



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Nuevos modelos in vitro para el estudio de la
hepatotoxicidad inducida por fármacos

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Colomer Merino, Lucía

Tutor/a: Gallego Ferrer, Gloria

Cotutor/a: Tolosa Pardo, Laia

Cotutor/a externo: DONATO MARTIN, MARIA TERESA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL (ETSEAMN)



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Investigación
Sanitaria La Fe

Nuevos modelos *in vitro* para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos

Trabajo Final de Grado en Biotecnología

Curso académico 2021-2022

Autora: Lucía Colomer Merino

Tutora académica: Dña. Gloria Gallego Ferrer

Tutora externa: Dña. Laia Tolosa Pardo

Cotutora externa: Dña. María Teresa Donato Martín

TÍTULO

Nuevos modelos *in vitro* para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos.

RESUMEN

El daño hepático inducido por fármacos (DILI) es un proceso fisiopatológico multifactorial específico de paciente que no se puede recapitular en los modelos *in vitro* actuales. El DILI es una de las principales razones de retirada de fármacos en desarrollo y en la práctica clínica, por lo que es necesario crear nuevas aproximaciones holísticas que sean predictivas del mismo. Dado que se han implicado múltiples mecanismos y tipos celulares, la predicción de todas las formas del DILI puede ser difícil con estrategias simples como los monocultivos bidimensionales. Las estrategias clásicas se han basado en el uso de hepatocitos humanos primarios o líneas celulares de hepatoma, pero también se reconoce el papel de las células no parenquimáticas en DILI, principalmente en la hepatotoxicidad idiosincrásica. En este sentido, las células de Kupffer son macrófagos residentes en el hígado con funciones fagocíticas que desempeñan un papel importante. El presente proyecto pretende desarrollar y caracterizar distintos sistemas de co-cultivo de células hepáticas (HepG2) y macrófagos aislados y diferenciados a partir de sangre periférica, o bien obtenidos a partir de la diferenciación de la línea celular de monocitos THP-1 para realizar estudios de hepatotoxicidad. En este trabajo se han puesto a punto los modelos, estudiando diferentes proporciones de células y medios de cultivo y usando diferentes técnicas de Biología Celular y Molecular (qPCR, inmunofluorescencia...) para caracterizar los sistemas desarrollados. En el modelo seleccionado como óptimo se ha estudiado la hepatotoxicidad inducida por un fármaco modelo (troglitazona), demostrando la idoneidad y sensibilidad de los co-cultivos para la evaluación del daño hepático inducido por fármacos.

Hepatotoxicidad | modelos *in vitro* | co-cultivo | hepatocitos | macrófagos

AUTORA: Lucía Colomer Merino

TUTORA ACADÉMICA: Dña. Gloria Gallego Ferrer

TUTORA EXTERNA: Dña. Laia Tolosa Pardo

COTUTORA EXTERNA: Dña. María Teresa Donato Martín

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, Septiembre 2022

TÍTOL

Nous models *in vitro* per a l'estudi de l'hepatotoxicitat induïda per fàrmacs

RESUM

El dany hepàtic induït per fàrmacs (DILI) és un procés fisiopatològic multifactorial específic de pacient que no es pot recapitular en els models *in vitro* actuals. El DILI és una de les principals causes de retirada de fàrmacs en el desenvolupament i en la pràctica clínica, pel que és necessari crear noves aproximacions holístiques que siguin predictives. Donat que s'han implicat múltiples mecanismes i tipus cel·lulars, la predicció de totes les formes del DILI pot ser difícil amb estratègies simples com els monocultius bidimensionals. Les estratègies clàssiques s'han basat en l'ús d'hepatòcits primaris o les línies cel·lulars d'hepatoma, però també es reconeix el paper de les cèl·lules no parenquimàtiques en el DILI, principalment a l'hepatotoxicitat idiosincràtica. En aquest sentit, les cèl·lules de Kupffer són macròfags residents al fetge amb funcions fagocítiques que tenen un paper important. Aquest projecte pretén desenvolupar i caracteritzar diferents sistemes de co-cultiu de cèl·lules hepàtiques (HepG2) i macròfags aïllats i diferenciats a partir de sang perifèrica, o bé obtinguts a partir de la diferenciació de la línia cel·lular de monòcits THP-1 per a realitzar estudis d'hepatotoxicitat. En aquest treball s'han posat a punt els models, estudiant diferents proporcions de cèl·lules i medis de cultiu i usant diferents tècniques de Biologia Cel·lular i Molecular (qPCR, immunofluorescència...) per caracteritzar els models plantejats. Al sistema seleccionat com a òptim s'ha estudiat l'hepatotoxicitat induïda per un fàrmac model (troglitazona), demostrant la idoneïtat i sensibilitat dels co-cultius per a l'avaluació del dany hepàtic induït per fàrmacs.

Hepatotoxicitat | models *in vitro* | co-cultiu | hepatòcits | macròfags

AUTORA: Lucía Colomer Merino

TUTORA ACADÈMICA: Dña. Gloria Gallego Ferrer

TUTORA EXTERNA: Dña. Laia Tolosa Pardo

COTUTORA EXTERNA: Dña. María Teresa Donato Martín

LOCALITAT Y DATA: València, Septembre 2022

TITLE

New *in vitro* models for the study of drug-induced hepatotoxicity

ABSTRACT

Drug-induced liver injury (DILI) is a multifactorial patient-specific pathophysiological process that cannot be recapitulated in current *in vitro* models. DILI is one of the main reasons for drug withdrawal the development process and in the clinical practice; thus, it is necessary to create new holistic approaches that are predictive of DILI. Since multiple mechanisms and cell types have been implicated, prediction of all forms of DILI can be difficult with simple strategies such as two-dimensional monocultures. Classic strategies have been based on the use of primary human hepatocytes or hepatoma cell lines, but the role of non-parenchymal cells in DILI, mainly in idiosyncratic hepatotoxicity, has been also recognized. In this sense, Kupffer cells are liver resident macrophages with phagocytic functions. This project aims to develop and characterize different co-culture systems that combine liver cells (HepG2) and macrophages isolated and differentiated from peripheral blood or obtained from the differentiation of the monocyte cell line THP-1 to carry out hepatotoxicity studies. In this project, the models have been optimized, studying different proportions of cells and culture media, and using different Cellular and Molecular Biology techniques (qPCR, immunofluorescence...) to characterize the developed models. In the system selected as optimal, hepatotoxicity induced by a model drug (troglitazone) has been studied, demonstrating the suitability and sensitivity of co-cultures for the evaluation of drug-induced liver damage.

Hepatotoxicity | *in vitro* models | co-culture | hepatocytes | macrophages

AUTHOR: Lucía Colomer Merino

ACADEMIC SUPERVISOR: Dña. Gloria Gallego Ferrer

EXTERNAL SUPERVISOR: Dña. Laia Tolosa Pardo

COTUTORA EXTERNA: Dña. María Teresa Donato Martín

LOCATION AND DATE: Valencia, September 2022

AGRADECIMIENTOS

Después de cuatro años concluye una de las etapas más enriquecedoras de mi vida, en la que además de conocer a personas maravillosas, me he formado, he aprendido y madurado.

Me gustaría agradecer en primer lugar a todos los compañeros de la Unidad de hepatología experimental y trasplante hepático, que me han acogido y ayudado desde el primer día que llegué. Sobre todo, gracias a Estela por acompañarme estos meses con mi trabajo, por dedicarme tu tiempo y haberme enseñado desde lo más básico de un laboratorio hasta detalles que me van a acompañar a lo largo de mi vida.

Gracias también a Gloria por darme la oportunidad de realizar mis prácticas en este laboratorio, y muchísimas gracias a Laia por aceptarme, tutorizarme y por resolverme cualquier mínima duda en todo momento.

No me olvido de mis compañeros de clase y amigos. Estoy segura de que sin vosotros este camino hubiera sido muchísimo más largo. Os admiro y quiero mucho.

Compañeras de hockey, no puedo cerrar esta etapa sin dedicaros un pequeño párrafo. Durante estos cuatro años no solo he conseguido acabar mi carrera, también hemos logrado cosas muy importantes juntas. Gracias por estar ahí siempre, en las buenas y en las malas.

Mamá y papá, desde luego que sin vosotros no habría llegado tan lejos. Gracias por siempre confiar, apoyarme y demostrarme lo orgullosos que estáis de mí. Ángela, aunque me metas tanta caña también te debo a ti lo lejos que he llegado. Os quiero mucho y no os podéis imaginar lo orgullosa que estoy de la familia a la que pertenezco.

Por último, no me olvido de que esta etapa no la cierro sola. Alejandro, gracias por acompañarme durante estos cuatro años en los que te he conocido y hemos crecido. Cerramos esta etapa juntos, pero espero poder vivir muchas otras a tu lado. Gracias por apoyarme siempre y por quererme tanto como yo a ti.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El hígado	1
1.2 Daño hepático inducido por fármacos (DILI)	3
1.3 Metabolismo de fármacos	4
1.4 Modelos <i>in vitro</i> para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos	5
1.5 Co-cultivos como modelo de estudio de iDILI	10
2 OBJETIVOS	11
3 MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Cultivos celulares	11
3.1.1 Cultivo HepG2	11
3.1.2 Cultivo THP-1	12
3.1.3 Diferenciación THP-1	12
3.1.4 Monocitos extraídos de sangre periférica	13
3.1.5 Co-cultivo	13
3.2 Inmunofluorescencia	13
3.3 Ensayo de viabilidad (MTT)	14
3.4 Extracción de RNA y PCR	15
3.5 Estudio de hepatotoxicidad inducida por fármacos	15
4 RESULTADOS	16
4.1 Diferenciación THP-1 a macrófagos	16
4.1.1 Expresión de marcadores de M1	17
4.1.1.1 Inmunofluorescencia	17
4.1.1.2 Estudio de la expresión génica	18
4.1.2 Viabilidad del proceso de diferenciación	19
4.2 Diferenciación de monocitos aislados de PBMCs	20
4.2.1 Expresión de marcadores de M1	20
4.3 Generación de co-cultivo HepG2:Macrófagos	21
4.3.1 Inmunofluorescencia	21
4.3.2 Viabilidad del co-cultivo	22
4.4 Estudio de hepatotoxicidad inducida por fármacos	22
5. DISCUSIÓN	24
6. CONCLUSIONES	26
7. BIBLIOGRAFÍA	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Arquitectura hepática	1
Figura 2. Localización de las células de KCs en el sinusoide hepático	2
Figura 3. Eventos moleculares que llevan al daño celular inducido por fármacos y a la muerte celular	4
Figura 4. Esquema del proceso de diferenciación de la línea celular THP-1	12
Figura 5. Proceso de diferenciación de la línea celular THP-1	16
Figura 6. Imagen tomada durante el proceso de diferenciación de la línea celular THP-1	17
Figura 7. Inmunofluorescencia llevada a cabo durante el proceso de diferenciación de la línea celular THP-1 para observar marcadores de macrófago	17
Figura 8. Expresión de los marcadores CD80, CXCL10, IL-1 β y TNF- α de macrófago tras la estimulación de la línea celular THP-1	18
Figura 9. Resultados del ensayo MTT realizado durante el proceso de diferenciación de la línea celular THP-1	19
Figura 10. Proceso de diferenciación de monocitos extraídos de sangre periférica	20
Figura 11. Expresión de marcadores de macrófago tras la estimulación de monocitos extraídos de sangre periférica	21
Figura 12. Inmunofluorescencia llevada a cabo en los co-cultivos	21
Figura 13. Viabilidad de los co-cultivos a diferentes proporciones celulares y con macrófagos en sus estadios M0 y M1	22
Figura 14. Estudio de la viabilidad en cultivos de HepG2 tratados con TGZ	23
Figura 15. Estudio de iDILI en co-cultivo 1:10 con macrófagos en estadio M0 y M1	23
Figura 16. Estudio de iDILI en co-cultivos 1:2 con macrófagos en estadio M0 y M1	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los distintos modelos <i>in vitro</i> desarrollados para testar hepatotoxicidad.	7
Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunofluorescencia	14
Tabla 3. Primers empleados en la PCR	15

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de la concentración celular (células/mL) en Cámara de Neubauer	12
---	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3D: tridimensional

ALT: alanina aminotransferasa

BSA: albúmina de suero bovino – del inglés *bovine serum albumin*

CD: cúmulo de diferenciación

CV: vena central – del inglés *central vein*

CXCL10: ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C – del inglés *C-X-C Motif Chemokine Ligand 10*

CYP: citocromo P450

DILI: daño hepático inducido por fármacos – del inglés *drug induced liver injury*

DMSO: dimetilsulfóxido – del inglés *dimethyl sulfoxide*

DNA: ácido desoxirribonucleico – del inglés *deoxyribonucleic acid*

ECM: matriz extracelular – del inglés *extracellular matrix*

HA: arteria hepática – del inglés *hepatic artery*

HNF4: factor nuclear 4 alfa de hepatocito – del inglés *hepatocyte nuclear factor 4*

HSC: células hepáticas estrelladas – del inglés *hepatic stellate cells*

iDILI: DILI idiosincrático

IFN: interferón

IHBD: conducto biliar intrahepático – del inglés *Intrahepatic Bile Duct*

IL: interleucina

I.R: incremento relativo

KC: células de Kupffer – del inglés *Kupffer cells*

L15: Leibovitz 15

LPS: lipopolisacárido

LSEC: células endoteliales sinusoidales del hígado – del inglés *liver sinusoidal endothelial cells*

M-CSF: factor estimulante de colonias a macrófagos – del inglés *macrophage colony-stimulating factor*

M-MLV RT: del inglés *moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NK: células asesinas naturales – del inglés *natural killer*

NKT: células T asesinas naturales – del inglés *natural killer-T cells*

NPC: células no parenquimales – del inglés *non-parenchymal cells*

PBMCs: del inglés *peripheral blood mononuclear cells*

PBS: tampón fosfato salino – del inglés *phosphate buffer saline*

PFA: paraformaldehído

PHHs: hepatocitos humanos primarios – del inglés *primary human hepatocytes*

PMA: forbol-12 miristato-13-acetato

PV: vena porta – del inglés *portal vein*

RNA: ácido ribonucleico – del inglés *ribonucleic acid*

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

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute – del inglés *Roswell Park Memorial Institute medium*

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real – del inglés *real-time reverse transcription PCR*

SBF: suero bovino fetal – del inglés *Fetal Bovine Serum*

SLC: transportadores de solutos – del inglés *solute carrier transporters*

TNF- α : factor de necrosis tumoral – del inglés *tumor necrosis factor*

Transportadores ABC: del inglés *ATP-Binding Cassette transporters*

TGZ: troglitazona

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El hígado

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo humano (Lorente et al., 2020). Se localiza detrás de la caja torácica, por encima del estómago y el intestino delgado, desde donde establece conexiones con muchos órganos del tracto gastrointestinal (Thompson & Takebe, 2021).

Este órgano se puede dividir en cuatro lóbulos (derecho, izquierdo, caudado y cuadrado), que a su vez se subdividen en lobulillos, la unidad funcional del hígado (Lorente et al., 2020; Thompson & Takebe, 2021). Los lobulillos tienen una forma hexagonal o pentagonal y constan de una vena central (CV) y la tríada porta, compuesta por la vena porta (PV), la arteria hepática (HA) y el conducto biliar intrahepático (IHBD) en cada uno de los vértices (Figura 1) (Godoy et al., 2013; Huppert & Iwafuchi-Doi, 2019; Thompson & Takebe, 2021).

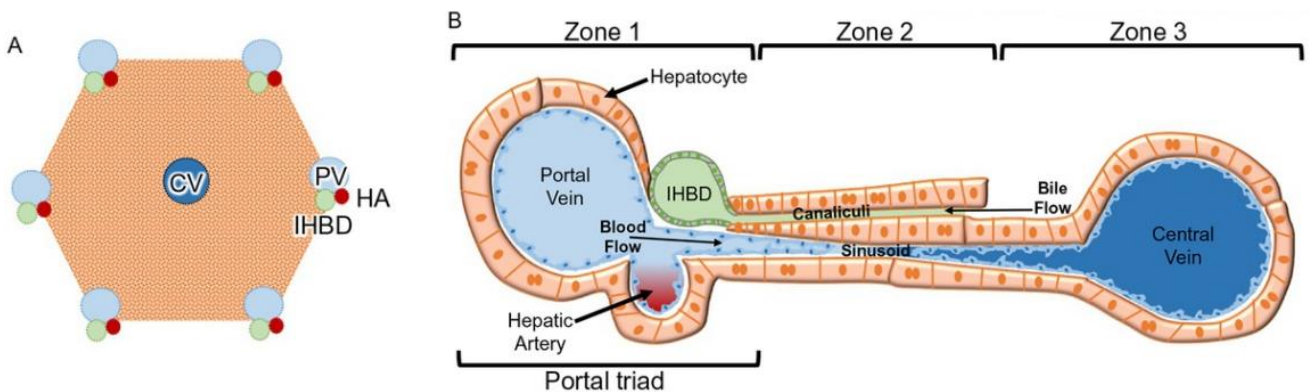


Figura 1. Arquitectura hepática. A) Esquema del lobulillo hepático. B) Radio aproximado del lobulillo hepático. Se observa como los cordones de hepatocitos se distribuyen a lo largo del lobulillo, entre las PV y las venas centrales (CV). Estos hepatocitos se disponen en tres zonas: zona 1 cerca de la PV; zona 2 y zona 3 cerca de la CV. La bilis se secreta desde los hepatocitos hacia los canalículos biliares y se transporta a los IHBD. Los capilares sinusoidales transportan sangre oxigenada desde la PV y la HA más allá de los hepatocitos hasta la CV (Huppert & Iwafuchi-Doi, 2019).

Las células del sinusoides hepático se dividen en parenquimales, que incluyen los hepatocitos y los colangiocitos, y en células no parenquimales (NPC), entre las que se encuentran las células de Kupffer (KC), las células hepáticas estrelladas (HSC), células almacenadoras de grasa, células endoteliales sinusoidales (LSEC) y células citotóxicas o *pit cells* (Clària & Titos, 2004; Godoy et al., 2013; Trefts et al., 2017).

El principal tipo celular del hígado son los hepatocitos, que suponen el 80% del volumen y llevan a cabo muchas de las funciones asociadas al hígado (Clària & Titos, 2004; Godoy et al., 2013; Trefts et al., 2017). Estas células radian desde la CV hacia los extremos del hexágono y están unidas entre sí por uniones estrechas. Además, se encuentran expuestos a ambos lados de los sinusoides (capilares), uniformemente distribuidos en el hígado y constituyendo la microcirculación hepática (Godoy et al., 2013; Lorente et al., 2020).

Las principales funciones de los hepatocitos incluyen el metabolismo de carbohidratos, la síntesis y secreción de proteínas circulantes como la albúmina, inhibidores de proteasas, factores de coagulación sanguíneos y moduladores inmunitarios y de la inflamación. También metabolizan aminoácidos, participan en la ureogénesis, en la biotransformación de medicamentos y en el metabolismo de lípidos, entre otros. Sin embargo, aunque los hepatocitos llevan a cabo la mayoría de las funciones metabólicas asociadas al hígado, lo hacen de manera coordinada con otros tipos celulares (Godoy et al., 2013; Gómez-Lechón, Tolosa & Donato, 2014; Gómez-Lechón, Tolosa, Conde & Donato, 2014).

Por otra parte, las KC constituyen la población de macrófagos residentes en el hígado, que juegan un papel fundamental en la respuesta inmune innata ya que su localización les permite eliminar patógenos introducidos por la circulación o células muertas; además, son la primera línea de defensa contra partículas e inmunorreactivos que llegan del tracto gastrointestinal. Así, estas células pueden jugar un papel pro- o antiinflamatorio (Dixon et al., 2013; Naito et al., 2004; Trefts et al., 2017).

En un hígado sano, las KC muestran un fenotipo “tolerogénico”, que previene respuestas inmunitarias indeseadas frente a materiales inmunorreactivos. Sin embargo, bajo condiciones de enfermedad, éstas se activan y pueden provocar daño hepatocelular. Por lo tanto, la pérdida de actividad funcional de las KC puede contribuir a la invasión de patógenos y/o inflamación sistémica, mientras que una sobre-activación puede llevar a un estado inflamatorio descontrolado (Dixon et al., 2013).

Igual que las células de Kupffer, otras células del sistema inmune innato como las *natural killer* (NK), las células dendríticas o las *natural killer-T cells* (NKT), residen en el sinusoides hepático (Figura 2). La proximidad de las KC al resto de células permite que los productos liberados por estos macrófagos, como citoquinas, quimiocinas, especies reactivas de nitrógeno y especies reactivas de oxígeno (ROS), regulen la función hepática, tanto promoviendo la salud como la enfermedad (Dixon et al., 2013).

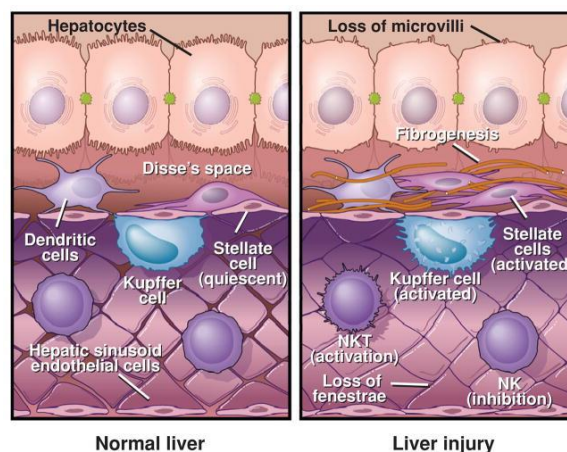


Figura 2. Localización de las células de KCs en el sinusoides hepático, en hígado sano y enfermo. Las células de Kupffer se encuentran muy cerca de otras células en el sinusoides, incluidas las NK y las NKT, así como las LSEC. A pesar de la barrera de las LSEC, los productos liberados por las KCs influyen en la actividad de las HSCs y de los hepatocitos (Dixon et al., 2013).

Esta distribución espacial y celular tan precisa permite que el hígado lleve a cabo funciones metabólicas, de detoxificación, sintéticas e inmunológicas, manteniendo la homeostasis del organismo (Huppert & Iwafuchi-Doi, 2019).

1.2 Daño hepático inducido por fármacos (DILI)

El daño hepático inducido por fármacos (DILI, del inglés *drug induced liver injury*) es un término que engloba cualquier lesión producida en el hígado por un medicamento recetado, de venta libre o un producto alimentario. Este tipo de daño se manifiesta como un conjunto de eventos asociados a múltiples mecanismos, desde asintomáticos hasta fallo hepático agudo (Alempijevic et al., 2017; Katarey & Verma, 2016; Kuna et al., 2018; Leise et al., 2014; Norman, 2020). De hecho, el DILI es la causa más común de insuficiencia hepática aguda en el mundo occidental (Katarey & Verma, 2016), lo que ha llevado a la retirada de fármacos en fases de desarrollo, una vez han sido comercializados o a la emisión de avisos para muchos medicamentos y productos naturales (Alempijevic et al., 2017; Gómez-Lechón, Tolosa & Donato, 2014; Katarey & Verma, 2016; Moreno, 2002; Pelechá et al., 2017; Reuben et al., 2010).

La incidencia de DILI es difícil de determinar debido al desconocimiento del número de pacientes que reciben un fármaco, la inexistencia de una prueba de diagnóstico simple, la falta de consenso sobre qué anomalías constituyen DILI, la dificultad en la atribución de causalidad a un solo fármaco y la escasez de notificación sistemática (Katarey & Verma, 2016; Leise et al., 2014). Sin embargo, se estima que este tipo de daño tiene una prevalencia entre 1 en 100.000 y 1 en 10.000 pacientes, aunque ocasionalmente puede ser más frecuente (Navarro & Senior, 2006; Reuben et al., 2010).

Existen dos tipos de DILI: intrínseco (predecible) e idiosincrático (impredecible). El DILI intrínseco depende de la dosis administrada, se manifiesta pronto y se puede predecir a dosis que exceden el límite establecido, ya que se debe a la toxicidad directa del fármaco. La sobredosis por paracetamol es la principal causa de este tipo de DILI (Katarey & Verma, 2016; Leise et al., 2014; Norman, 2020).

Sin embargo, la gran mayoría de pacientes manifiestan DILI idiosincrático (iDILI), que normalmente está influenciado por el sistema inmune adaptativo y la susceptibilidad de cada paciente. Estos hechos suelen estar ligados a tiempos de latencia más largos, lo que lleva semanas e incluso meses hasta su detección. El iDILI generalmente no depende de la dosis y por ello, es menos predecible en estudios preclínicos (Katarey & Verma, 2016; Leise et al., 2014; Norman, 2020). Los mecanismos del iDILI tienen una naturaleza mucho más compleja y por ello son el foco de la mayoría de las investigaciones actuales. Esta hepatotoxicidad puede ser inducida por el propio medicamento o indirectamente por la generación de metabolitos reactivos que generan hipersensibilidad. El metabolismo de los fármacos va a jugar un papel esencial en la aparición de este tipo de daño (Alempijevic et al., 2017; Gómez-Lechón, Tolosa & Donato, 2014; Gómez-Lechón, Tolosa, Conde & Donato, 2014; Pelechá et al., 2017).

Por otra parte, también se puede hacer una distinción respecto al patrón de daño hepático, es decir, en función de los parámetros bioquímicos del hígado. De esta forma, el tipo de daño se puede clasificar como hepático (lesión hepatocelular), colestásico o mixto (Leise et al., 2014).

Para definir cada tipo de DILI en la clínica se ha determinado la relación R, en función de la proporción de alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina, en comparación con sus respectivos límites superiores de normalidad (LSN) (Katarey & Verma, 2016; Leise et al., 2014; Moreno, 2002; Navarro & Senior, 2006).

1.3 Metabolismo de fármacos

Una de las funciones más importantes del hígado es la transformación de sustancias tóxicas (moléculas lipófilas) en metabolitos solubles en agua que el cuerpo puede eliminar fácilmente a través de la orina (Lorente et al., 2020; Moreno, 2002). Esta actividad depende de la expresión de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, capaces de catalizar la oxidación, reducción, hidrólisis y/o conjugación de grupos funcionales de medicamentos y moléculas químicas (Almazroo et al., 2017).

El metabolismo de los fármacos puede comprender varias etapas en las que se va modificando los medicamentos hasta convertirlos en una molécula hidrofílica. En la fase I, destaca el citocromo P450 (CYP), que actúa como una oxidasa. En la fase II, los metabolitos de la primera fase son inactivados mediante su conjugación a ácido glucurónico o sulfúrico, por acetilación o acoplándose a glutatión (Almazroo et al., 2017; Grant, 1991; Moreno, 2002).

Finalmente, en la fase III se facilita el transporte de moléculas grandes y/o ionizadas a través de las células. Para ello participan 2 familias de proteínas transmembrana, los transportadores ABC (ATP-Binding Cassette) y los SLC (Solute Carrier Transporters) (Grant, 1991).

Estos sistemas enzimáticos son específicos, múltiples e inducibles, por lo que están muy bien adaptados para trabajar con la gran variedad de estructuras químicas presentes en el ambiente. Sin embargo, en ocasiones los productos generados por estas enzimas son más tóxicos (bioactivación) y pueden inducir toxicidad, aunque en muchas ocasiones son los propios fármacos los que la causan (Figura 3) (Almazroo et al., 2017; Gómez-Lechón, Tolosa & Donato, 2014; Grant, 1991; Pelechá et al., 2017).

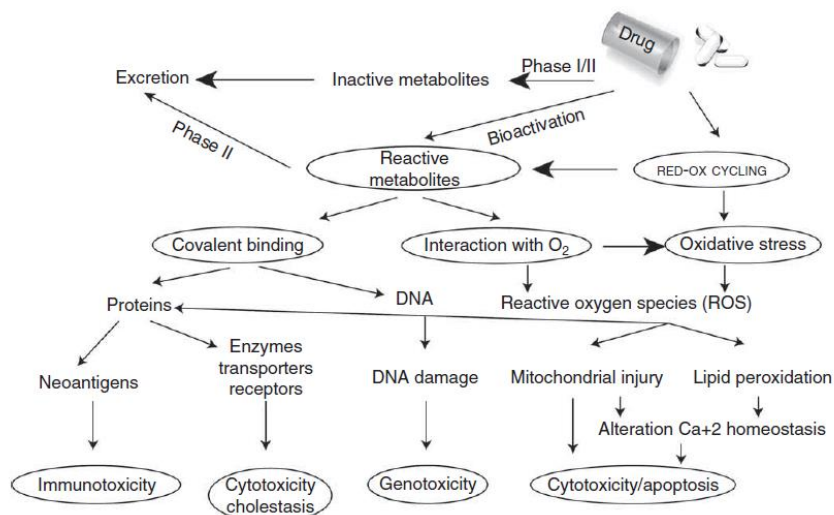


Figura 3. Eventos moleculares que llevan al daño celular inducido por fármacos y a la muerte celular. Los medicamentos pueden actuar directamente sobre las células o después de su biotransformación por los hepatocitos. En este último caso, la toxicidad es el equilibrio entre la bioactivación y la desintoxicación, que determina si un metabolito reactivo provoca un efecto tóxico o no. Hay varios procesos que juegan

un papel en los eventos moleculares que conducen al daño celular irreversible y la muerte celular por necrosis o apoptosis (Gómez-Lechón, Tolosa, Conde & Donato, 2014).

La bioactivación puede llevar a la aparición de metabolitos reactivos, que si no son neutralizados pueden formar aductos con proteínas, alterando su estructura y función. Por otra parte, el aumento de los niveles de ROS y la propia reactividad de estos metabolitos puede provocar daño en el DNA e inducir genotoxicidad, mutaciones y carcinogénesis (Alempijevic et al., 2017; Pelechá et al., 2017).

Estos hechos pueden causar lesiones metabólicas, alterar la homeostasis celular, desencadenar reacciones inmunitarias o inducir la producción de citoquinas proinflamatorias. Como consecuencia de estas alteraciones los hepatocitos mueren, causando toxicidad y daño hepático (Figura 3) (Alempijevic et al., 2017; Pelechá et al., 2017).

1.4 Modelos *in vitro* para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos

Son múltiples los mecanismos que causan lesiones tóxicas en los hepatocitos, por lo que se han implementado diversos ensayos que permitan evaluar el potencial riesgo de los nuevos fármacos para los humanos (Gómez-Lechón, Tolosa, Conde & Donato, 2014). Si bien es cierto que el DILI intrínseco es reproducible en modelos animales (por ejemplo, la sobredosis con paracetamol) (Katarey & Verma, 2016), las diferencias en los sistemas de detoxificación entre especies impiden que las pruebas preclínicas en animales de laboratorio identifiquen su toxicidad clínica posterior (iDILI) (Gómez-Lechón, Tolosa, Conde & Donato, 2014; Katarey & Verma, 2016; Pelechá et al., 2017). Además, cada día existe más presión por aplicar las 3R (reducción, refinamiento y reemplazamiento) para un uso más ético de los animales de experimentación, lo que ha impulsado el desarrollo y validación de nuevos métodos alternativos basados en el uso de células (Kyffin et al., 2018; Soldatow et al., 2013).

En este escenario, se han desarrollado nuevos modelos celulares humanos que permitan mejorar la predictividad del DILI. Los ensayos *in vitro* tienen la capacidad de proporcionar información rápida y económicamente viable durante las fases tempranas del desarrollo farmacéutico. Sin embargo, aunque está demostrada su disponibilidad para estudiar los procesos implicados en la hepatotoxicidad, su capacidad predictiva depende de forma crítica del comportamiento funcional de las células utilizadas, ya que los modelos celulares no representan la toxicidad en el órgano completo. Además, la falta de modelos celulares que mantengan una funcionalidad prolongada limita este tipo de investigación (Pelechá et al., 2017).

Los hepatocitos humanos primarios (PHH) en cultivo son el *gold standard* en investigación, debido a que son el modelo más similar al hígado humano (Gómez-Lechón, Tolosa & Donato, 2014). Aun así, presentan algunas desventajas, como su compleja obtención o su baja reproducibilidad, que quedan recogidas en la *Tabla 1*. Otros modelos celulares propuestos para cultivo primario son las líneas celulares de hepatoma como HepG2 o HepaRG, progenitores hepáticos o células pluripotentes (Pelechá et al., 2017).

Particularmente, las células HepG2 son una línea celular hepática humana muy usada en el estudio de farmacotoxicológica. Se trata de una línea celular inmortalizada, derivada de biopsias de hígado de un varón caucásico de 15 años con un carcinoma hepatocelular diferenciado (Arzumanian et al., 2021; Choi et al., 2015; Costantini et al., 2013). Estas células son de fenotipo estable, fáciles de cultivar y presentan una disponibilidad ilimitada (Mueller et al., 2013). Cuando

se cultivan sobre una superficie sólida muestran una morfología epitelial y expresan una gran variedad de funciones hepáticas (Segovia-Zafra et al., 2021). Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de estas células es la baja expresión de enzimas y transportadores involucrados en el metabolismo de fármacos, por lo que no representan la funcionalidad real de un hepatocito (Kyffin et al., 2018; Segovia-Zafra et al., 2021; Soldatow et al., 2013).

Las respuestas a la toxicidad que se observan *in vivo* están mediadas por las complejas interacciones celulares. Por ello, con el objetivo de mantener la función hepática, en muchas ocasiones se llevan a cabo cultivos con NPC, tanto en 3D como en 2D (Godoy et al., 2013; Kyffin et al., 2018).

En los últimos años, se han propuesto otros modelos celulares para el estudio de hepatotoxicidad. Todos ellos quedan recogidos en la *Tabla 1*, junto a sus ventajas y desventajas.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los distintos modelos *in vitro* desarrollados para testar hepatotoxicidad.

MODELOS 2D	VENTAJAS	DESVENTAJAS
EXPLANTES	<p>Estructura 3D biológica y tipos celulares encontrados <i>in vivo</i></p> <p>Buena correlación <i>in vitro/in vivo</i> del metabolismo de xenobióticos</p> <p>Interacciones célula-célula</p> <p>Actividad citocromo específica de zona</p>	<p>Reproducibilidad limitada</p> <p>Necrosis tras 48-72 h</p> <p>Distribución de medicamentos heterogénea</p> <p>Enzimas de fase II, producción de albúmina y gluconeogénesis disminuyen progresivamente</p>
LÍNEAS CELULARES INMORTALIZADAS	<p>Disponibilidad</p> <p>Manejo sencillo</p> <p>Fenotipo estable</p> <p>Propagación ilimitada</p> <p>Estudio de mecanismos moleculares y celulares del daño hepático</p>	<p>No variabilidad interindividual</p> <p>Ausencia de características fenotípicas y funciones hepáticas</p> <p>Variabilidad en la expresión de enzimas de las fases I y II del metabolismo entre pases</p> <p>Baja actividad metabólica</p>
SUSPENSIÓN DE HEPATOCITOS PRIMARIOS	<p>Manejo sencillo</p> <p>Rendimiento alto en estudios de toxicología</p> <p>Estimación precisa de la tasa de eliminación interna</p> <p>Altos niveles de funcionalidad</p>	<p>Baja disponibilidad de tejido hepático para el aislamiento</p> <p>Cortos periodos de viabilidad.</p> <p>Pérdida de contactos celulares y con la ECM.</p> <p>Pérdida de polaridad celular, integridad y capacidad de diferenciación.</p>
CULTIVO DE HEPATOCITOS PRIMARIOS EN MONOCAPA	<p>Disponibilidad</p> <p>Estudio de variaciones interindividuales.</p> <p>Interacciones celulares</p> <p>Enzimas de fase II y CYP</p> <p>Los hepatocitos humanos son el modelo de elección para screening de fármacos, con buena transferencia de datos a humanos</p>	<p>Baja reproducibilidad</p> <p>Variaciones entre donantes que dificultan la interpretación</p> <p>A largo plazo requieren adhesión a una ECM</p> <p>Pérdida de polaridad celular</p> <p>Cortos periodos de supervivencia</p> <p>Pérdida de morfología, actividad metabólica y funciones específicas.</p> <p>Ensayos restringidos</p> <p>Obtención compleja e invasiva.</p> <p>Tratamientos con medicamentos o citoquinas para reproducir iDILI</p>

CO-CULTIVO	<p>Mantiene la funcionalidad Ambiente multicelular Polaridad celular Contactos heterotípicos célula-célula Mayor longevidad celular CYP y enzimas de fase II Buena correlación con datos <i>in vivo</i> (hepatocitos humanos)</p>	<p>Falta de estandarización de los tipos celulares a usar Los métodos varían entre laboratorios Variabilidad en función de los tipos celulares usados El estado de diferenciación y la viabilidad dependen de las condiciones de cultivo El rendimiento depende de la aplicación</p>
CO-CULTIVO EN SANDWICH	<p>Secreción de albúmina Morfología poligonal Viabilidad y funcionalidad prolongada CYP y enzimas de fase II con actividades basales Excreción biliar Polaridad celular gracias a la ECM Contactos célula-célula Canalículo biliar funcional Buena transferencia de los datos a humanos (hepatocitos humanos)</p>	<p>La expresión de genes responsables de las funciones hepáticas disminuye con el tiempo. Disponibilidad limitada de hígado humano Variabilidad entre donantes</p>
STEM CELLS	<p>Fuente de células renovable capaces de proporcionar un gran número de células funcionalmente equivalentes</p>	<p>Los protocolos de diferenciación dan como resultado una funcionalidad variable en la población celular</p>
MODELOS 3D		
ESFEROIDES DE PHH	<p>Firmas transcriptómicas y proteómicas similares a <i>in vivo</i>. Funcionalidad a largo plazo CYP y enzimas de fase II Buena transferencia de datos a humanos Contactos y polaridad celular Componentes de la ECM dentro y alrededor de los agregados.</p>	<p>Tamaños aleatorios Necrosis en el centro por acumulación de residuos Limitaciones en la difusión de nutrientes y oxígeno Difusión del fármaco aleatoria</p>

SCAFFOLDS	<p>Diferentes materiales (naturales, sintéticos y descelularizados) Dan soporte estructural Cada matriz induce un comportamiento morfológico o fisiológico Los <i>scaffolds</i> naturales son biocompatibles e imitan la ECM nativa Los hígados descelularizados conservan la microarquitectura 3D y las características biológicas nativas Mantienen las funciones específicas del hígado por largos periodos CYP y enzimas de fase II Expresión de albúmina Polaridad específica del hígado</p>	<p>Dificultades en la reproducibilidad debido a la variedad de materiales Recuperación celular complicada Escasez de <i>scaffolds</i> descelularizados Necrosis en el centro de la estructura Necesidad de mejora y estandarización en las técnicas de elaboración de los <i>scaffolds</i>.</p>
HIDROGELES	<p>Regulan el comportamiento celular Dan soporte estructural Formación mejorada de los canalículos biliares Funciones hepáticas conservadas Alta biocompatibilidad</p>	<p>Recuperación celular complicada Baja transferencia de oxígeno, nutrientes y xenobióticos Baja reproducibilidad</p>
HÍGADO BIOIMPRESO	<p>Distribución espacial de las células y el microambiente Función hepática normal y viable durante largos periodos Detección de toxicidad muy eficiente</p>	<p>Para reproducir completamente las funciones hepáticas se necesita combinar diferentes técnicas de bioimpresión Técnicas actuales de bioimpresión poco precisas Necesidad de mejora en el coste y la eficiencia</p>

ECM (matriz extracelular), CYP (citocromo P450), DILI (daño hepático inducido por fármacos).

REFERENCIAS: (Bachmann et al., 2015; Godoy et al., 2013; Gómez-Lechón, Tolosa & Donato, 2014; Gómez-Lechón, Tolosa, Conde & Donato, 2014; Kyffin et al., 2018; Ma et al., 2020; Segovia-Zafra et al., 2021; Soldatow et al., 2013; Verneti et al., 2017).

1.5 Co-cultivos como modelo de estudio de iDILI

Las complejas interacciones celulares median muchas de las respuestas tóxicas que se producen en el hígado, por lo que los hepatocitos por sí solos no tienen un buen poder predictivo (Gómez-Lechón, Tolosa, Conde & Donato, 2014; Kuna et al., 2018). Es cierto que, con el objetivo de simplificar los modelos, en algunos estudios se han tratado los propios hepatocitos con citoquinas asociadas al DILI o con medios condicionados de células inmunitarias. Del mismo modo, también se han llevado a cabo estudios en los que se han tratado las propias células inmunitarias con hepatotóxicos. Sin embargo, en ninguno de estos casos se aborda la interacción celular directa, por lo que es necesario recurrir a modelos de estudio más complejos (Tasnim et al., 2021).

Para representar la población multicelular que compone el hígado, se han estudiado los co-cultivos de hepatocitos con NPC, como las HSC, las KC o las LSEC. Estas células median muchas de las respuestas tras la exposición a fármacos, y han demostrado aumentar la longevidad y funcionalidad hepática de los cultivos. Es por ello por lo que son comúnmente empleadas en los co-cultivos (Godoy et al., 2013; Kyffin et al., 2018).

Dada la abundancia de macrófagos en el hígado, muchos modelos de estudios basados en hepatocitos se centran en las KC (Kyffin et al., 2018), que juegan un papel clave en la hepatotoxicidad, tanto promoviendo DILI como protegiendo el entorno hepatocelular (Dixon et al., 2013; Granitzny et al., 2017). Los fármacos pueden activar a las KC de forma directa o tras una lesión hepática inicial. Así, los macrófagos activados liberan citocinas inflamatorias (TNF- α e interleucinas) que pueden incrementar el daño en los hepatocitos (Granitzny et al., 2017). Es por ello por lo que en este tipo de cultivos se obtienen más respuestas que con cualquier otro tipo celular por sí solo (Kyffin et al., 2018).

Concretamente, la línea celular THP-1, aislada de la sangre periférica de un paciente con leucemia monocítica aguda, o los monocitos extraídos a partir de PBMC, se han utilizado ampliamente en el estudio de respuestas inmunitarias. Una particularidad de estos modelos celulares es que se pueden diferenciar a macrófagos y actuar como células de Kupffer en los co-cultivos (Chanput et al., 2014; Padberg et al., 2021; Tasnim et al., 2021).

Otros estudios se han centrado en el co-cultivo de hepatocitos y NPC separados por una membrana porosa (*transwell*). Este sistema permite el intercambio de productos y señales celulares, dando unos resultados prometedores. Sin embargo, este tipo de modelo de estudio no permite que se establezcan contactos celulares (Granitzny et al., 2017).

Uno de los retos actuales es el mantenimiento de la morfología y la funcionalidad de los cultivos a largo plazo. Para ello se han llevado a cabo diseños más complejos como un cultivo multicelular de PHH, KC y fibroblastos (HepatoMune™, Hepregen/BioIVT). Desafortunadamente, este tipo de cultivos no son adecuados para estudios de alto rendimiento (Tasnim et al., 2021).

Por tanto, los sistemas basados en células parenquimales y NPC podrían ahorrar tiempo en el proceso de detección de iDILI, además de reducir el número de animales empleados en investigación y los costos económicos. Concretamente, los co-cultivos son modelos que se aproximan fielmente a la situación real, pese a ello, este tipo de ensayos están muy limitados a ciertos fármacos o rangos de exposición, por lo que es necesario realizar nuevos avances y caracterizaciones de los mismos para que se puedan establecer como una prueba fiable en la predicción de iDILI (Granitzny et al., 2017).

2 OBJETIVOS

La falta de modelos *in vitro* predictivos de la hepatotoxicidad causada por fármacos ha llevado a la retirada de muchos medicamentos en fase clínica o de comercialización.

Los modelos animales son esenciales en fases preclínicas, pero no son capaces de predecir iDILI en humanos; por su parte, los modelos *in vitro*, aunque permitirían una detección rápida y económicamente viable, a menudo presentan limitaciones debido a que solo reflejan una parte del fenotipo hepático o se basan en un único tipo celular. Por ello, actualmente hay un interés creciente en el desarrollo de modelos celulares robustos, que mantengan la viabilidad y funcionalidad celular, y que por tanto permitan estudiar el iDILI de forma eficiente.

Por ello, el objetivo principal de este proyecto es caracterizar un modelo de estudio de iDILI basado en un co-cultivo que combina hepatocitos derivados de la línea celular de HepG2 con células THP-1 diferenciadas a macrófagos, que van a actuar como las células de Kupffer. Estas células mantendrán los contactos celulares y serán usadas para realizar estudios de hepatotoxicidad. Para ello, los objetivos concretos del presente proyecto fueron:

- Definir un protocolo de diferenciación de la línea THP-1 y de monocitos derivados de PBMCs a macrófagos y caracterizar la expresión de marcadores típicos de M1.
- Determinar un protocolo óptimo de co-cultivo de células THP-1 diferenciadas a macrófago y HepG2, utilizando diferentes proporciones celulares.
- Determinar la idoneidad de los co-cultivos optimizados para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos en comparación con los monocultivos de HepG2.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

3.1.1 Cultivo HepG2

La línea HepG2 (ATCC HB-8065) se cultiva en medio comercial Ham's F12 (Gibco Ref 21765-029) y L15 (Gibco Ref 11415-049) a una proporción 1:1 v/v, suplementado con L-Glutamina (Biochrom K0283) 3,5 mM, 7% de Suero Bovino Fetal (SBF LINU-8460), Glucosa (Sigma G7021) 5 mM, 2 mg de BSA (Sigma A4503), Bicarbonato (Grifols) 12 mM y Pen-Strep (Gibco 15140-122) 10000 U/mL Penicillin y 10000 ug/mL Streptomycin

Las células se subcultivaron 2 veces a la semana. Para realizar el subcultivo, en primer lugar, se lava toda la superficie con PBS, eliminando restos celulares y de medio de cultivo. A continuación, se cubre las células con tripsina y se incuba a 37°C durante 2-3 minutos, para que la enzima haga su efecto. Una vez transcurrido este tiempo, se añade medio completo para inactivar la enzima y se recoge toda la suspensión celular, que se centrifuga a 1500 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se descarta y el pellet de células se resuspende en medio de cultivo.

Para conocer la concentración celular, se cargan 10 µL de la suspensión celular en una cámara de Neubauer y se lleva a cabo el conteo. A partir de la *Ecuación 1* se calcula la concentración de células y el volumen necesario para la siembra. El cultivo se incuba a 37°C y 5% CO₂.

$$\text{Concentración celular} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Células contadas} * \text{Dilución} * 10^4}{\text{Número de cuadrados}}$$

Ecuación 1. Cálculo de la concentración celular (células/mL) en Cámara de Neubauer.

3.1.2 Cultivo THP-1

La línea celular THP-1 (ATCC TIB-202) se cultiva en suspensión en medio RPMI (Gibco Ref 21875-034), suplementado con un 10% de Suero Fetal Bovino (SBF LINU-8460), Glutamina (Biochrom K02832) 2 mM y antibiótico (Gibco 15140-122) 10000 U/mL Penicillin y 10000 ug/mL Streptomycin. Las células se sembraron hasta alcanzar la confluencia deseada y se subcultivaron dos veces por semana.

Para llevar a cabo el subcultivo, la suspensión celular se debe centrifugar 3 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante se descarta y el pellet de células se resuspende en medio de cultivo. Para conocer la concentración celular se debe llevar a cabo el mismo procedimiento que con las HepG2 (Ecuación 1). El nuevo frasco se incuba a 37°C y 5% CO₂.

3.1.3 Diferenciación THP-1

Las células THP-1 en estado de monocitos se pueden diferenciar hacia un fenotipo similar al de los macrófagos. En base a literatura, se va a emplear forbol-12 miristato-13-acetato (PMA) como agente para la diferenciación. Tras un tratamiento con este compuesto, las células dejan de proliferar, se adhieren al plástico de las placas de cultivo y adquieren una morfología estrellada (Auwerx, 1991; Baxter et al., 2020).

En este estudio, para llevar a cabo la diferenciación de las células THP-1, se probaron distintas condiciones de PMA, con el objetivo de determinar el mejor protocolo de diferenciación. En base a literatura (Baxter et al., 2020; Park et al., 2007) se decidieron probar dos concentraciones distintas de PMA durante 72 horas, 20 ng/mL y 50 ng/mL.

A partir de entonces, se analizó la diferenciación a M1 mediante citocinas proinflamatorias. Estas dan como resultado células similares a macrófagos y que expresan algunos de sus marcadores típicos (Baxter et al., 2020). Para ello se probaron dos condiciones, en la primera de ellas, las células se sometieron a una concentración de 1 µg/mL de LPS durante 24 horas; en el otro caso se estudió el estímulo con LPS a 1 µg/mL e IFNγ a 20 ng/mL durante el mismo periodo de tiempo (Genin et al., 2015; Qin, 2012; Tedesco et al., 2018) (Figura 4).

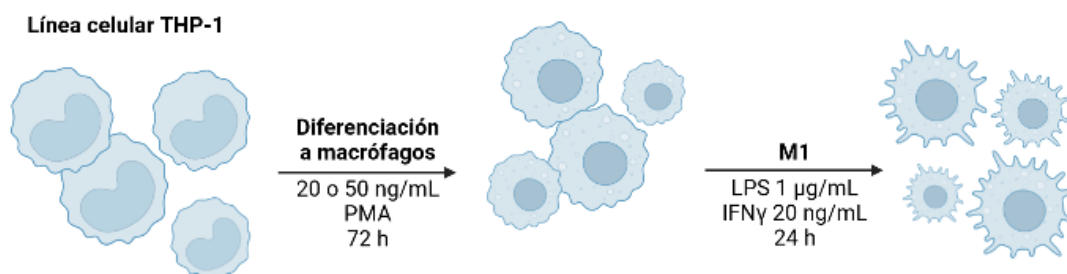


Figura 4. Esquema del proceso de diferenciación de la línea celular THP-1.

3.1.4 Monocitos extraídos de sangre periférica

Para el uso de monocitos de sangre periférica (PBMCs), en primer lugar, se debe llevar a cabo su extracción. Una vez atemperados los reactivos que se van a usar, la sangre se diluye en PBS para disminuir su densidad.

El Histopaque va a permitir crear un gradiente de densidad en el que aislar los monocitos. Una vez llevada a cabo la centrifugación, se recoge la interfase de monocitos con una pipeta Pasteur y se añade a un nuevo falcon, donde se llevan a cabo las centrifugaciones necesarias con DPBS-EDTA + BSA, para eliminar cualquier tipo de contaminación.

Finalmente, se resuspende el pellet en RPMI-1640 completo, se cuentan las células y se siembra a la confluencia deseada. Las placas se incuban 1 hora a 37°C y 5% de CO₂ y posteriormente se elimina la capa no adherente.

Para diferenciar los monocitos, las células se deben cultivar con medio de diferenciación RPMI con 5 ng/mL de M-CSF durante 7 días. Para estimular a M1, el día 5 se deben añadir 1 µg/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN.

3.1.5 Co-cultivo

Para llevar a cabo el co-cultivo se seleccionaron distintas proporciones de hepatocitos y macrófagos que puedan simular distintas situaciones en el organismo. Una proporción 1:10 que representa el estado fisiológico, 1:5 que simula un estado intermedio y 1:2 que se correspondería con un estado inflamatorio.

En primer lugar, se deben sembrar los macrófagos. Estos se encuentran adheridos y se deben levantar empleando tripsina, durante 3 minutos a 37°C, y rascando la placa. Una vez obtenida la suspensión celular, se debe contar la concentración celular de la que se dispone y sembrar el número de células deseado en una nueva placa. Este nuevo cultivo se dejará reposar durante 5 horas para permitir la adherencia celular.

Transcurrido este tiempo, se procederá con la siembra de los hepatocitos. Estos se cultivarán sobre los anteriores, de forma que quede una proporción de medios 1:1 v/v, y se dejará 1 día de reposo para permitir que el co-cultivo se establezca.

3.2 Inmunofluorescencia

Para caracterizar tanto el proceso de diferenciación de las células THP-1 a macrófagos como los co-cultivos de HepG2 y THP-1, se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos específicos para cada estadio y tipo celular (*Tabla 2*).

En primer lugar, se procedió a la siembra de las células en placas de 24 pocillos a 50.000 células/pocillo.

Una vez establecidos los cultivos, se procedió con el protocolo de la inmunofluorescencia. Este se divide en 5 etapas fundamentales, la fijación para detener el metabolismo celular, la permeabilización de la membrana, el bloqueo, la adición del anticuerpo primario y la adición del secundario. En el caso de las células THP-1, se puede prescindir del paso de permeabilización, ya que las proteínas que se desea detectar se encuentran en la propia membrana plasmática.

En primer lugar, se debe aspirar el medio de cultivo y lavar con PBS 1X. A continuación, se debe retirar el PBS y, en una campana de extracción de gases, se añade paraformaldehído (PFA) al 4%. Tras 20 minutos, se aspira el PFA y se lava 3 veces con PBS 1X.

En la etapa de bloqueo se añadió PBS/BSA 3% y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el PBS/BSA 3% y se procedió a la adición de los anticuerpos (*Tabla 2*).

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunofluorescencia.

TIPO CELULAR	MARCADOR	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
HepG2	Albúmina	<i>Goat anti-Human Albumin (A80-229A, Bethyl)</i>	<i>Alexa fluor 488 donkey anti-Goat (A11055, Invitrogen)</i>
THP-1	CD68	<i>Recombinant anti-CD68 (mouse) antibody (AB233172, ABCAM)</i>	<i>Alexa fluor 594 donkey anti-mouse (R37115, Invitrogen)</i>
	CD163	<i>Recombinant Alexa fluor 488 anti-CD163 (rabbit) antibody (AB218293, ABCAM)</i>	<i>Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (A21206, Invitrogen)</i>

Una vez añadidos los anticuerpos se lavó con PBS/BSA 1% con Hoech (1/500) y se cubrieron las células con PBS 1X hasta su lectura. La toma de imágenes se llevó a cabo mediante el microscopio Leica HMR (Leica Microsystems).

3.3 Ensayo de viabilidad (MTT)

Este prueba se llevó a cabo para determinar si el protocolo de diferenciación a macrófagos M1 (20 y 50 ng/mL de PMA) tenía efectos en la viabilidad celular, así como para estudiar la viabilidad de los co-cultivos a distintas proporciones celulares.

Este ensayo se basa en la reducción de una sal de tetrazolio soluble de color amarillo (MTT) a un formazán insoluble de color azul. La reducción se lleva a cabo intracelularmente por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa.

Para llevar a cabo este ensayo, en primer lugar, se debe preparar el reactivo (MTT) a una dilución 1:11 con medio de cultivo. Una vez preparado, se debe vaciar y lavar los pocillos con PBS, para posteriormente añadir el medio con la sal e incubar 2 horas a 37°C.

Una vez transcurrido este tiempo, el medio se elimina y se añade DMSO para resuspender el formazán. Las placas se leen con el lector de placas Halo Led 96 (Dynamica) a una longitud de onda de 550 nm.

3.4 Extracción de RNA y PCR

Para la extracción de mRNA se empleó el RNeasy kit y el protocolo de Qiagen. En primer lugar, los cultivos en monocapa se lisaron con β -mercaptoetanol y buffer de lisis RLT. Posteriormente se recogió el contenido de cada pocillo en un *ependorf* y se siguió el procedimiento indicado por la casa comercial.

Una vez obtenido el RNA, se llevó a cabo su cuantificación en el espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Para la RT-PCR (del inglés, *real-time reverse transcription PCR*) son necesarios los reactivos de la reacción en cadena de la polimerasa, entre ellos la transcriptasa reversa M-MLV (Sigma Aldrich) y RNaseOUT (Invitrogen). Cada muestra se incubó 1 hora a 42° C y la enzima se inactiva a 70° C durante 15 minutos.

Finalmente, para la PCR se emplea PCR SYBR Green I Master y el colorante RiboGreen (Invitrogen). Además, son necesarios los primers recogidos en la *Tabla 3* y el termociclador LigthCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Sciences).

Tabla 3. Primers empleados en la PCR.

	FORWARD	REVERSE
PBGD	CGG AAG AAA ACA GCC CAA AGA	TGA AGC CAG GAG GAA GCA CAG T
CD80	CAG AAG TGG AGT CTT ACC CTG A	GCT CAC GTA GAA GAC CCT CC
TNF	GCA ACA AGA CCA CCA CTT CG	GAT CAA AGC TGT AGG CCC CA
IL-1 β	GCA GAA GTA CCT GAG CTC GC	TCC ATG GCC ACA ACA ACT GA
CXCL10	GCT TCC AAG GAT GGA CCA CA	GCA GGG TCA GAA CAT CCA CT

3.5 Estudio de hepatotoxicidad inducida por fármacos

El modelo *in vitro* planteado en este proyecto se va a emplear para el análisis de la hepatotoxicidad causada por fármacos mediante el estudio de la viabilidad celular mediante un ensayo MTT.

Para el estudio las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos a una confluencia de 10.000 células/pocillo. Las condiciones que se decidió estudiar fueron los co-cultivos a una proporción 1:2 y 1:10 con macrófagos en estadio M0 y M1. También se estudiaron como controles las células HepG2 en monocultivo.

El fármaco escogido fue la Troglitazona (TGZ), un medicamento del que se han reportado múltiples casos de lesión hepática aguda. La solución madre de dicho fármaco se encuentra disuelta en DMSO y a partir de ella se obtuvieron concentraciones de 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M

para el estudio tanto en los monocultivos como en los co-cultivos. El rango de toxicidad se basó en bibliografía (Granitzny et al., 2017) para estudiar dosis citotóxicas pero que permitieran analizar diferencias.

Una vez tratadas las células, se dejaron reposar 24 horas. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo una MTT para estudiar la viabilidad celular.

4 RESULTADOS

4.1 Diferenciación THP-1 a macrófagos

El primer objetivo del estudio fue determinar la idoneidad del protocolo de diferenciación en base a lo descrito en la literatura. Para ello las células THP-1 fueron expuestas a dos concentraciones de PMA (20 ng/mL y 50 ng/mL) durante 24 y 72 horas (*Figura 5*).

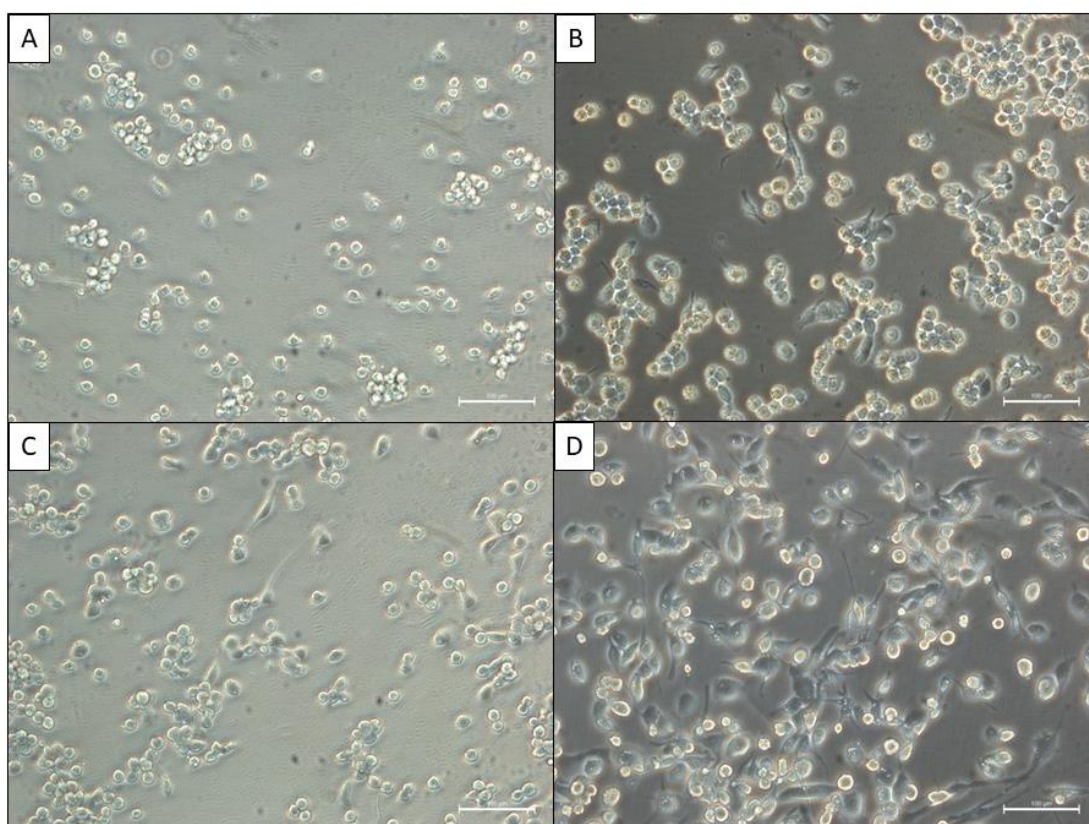


Figura 5. Proceso de diferenciación de la línea celular THP-1. A) Día 0 sin PMA. B) Día 1 con PMA 50 ng/mL. C) Día 1 con PMA 20 ng/mL. D) 72 horas con PMA y 24 horas de descanso.

Como se puede observar en la *Figura 5*, tras estimular las células con PMA a diferentes concentraciones (20 y 50 ng/mL), éstas se adhirieron al plástico de la placa de cultivo y obtuvieron un fenotipo alargado similar a la de los macrófagos. En ambos casos, las células mostraron una apariencia similar y por tanto no destacan diferencias morfológicas entre ambos estímulos de PMA a las 24 horas.

Tras 72 horas de estímulo, se puede observar como las células presentan una morfología estrellada más intensa y una mayor similitud al fenotipo de los macrófagos, lo que indica que la diferenciación hacia el estadio M1 se está llevando a cabo.

En la *Figura 6* se puede observar cómo tras añadir el estímulo de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS o 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS y 20 ng/mL de IFN, la morfología de macrófago M1 es todavía más pronunciada, donde se observan células alargadas y con ramificaciones, aunque no se observan diferencias entre ambas condiciones.

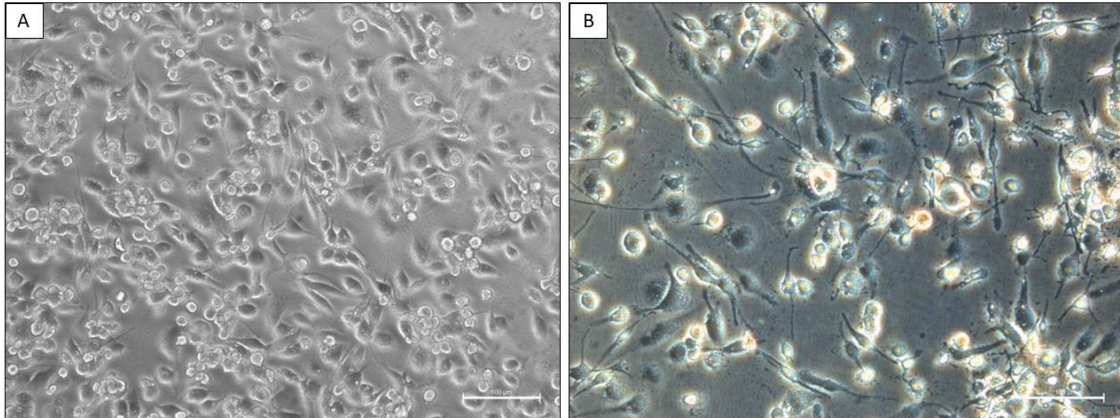


Figura 6. Imagen tomada durante el proceso de diferenciación de la línea celular THP-1. A) Estímulo durante 72 horas con PMA y 24 horas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS. B) Estímulo durante 72 horas con PMA y 24 horas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS y 20 ng/mL de IFN.

4.1.1 Expresión de marcadores de M1

4.1.1.1 Inmunofluorescencia

Para comprobar que efectivamente se había producido la diferenciación de las células THP-1 a macrófagos, se llevó a cabo una inmunofluorescencia empleando marcadores específicos (*Figura 7*).

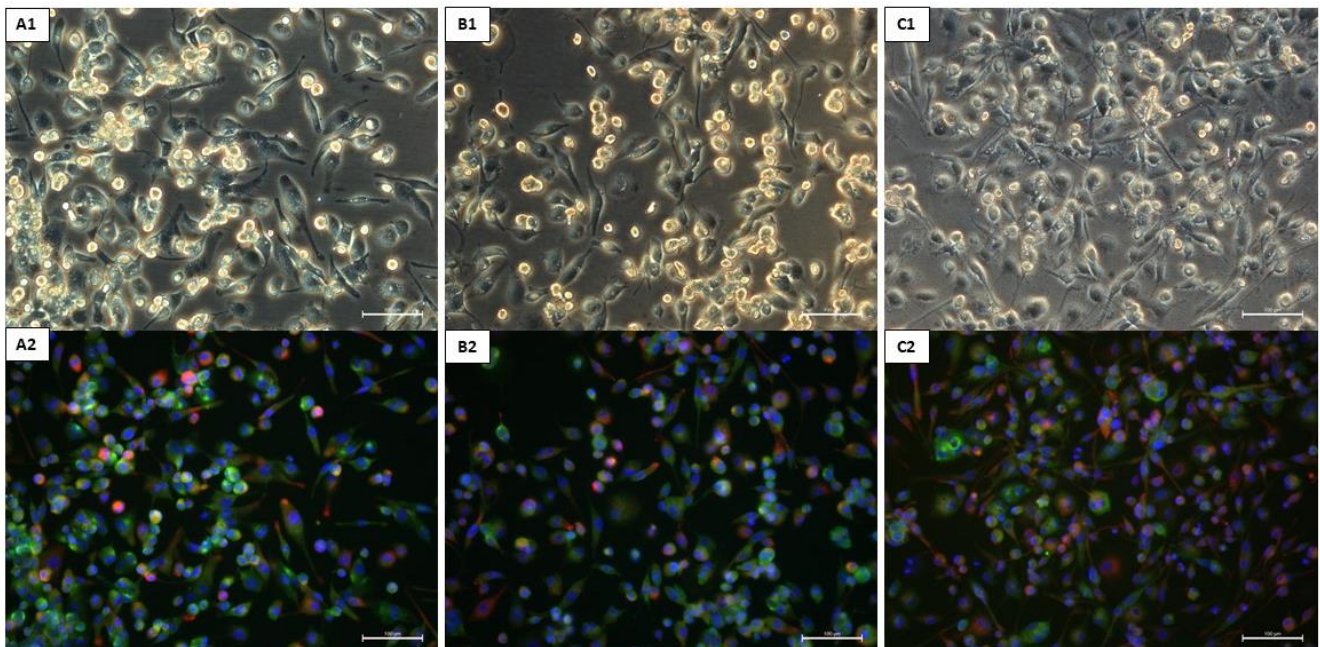


Figura 7. Inmunofluorescencia llevada a cabo durante el proceso de diferenciación de la línea celular THP-1 para observar marcadores de macrófago. En rojo se visualiza el marcador CD68, en verde el CD163 y en azul el núcleo celular. A) 72 horas de PMA y 24 horas de descanso. B) 72 horas de PMA y 24 horas con LPS. C) 72 horas con PMA y 24 horas con LPS e IFN.

Tal y como se puede observar en las imágenes, desde el momento en el que las células fueron tratadas con PMA (*Figuras 7, A1 y A2*) estas adquirieron una morfología alargada y se adhirieron al plástico. Además, también obtuvieron marcadores de macrófagos M1, CD68 y CD163.

En el caso de las células tratadas con PMA y LPS o PMA, LPS e IFN se observan unas imágenes similares a las observadas en el primer caso. Sin embargo, en la *Figura 7 C2* parece que el marcador CD68, en color rojo, se observa con una mayor intensidad. Para determinar el mejor protocolo, se pasó a estudiar la expresión génica.

4.1.1.2 Estudio de la expresión génica

Con el objetivo de determinar el mejor protocolo de diferenciación de la línea celular THP-1 a macrófago, se estudió la expresión génica de marcadores típicos de macrófago. Para ello se estudiaron los genes CD80, IL-1 β , TNF- α y CXCL10 (*Figura 8*). El gen PBGD se usó como *housekeeping* para poder normalizar la expresión.

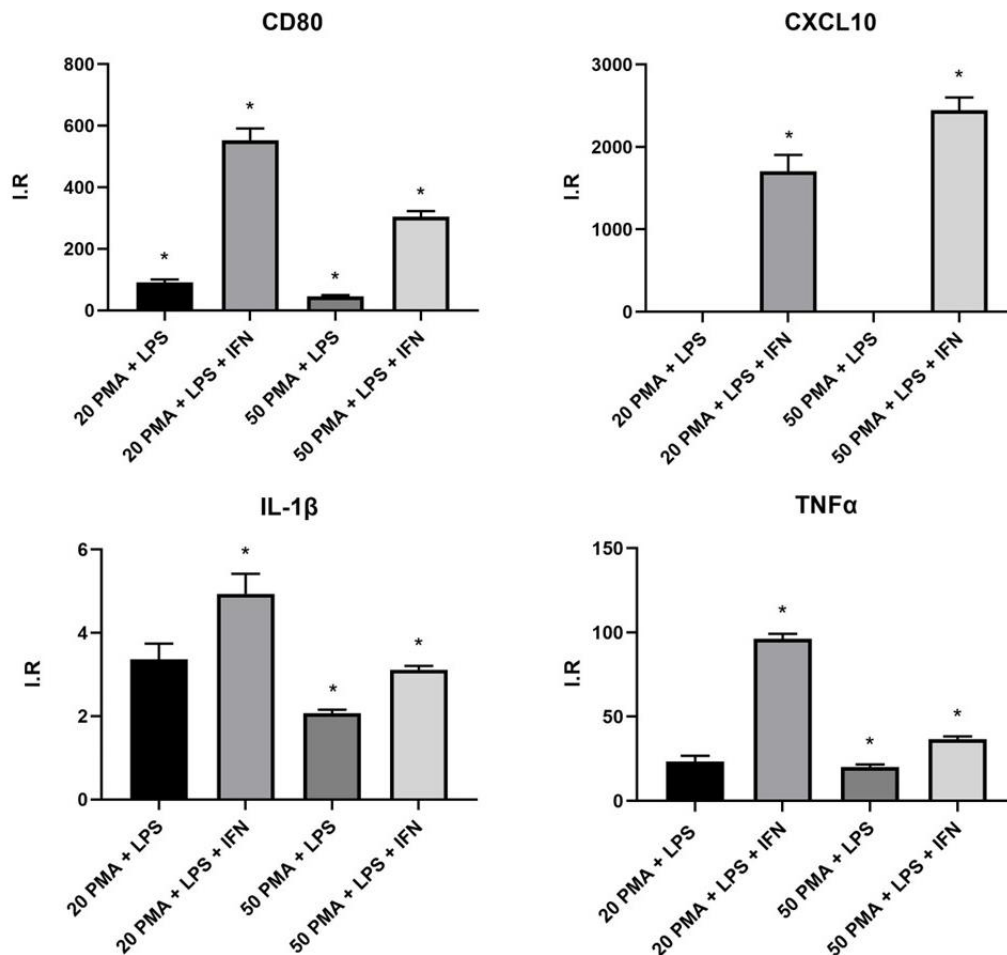


Figura 8. Expresión de los marcadores CD80, CXCL10, IL-1 β y TNF- α de macrófago tras la estimulación de la línea celular THP-1 con 20 ng/mL de PMA y 1 μ g/mL de LPS; 20 ng/mL de PMA, 1 μ g/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN; 50 ng/mL de PMA y 1 μ g/mL de LPS; 50 ng/mL de PMA, 1 μ g/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN (I.R, intensidad relativa). * Al menos $p < 0,01$, ($n=2$, t test) respecto a la expresión génica de las células únicamente tratadas con PMA (20 o 50 ng/mL).

Como se puede observar en la *Figura 8*, todos los genes escogidos aumentaron su expresión en las cuatro condiciones. Para analizar la significancia de los datos, se llevó a cabo un *t test* no pareado en un intervalo de confianza del 99%, empleando como controles de la expresión las muestras de células tratadas únicamente con PMA (20 y 50 ng/mL). Los resultados revelaron que cuando las células fueron tratadas con IFN, el aumento en la expresión de los marcadores fue significativo ($p < 0,01$).

Los genes CD80, IL-1 β y TNF- α , mostraron una expresión máxima cuando las células fueron tratadas con 20 ng/mL de PMA, 1 μ g/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN. Sin embargo, la máxima expresión del gen CXCL10 se observa a 50 ng/mL de PMA, 1 μ g/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN.

4.1.2 Viabilidad del proceso de diferenciación

Dado que el estudio de la expresión génica no permitió elegir de manera inequívoca el mejor protocolo de diferenciación, ya que la expresión variaba entre los diferentes marcadores elegidos, se realizó un estudio de viabilidad celular para determinar si todas las condiciones de estudio eran óptimas (*Figura 9*).

Los controles respecto a los que se calculó el porcentaje de viabilidad fueron las células tratadas con 20 y 50 ng/ml de PMA.

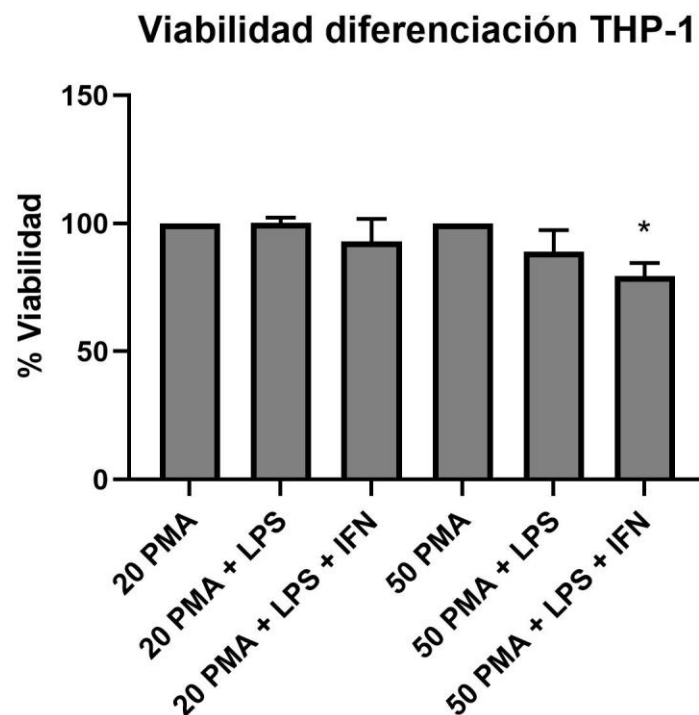


Figura 9. Resultados del ensayo MTT realizado durante el proceso de diferenciación de la línea celular THP-1. * Al menos $p < 0,01$, ($n = 3$, *t test*) respecto a las muestras tratadas únicamente con PMA (20 y 50 ng/mL).

Como se observa en la *Figura 9*, la viabilidad se mantuvo en las células THP-1 tratadas con PMA 20 ng/mL y sus diferentes combinaciones. Sin embargo, la combinación de la concentración más elevada de PMA (50 ng/mL) con LPS e IFN, resultó en una disminución significativa de la viabilidad alrededor de un 21% ($p < 0,01$).

Estos resultados, junto con los de expresión génica, nos permitieron escoger la condición 20 ng/mL de PMA, 1 µg/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN como la óptima para la diferenciación de la línea celular THP-1 a macrófagos M1.

4.2 Diferenciación de monocitos aislados de PBMCs

Con el objetivo de determinar cuál era la mejor fuente de macrófagos M1 para su cultivo con células hepáticas y uso en estudios de hepatotoxicidad, se realizaron cultivos de monocitos extraídos de sangre periférica y su diferenciación a macrófagos. Para ello, tras centrifugar la sangre y aislar la interfase de células mononucleares, se procedió al aislamiento de los monocitos. Para ello, tras respectivas centrifugaciones, las células se resuspendieron y sembraron durante 1 hora a 37 °C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo la capa adherente de la placa constituía la población de monocitos (*Figura 10 A*).

Después de eliminar la capa no adherente, se procedió con la diferenciación hacia macrófagos M0. Para ello las células se sembraron durante 7 días con medio de diferenciación, que contenía RPMI con 5 ng/mL de M-CSF (*Figura 10 B*). Finalmente, para estimular a M1, las células se estimularon durante 2 días con 10 ng/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN. Como se puede observar en la *Figura 10 C*, tras este estímulo las células mostraron una morfología estrellada similar a la de los macrófagos, con ramificaciones más pronunciadas que en el estadio M0.

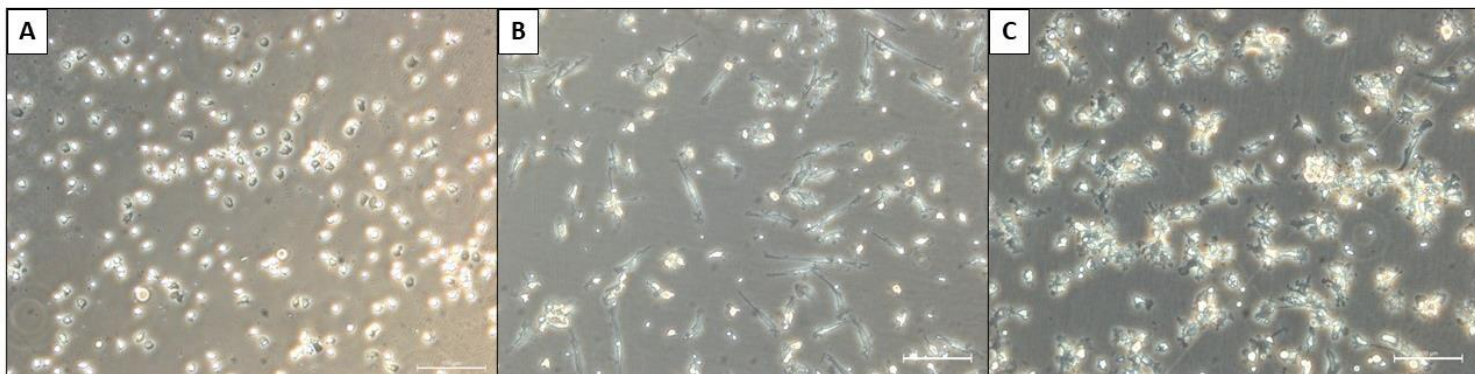


Figura 10. Proceso de diferenciación de monocitos extraídos de sangre periférica. A) Día 0 tras aislamiento. B) 7 días con medio de diferenciación. C) 2 días con IFN 20 ng/mL y LPS 1 µg/mL.

4.2.1 Expresión de marcadores de M1

Para comprobar si la diferenciación de los monocitos se había realizado correctamente, se estudió la expresión de los genes CD80, IL-1 β , TNF- α y CXCL10, marcadores típicos macrófago M1. De nuevo, el gen PBGD se usó como *housekeeping*.

Como se puede observar en la *Figura 11*, todos los genes escogidos aumentaron su expresión, aunque esta solo fue significativa en los genes IL-1 β y TNF- α ($p < 0,01$).

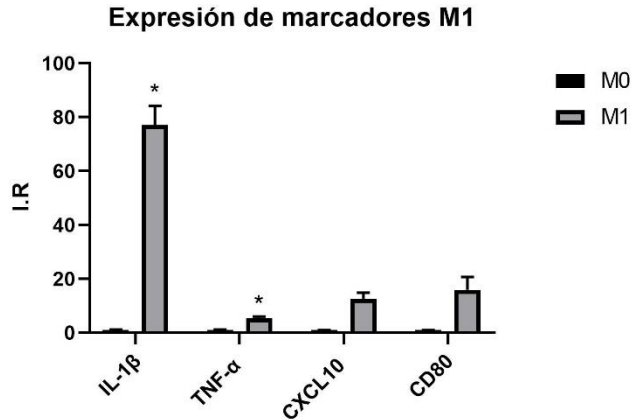


Figura 11. Expresión de marcadores de macrófago tras la estimulación de monocitos extraídos de sangre periférica (I.R: intensidad relativa). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un *t test* no pareado (* $p < 0,01$, $n = 2$), empleando como control la expresión génica en macrófagos M0.

4.3 Generación de co-cultivo HepG2:Macrófagos

4.3.1 Inmunofluorescencia

Una vez determinado el mejor protocolo de diferenciación de la línea celular THP-1 a fenotipo macrófago M1, se procedió a realizar un co-cultivo de los macrófagos diferenciados con células HepG2, un modelo ampliamente utilizado en estudios de hepatotoxicidad. Para ello, el primer paso fue realizar co-cultivos con diferentes proporciones celulares, imitando una proporción fisiológica (1:10) y situaciones inflamatorias (1:5 y 1:2). Como se puede observar (*Figura 12*), en las tres imágenes se observa una distribución homogénea de los marcadores de hepatocito y de macrófago.

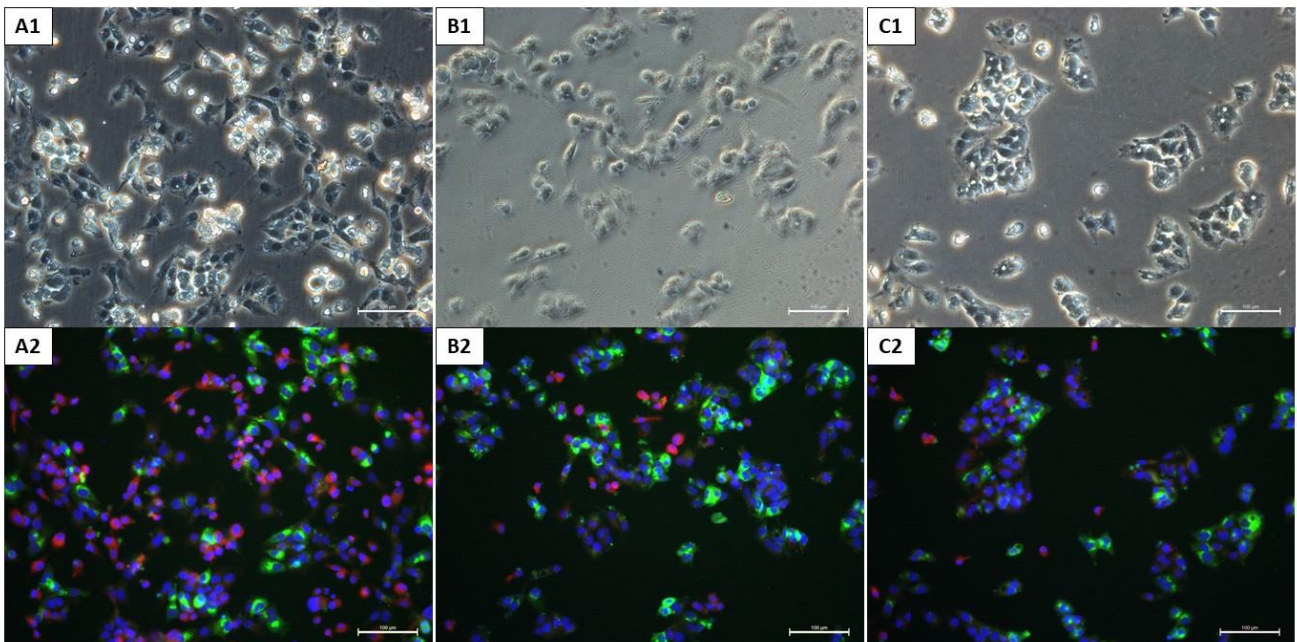


Figura 12. Inmunofluorescencia llevada a cabo en los co-cultivos. Como marcador de hepatocitos se observa la albúmina en color verde, en rojo se observa el marcador CD68 de macrófagos y en azul el núcleo celular. A) Co-cultivo en proporción 1:2. B) Co-cultivo en proporción 1:5. C) Co-cultivo en proporción 1:10.

4.3.2 Viabilidad del co-cultivo

Una vez determinado que se podían co-cultivar las células HepG2 y las THP-1 M1, se estudió la viabilidad de los co-cultivos (Figura 13).

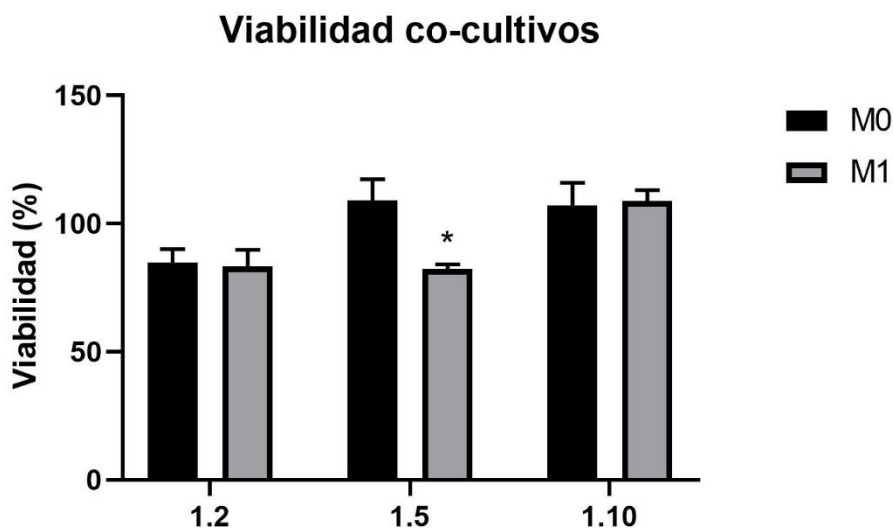


Figura 13. Viabilidad de los co-cultivos a diferentes proporciones celulares y con macrófagos en sus estadios M0 y M1. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un *t test* no pareado (* $p < 0,01$, $n = 3$) respecto a cultivos HepG2.

Los co-cultivos con una mayor proporción de células tipo hepatocito (1:10) mostraron una viabilidad alta y no se observaron diferencias significativas dependiendo del tipo de macrófago (M0 o M1) subcultivado. En cambio, cuando se usaron mayores proporciones de macrófagos en el subcultivo, se observó una disminución de la viabilidad, principalmente en el co-cultivo de M1 a la proporción 1:5, en el que se observan diferencias significativas respecto al monocultivo de HepG2 ($p < 0,01$).

4.4 Estudio de hepatotoxicidad inducida por fármacos

Con el objetivo de determinar la idoneidad de los co-cultivos como modelo de estudio de la hepatotoxicidad, se llevó a cabo el análisis del efecto de la TGZ sobre un cultivo clásico de HepG2 y sobre los propios co-cultivos a diferentes proporciones celulares.

Con la idea de recrear una situación proinflamatoria, se estimularon los co-cultivos con LPS, según otros protocolos descritos en la literatura (Granitzny et al., 2017). El LPS es un potente activador de los macrófagos, que desencadena la secreción de múltiples citoquinas desde los mismos. Aunque el efecto del LPS se ha descrito en células inmunes, se quiso descartar un posible efecto en las células hepáticas. Por tanto, el primer objetivo fue determinar si el LPS podía tener algún efecto en las células HepG2 y si la toxicidad con la TGZ variaba en presencia de este compuesto (Figura 14). No se observaron efectos tóxicos de LPS en las células HepG2. De igual manera, como se muestra en la Figura 14, no hubo un efecto sinérgico del LPS y la TGZ, por lo que se procedió a estudiar los efectos en los co-cultivos desarrollados.

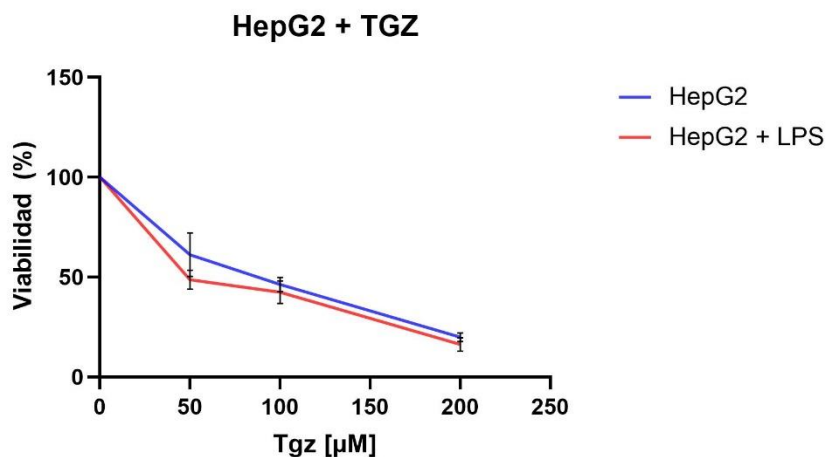


Figura 14. Estudio de la viabilidad en cultivos de HepG2 tratados con TGZ.

El siguiente paso fue estudiar la toxicidad de la TGZ en los diferentes co-cultivos desarrollados y compararlos con los monocultivos de HepG2. En este caso, todos los tratamientos se realizaron en presencia de LPS para estimular la situación pro-inflamatoria. En los co-cultivos en proporción 1:10, es decir, en aquellos que se emulan las condiciones fisiológicas, se observó una disminución de la viabilidad concentración dependiente al tratarlos con TGZ. En este modelo de co-cultivo, la TGZ resultó ser más tóxica en los monocultivos de HepG2 que en los co-cultivos con macrófagos M0 y M1, aunque las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en los co-cultivos con M1 y a la concentración de 100 μM. En estas condiciones, los macrófagos M1 ofrecerían un papel protector, aunque habría que explorar otros fármacos y condiciones para confirmar dicho efecto (*Figura 15*).

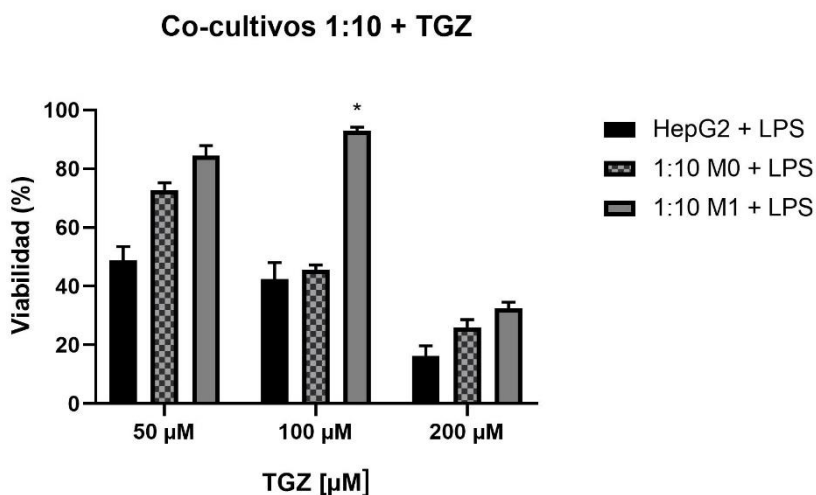


Figura 15. Estudio de iDILI en co-cultivo 1:10 con macrófagos en estadio M0 y M1. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un *t test* no pareado (* $p < 0,01$, $n = 3$), respecto a los cultivos de HepG2 tratados con TGZ.

Sin embargo, en los co-cultivos a la proporción 1:2, si se observa una disminución significativa de la viabilidad en presencia de macrófagos M1, tanto a la concentración de 50 como a la de 100 μM de TGZ, que sería debido al ambiente inflamatorio causado por la mayor presencia de macrófagos activados con LPS. Los macrófagos M0 no mostraron un efecto sinérgico, e incluso mostraron una viabilidad incrementada (*Figura 16*).

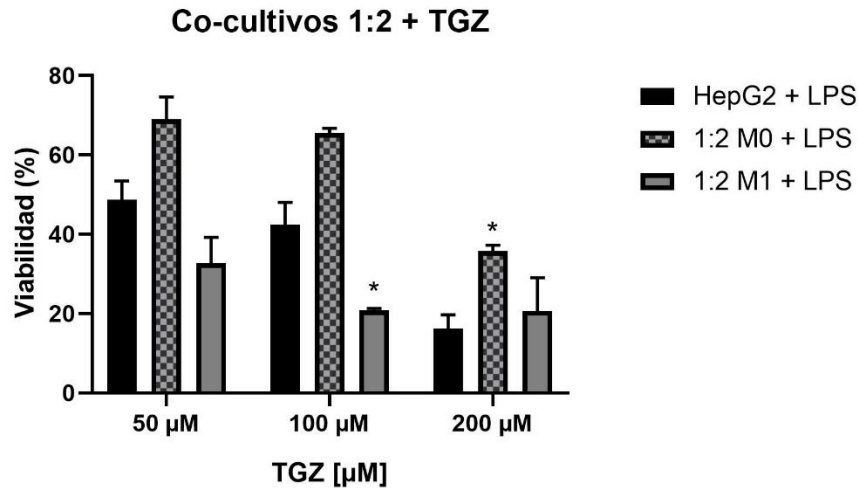


Figura 16. Estudio de iDILI en co-cultivos 1:2 con macrófagos en estadio M0 y M1. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un *t test* no pareado (* $p < 0,01$, $n = 3$), respecto a los cultivos de HepG2 tratados con TGZ.

5. DISCUSIÓN

El iDILI representa un grave problema de para la población general y para la industria farmacéutica, ya que es una de las principales causas de retirada de fármacos en ensayos clínicos y en fase de comercialización. Esto se debe en gran medida a la ausencia de modelos predictivos para su rápida detección en las fases preclínicas del desarrollo de fármacos (Alempijevic et al., 2017; Gómez-Lechón, Tolosa, & Donato, 2014; Granitzny et al., 2017; Pelechá et al., 2017).

En los últimos años han surgido nuevos modelos *in vitro* que permiten detectar la hepatotoxicidad causada por fármacos en fases preclínicas y con una mayor sensibilidad que los modelos animales (Gómez-Lechón, Tolosa & Donato, 2014; Pelechá et al., 2017). Entre ellos se encuentra el cultivo de PHH, *gold* estándar en hepatología, o los co-cultivos de PHH o células tipo hepatocito como líneas celulares inmortalizadas en combinación con otras NPC y separadas por *transwells*. Sin embargo, estos novedosos modelos de estudio no abordan las complejas interacciones celulares (Tasnim et al., 2021).

Mediante el co-cultivo de hepatocitos y macrófagos propuesto en el presente trabajo, se pretende diseñar un nuevo modelo *in vitro* que permita llevar a cabo la detección del iDILI en fases preclínicas. Este prototipo se basa en el uso de la línea celular humana HepG2, que como principal ventaja presenta una alta disponibilidad en comparación con los PHH y permite estudiar los mecanismos celulares del daño hepático (Kyffin et al., 2018; Soldatow et al., 2013). Estas células se estudiarán en combinación de macrófagos M1, que imitarían las funciones de las KC en el hígado.

Los hepatocitos llevan a cabo la mayoría de las funciones asociadas al hígado, mientras que los macrófagos juegan un papel fundamental en la respuesta inmune (Dixon et al., 2013; Godoy et al., 2013; Gómez-Lechón, Tolosa, & Donato, 2014; Naito et al., 2004). Se sabe que los productos liberados por macrófagos activados contribuyen a la hepatotoxicidad, al actuar directamente sobre los hepatocitos. Es posible que estas respuestas celulares influyan en la aparición de iDILI y por tanto no se pueden reproducir en sistemas que únicamente se centren en los hepatocitos (Dixon et al., 2013; Granitzny et al., 2017).

Por tanto, dado que el iDILI en ocasiones requiere de la participación de macrófagos, se ha planteado el co-cultivo de este tipo celular junto con hepatocitos HepG2 para desarrollar un modelo de estudio más sensible y con un mayor poder predictivo que el cultivo de hepatocitos por sí solos.

Dada la dificultad para obtener cultivos primarios de KC, se eligió el uso de macrófagos diferenciados a partir de monocitos. La primera fase fue la optimización de los protocolos de diferenciación, así como la caracterización de las poblaciones celulares obtenidas. Como fuente de células tipo monocitos se eligieron tanto monocitos primarios aislados de sangre periférica como una línea celular de más fácil manejo, las células THP-1.

Para optimizar el protocolo de diferenciación, se eligió la línea celular THP-1, con la que se estudiaron dos concentraciones diferentes de PMA, 20 y 50 ng/mL durante 72 horas según lo descrito en la bibliografía (Baxter et al., 2020; Park et al., 2007). Este compuesto permitiría la adherencia y la diferenciación celular hacia un fenotipo M0 de macrófago (Auwerx, 1991; Baxter et al., 2020). A continuación, la administración de PMA se estudió en combinación de 1 µg/mL de LPS y 1 µg/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN durante 24 horas. Estas citoquinas permitirán la diferenciación hacia M1, dando lugar a células que expresan marcadores típicos de macrófago (Baxter et al., 2020). Los estudios morfológicos (*Figura 5* y *Figura 6*) y de expresión tanto por inmunofluorescencia (*Figura 7*) como mediante el análisis de expresión génica (*Figura 8*), demostraron que las células diferenciadas expresaban marcadores típicos de macrófago M1 (IL-1β, CD80, TNF-α y CXCL10), que mostraron una máxima expresión cuando las células fueron tratadas con LPS e IFN. La ausencia de diferencias significativas entre los diferentes protocolos aplicados llevó a analizar la supervivencia celular para comprobar que ésta no se viera afectada (*Figura 9*). Los resultados mostraron que en las condiciones en las que se emplea PMA 50 ng/mL, 1 µg/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN, la supervivencia celular disminuye significativamente. Estos resultados llevaron a considerar como óptimo el protocolo con la menor concentración de PMA (20 ng/mL) en combinación de 1 µg/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN.

En el caso de los PBMCs, tras su diferenciación siguiendo el protocolo previamente optimizado, adquirieron una morfología estrellada (*Figura 10*) y aumentaron significativamente la expresión de los marcadores IL-1β y TNF-α, típicos de macrófagos M1 (*Figura 11*). Estos datos indican que la diferenciación se llevó a cabo y que estos macrófagos podrían ser candidatos para su estudio en los co-cultivos.

Finalmente, únicamente se llevaron a cabo co-cultivos con la línea celular THP-1 ya que la obtención de PBMCs es un proceso invasivo y su aislamiento es costoso. Sin embargo, también sería interesante estudiar el uso de estas células diferenciadas ya que permitirían analizar las variaciones entre pacientes y podrían constituir un modelo de estudio individualizado.

Los co-cultivos con macrófagos derivados de la línea celular THP-1 se llevaron a cabo empleando diferentes proporciones celulares (1:2, 1:5 y 1:10). En los tres casos, se mantuvieron los marcadores de macrófago CD68 y la albúmina como marcador de hepatocito (*Figura 12*).

El siguiente paso fue analizar la viabilidad a las tres proporciones celulares (*Figura 13*). Los resultados indicaron que, a mayor concentración de macrófagos, la viabilidad disminuyó, sin embargo, este descenso solo fue significativo en el co-cultivo de M1 a la proporción 1:5 respecto al monocultivo de HepG2. Esto puede deberse a que los macrófagos activados afecten a la supervivencia de los hepatocitos, sin embargo, en el ratio 1:2, no se observó este descenso. Aun así, para el estudio de la hepatotoxicidad finalmente sólo se escogieron dos proporciones celulares, 1:2 y 1:10 que simularían un estado inflamatorio y uno fisiológico, respectivamente.

Finalmente, el modelo de estudio propuesto se analizó para evaluar su potencial como nuevo modelo *in vitro* en el estudio de hepatotoxicidad. El fármaco escogido para llevar a cabo dicha investigación fue la TGZ, un medicamento que se ha descrito puede inducir iDILI en determinados pacientes (Woodhead et al., 2017).

Tal y como se ha demostrado en diferentes modelos celulares (Edling et al., 2009; Granitzny et al., 2017), la TGZ provocó una disminución significativa de la viabilidad en comparación con cultivos control en todos los modelos de estudio (monocultivos de HepG2 y co-cultivos). El co-cultivo a una proporción celular 1:2 (Figura 16) que imitaría el estado super-inflamatorio que se observa *in vivo* en determinadas condiciones patológicas, resultó en una mayor sensibilidad para la detección de la hepatotoxicidad de la TGZ, ya que la disminución de la viabilidad fue mayor. Esto indicaría que las células THP-1 diferenciadas a macrófagos M1 y activados con LPS, ejercerían un efecto sinérgico en la toxicidad inducida por la TGZ. Sin embargo, en las condiciones de co-cultivo que imitarían un hígado sano (1:10), la respuesta al fármaco fue diferente (Figura 15), por lo que se requerirían más estudios y analizar la respuesta a otros fármacos modelo, tanto positivos de iDILI como fármacos en los que no se ha descrito un papel del sistema inmune, para validar nuestro sistema y determinar su sensibilidad y especificidad para predecir la hepatotoxicidad inducida por fármacos. Finalmente, el co-cultivo de estas células en matrices 3D, probablemente recapitularía mejor el fenotipo hepático y contribuiría a generar modelos más robustos.

6. CONCLUSIONES

Después de la realización del presente trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha establecido un protocolo óptimo de diferenciación de la línea celular THP-1 hacia macrófagos M1 mediante el estímulo morfológico y de expresión de marcadores específicos.
- Se ha conseguido diferenciar PBMC obtenidas a partir de sangre periférica y su diferenciación hacia macrófagos M1 mediante el protocolo previamente establecido en la línea celular THP-1, lo que confirmaría la idoneidad del mismo.
- Se ha realizado y caracterizado un nuevo modelo *in vitro* de co-cultivo de células HepG2 y THP-1 diferenciadas a macrófago M1, que presentan buena viabilidad y mantienen la expresión de marcadores específicos.
- Se ha observado una mayor sensibilidad de los co-cultivos a la TGZ en comparación con las HepG2 solas, lo que demuestra la importancia de la presencia de células inmunitarias en los sistemas *in vitro* para el estudio de la hepatotoxicidad idiosincrática causada por fármacos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alempijevic, T., Zec, S., & Milosavljevic, T. (2017). Drug-induced liver injury: Do we know everything? En *World Journal of Hepatology* (Vol. 9, Issue 10, pp. 491-502). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i10.491>
- Almazroo, O. A., Miah, M. K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. En *Clinics in Liver Disease* (Vol. 21, Issue 1, pp. 1-20). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>

- Arzumanian, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. v. (2021). The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13135. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 47(1), 22-31. <https://doi.org/10.1007/BF02041244>
- Bachmann, A., Moll, M., Gottwald, E., Nies, C., Zantl, R., Wagner, H., Burkhardt, B., Sánchez, J., Ladurner, R., Thasler, W., Damm, G., & Nussler, A. (2015). 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays*, 4(1), 64-83. <https://doi.org/10.3390/microarrays4010064>
- Baxter, E. W., Graham, A. E., Re, N. A., Carr, I. M., Robinson, J. I., Mackie, S. L., & Morgan, A. W. (2020). Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *Journal of Immunological Methods*, 478, 112721. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721>
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. En *International Immunopharmacology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 37-45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Choi, J. M., Oh, S. J., Lee, S. Y., Im, J. H., Oh, J. M., Ryu, C. S., Kwak, H. C., Lee, J.-Y., Kang, K. W., & Kim, S. K. (2015). HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*, 38(5), 691-704. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0502-6>
- Clària, J., & Titos, E. (2004). La célula de Kupffer. *Gastroenterología y Hepatología*, 27(4), 264-273.
- Costantini, S., di Bernardo, G., Cammarota, M., Castello, G., & Colonna, G. (2013). Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene*, 518(2), 335-345. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.106>
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer Cells in the Liver. En *Comprehensive Physiology* (pp. 785-797). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>
- Edling, Y., Sivertsson, L. K., Butura, A., Ingelman-Sundberg, M., & Ek, M. (2009). Increased sensitivity for troglitazone-induced cytotoxicity using a human in vitro co-culture model. *Toxicology in Vitro*, 23(7), 1387-1395. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.026>
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., & Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 15(1), 577. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1546-9>
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Bode, J. G., Bolleyn, J., Borner, C., Böttger, J., Braeuning, A., Budinsky, R. A., Burkhardt, B., Cameron, N. R., Camussi, G., Cho, C. S., Choi, Y. J., Craig Rowlands, J., Dahmen, U., ... Hengstler, J. G. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. En *Archives of Toxicology* (Vol. 87, Issue 8, pp. 1315-1530). <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>

- Gómez-Lechón, M. J., Tolosa, L., Conde, I., & Donato, M. T. (2014). Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *10*(11), 1553-1568. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.967680>
- Gómez-Lechón, M. J., Tolosa, L., & Donato, M. T. (2014). Cell-based models to predict human hepatotoxicity of drugs. *Revista de Toxicología*, *31*, 149-156.
- Granitzny, A., Knebel, J., Müller, M., Braun, A., Steinberg, P., Dasenbrock, C., & Hansen, T. (2017). Evaluation of a human in vitro hepatocyte-NPC co-culture model for the prediction of idiosyncratic drug-induced liver injury: A pilot study. *Toxicology Reports*, *4*, 89-103. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.02.001>
- Grant, D. M. (1991). Detoxification Pathways in the Liver. En *J. Inher. Metab. Dis* (Vol. 14).
- Huppert, S. S., & Iwafuchi-Doi, M. (2019). *Molecular regulation of mammalian hepatic architecture* (pp. 91-136). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.003>
- Katarey, D., & Verma, S. (2016). Drug-induced liver injury. *Clinical Medicine*, *16*(Suppl 6), s104-s109. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-6-s104>
- Kuna, L., Bozic, I., Kizivat, T., Bojanic, K., Mrso, M., Kralj, E., Smolic, R., Wu, G. Y., & Smolic, M. (2018). Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) – Current Issues and Future Perspectives. *Current Drug Metabolism*, *19*(10), 830-838. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180523095355>
- Kyffin, J. A., Sharma, P., Leedale, J., Colley, H. E., Murdoch, C., Mistry, P., & Webb, S. D. (2018). Impact of cell types and culture methods on the functionality of in vitro liver systems – A review of cell systems for hepatotoxicity assessment. *Toxicology in Vitro*, *48*, 262-275. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.023>
- Leise, M. D., Poterucha, J. J., & Talwalkar, J. A. (2014). Drug-Induced Liver Injury. *Mayo Clinic Proceedings*, *89*(1), 95-106. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.09.016>
- Lorente, S., Hautefeuille, M., & Sanchez-Cedillo, A. (2020). The liver, a functionalized vascular structure. *Scientific Reports*, *10*(1), 16194. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73208-8>
- Ma, L., Wu, Y., Li, Y., Aazmi, A., Zhou, H., Zhang, B., & Yang, H. (2020). Current Advances on 3D-Bioprinted Liver Tissue Models. *Advanced Healthcare Materials*, *9*(24), 2001517. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001517>
- Moreno, R. (2002). Hepatotoxicidad por fármacos. *Revista Española de Reumatología*, Vol. 1. Núm. S1., 1:60-71.
- Mueller, D., Heinzle, E., & Noor, F. (2013). 3D Hepatic In Vitro Models as Tools for Toxicity Studies. *Current Tissue Engineering*, *2*(1), 78-89. <https://doi.org/10.2174/2211542011302010007>
- Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y., & Yamamoto, T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Medical Electron Microscopy*, *37*(1), 16-28. <https://doi.org/10.1007/s00795-003-0228-x>
- Navarro, V. J., & Senior, J. R. (2006). Drug-Related Hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine*, *354*(7), 731-739. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052270>

- Norman, B. H. (2020). Drug Induced Liver Injury (DILI). Mechanisms and Medicinal Chemistry Avoidance/Mitigation Strategies. En *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 63, Issue 20, pp. 11397-11419). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00524>
- Padberg, F., Höper, T., Henkel, S., Driesch, D., Luch, A., & Zellmer, S. (2021). Novel indirect co-culture of immortalised hepatocytes with monocyte derived macrophages is characterised by pro-inflammatory cytokine networks. *Toxicology in Vitro*, *73*, 105134. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105134>
- Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, *56*(1), 45-50. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-6115-5>
- Pelechá, M., Gómez-Lechón, M., Tolosa, L., & Donato, M. (2017). Hepatocitos Humanos Upcytes como modelo experimental in vitro para el estudio del daño hepático inducido por fármacos a largo plazo. *Revista de Toxicología*, *34*, 109-117.
- Qin, Z. (2012). The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, *221*(1), 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.003>
- Reuben, A., Koch, D. G., & Lee, W. M. (2010). Drug-induced acute liver failure: Results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology*, *52*(6), 2065-2076. <https://doi.org/10.1002/hep.23937>
- Segovia-Zafra, A., di Zeo-Sánchez, D. E., López-Gómez, C., Pérez-Valdés, Z., García-Fuentes, E., Andrade, R. J., Lucena, M. I., & Villanueva-Paz, M. (2021). Preclinical models of idiosyncratic drug-induced liver injury (iDILI): Moving towards prediction. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *11*(12), 3685-3726. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.11.013>
- Soldatow, V. Y., LeCluyse, E. L., Griffith, L. G., & Rusyn, I. (2013). In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol. Res.*, *2*(1), 23-39. <https://doi.org/10.1039/C2TX20051A>
- Tasnim, F., Huang, X., Lee, C. Z. W., Ginhoux, F., & Yu, H. (2021). Recent Advances in Models of Immune-Mediated Drug-Induced Liver Injury. *Frontiers in Toxicology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/ftox.2021.605392>
- Tedesco, S., de Majo, F., Kim, J., Trenti, A., Trevisi, L., Fadini, G. P., Bolego, C., Zandstra, P. W., Cignarella, A., & Vitiello, L. (2018). Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Frontiers in Pharmacology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00071>
- Thompson, W. L., & Takebe, T. (2021). Human liver model systems in a dish. *Development, Growth & Differentiation*, *63*(1), 47-58. <https://doi.org/10.1111/dgd.12708>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, *27*(21), R1147-R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Verneti, L. A., Vogt, A., Gough, A., & Taylor, D. L. (2017). Evolution of Experimental Models of the Liver to Predict Human Drug Hepatotoxicity and Efficacy. *Clinics in Liver Disease*, *21*(1), 197-214. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.013>

Woodhead, J. L., Watkins, P. B., Howell, B. A., Siler, S. Q., & Shoda, L. K. M. (2017). The role of quantitative systems pharmacology modeling in the prediction and explanation of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 32(1), 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2016.11.008>