; Matsuo et al., 2014); resaltando la necesidad de seguir investigando los factores implicados en la aparición, además de los mecanismos subyacentes implicados.

Debido a la naturaleza persistente y acumulativa del PFOA, capaz de generar un daño hepático (Gou et al., 2024; Roth et al., 2021); cabe la posibilidad de que su presencia sostenida en hepatocitos, junto con el uso de algunos de los fármacos mencionados previamente como tratamiento, provoque un daño hepático mayor que el esperado por cada compuesto de forma individual.

Por tanto, es necesario investigar el posible efecto hepatotóxico combinado del PFOA con amoxicilina-clavulánico o azatioprina en hepatocitos.

En este estudio, la amoxicilina (AMOX), el ácido clavulánico (CLAV), su combinación (AMOX/CLAV) y la azatioprina (AZA) fueron empleados en presencia del contaminante ambiental ácido perfluorooctanoico (PFOA) en hepatocitos humanos *upcyte*® con el objetivo de poder evaluar si la coexposición de los compuestos da lugar a un aumento de la toxicidad hepática en comparación con la exposición individual de estos.

2. Hipótesis

La exposición combinada del contaminante PFOA con el ácido clavulánico o el PFOA en concomitancia con la azatioprina induce un daño mayor en hepatocitos humanos que la exposición individual a estos compuestos. Esta interacción sinérgica podría traducirse en una actividad metabólica mitocondrial alterada, menor viabilidad celular y una alteración en los procesos de detoxificación.

3. Objetivos

El objetivo principal del Trabajo de Fin de Grado es comprobar y demostrar que el uso concomitante de un fármaco junto con el contaminante ambiental PFOA es capaz de sensibilizar y disminuir la viabilidad celular de los hepatocitos humanos.

Los objetivos específicos del Trabajo de Fin de Grado son:

1. Demostrar que el uso concomitante de amoxicilina-clavulánico junto con PFOA genera una sinergia y un daño mayor que su uso individual en los hepatocitos humanos.
 2. Demostrar que el uso concomitante de azatioprina junto con PFOA genera una sinergia y un daño mayor que su uso individual en los hepatocitos humanos.
 3. Observar si la ruta NRF2 involucrada en el estrés oxidativo se ve sobreexpresada en aplicación de PFOA y ácido clavulánico en comparación de la expresión génica causada por los compuestos individuales en los hepatocitos humanos.
- Trabajo sobre el daño hepático inducido por fármacos (DILI) en relación con compuestos hepatotóxicos como el PFOA, la azatioprina o el ácido clavulánico → Objetivo 3 (Salud y Bienestar): Meta 3.9.

4. Material y métodos

4.1 Cultivo celular

Todos los ensayos se realizaron utilizando hepatocitos humanos *upcyte*® (*upcyte*® Technologies GmbH), derivados de hepatocitos primarios obtenidos de donantes y posteriormente expandidos. Estas células presentan una capacidad de proliferación limitada que les permite conservar funciones hepáticas específicas sin llegar a inmortalizarse. A diferencia de líneas celulares comúnmente empleadas como HepG2, los hepatocitos *upcyte*® expresan genes implicados en la síntesis de ácidos biliares y en el transporte hepático, lo que les permite mantener un fenotipo más similar al de los hepatocitos primarios cultivados (Petrov et al., 2021). Concretamente, en estos ensayos se emplearon células *upcyte*® procedentes del donante 10-03.

Los medios de cultivo empleados fueron dos: el medio de diferenciación (*Differential Medium*, DM) y el medio de crecimiento (*Growth Medium*, GM). El DM tiene como objetivo principal favorecer la propia diferenciación celular hacia un fenotipo hepático funcional, promoviendo la síntesis de enzimas detoxificantes. Por otro lado, el GM se emplea principalmente durante las fases de expansión celular, permitiendo la proliferación controlada de los hepatocitos y facilitando el subcultivo sin comprometer el fenotipo celular.

El DM se compone de los siguientes elementos:

- Medio Williams E como base (Ref. 22551089, *Gibco*™), específico para el cultivo de hepatocitos primarios de rata y de humano.
- 1.5% de BSA (*Bovine Serum Albumin*, P06-139450 *Pan-Biotech*®), para facilitar la estabilización de las células y poder aportar los nutrientes basales.

- 1% de ITS (Insulina, Transferrina y Selenito) (ITS-G 100X, Ref. 41400045, *Gibco*TM) al 1X.
- 1% de PSS que equivalen a una concentración final de 100U/mL (Penicilina-Estreptomicina) (Ref. 15140122, *Gibco*TM, 10.000 U/mL).
- 0.001% de Dexometasona 10mM (Ref. D2915, *Merck*[®]) que equivale a una concentración final de 100 nM.
- 1% de L-glutamina (Ref. 25030024 *Gibco*, 200 mM) para una concentración final de 2 mM.

Debido a la complejidad inherente que conlleva amplificar y expandir hepatocitos humanos, y a fin de evitar la senescencia celular durante el proceso de expansión, se recurrió al GM, el cual se basa en la misma composición del DM con la adición de 10ng/mL de Oncostatina M (*Preprotech*[®] 300-IOT, 100ng/ μ L). La Oncostatina M (OSM) es una citocina perteneciente a la familia de las interleucinas 6 (IL-6) que activa diversas vías implicadas en la proliferación celular controlada. Es importante señalar que la adición de OSM no induce la inmortalización celular, ya que conllevaría a la pérdida del fenotipo hepático; sino que permite una expansión limitada de manera controlada (Levy et al., 2015).

Los frascos empleados (*Corning*[®] *BioCoat*[®] *Collagen I-coated Flasks*) fueron de 75 y 150 cm² y son esenciales para el crecimiento de estas células, debido a que se componen de una capa de colágeno en la base para facilitar la adherencia y fomentar la expansión de la monocapa celular.

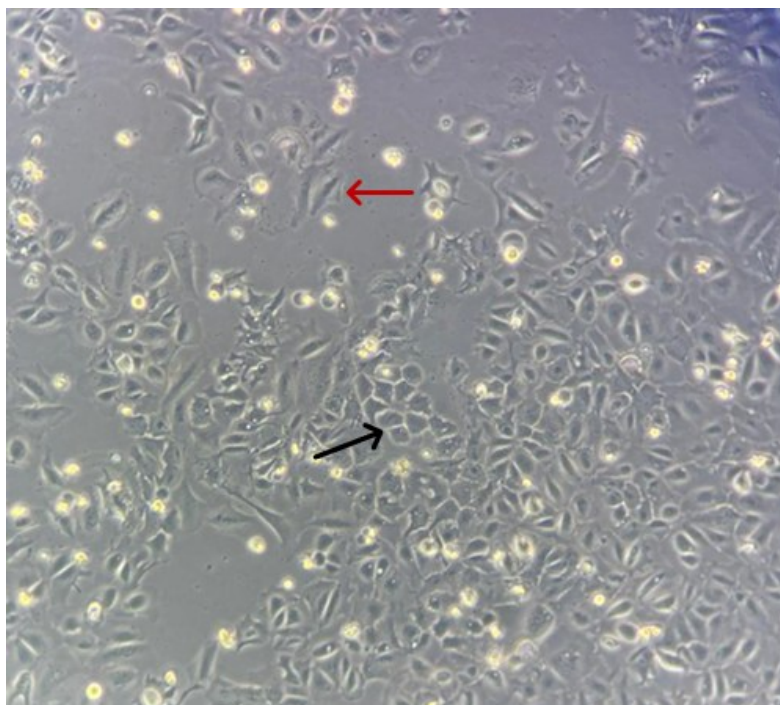


Figura 4. Hepatocitos humanos *upcyte*[®] en expansión bajo microscopio óptico de contraste de fases a 20x, donde se muestra la morfología hexagonal característica de los hepatocitos (señalado por la flecha negra) y donde se muestra el fenotipo de los hepatocitos sin diferenciar, con forma alargada e irregular (señalado por la flecha roja). Imagen obtenida en el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe).

Para las siembras de células, fueron utilizadas placas de 96 pocillos (*Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™*) y placas de 24 pocillos, concretamente. A la hora de sembrar en placas de 96 pocillos, se dejó sin sembrar la primera y última fila, así como la primera y última columna de la placa. Esto se hace con el fin de evitar que las células situadas en los bordes, que están más expuestas al entorno, sufran efectos no deseados que puedan sesgar los resultados.

Las placas de 96 pocillos se usaron en todos los ensayos de viabilidad celular con una siembra de unas 18.000 células por pocillo (un total de 1.080.000 células por placa) y, en las placas de 24 pocillos, se sembraron unas 180.000 células por pocillo empleando, como mínimo, 9 pocillos para las 9 condiciones (1.620.000 células en total).

Todas las placas se recubrieron previamente con una capa de *Coating K* en el fondo de cada pocillo hasta cubrirlo enteramente. Este recubrimiento está compuesto por DMEM *Low Glucose*, fibronectina humana, colágeno de rata y BSA (*Bovine Serum Albumine*). La solución se añadió a los pocillos de las placas nuevas y se incubó durante aproximadamente 10 minutos a 37°C y 5% CO₂. Una vez transcurrido el tiempo, el recubrimiento se retiró por completo. Este proceso es fundamental para garantizar una adecuada adhesión celular y facilitar la formación de la monocapa.

Para mejorar la expresión de las enzimas CYP de los hepatocitos, *upcyte®* recomienda emplear la configuración “sándwich” basada en utilizar una matriz Matrigel™ (Ref. 354234, *Corning®*). El Matrigel™ es una preparación de membrana base solubilizada extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) que es rico en proteínas de matriz como laminina, colágeno IV, proteoglicanos heparán sulfato, además de otros componentes de crecimiento. Teóricamente, es capaz de facilitar la expresión génica y la metabolización celular.

El Matrigel™ debe ser aplicado 5h después de la siembra de las células en placa, para asegurarnos que las células han tenido el tiempo suficiente para adherirse al fondo del pocillo. Previo a su aplicación, nos aseguramos de que se hayan conseguido adherir mediante observación al microscopio; comprobando si han sido capaces de formar la monocapa o si siguen en suspensión. Una vez formada, retiramos todo el medio del pocillo evitando rasgar la monocapa del fondo y aplicamos el medio con Matrigel™ diluido al 5% en DM. Es importante trabajar rápido para evitar la solidificación de la solución, ya que se descongela muy rápido.

4.2 Reactivos

Para los ensayos tanto de viabilidad celular como de expresión génica, se emplearon el ácido clavulánico asociado a potasio (*Potassium Clavulanate*, Ref. 33454, *VETRANAL®*), amoxicilina (Ref. A8523, *Merck®*), amoxicilina con clavulánico (Ref. SMB00607, *Merck®*), ácido perfluorooctanoico (Ref. 171468, *Merck®*) y azatioprina (CAS: 446-86-6, *MedChemExpress®*).

Para los ensayos de expresión génica, se emplearon los siguientes cebadores o *primers*:

Tabla 1. Nombres de los genes con sus respectivos *primers*, los *forward* y los *reverse* junto con la zona de amplificación del gen (amplicón).

NOMBRE	FORWARD	REVERSE	AMPLICÓN
<i>H-PBGD</i>	5' CGG AAG AAA ACA GCC CAA AGA 3'	3' TGA AGC CAG GAG GAA GCA CAGT 5'	59 – 331pb
<i>RPLP0</i>	5' ACA ACC CAGCTC TGG AGA AA 3'	3' TGC CCC TGG AGA TTT TAG TG 5'	289 – 528pb
<i>FGF19</i>	5' CGC GCA CAG TTT GCT GGA 3'	3' CGG TGC TTC TCG GAT CGG TA 5'	371 – 546pb
<i>TXNRD1</i>	5' GGT GCT TGT GGC CTT TCT GA 3'	3' GGA CCC AGT ACG TGA AAG CC 5'	1687 – 1874pb
<i>AKR1B10</i>	5' AGT GAT GAG GAG ATG GCA ACC 3'	3' AAA TGG GAC ATG AGT GGA GGT 5'	1189 – 1375pb
<i>GCLC</i>	5' TCA ATG GGA AGG AAG GTG TGT 3'	3' TGG TTT GCG ATA AAC TCC CTC A 5'	2027 – 2207pb
<i>GCLM</i>	5' AAT CTT GCC TCC TGC TGT GTG 3'	3' ACT CGT GCG CTT GAA TGT CAG 5'	832 – 991pb
<i>GPX2</i>	5' TGA GAA TGT GGC TTC GCT CTG 3'	3' ACC CCC AGG ACG GAC ATA C 5'	118 – 298pb
<i>GSR</i>	5' GGC CGA AAA CTT GCC CAT C 3'	3' ATC GGG GTA AAG CTC GTT GA 5'	1245 – 1426pb

Todos los *primers* fueron obtenidos de IDT (*Integrated DNA Technologies*®).

4.3 Equipamiento

Todos los tratamientos y el mantenimiento de las células fueron realizados en condiciones de esterilidad, mediante una cabina de bioseguridad tipo II (*Bio II Advance Plus*, *Telstar*®).

Se requirieron centrífugas específicas para las centrifugaciones de los pases celulares (*Heraeus Megafuge 40R Centrifuge*, *ThermoFisher Scientific*®), de los tubos de 1.5 mL para la extracción de RNA (*Heraeus Fresco 17 Centrifuge*, *Thermo Electron Corporation*®), y de las placas de 384 pocillos (*Scanspeed 1236*, *LaboGene*®).

También se emplearon para los distintos ensayos los siguientes equipos: Baño maría (*Bath-D*, OVAN®), *Nanodrop* (*Implen NanoPhotometer*, *Implen*®), termociclador (*LightCycler 480*, Roche LifeScience®), lector de placas (*Ledetect 96 Microplate Reader*, IBIAN Technologies®), vórtex (*Vortex Genie 2*, Scientific Industries®) y el termobloque (*Isotemp*, fisherbrand®).

4.4 Ensayo MTT

El ensayo de viabilidad se realizó con el reactivo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro). Este compuesto puede convertirse en formazán según la actividad metabólica de la mitocondria, pasando de un color amarillento a un color más morado. Para el ensayo, se diluyó en DM para obtener una solución con un 10% de reactivo MTT, y se incubó la placa a 37°C y 5% CO₂ durante aproximadamente 35 min. Después, se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% a cada pocillo durante al menos 15 minutos para poder disolver los cristales de formazán, generados por las células, que acaban precipitados al fondo del pocillo.

4.5 Protocolo del análisis de la expresión génica

4.5.1 Extracción RNA

La extracción de RNA fue realizada mediante el kit de extracción de RNA de *Omega Bio-tek*® (Ref.: R6731-01, E.Z.N.A.® DNA/RNA Isolation Kit).

Para asegurarnos la correcta extracción de RNA, comprobamos los resultados en por espectrofotometría en el *Nanodrop*. Podemos verificar la pureza y la ausencia de contaminantes con los ratios A260/280 y A260/230. El primero nos indica que, si obtenemos un valor en torno al 2, nuestra muestra está enteramente compuesta de RNA (los ácidos nucleicos tienen un pico de absorbancia en el A60, trabajando en el programa de “detección de RNA”) y no hay proteínas contaminantes en el medio (que tienen un pico de absorbancia en el A280).

El segundo ratio (A260/230) nos muestra la proporción de grupos residuales como anillos o fenoles que puedan haberse quedado en la muestra, del cual debemos obtener también valores alrededor del 2. Idealmente, debemos obtener concentraciones, como mínimo, alrededor de los 100 ng/μL.

4.5.2 Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

Para obtener DNA complementario (cDNA) a partir de RNA mensajero (mRNA) realizamos una reacción de transcripción inversa (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Cabe destacar que las muestras fueron manipuladas en todo momento en

hielo, para preservar la integridad del RNA y ralentizar, en caso de haberlas, la acción de las posibles nucleasas que hayan podido acceder a la muestra.

A partir de las concentraciones obtenidas en el *Nanodrop*, calculamos la cantidad de muestra necesaria para conseguir resuspender 1 µg de RNA en 10 µL de agua libre de nucleasas. Por ejemplo, si hubiéramos conseguido una extracción de 150 ng/µL, necesitaríamos 6.67 µL del RNA extraído de la muestra y resuspenderlo en un volumen final de 10 µL con agua libre de nucleasas (6.67 µL de muestra + 3.43 µL de agua). Este procedimiento se repitió para cada muestra según su concentración específica y se realizaron las diluciones en un tubo de 1.5 mL estéril.

Una vez ajustadas las concentraciones, se añadieron los siguientes compuestos en cada una de las muestras diluidas:

Tabla 2. Componentes necesarios para realizar la RT-PCR.

MASTER MIX	VOLUMEN/REACCIÓN
Agua libre de nucleasas	5.25 µL
dNTPs 4 mM	3.75 µL
0.1 DTT (10 mM)	3 µL
Primer Oligo dT (3 µM)	0.75 µL
M-MLV (200u)	1 µL
RNaseOUT (10u)	0.25 µL
5X Buffer	6 µL

De esta manera, se obtuvo un volumen final de 30 µL (10 µL correspondientes a la muestra y 20 µL de la Master Mix). En el caso del control negativo (blanco), no se añadieron las enzimas transcriptasa inversa (M-MLV) ni el inhibidor de RNasas (*RNaseOUT*), siendo reemplazadas por un volumen equivalente de agua libre de nucleasas.

Las muestras se homogenizaron suavemente y se incubaron durante 60 min a 42°C. Posteriormente, se llevó a cabo un paso de inactivación de las enzimas con el termobloque durante 15 min a 70°C. Una vez pasado el tiempo, se devolvieron las muestras al hielo para su conservación hasta su posterior uso.

4.5.3 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR).

Teóricamente, en el volumen final de 30 µL de la RT-PCR, si se alcanzó una concentración mínima de 100 ng/µL, se puede asumir que se amplificó correctamente el 1 µg de RNA en todo el volumen (es decir, hemos conseguido 30 µg de cDNA). Debido a que esta

concentración puede ser excesiva para realizar la PCR cuantitativa (qPCR), pudiendo saturar e inhibir la reacción, las muestras se diluyeron en una proporción 1:30 utilizando tampón TE 0.1X con 2X de colorante QY amarillo.

Las muestras diluidas se cargaron con una pipeta automática en una placa de 384 pocillos a 2.5 µL/pocillo por duplicado. Es decir, para el análisis de 9 genes, cada muestra se cargó 18 veces (2 réplicas por gen). Se destaca que, a parte del blanco, también fue empleado un *Liver Control* (LC) que está compuesto por una mezcla de diversas muestras hepáticas. Actúa como estándar de referencia para representar la expresión génica basal de los genes seleccionados en tejido hepático, permitiendo así la normalización de los resultados y ayudando a evitar la obtención de falsos positivos.

Paralelamente, realizamos la Master Mix de la qPCR para cada uno de los genes que contenía:

Tabla 3. Componentes necesarios para realizar la qPCR:

MASTER MIX	VOLUMEN/REACCIÓN
Agua libre de nucleasas	1.6 µL
<i>Primer</i> FORWARD 6mM	0.8 µL
<i>Primer</i> REVERSE 6mM	0.8 µL
<i>DNA master</i> SYBR GREEN 0'8X	3.6 µL
COLORANTE XC AZUL	0.2 µL

Finalmente, se preparó un volumen total de 7 µL por reacción, que se agitó y se cargó en los pocillos correspondientes evitando tocar el volumen original de cDNA, con el fin de evitar posibles contaminaciones. Este proceso se repitió para cada uno de los genes analizados, completando así el ensayo total de los 9 genes.

Una vez cargadas las reacciones, se golpeó suavemente la base de la placa para asegurar que las gotas precipitaran al fondo del pocillo y se mezclaran correctamente, observándose un cambio de color a un tono verdoso. La placa fue sellada con su *film* protector y se reforzó el sellado pasando varias veces una tarjeta plástica sobre la superficie, asegurando así la eliminación de posibles burbujas de aire. Posteriormente, la placa fue centrifugada a 1200g durante 1 minuto y 30 segundos, y colocada en el termociclador para llevar a cabo la amplificación.

El programa del termociclador constaba de un ciclo de pre-incubación a 95°C, 45 ciclos de amplificación (con desnaturalización a 95°C, alineación a 60°C y elongación a 70°C), un ciclo de análisis de la *melting curve* partiendo desde 60°C a 95°C y, por último, un ciclo de enfriamiento desde los 95°C hasta llegar a los 40°C.

Una vez completado el programa, se analizaron los resultados de la amplificación comparando la expresión génica de las muestras con la del control negativo (blanco) y con el *Liver Control*. Además, se emplearon genes constitutivos o *housekeeping* como referencia para asegurar la correcta amplificación y normalización de los datos.

4.6 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y cada uno de los experimentos tuvo un análisis estadístico específico.

En el caso de los ensayos de viabilidad celular, los datos obtenidos con el lector de placas *Ledetect 96 Microplate Reader* se procesaron calculando el promedio y la desviación estándar para cada condición experimental. Los valores se normalizaron utilizando como referencia la condición de control negativo (DMSO), mediante el software *Microsoft Excel*.

Para el análisis de la expresión génica, los datos de los ciclos de amplificación y las concentraciones de cDNA correspondientes a cada duplicado fueron extraídos a través del software *LightCycler480®* del termociclador. A partir de estos valores se calculó, utilizando *Excel*, el promedio y la desviación estándar de las concentraciones obtenidas. Posteriormente, se normalizaron los datos de concentración en función del promedio obtenido para los genes *housekeeping* *RPLP0* y *PBGD* correspondientes a cada condición experimental. Por ejemplo, los datos de la condición PFOA 0.26 mM, fueron normalizados en base al valor medio de los *housekeeping genes* en esa misma condición.

Una vez normalizados los datos, se calcularon la media y la desviación estándar de los dos experimentos independientes. A partir de ello, se determinó el *fold change* (aumento o disminución relativa) de la expresión génica para cada condición.

La significancia estadística de las diferencias observadas entre condiciones fue evaluada mediante la prueba t de *Student* (*t-test*), calculando el correspondiente p-valor. Un p-valor inferior a 0.05 se consideró indicativo de una diferencia estadísticamente significativa. Para los ensayos de viabilidad, se compararon los resultados frente al control negativo y, en el caso de los pretratamientos, también frente al tratamiento agudo. En el análisis de expresión génica, las comparaciones se realizaron entre el control negativo, las condiciones individuales de tratamiento y las combinaciones correspondientes.

5. Resultados

5.1 Ensayo de viabilidad mitocondrial de células tratadas con PFOA y AMOX, AMOX/CLAV o CLAV

Inicialmente, se realizó un ensayo de viabilidad mitocondrial en hepatocitos cultivados en placas de 96 pocillos, sometidos a un tratamiento previo con el contaminante PFOA, PFOA junto con AMOX y PFOA junto con la combinación AMOX/CLAV, con el fin de confirmar que la AMOX no provocara daño celular. Las concentraciones crecientes de PFOA seleccionadas fueron: 0 mM, 0.177 mM, 0.266 mM, 0.399 mM, 0.598 mM, 0.897 mM, 1.346 mM y 2'02mM. Si bien en estudios previos (Gou et al., 2024) utilizaron concentraciones más bajas de PFOA (hasta 0.5 mM), optamos por emplear un rango más amplio para evaluar la citotoxicidad en distintos niveles.

En un principio, se intentó determinar la concentración adecuada de CLAV mediante ensayos de viabilidad en placas de 96 pocillos con concentraciones crecientes del compuesto. En estos ensayos, se colocaron concentraciones mínimas en las primeras columnas (dejando la primera de control negativo), incrementándose progresivamente hacia las columnas finales siguiendo una proporción 2:3. Según referencias bibliográficas (Petrov et al., 2021), se probaron concentraciones de CLAV de 7 mM, 4.2 mM, 2.8 mM, 1.85 mM, 1.21 mM, 0.8 mM, 0.53 mM, 0.35 mM. Los resultados mostraron que CLAV, por sí solo, presentaba citotoxicidad mínima, ya que las células mantenían su forma hexagonal y la integridad de la membrana celular tras 3 días de diferenciación, con una viabilidad apenas afectada. Sin embargo, debido a que estos ensayos no permitieron definir con exactitud la concentración óptima de CLAV, se optó por establecerla en 2 mM basándose en datos previamente publicados (Petrov et al., 2021).

Dado que el reactivo comercial de AMOX/CLAV se presenta en con una proporción fija de 4:1, para obtener una concentración final de 2 mM en la mezcla, fue necesario ajustar la concentración de AMOX a 4.5 mM. De esta forma, la concentración de AMOX en los experimentos con el compuesto solo también se estableció en 4.5 mM, garantizando así que los resultados sean comparables entre ambos tratamientos.

Tabla 4. Tratamiento de los hepatocitos *upcyte*® a 3 días de diferenciación con las siguientes concentraciones de: PFOA, PFOA + AMOX con las concentraciones variables de PFOA y una concentración constante de 4.5 mM de AMOX, PFOA + AMOX/CLAV con las concentraciones variables de PFOA y concentraciones constantes de AMOX asociada con CLAV (AMOX a 4.5 mM y CLAV a 2 mM) y un último tratamiento de PFOA + CLAV con las concentraciones variables de PFOA y una concentración constante de CLAV (2 mM); obteniendo así 4 condiciones distintas.

Concentraciones PFOA	Concentración AMOX	Concentraciones AMOX/CLAV	Concentración CLAV
0 mM	4.5 mM	4.5 mM (AMOX) y 2 mM (CLAV)	2 mM
0.177 mM			
0.266 mM			
0.399 mM			
0.598 mM			
0.897 mM			
1.346 mM			
2.02 mM			

Las células fueron incubadas a 37°C y 5%CO₂ durante 24h con los distintos tratamientos, para posteriormente realizar el ensayo de viabilidad mitocondrial.

Debido a la baja solubilidad en agua de los fármacos, AMOX y CLAV fueron disueltos en DMSO al 100%. Asimismo, para prolongar la vida media del *stock* de PFOA, también se disolvió en DMSO.

La distribución de la placa fue la siguiente:

- 1º columna: Sin células, columna posteriormente empleada para realizar el blanco.
- 2º columna: Células sin tratamiento, únicamente con medio de cultivo.
- 3º columna: Células con el porcentaje promedio de DMSO (calculado a partir del promedio de los porcentajes finales de DMSO en el volumen total del pocillo). El porcentaje de DMSO nunca debe superar el 1%, ya que comienza a presentar efectos citotóxicos. En nuestro caso, la concentración máxima de DMSO es de 0.6%.
- De la 4ª a la 11ª columna: Células con las distintas concentraciones de PFOA, combinadas según el tratamiento con AMOX, AMOX/CLAV, CLAV o PFOA solo.

Para tener un factor de referencia que permita distinguir el mínimo de detección del lector de placas y el ruido causado por el DMSO, empleamos la primera columna sin células, pipeteando la misma cantidad de DMSO que en el resto de pocillos.

Finalmente, se realizó la lectura de la placa midiendo la absorbancia a 550 nm, correspondiente al pico de absorbancia del formazán.

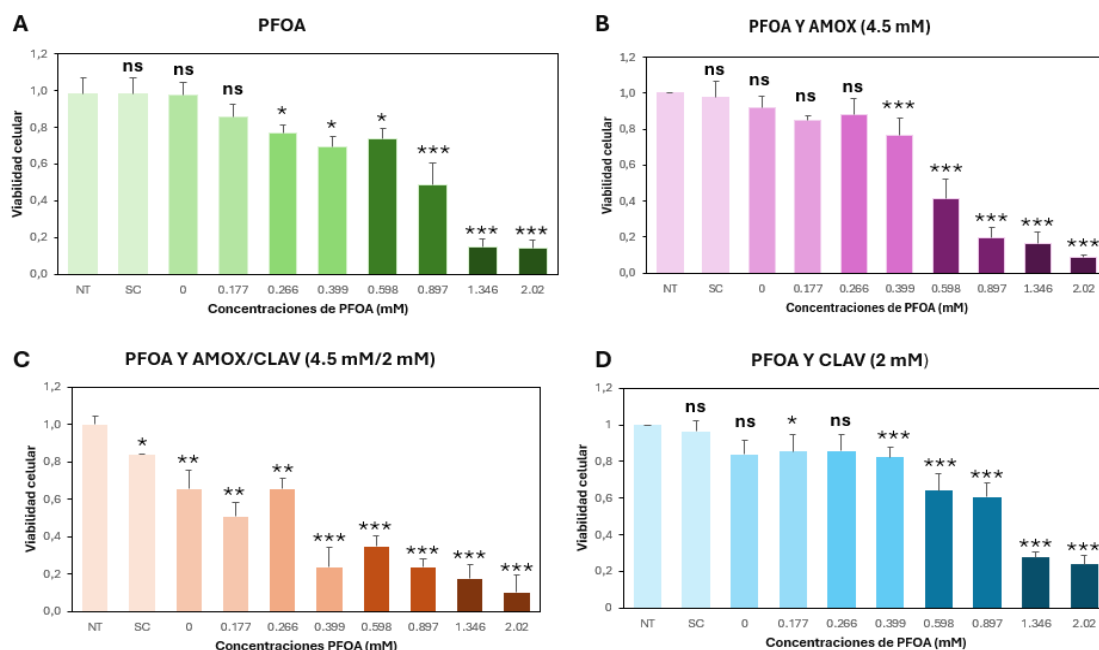


Figura 5. Gráficos representativos de la viabilidad celular basada en la actividad metabólica mitocondrial del ensayo MTT con los distintos compuestos: PFOA (A), PFOA con AMOX a 4.5 mM (B), PFOA con AMOX asociada a CLAV (4.5 mM y 2 mM respectivamente) (C) y PFOA y CLAV (2 mM) (D). El eje x representa las distintas concentraciones de PFOA, siendo NT (No tratadas) y SC (Solvent Control) los controles negativos. El eje y representa la viabilidad celular, donde el 1 es el 100% de viabilidad. La significancia se ha medido en base al p-valor obtenido donde: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns equivale a “no significativo”.

En base a los resultados obtenidos en los distintos gráficos para cada condición, observamos que a concentraciones elevadas de PFOA (como es el caso de PFOA 0.897 mM), AMOX (gráfico B) reduce significativamente la viabilidad celular, pasando de un 80% (0.399 mM) a un 40% (0.598 mM). En cambio, CLAV (gráfico D), en la concentración de 0.897 mM, la viabilidad celular es del 60% aproximadamente, siendo muy similar a cuando encontramos PFOA solo (alrededor del 50%). Es importante destacar que la condición de AMOX/CLAV (gráfico C) tiene un mayor impacto en la viabilidad que AMOX a concentraciones moderadas de PFOA (como pueda ser 0.399, 0.598 y 0.897 mM), habiendo un 70% de viabilidad en PFOA 0.399 mM en comparación a la misma concentración de PFOA junto con AMOX/CLAV (menos del 30%).

5.2 Ensayo de viabilidad mitocondrial con células tratadas con PFOA y AZA

Además de AMOX, AMOX/CLAV y CLAV, analizamos la viabilidad celular con la combinación de PFOA y AZA. En este caso, sí fue posible determinar las concentraciones a emplear basándonos en ensayos de viabilidad realizados por separado con PFOA y con AZA.

Primeramente, para AZA, se eligieron las siguientes concentraciones: 655 μM , 819 μM , 1024 μM , 1280 μM y 2000 μM . Las concentraciones fueron determinadas a partir de ensayos previos de viabilidad que abarcaron un rango de 15 μM hasta 2000 μM . La selección final de esas 5 concentraciones representativas se realizó con el *software* estadístico *CRVSTATS* V2.0.3, basado en análisis R, que indicó que eran las concentraciones más relevantes para la curva de respuesta.

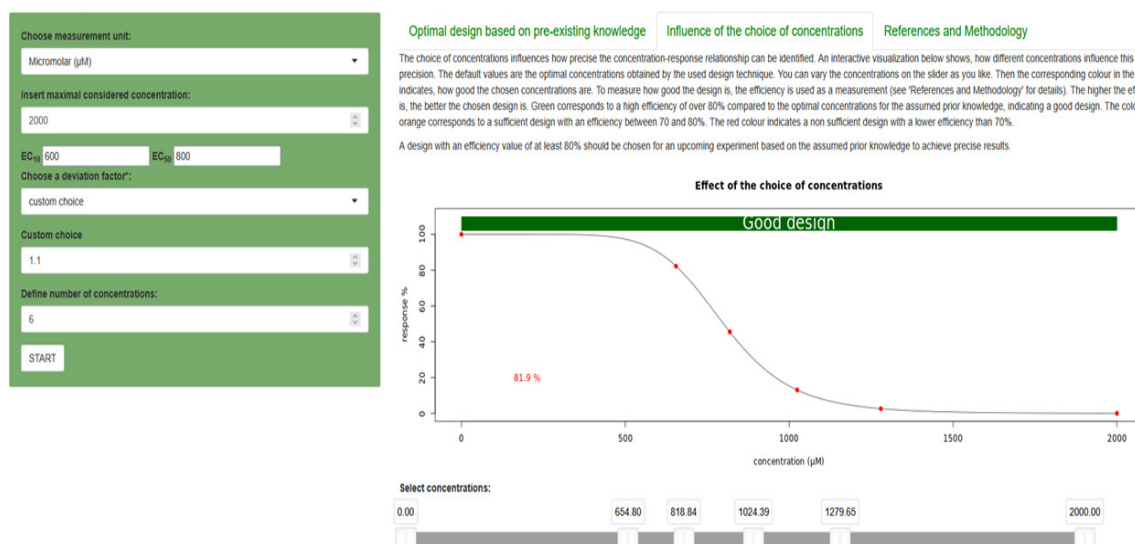


Figura 6. Curva de viabilidad donde se obtienen las 5 concentraciones de AZA más representativas para la curva representadas con puntos rojos. Realizado con *CRVSTATS* V2.0.3.

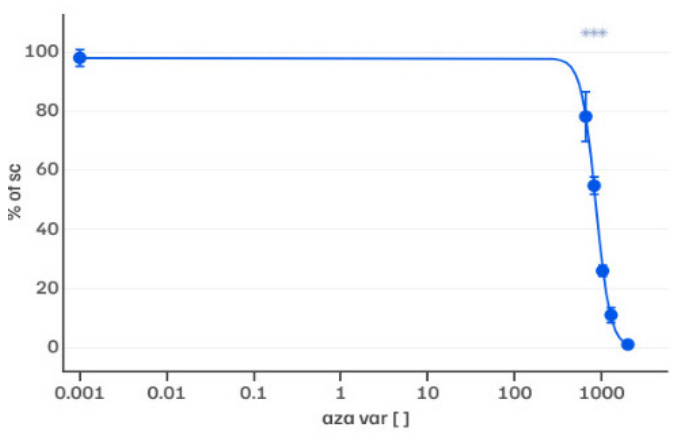
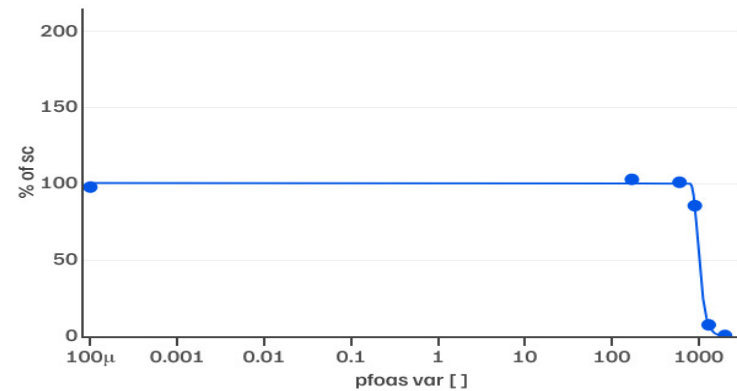


Figura 7. Curva de viabilidad de las concentraciones de AZA con los hepatocitos a 3 días de diferenciación de 15 μM a 2000 μM , donde “aza var []” son las concentraciones de AZA y “% of sc” es el porcentaje de viabilidad celular. Realizado con *CRVSTATS* V2.0.3.

En el caso de PFOA, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad con concentraciones crecientes de PFOA, desde 100 μM hasta 1 mM, con el objetivo de determinar la IC₁₀ del compuesto, es decir, la concentración de PFOA en la que el 90% de las células permanecen viables. Se determinó a partir de una curva de viabilidad realizada por el mismo *software* estadístico mencionado anteriormente.



PFOA range

Model: Weibull (type 2) with lower limit at 0

Model abbr.: W2.3()

AIC: 29.732

THR: 90

THR reach estimate: 804.355 ∈ (759.297, 910.144)

Figura 8. Curva de viabilidad celular con el compuesto PFOA, siendo “% of sc” la viabilidad celular en porcentaje y “pfoas var” la concentración de PFOA empleada. THR se refiere al threshold, siendo este el umbral de viabilidad escogido. Los puntos azules de la curva representan las distintas concentraciones de PFOA empleadas en los ensayos *in vitro* siendo estas: 100 μM, 800 μM, 950 μM, 1000 μM y 1200 μM respectivamente. Para el 90% de viabilidad, el programa recomienda emplear la concentración de 804.355 μM. Realizado con CRVSTATS V2.0.3.

Bajo la premisa de que las personas están en permanente exposición o contacto con PFOA, y no suele deberse a una exposición puntual, en condiciones *in vitro* se aplicó un pretratamiento con el contaminante durante 48h a las células, un día después de ser sembradas en placas, con el fin de simular una exposición crónica previa del contaminante. Transcurridos 3 días desde la siembra (es decir, 2 días después del pretratamiento), cuando las células se encontraban diferenciadas; se les aplicó el tratamiento con AZA bajo tres condiciones específicas:

- Las primeras 3 columnas de la placa fueron empleadas para el tratamiento agudo tanto del contaminante como del medicamento. En este caso no hubo pretratamiento, se trataron las células a los 3 días de la siembra, a la concentración requerida de PFOA. A cada línea de las 3 columnas se le aplicó una concentración de AZA (según las previamente mencionadas) excepto en la primera que se empleó como control sin tratamiento de AZA.
- Las siguientes 3 columnas de la placa recibieron el pretratamiento con PFOA y, tras 3 días, se añadió la concentración correspondiente de AZA en cada fila manteniendo el volumen presente en el pocillo (tratamiento MISMO MEDIO).
- Las últimas 3 columnas de la placa también fueron sometidas al pretratamiento con PFOA y, después de 3 días, se reemplazó el medio que contenía el contaminante por

medio fresco con PFOA (800 μ M) y con AZA a la concentración indicada según la fila. Esta condición se estableció para evaluar si pudo haber alguna degradación del contaminante en el medio y para confirmar la posible sensibilización de los hepatocitos por el PFOA (tratamiento CAMBIO MEDIO).

- Finalmente, una única columna se empleó como control de DMSO, sin tratamiento con PFOA ni AZA.

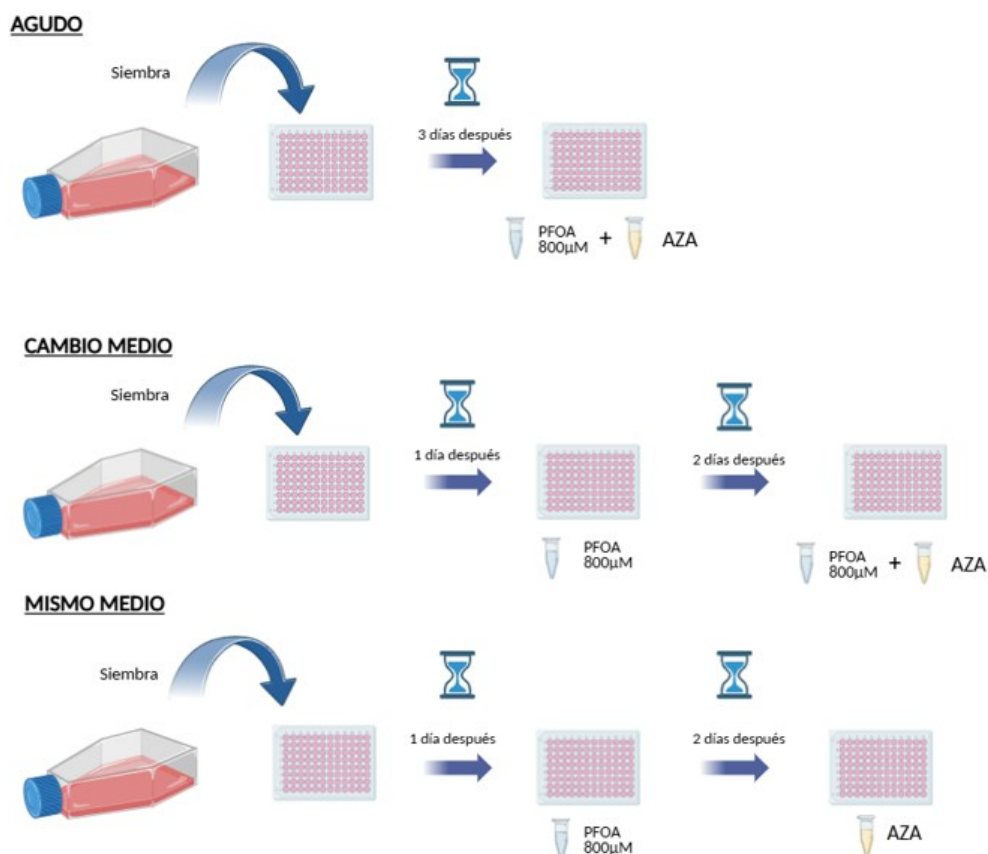


Figura 9. Esquema de tratamiento de las células con AZA y PFOA según el tratamiento indicado, siendo AGUDO (tratamiento agudo), CAMBIO MEDIO (pretratamiento con cambio de medio) y MISMO MEDIO (pretratamiento sin cambio de medio). Creado con *Biorender.com*.

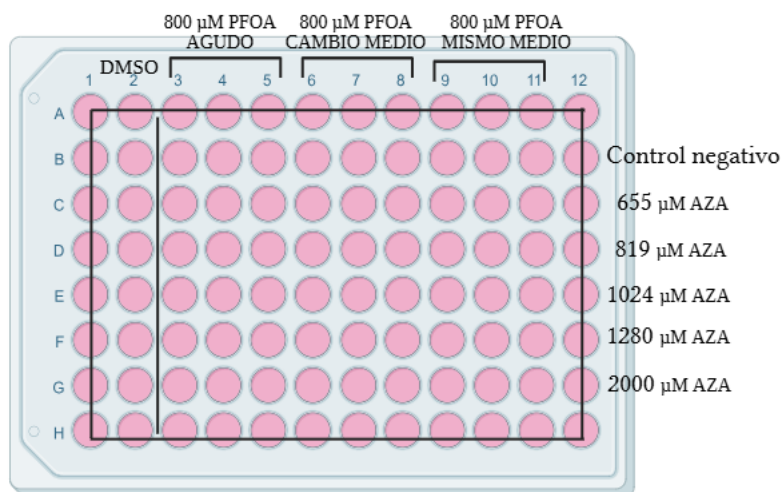


Figura 10. Distribución del ensayo de viabilidad con AZA (655 μ M, 819 μ M, 1024 μ M, 1280 μ M, 2000 μ M) con su control negativo (Control negativo) y un control negativo tanto de AZA como de PFOA (DMSO) y a 800 μ M con las tres condiciones (AGUDO: Tratamiento agudo, CAMBIO MEDIO: Pretratamiento de PFOA para un cambio de medio posterior de PFOA y AZA, MISMO MEDIO: Pretratamiento de PFOA y adición de las concentraciones de AZA sin cambiar medio, sobre el mismo inicialmente tratado de PFOA). La primera y última fila y la primera y última columna no contienen células, solo medio. Creado con *Biorender.com*.

Una vez aplicados los respectivos tratamientos a las células, se añadió el reactivo de MTT al 10% en medio de cultivo DM, dejándolo incubar 35 minutos a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se retiró el medio y se añadió a cada pocillo un volumen constante de 100 μ L de DMSO al 100%, con el fin de disolver los cristales de formazán formados. Tras una incubación mínima de 15 minutos, la placa fue leída en el lector de placas a una longitud de onda de 550 nm.

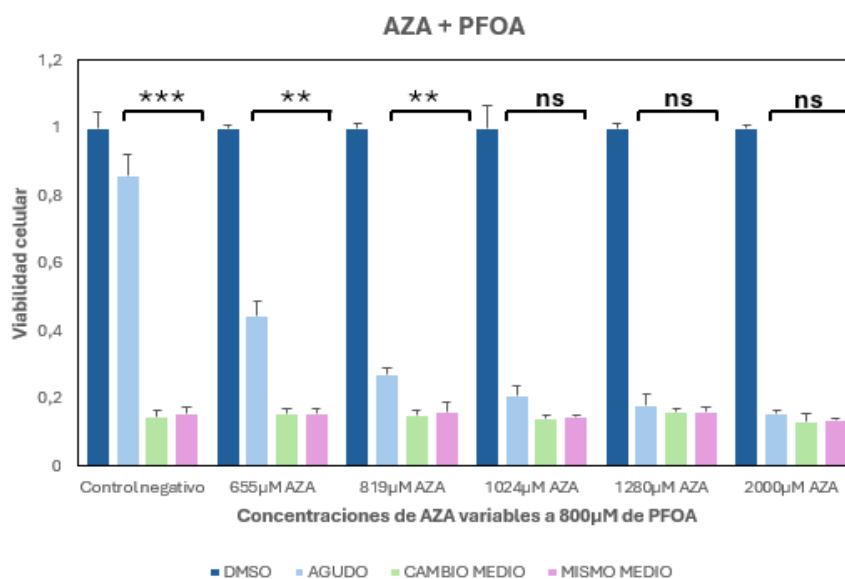


Figura 11. Gráficos representativos de la viabilidad celular basada en la actividad metabólica mitocondrial del ensayo MTT con las distintas condiciones de los compuestos: DMSO (siendo el control negativo de PFOA y de AZA), AGUDO

(tratamiento agudo), CAMBIO MEDIO (pretratamiento con PFOA a 800 μ M y cambio posterior de medio con AZA y PFOA) y NUEVO MEDIO (pretratamiento con PFOA y adición posterior de la AZA); a las respectivas concentraciones de AZA (655 μ M, 819 μ M, 1024 μ M, 1280 μ M y 2000 μ M) con su control negativo (Control negativo). La significancia se ha medido en base al p-valor obtenido donde: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, ns equivale a “no significativo”.

Podemos observar que el tratamiento agudo a bajas concentraciones de AZA afecta a la viabilidad celular en comparación con las células que han sido tratadas únicamente con PFOA (control negativo), reduciéndola ligeramente hasta aproximadamente un 80%, frente al 100% del control. En cuanto a los pretratamientos, ambos generan un daño considerable por sí solos (como se refleja en el control negativo), con una disminución de la viabilidad superior al 80%. Esto hace que no se observe un daño adicional significativo tras la exposición a AZA, ya que la viabilidad se mantiene alrededor del 20% en todas las condiciones, dificultando la discriminación de una posible sinergia. Asimismo, no es posible distinguir cuál de los dos pretratamientos provoca un mayor daño, dado que las diferencias entre ellos son mínimas y las células presentan una viabilidad celular similar.

5.3 Análisis de la expresión génica

Debemos tener en cuenta que tanto el compuesto PFOA como CLAV son capaces de activar la ruta NRF2 (*Nuclear factor erythroid -Related Factor 2*) (Murase et al., 2023; Petrov et al., 2021). Esta ruta involucra dos componentes clave: el factor de transcripción NRF2 y la proteína KEAP1 (*Kelch-Like ECH-Associated Protein 1*). En condiciones normales y sin estrés celular, KEAP1 se une a NRF2 en el citoplasma, facilitando su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma (He et al., 2020; Hiemstra et al., 2022).

Cuando la célula experimenta estrés oxidativo, las especies reactivas del oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*) unen a NRF2 por los residuos de cisteína, modificando la conformación del complejo NRF2-KEAP1. Esta modificación impide la ubiquitinación de NRF2, lo que conduce a su acumulación de NRF2 en el citoplasma. Esta acumulación se debe tanto a la inhibición de su degradación como a la síntesis continua de NRF2 que tampoco puede ser ubiquitinada debido a la presencia de ROS (Hiemstra et al., 2022).

La acumulación de NRF2 promueve su traslocación al núcleo, donde se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE, *Antioxidant Response Elements*). Esta unión activa la transcripción de múltiples genes diana involucrados en la defensa celular frente a las ROS y en la prevención de la senescencia. Generalmente, se activan genes que codifican enzimas detoxicantes (como las oxigenasas), metabolizadores de xenobióticos y enzimas involucradas en la síntesis del glutatión (Hiemstra et al., 2022).

Concretamente, nos centraremos en la transcripción de genes y enzimas relacionadas con la síntesis del glutatión. Es importante recordar que el glutatión, en su forma reducida (GSH),

es capaz de neutralizar ROS y metabolito reactivos derivados del procesamiento de xenobióticos, mientras que su forma oxidada (GSSG) no puede realizar esta función.

Según bibliografía (Petrov et al., 2021), nos centraremos en el análisis de los siguientes genes involucrados la ruta de síntesis del GSH:

- Gen *TXNRD1*: Codifica para la tioredoxina reductasa 1, una enzima antioxidante que cataliza la reducción del sitio activo de la tioredoxina 1 (Tuo et al., 2018).
- Gen *AKR1B10*: Codifica para la aldo-ketoreductasa, con actividad oxidorreductasa hacia aldehídos alifáticos y aromáticos para reducir compuestos complejos (Nishinaka et al., 2011).
- Gen *GCLC*: Codifica para la subunidad catalítica de la glutatión-cisteína ligasa, involucrada en la catálisis directa del GSH (Hiemstra et al., 2022).
- Gen *GCLM*: Codifica para la subunidad moduladora de la glutatión-cisteína, involucrada en la modulación de la subunidad catalítica de GCLC (Hiemstra et al., 2022).
- Gen *GPX2*: Codifica para la glutatión peroxidasa 2, reduciendo diversos peróxidos (Zimta et al., 2019).
- Gen *GSR*: Codifica para la glutatión reductasa, encargada de reducir el GSSG obtenido de la reducción de las ROS (Hiemstra et al., 2022).
- Gen *FGF19*: Codifica para el Factor de Crecimiento Fibroblástico 19 (*Fibroblast Growth Factor 19*) que facilita la acumulación de NRF2 en el núcleo (Teng et al., 2017).
- Gen *PBGD*: Codifica para la enzima porfobilinógeno desaminasa, se emplea como gen normalizador o *housekeeping* (Jericó et al., 2022).
- Gen *RPLP0*: Codifica para la subunidad del ribosoma, se emplea como gen normalizador o *housekeeping* (Bonnet et al., 2013).

Trataremos los hepatocitos con CLAV 0.7 mM, CLAV 2 mM, PFOA 0.26 mM, PFOA 0.59 mM de la siguiente forma:

Tabla 5. Concentraciones de los distintos compuestos para el tratamiento de los hepatocitos teniendo CLAV a 0.7 mM; CLAV a 2 mM, PFOA 0.26 mM y PFOA 0.59 mM y sus combinaciones, CLAV 0.7 mM con PFOA 0.26 mM, CLAV 0.7 mM con PFOA 0.59 mM, CLAV 2 mM con PFOA 0.26 mM y CLAV 2 mM con PFOA 0.59 mM.

Tratamiento de las células para análisis de la expresión génica			
CLAV 0.7 mM	CLAV 2 mM	PFOA 0.26 mM	PFOA 0.59 mM
CLAV 0.7 mM + PFOA 0.26 mM	CLAV 0.7 mM + PFOA 0.59 mM	CLAV 2 mM + PFOA 0.26 mM	CLAV 2 mM + PFOA 0.59 mM

También se tuvo en cuenta el nivel basal de expresión de los genes mediante dos condiciones control: células sin tratamiento (únicamente con medio de cultivo) y células tratadas con DMSO al porcentaje correspondiente al promedio de los reactivos; centrándonos en la concentración de DMSO presente en la mezcla de PFOA y CLAV, ya que ambos *stocks* estaban preparados en DMSO.

Una vez tratadas las células, permanecieron 24h a 37°C a 5% CO₂ para la posterior extracción del RNA y cuantificación en el *Nanodrop* midiendo la absorbancia.

Posteriormente, se llevó a cabo la RT-PCR y la qPCR, para finalmente analizar los datos obtenidos.

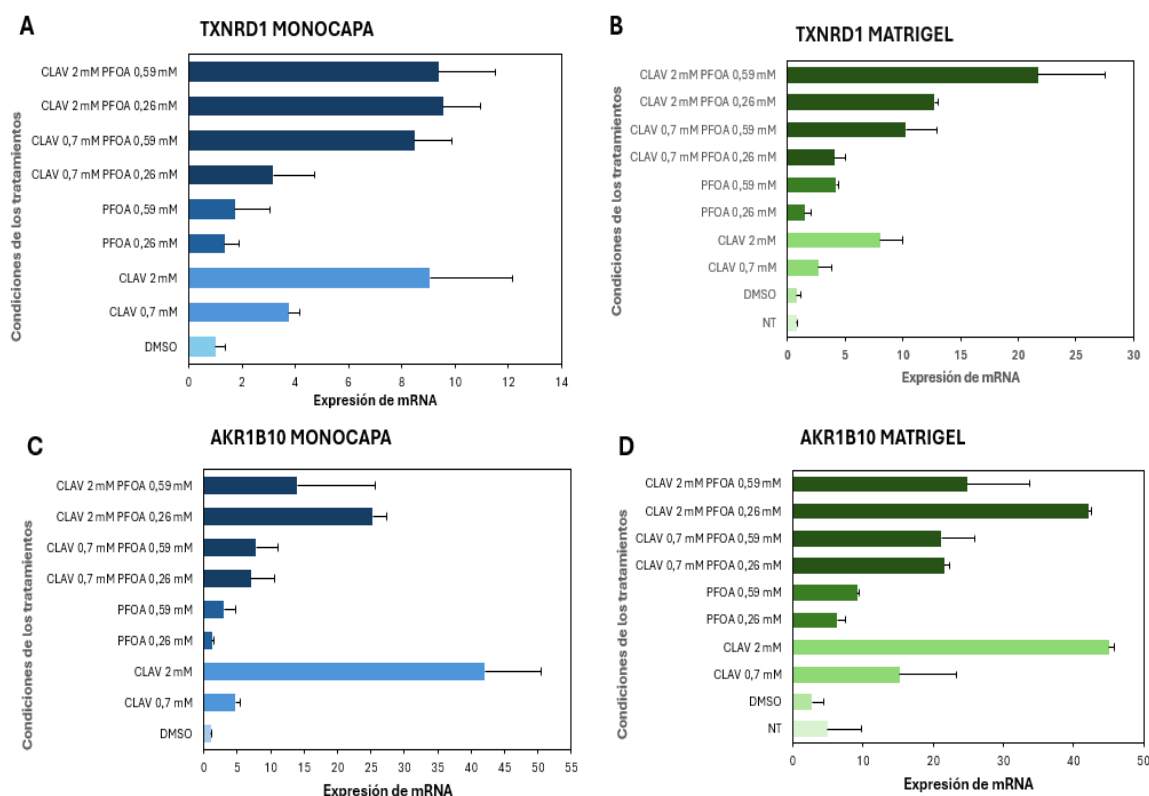


Figura 12. Análisis de la expresión de los genes *TXNRD1* (A,B) y *AKR1B10* (C,D) en hepatocitos humanos el tratamiento de PFOA y CLAV a 3 días de diferenciación en monocapa sin la configuración sándwich con Matrigel™ (A, C) y con la configuración sándwich (B, D). En el eje x se encuentran expresados las condiciones empleadas, siendo NT (No tratadas) y DMSO los controles negativos.

Se observa que, tanto en el gen *TXNRD1* como en *AKR1B10*, la aplicación del Matrigel™ mejora la expresión génica en determinadas condiciones. Por ejemplo, en el caso de CLAV 2 mM combinado con PFOA 0.26 mM, (figura 9, D), la expresión relativa se incrementa, duplicándose en el gen *TXNRD1* al compararlo con CLAV 2 mM junto con PFOA 0.59 mM. Además, principalmente con Matrigel™, las condiciones CLAV 0.7 mM y CLAV 2 mM combinadas con PFOA 0.59 mM en *TXNRD1*, presenta una expresión 2.6 veces mayor que CLAV 2 mM sola y 5.25 veces superior a PFOA 0.59 mM individual (figura 9, B), con un p-valor de <0.05 en las combinaciones, indicando significancia estadística.

En cuanto a *AKR1B10*, la expresión es más variable, mostrando una sobreexpresión destacada especialmente en la condición de CLAV 2 mM (figura 9, D). No obstante, los p-valores obtenidos para las combinaciones fueron superiores a 0.05, indicando que las diferencias no son estadísticamente significativas.

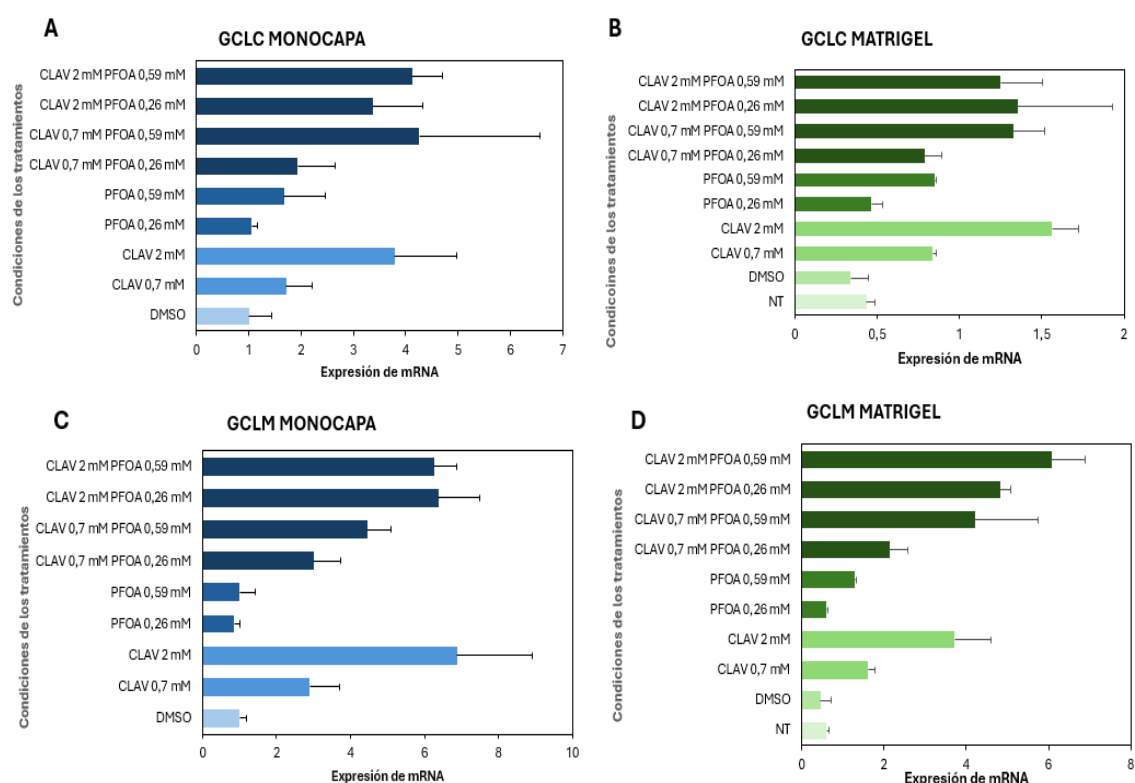


Figura 13. Análisis de la expresión de los genes *GCLC* (A,B) y *GCLM* (C,D) en hepatocitos humanos el tratamiento de PFOA y CLAV a 3 días de diferenciación en monocapa sin la configuración sándwich con Matrigel™ (A, C) y con la configuración sándwich (B, D). En el eje x se encuentran expresados las condiciones empleadas, siendo NT (No tratadas) y DMSO los controles negativos.

En base a los resultados, la aplicación de Matrigel™ no ha facilitado de manera significativa una mayor expresión de las condiciones, ya que los niveles de expresión se mantienen muy similares dentro de la expresión relativa de cada gen. En el caso del gen *GCLC*, no se observa una sobreexpresión clara en las combinaciones de los dos compuestos, ya que la expresión es comparable a la obtenida únicamente con CLAV, e incluso en las combinaciones de CLAV 2 mM con PFOA 0.26 mM y 0.59 mM la expresión es menor (figura 10, B). Comparando con el control (DMSO), CLAV 2 mM ha inducido un aumento en la expresión relativa de un 56%, mientras que CLAV 2 mM con PFOA 0.59 mM ha mostrado un incremento del 24%. Los p-valores obtenidos son altos (>0.05), indicando la falta de significancia.

Por otro lado, el gen *GCLM* ha mostrado una expresión más consistente con niveles ligeramente superiores en la configuración sándwich de Matrigel™ (figura 10, D). En esta condición, las combinaciones con CLAV 2 mM y ambas concentraciones de PFOA presentan una expresión génica mayor en comparación con los compuestos aplicados de forma individual con incrementos de 4.7 y 1.64 veces respecto a CLAV 2 mM y PFOA 0.59 mM, respectivamente. Estos resultados fueron estadísticamente significativos, con un p-valor <0.05 .

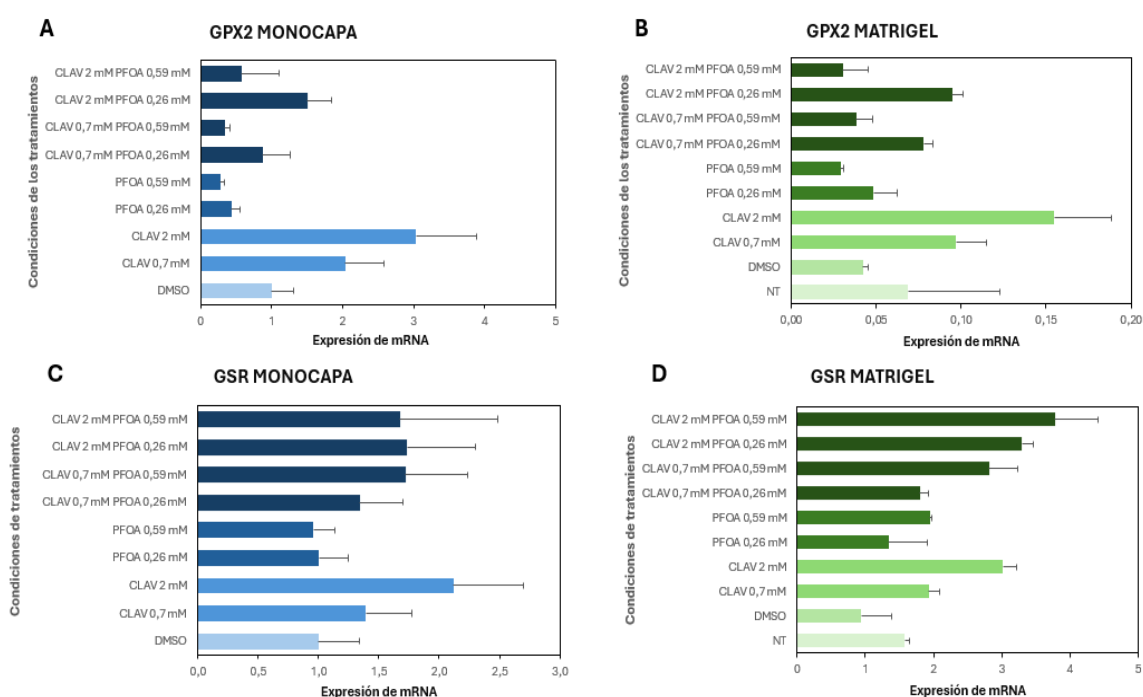


Figura 14. Análisis de la expresión de los genes *GPX2* (A,B) y *GSR* (C,D) en hepatocitos humanos el tratamiento de PFOA y CLAV a 3 días de diferenciación en monocapa sin la configuración sándwich con Matrigel™ (A, C) y con la configuración sándwich (B, D). En el eje x se encuentran expresados las condiciones empleadas, siendo NT (No tratadas) y DMSO los controles negativos. En el eje y se encuentra el orden de magnitud de la expresión del gen.

Podemos observar como la aplicación de Matrigel™ no ha tenido un impacto significativo en la expresión del gen *GPX2* en las distintas condiciones, aunque sí facilitó la expresión de algunas condiciones del gen *GSR* (figura 11, D) como CLAV 2 mM en combinación con PFOA, además de poder observarse una expresión más regular.

En el caso del gen *GPX2*, se puede observar una sobreexpresión de 3.75 veces en la condición de CLAV 2 mM en comparación del control DMSO (figura 11, A y B) pero no se detecta un aumento en la expresión para las combinaciones del contaminante con el antibiótico, incluso mostrándose una reducción de la expresión de 1.33 veces respecto al control. Los p-valores son menores de <0.05, indicando diferencias significativas a favor de los compuestos individuales (ya que no ha generado un efecto sinérgico en las combinaciones).

Por otro lado, para el gen *GSR*, sí podemos observar un aumento en la expresión al combinar CLAV con PFOA, aunque sin evidenciar una sinergia clara (figura 11, D). CLAV 2 mM aumenta la expresión 3.2 veces respecto al control, PFOA 0.59 mM la ha duplicado, y la combinación de ambos aumenta la expresión 4 veces más en comparación con el control. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, con un p-valor de >0.05.

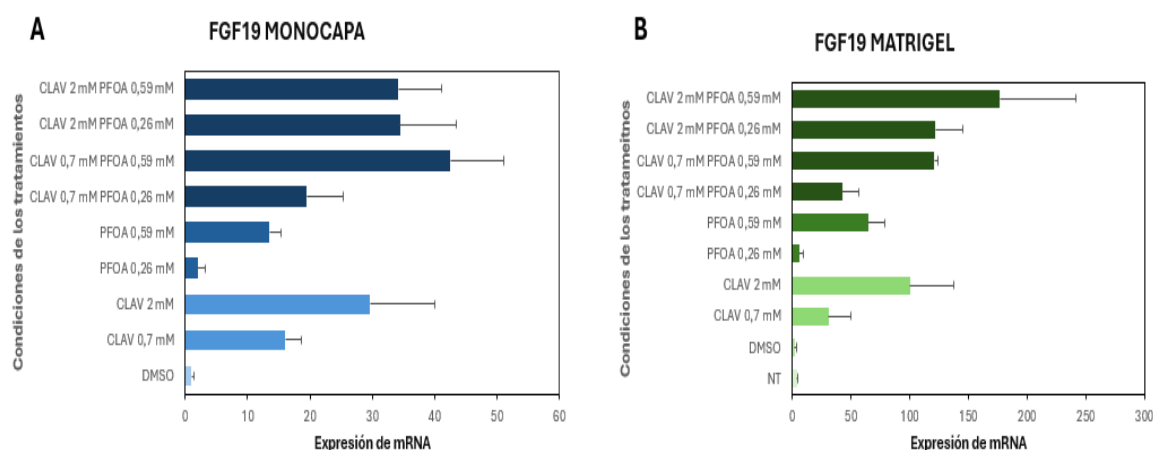


Figura 15. Análisis de la expresión del gen *FGF19* hepatocitos humanos el tratamiento de PFOA y CLAV a 3 días de diferenciación en monocapa sin la configuración sándwich con Matrigel™ (A) y con la configuración sándwich (B). En el eje x se encuentran expresados las condiciones empleadas, siendo NT (No tratadas) y DMSO los controles negativos. En el eje y se encuentra el orden de magnitud de la expresión del gen.

En base a los gráficos, la aplicación de Matrigel™ ha facilitado considerablemente una expresión más regular y aumentada del gen *FGF19* (figura 12, B). En ambas condiciones de CLAV (0.7 y 2 mM) combinadas con las dos concentraciones de PFOA, se observa una clara sobreexpresión del gen, evidenciando una sinergia más marcada (figura 12, B).

En comparación con el control, la expresión se ve incrementada aproximadamente 15 veces más con CLAV 0.7 mM, hasta 50 veces con CLAV 2 mM y 32.47 veces con PFOA 0.59 mM. Las combinaciones resultaron en aumentos aún mayores: CLAV 0.7 y PFOA 0.59 alcanzan un incremento de 60 veces, y CLAV 2 mM y PFOA 0.59 mM, de 88.44 veces.

Los resultados fueron estadísticamente significativos, con un p-valor de <0.05.

6. Discusión

En este estudio, hemos centrado nuestra atención en el análisis de dos fármacos con una elevada incidencia en el iDILI como son la azatioprina (Matsuo et al., 2014) y la combinación amoxicilina-clavulánico (E. S. Björnsson, 2017; H. K. Björnsson & Björnsson, 2022), junto con un contaminante ambiental persistente, el PFOA, cuya implicación en la enfermedad está claramente demostrada (Gou et al., 2024; Roth et al., 2021). Además de observar la reducción en la viabilidad celular, nuestro objetivo era evaluar si existía un incremento en la expresión génica relacionada con la ruta NRF2 encargada de la defensa celular frente al estrés oxidativo (He et al., 2020; Hiemstra et al., 2022), especialmente en el caso del ácido clavulánico junto con PFOA, dado que estudios previos demostraron que ambos compuestos, por separado, eran capaces de activar la ruta (Petrov et al., 2021; Murase et al., 2023).

En los ensayos de viabilidad celular con PFOA, amoxicilina, amoxicilina-clavulánico y ácido clavulánico, observamos que la viabilidad celular se reduce considerablemente en la combinación de PFOA con AMOX/CLAV en comparación con PFOA o PFOA con AMOX. Sin embargo, las combinaciones de PFOA con CLAV mostraron una mejor viabilidad en concentraciones moderadas del contaminante con respecto a AMOX/CLAV. Este resultado resulta inesperado, dado que estudios anteriores indican que AMOX por sí solo no debería inducir hepatotoxicidad (Petrov et al., 2021; Román-Sagüillo et al., 2024), por tanto, no debería mostrarse una reducción tan marcada en la viabilidad al combinarse con PFOA. Aun así, detectamos un efecto sinérgico claro entre AMOX/CLAV y concentraciones intermedias de PFOA, confirmando una interacción dañina entre el antibiótico y el contaminante (figura 2, C).

En cuanto a los ensayos de viabilidad con azatioprina y PFOA, podemos comprobar como concentraciones de PFOA junto con concentraciones bajas de AZA (655 μ M) induce un mayor daño que con el tratamiento de PFOA solo (figura 8), reforzando la idea de que AZA es capaz de reducir la viabilidad hepatocelular por sí misma (LaDuke et al., 2015) y genera un mayor daño cuando es administrado con PFOA.

En cambio, ambos pretratamientos han generado un daño elevado al aplicar PFOA un día después de la siembra, impidiendo discriminar cuál de los dos pretratamientos es más adecuado y detectar sinergias claras entre el contaminante y el fármaco. Sospechamos que este suceso se debe a que las células no se encontraban lo suficientemente diferenciadas, ya que *upcyte*® recomienda que las células alcancen una elevada confluencia por al menos 3 días para ensayos de citotoxicidad, como se ha evidenciado en estudios previos con estas mismas células (Burkard et al., 2012).

La notable disminución de viabilidad tras el pretratamiento podría explicarse a que las células inmaduras probablemente no hayan podido producir enzimas detoxificantes clave (como las CYP), haciéndolas más susceptibles a cualquier compuesto mínimamente dañino, incluido el PFOA. En base a estudios anteriores (Tolosa et al., 2019), mostraron que la expresión de enzimas metabolizadoras de fármacos está baja el mismo día de la siembra y el siguiente, estabilizándose a partir del día 3, apoyando nuestra hipótesis inicial sobre la susceptibilidad por falta de diferenciación.

Sorprendentemente, aunque el uso de Matrigel™ en configuración “sándwich” no mejoró significativamente los ciclos de amplificación en qPCR ni facilitó la extracción de RNA, sí permitió una expresión más eficiente de ciertos genes de la ruta NRF2 en algunas condiciones. Además, se ha conseguido observar una sinergia en genes como *TXNRD1*, *GCLM* o *FGF19* en las combinaciones de CLAV junto con PFOA (Figuras 9, B; 10, D; 12, B).

Conviene resaltar que en la condición de CLAV 2 mM junto con PFOA 0.59 mM, las células podrían encontrarse demasiado sensibles, lo que podría explicar irregularidades en la expresión génica, donde algunos genes como *AKR1B10* mostraron una alta expresión con CLAV

2 mM y con PFOA 0.59 mM por separado, pero una expresión reducida al combinarlos, sin evidenciar un efecto aditivo o sinérgico (figura 9, D).

Es preciso mencionar que, aunque estemos observando estos genes implicados en la misma ruta, no necesariamente se expresan simultáneamente o en la misma magnitud, lo que podría explicar las variaciones observadas entre genes correlacionados, como *GCLC* y *GCLM*.

En conclusión, hemos demostrado una sinergia entre PFOA y CLAV tanto a nivel de viabilidad celular como la activación de la ruta NRF2 relacionada con el estrés oxidativo; además de poder observar un efecto sinérgico entre PFOA y AZA en tratamiento agudo. Para futuras investigaciones, nos gustaría poder estudiar las rutas génicas que puedan encontrarse activadas en la aplicación del tratamiento con PFOA y AZA, así como cuantificar directamente el GSSG neto en células tratadas con PFOA y CLAV.

7. Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos previamente expuestos concluimos que sí hemos conseguido evaluar si existe una disminución de la viabilidad celular en los hepatocitos humanos ya que:

1. El uso concomitante de AMOX/CLAV junto con PFOA genera una disminución notoria de la viabilidad celular en comparación de los compuestos aplicados de manera individual sugiriendo, por ende, una sinergia entre ambos compuestos al aplicarse en hepatocitos humanos.
2. El uso concomitante de AZA junto con PFOA en el tratamiento agudo ha generado un daño mayor significativo que los compuestos aplicados de manera individual, sugiriendo nuevamente una sinergia.
3. Al analizar la expresión génica, genes tales como *TXNRD1* o *FGF19*, involucrados en la ruta NRF2 relacionada con el estrés oxidativo, se encuentran más sobreexpresados al tratar los hepatocitos con CLAV y PFOA a distintas concentraciones que con los compuestos por separado.

8. Bibliografía

- Bonnet, M., Bernard, L., Bes, S., & Leroux, C. (2013). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in adipose tissue, muscle, liver and mammary gland from ruminants. *Animal : an international journal of animal bioscience*, 7(8), 1344–1353. <https://doi.org/10.1017/S1751731113000475>
- Björnsson E. S. (2017). Drug-induced liver injury due to antibiotics. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 52(6-7), 617–623. <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1291719>
- Björnsson, H. K., & Björnsson, E. S. (2022). Drug-induced liver injury: Pathogenesis, epidemiology, clinical features, and practical management. *European journal of internal medicine*, 97, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2021.10.035>
- Burkard, A., Dähn, C., Heinz, S., Zutavern, A., Sonntag-Buck, V., Maltman, D., Przyborski, S., Hewitt, N. J., & Braspenning, J. (2012). Generation of proliferating human hepatocytes using Upcyte® technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 42(10), 939–956. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.675093>
- Chavez-Alvarez, S., Herz-Ruelas, M., Villarreal-Martinez, A., Ocampo-Candiani, J., Garza-Garza, R., & Gomez-Flores, M. (2020). Azathioprine: its uses in dermatology. *Anais brasileiros de dermatologia*, 95(6), 731–736. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.05.003>
- de Abajo, F. J., Montero, D., Madurga, M., & García Rodríguez, L. A. (2004). Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study. *British journal of clinical pharmacology*, 58(1), 71–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02133.x>
- Ferrer, P., Amelio, J., Ballarín, E., Sabaté, M., Vidal, X., Rottenkolber, M., Schmiedl, S., Laporte, J. R., Ibáñez, L., & PROTECT Work Package 2 (2016). Systematic Review and Meta-Analysis: Macrolides- and Amoxicillin/Clavulanate-induced Acute Liver Injury. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 119(1), 3–9. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12550>
- Frank Wolf, M., Sloma, R., Akria, L., Rimon, E., Wiener, Y., Carmiel Haggai, M., & Lowenstein, L. (2023). Azathioprine and 6-mercaptopurine-induced intrahepatic cholestasis of pregnancy: Case report and review of the literature. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 62(5), 761–764. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2023.07.023>
- Gou, X., Tian, M., Yan, L., Xia, P., Ji, H., Tan, H., Shi, W., Yu, H., & Zhang, X. (2024). A novel molecular pathway of lipid accumulation in human hepatocytes caused by PFOA and PFOS. *Environment international*, 191, 108962. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108962>
- Grant, L. M., & Rockey, D. C. (2012). Drug-induced liver injury. *Current opinion in gastroenterology*, 28(3), 198–202. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3283528b5d>
- He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4777. <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>

- Hiemstra, S., Fehling-Kaschek, M., Kuijper, I. A., Bischoff, L. J. M., Wijaya, L. S., Rosenblatt, M., Esselink, J., van Egmond, A., Mos, J., Beltman, J. B., Timmer, J., van de Water, B., & Kaschek, D. (2022). Dynamic modeling of Nrf2 pathway activation in liver cells after toxicant exposure. *Scientific reports*, 12(1), 7336. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10857-x>
- Hoofnagle, J. H., & Björnsson, E. S. (2019). Drug-Induced Liver Injury - Types and Phenotypes. *The New England journal of medicine*, 381(3), 264–273. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1816149>
- Hosack, T., Damry, D., & Biswas, S. (2023). Drug-induced liver injury: a comprehensive review. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 16, 17562848231163410. <https://doi.org/10.1177/17562848231163410>
- Huttner, A., Bielicki, J., Clements, M. N., Frimodt-Møller, N., Muller, A. E., Paccaud, J. P., & Mouton, J. W. (2020). Oral amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(7), 871–879. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.028>
- Jericó, D., Córdoba, K. M., Sampedro, A., Jiang, L., Joucla, G., Cabanne, C., Lanciego, J. L., Martini, P. G. V., Berraondo, P., Ávila, M. A., & Fontanellas, A. (2022). Recent Insights into the Pathogenesis of Acute Porphyria Attacks and Increasing Hepatic PBGD as an Etiological Treatment. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(11), 1858. <https://doi.org/10.3390/life12111858>
- LaDuke, K. E., Ehling, S., Cullen, J. M., & Bäumer, W. (2015). Effects of azathioprine, 6-mercaptopurine, and 6-thioguanine on canine primary hepatocytes. *American journal of veterinary research*, 76(7), 649–655. <https://doi.org/10.2460/ajvr.76.7.649>
- Levy, G., Bomze, D., Heinz, S., Ramachandran, S. D., Noerenberg, A., Cohen, M., Shibolet, O., Sklan, E., Braspenning, J., & Nahmias, Y. (2015). Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nature biotechnology*, 33(12), 1264–1271. <https://doi.org/10.1038/nbt.3377>
- Matsuo, K., Sasaki, E., Higuchi, S., Takai, S., Tsuneyama, K., Fukami, T., Nakajima, M., & Yokoi, T. (2014). Involvement of oxidative stress and immune- and inflammation-related factors in azathioprine-induced liver injury. *Toxicology letters*, 224(2), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.025>
- Moreno-Torres, M., Quintás, G., & Castell, J. V. (2022). The Potential Role of Metabolomics in Drug-Induced Liver Injury (DILI) Assessment. *Metabolites*, 12(6), 564. <https://doi.org/10.3390/metabo120605643>.
- Moreno-Torres, M., Quintás, G., Martínez-Sena, T., Jover, R., & Castell, J. V. (2024). Exploring Individual Variability in Drug-Induced Liver Injury (DILI) Responses through Metabolomic Analysis. *International journal of molecular sciences*, 25(5), 3003. <https://doi.org/10.3390/ijms25053003>
- Murase, W., Kubota, A., Ikeda-Araki, A., Terasaki, M., Nakagawa, K., Shizu, R., Yoshinari, K., & Kojima, H. (2023). Effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on gene expression profiles via nuclear receptors in HepaRG cells: Comparative study with in vitro transactivation assays. *Toxicology*, 494, 153577. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153577>

- Nishinaka, T., Miura, T., Okumura, M., Nakao, F., Nakamura, H., & Terada, T. (2011). Regulation of aldo-keto reductase AKR1B10 gene expression: involvement of transcription factor Nrf2. *Chemico-biological interactions*, 191(1-3), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.01.026>
- Petrov, P. D., Soluyanova, P., Sánchez-Campos, S., Castell, J. V., & Jover, R. (2021). Molecular mechanisms of hepatotoxic cholestasis by clavulanic acid: Role of NRF2 and FXR pathways. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 158, 112664. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112664>
- Richard, A. M., Hidle, H., Patlewicz, G., & Williams, A. J. (2022). Identification of Branched and Linear Forms of PFOA and Potential Precursors: A User-Friendly SMILES Structure-based Approach. *Frontiers in environmental science*, 10, 1–865488. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.865488>
- Román-Sagüillo, S., Quiñones Castro, R., Juárez-Fernández, M., Soluyanova, P., Stephens, C., Robles-Díaz, M., Jorquera Plaza, F., González-Gallego, J., Martínez-Flórez, S., García-Mediavilla, M. V., Nistal, E., Jover, R., & Sánchez-Campos, S. (2024). Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury and Amoxicillin-Clavulanate: Spotlight on Gut Microbiota, Fecal Metabolome and Bile Acid Profile in Patients. *International journal of molecular sciences*, 25(13), 6863. <https://doi.org/10.3390/ijms25136863>
- Roth, A. D., & Lee, M. Y. (2017). Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury (IDILI): Potential Mechanisms and Predictive Assays. *BioMed research international*, 2017, 9176937. <https://doi.org/10.1155/2017/9176937>
- Russmann, S., Kullak-Ublick, G. A., & Grattagliano, I. (2009). Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Current medicinal chemistry*, 16(23), 3041–3053. <https://doi.org/10.2174/092986709788803097>
- Sajid, M., & Ilyas, M. (2017). PTFE-coated non-stick cookware and toxicity concerns: a perspective. *Environmental science and pollution research international*, 24(30), 23436–23440. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0095-y>
- Saudagar, P. S., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2008). Clavulanic acid: a review. *Biotechnology advances*, 26(4), 335–351. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.002>
- Suzuki, H., Matsubara, D., Nakata, Y., Ito, M., & Noguchi, S. (2022). C-H...S Hydrogen Bonds in Ampicillin and Amoxicillin Crystals Investigated by Sulfur K-Edge X-Ray Absorption Near-Edge Structure Spectroscopy and Single-Crystal X-Ray Structure Analysis. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 70(10), 731–734. <https://doi.org/10.1248/cpb.c22-00377>
- Teng, Y., Zhao, H., Gao, L., Zhang, W., Shull, A. Y., & Shay, C. (2017). FGF19 Protects Hepatocellular Carcinoma Cells against Endoplasmic Reticulum Stress via Activation of FGFR4-GSK3 β -Nrf2 Signaling. *Cancer research*, 77(22), 6215–6225. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2039>

- Tolosa, L., Jiménez, N., Pelechá, M., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., & Donato, M. T. (2019). Long-term and mechanistic evaluation of drug-induced liver injury in Upcyte human hepatocytes. *Archives of toxicology*, 93(2), 519–532. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2349-y>
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Tuo, L., Xiang, J., Pan, X., Gao, Q., Zhang, G., Yang, Y., Liang, L., Xia, J., Wang, K., & Tang, N. (2018). PCK1 Downregulation Promotes TXNRD1 Expression and Hepatoma Cell Growth via the Nrf2/Keap1 Pathway. *Frontiers in oncology*, 8, 611. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00611>
- Zimta, A. A., Cenariu, D., Irimie, A., Magdo, L., Nabavi, S. M., Atanasov, A. G., & Berindan-Neagoe, I. (2019). The Role of Nrf2 Activity in Cancer Development and Progression. *Cancers*, 11(11), 1755. <https://doi.org/10.3390/cancers11111755>