



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 (ETSIAMN)

“DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE COLÁGENO I/ÁCIDO HIALURÓNICO CON HEPATOCITOS DERIVADOS DE iPSCs COMO MODELO 3D PARA EL ENSAYO DE MEDICAMENTOS HEPATOTÓXICOS”

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: ESTELA SÁNCHEZ GONZÁLEZ

TUTORA: GLORIA GALLEGO FERRER

COTUTORA: LAIA TOLOSA PARDO

CURSO ACADÉMICO: 2019-2020

VALENCIA, JUNIO DE 2020

Agradecimientos

Este proyecto no habría sido posible sin la ayuda de mis tutoras, Dra. Gloria Gallego y Dra. Laia Tolosa. Quiero darles gracias por darme la oportunidad de trabajar con ellas y por acogerme como una más. Agradecer la paciencia, la dedicación y la profesionalidad que han mostrado conmigo. Sobre todo, por transmitirme tranquilidad cuando más lo he necesitado, por encontrar siempre una solución y por transmitirme sus conocimientos con una sonrisa. También agradecer al Dr. Joaquín Ródenas por su apoyo durante mi estancia en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) en la UPV. Agradecerle todo el apoyo durante la realización del proyecto y por todas las aclaraciones y explicaciones que me han supuesto una fuente de conocimientos imprescindible para crecer profesionalmente.

En segundo lugar, agradecer a todo el personal del CBIT por su acogida y por ayudarme siempre que ha sido necesario. Sin olvidar las reuniones, los almuerzos con los compañeros y todos los momentos cargados de risas que me han ayudado a trabajar día tras día sin perder la ilusión. Gracias también a Sandra y María por acogerme desde el principio y por ayudarme demostrándome que, aunque el camino es difícil, al final hay satisfacción por el trabajo bien hecho.

Gracias a mis amigas del grado por aguantar todas mis quejas y, sobre todo, por escucharme. Sin sus consejos y sin las quedadas, estos cuatro años habrían parecido una eternidad.

No puedo finalizar los agradecimientos sin darle las gracias a los que realmente han hecho posible que yo llegue hasta aquí: mis padres y hermana. Ha sido su esfuerzo día a día y su amor lo que me ha ayudado a mejorar como persona. Me han dejado tropezar para aprender y me han enseñado a luchar por lo que realmente quiero. Sobre todo, a mi hermana por darme la mano y por acompañarme en el camino.

Gracias a todos.

RESUMEN

El objetivo de este proyecto es el diseño experimental de la síntesis de hidrogeles como modelo 3D para el cultivo de células hepáticas de cara a su empleo como plataformas de hepatotoxicidad *in vitro*. Los materiales y procedimientos seleccionados están basados en literatura existente y consisten en una combinación de macromoléculas presentes en la matriz extracelular del hígado. Primeramente, se explica la síntesis de los hidrogeles combinados de colágeno tipo I y ácido hialurónico (HA) en forma de redes interpenetradas, detallando la química de las reacciones y la evaluación de las propiedades biomecánicas. Asimismo, se describe la obtención de *induced pluripotent stem cells* (iPSCs) a partir de células de sangre humana y la diferenciación hasta *hepatocyte-like cells* (HLCs). Además, se describen los métodos de caracterización de ambos tipos celulares. Por otro lado, se plantea la encapsulación de las HLCs en los hidrogeles para evaluar la capacidad de mantener la funcionalidad y el fenotipo celular. La comparación del cultivo 3D con el cultivo de HLCs en monocapa, permite valorar si el modelo 3D es más predictivo que el cultivo en monocapa. Se lleva a cabo el planteamiento de la idoneidad del modelo para la evaluación de la hepatotoxicidad inducida por fármacos, tras la exposición a 15 fármacos modelo y el estudio mediante un ensayo de high-content screening (HCS) en el que se evalúan simultáneamente diferentes *endpoints* para determinar la capacidad predictiva del modelo. Se plantea el cultivo de la línea HepG2 para estandarizar los protocolos y realizar una puesta a puesto en un modelo más sencillo, pudiendo determinar si el modelo propuesto es adecuado. Por último, tras la selección del hidrogel óptimo en base a las características descritas en la literatura, la descripción del desarrollo del modelo *in vitro*, y el planteamiento del ensayo de hepatotoxicidad, se realiza una justificación de la posible eficacia e idoneidad del mismo para su uso en el ensayo de fármacos hepatotóxicos. El cultivo 3D de HLCs en hidrogeles de Col/HA intenta recrear el microambiente hepático favoreciendo las interacciones célula-célula, asegurando así el cultivo celular a largos tiempos y su uso en ensayos de hepatotoxicidad crónica. Mediante el cultivo en hidrogeles, y en base a la composición y propiedades biomecánicas de los mismos, se espera proporcionar un ambiente análogo al natural que asegure la capacidad de predicción del modelo propuesto.

Palabras clave: hidrogeles, cultivo 3D, DILI, iPSCs, hepatotoxicidad, HCS.

RESUM

L'objectiu del projecte és el disseny experimental de síntesi d'hidrogels com a model 3D per al cultiu de cèl·lules hepàtiques per al seu ús com a plataformes d'hepatotoxicitat *in vitro*. Els materials i els procediments seleccionats estan basats en la literatura existent i consisteixen en una combinació de macromolècules presents en la matriu extracel·lular del fetge. Primer s'explica la síntesi dels hidrogels combinats de col·lagen tipus I i àcid hialurònic en forma de xarxes interpenetrades, detallant la química de les reaccions i l'avaluació de les propietats biomecàniques. Així mateix, es descriu l'obtenció de cèl·lules pluripotents induïdes (iPSCs) a partir de cèl·lules de sang humana i la seva diferenciació a *hepatocyte-like cells* (HLCs). A més, es descriuen els mètodes de caracterització dels dos tipus cel·lulars. Per altra banda, es planteja l'encapsulació de les HLCs en els hidrogels per a avaluar la capacitat de mantenir la funcionalitat i el fenotip cel·lular. La comparació del cultiu 3D amb el cultiu d'HLCs en monocapa, permet valorar si el model 3D és més predictiu que el cultiu en monocapa. Es du a terme el plantejament de la idoneïtat del model per a l'avaluació de l'hepatotoxicitat induïda per fàrmacs, després d'exposar-lo a 15 fàrmacs model i l'estudi mitjançant *high-content screening* (HCS) que permet l'avaluació simultània de diferents *endpoints* per a determinar la capacitat predictiva del model. Es planteja el cultiu de la línia cel·lular HepG2 per a estandarditzar els protocols i realitzar una posada a punt en un model més senzill que permeti determinar si el model proposat és adequat. Per últim, després de la selecció de l'hidrogel òptim en base a les característiques descrites a la literatura, la descripció del desenvolupament del model *in vitro* i el plantejament de l'assaig d'hepatotoxicitat, es realitza una justificació de la possible eficàcia i idoneïtat per al seu ús per a l'estudi de fàrmacs hepatotòxics. El cultiu 3D d'HLCs en hidrogels de Col/HA intenta recrear el microambient hepàtic afavorint les interaccions cèl·lula-cèl·lula, assegurant així el cultiu cel·lular a temps llargs i el seu ús en assajos d'hepatotoxicitat crònica. Mitjançant el cultiu en hidrogels, i en base a la composició i propietats biomecàniques d'ells, s'espera proporcionar un ambient anàleg al natural que asseuri la capacitat de predicció del model proposat.

Paraules clau: hidrogels, cultiu 3D, DILI, iPSCs, hepatotoxicitat, HCS.

ABSTRACT

The main objective of this project is the experimental design of a hydrogel as a 3D model for the culture of hepatocytes and its use as an *in vitro* hepatotoxicity platform. The selection of materials and procedures is based on scientific literature and consists of a combination of macromolecules present in the extracellular matrix of the liver. First, the synthesis of combined hydrogels of collagen type I and hyaluronic acid, resulting in an interpenetrating network, is explained. Then, the chemistry of the reactions and how to evaluate the biomechanical properties is detailed. The reprogramming of human blood cells to obtain iPSCs and their differentiation to hepatocytes are described. In addition, methods for the characterization of both cell types are outlined. On one side, the encapsulation of iPSCs-derived hepatocytes in hydrogels, as well as the procedures for the hepatic differentiation of iPSCs to hepatocyte-like cells (HLCs) is detailed. Therefore, the *in vitro* model is based on the 3D culture of HLCs on collagen and HA hydrogels. On the other side, the encapsulation of HLCs in hydrogels is proposed to evaluate the capacity to maintain cell functionality and phenotype. The comparison of the 3D culture with monolayer HLC culture allows us to assess whether the 3D model is more predictive than monolayer culture. The ability of the model for the prediction of drug-induced hepatotoxicity is assessed after the exposure to 15 drugs and the analysis by a high-content screening (HCS) in which different endpoints are simultaneously evaluated. The culture of the HepG2 line is proposed to standardize the protocols and carry out a set up in a simpler model, being able to determine if the proposed model is adequate. Finally, after selecting the optimal hydrogel based on the bibliography, describing the development of the *in vitro* model, and planning the hepatotoxicity test, the efficacy and suitability for its use in the testing of hepatotoxic drugs is justified. The 3D culture of HLCs in Col/HA hydrogels tries to recreate the hepatic microenvironment favouring cell-cell interactions, thus ensuring long term cell culture and its use in chronic hepatotoxicity assays. By means of the hydrogel culture, and based on its composition and biomechanical properties, it is expected to provide an environment analogous to the natural one that assures the predictive capacity of the proposed model.

Keywords: hydrogels, 3D culture, DILI, iPSCs, hepatotoxicity, HCS.

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. EL HÍGADO | 1 |
| 1.2. DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS | 3 |
| 1.3. MODELOS DE HEPATOTOXICIDAD <i>IN VITRO</i> | 4 |
| 1.4. HIDROGELES COMO MODELOS 3D DE HEPATOTOXICIDAD | 7 |
| 2. HIPÓTESIS | 11 |
| 3. OBJETIVOS | 12 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 12 |
| 4.1. MATERIALES | 12 |
| 4.1.1. <i>Biopolímeros</i> | 12 |
| 4.1.2. <i>Síntesis y caracterización de hidrogeles</i> | 12 |
| 4.1.3. <i>Materiales para el cultivo celular</i> | 13 |
| 4.2. HIDROGELES | 15 |
| 4.2.1. <i>Modificaciones químicas</i> | 15 |
| 4.2.1.1. <i>Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular (HA-LMW)</i> | 15 |
| 4.2.1.2. <i>Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular con injerto de tiramina (HA-Tyr)</i> | 16 |
| 4.2.1.3. <i>Determinación del grado de sustitución de tiramina</i> | 16 |
| 4.2.2. <i>Entrecruzamiento</i> | 17 |
| 4.2.3. <i>Tiempo de gelificación y propiedades biomecánicas</i> | 19 |
| 4.2.4. <i>Hinchado de equilibrio</i> | 20 |
| 4.3. CÉLULAS | 20 |
| 4.3.1. <i>Línea HepG2</i> | 20 |
| 4.3.2. <i>Hepatocitos derivados de induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)</i> | 21 |
| 4.3.2.1. <i>Reprogramación de PBMCs a iPSCs</i> | 21 |
| 4.3.2.2. <i>Caracterización de iPSCs</i> | 23 |
| 4.3.2.3. <i>Diferenciación de iPSCs a HLCs</i> | 23 |
| 4.3.2.4. <i>Caracterización celular</i> | 24 |
| 4.4. CULTIVO 3D | 25 |
| 4.4.1. <i>Encapsulación celular</i> | 25 |
| 4.4.2. <i>Viabilidad y funcionalidad celular</i> | 26 |
| 4.4.2.1. <i>Viabilidad celular</i> | 26 |
| 4.4.2.2. <i>Funcionalidad celular</i> | 26 |
| 4.4.3. <i>Estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos</i> | 27 |
| 5. DISCUSIÓN | 30 |
| 6. CONCLUSIONES | 33 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 34 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. CANAL SINUSOIDAL HEPÁTICO CARACTERÍSTICO DEL LOBULILLO HEPÁTICO Y COMPONENTES ESPECÍFICOS DE LA MEC..... | 2 |
| FIGURA 2. REACCIÓN DE INJERTO DE TYR EN HA. EDC Y NHS SE EMPLEAN COMO CATALIZADORES Y ACTIVADORES DE LA REACCIÓN (LEE ET AL., 2008; SANMARTÍN, 2016). | 16 |
| FIGURA 3. ENTRECruzAMIENTO ENZIMÁTICO MEDIANTE HRP EN PRESENCIA DE H ₂ O ₂ DE LAS CADENAS DE HA-Tyr..... | 17 |
| FIGURA 4. REACCIÓN ENTRE COLÁGENO Y 4S-STARPEG. LOS GRUPOS NHS DEL 4S-STARPEG REACCIONAN CON LOS GRUPOS AMINA DEL COLÁGENO..... | 17 |
| FIGURA 5. ENTRECruzAMIENTO DE LOS POLÍMEROS PARA FORMAR UNA IPN DE COL/HA. | 17 |
| FIGURA 6. TIME-LINE DEL PROTOCOLO DE REPROGRAMACIÓN DE PBMCs DE CYTOTUNE™-IPS 2.0 SENDAI REPROGRAMMING KIT (THERMOFISHER, 2013). | 21 |
| FIGURA 7. CITOQUINAS EMPLEADAS EN LA DIFERENCIACIÓN DE iPSCs A HLCs Y LOS MARCADORES PARA LA CARACTERIZACIÓN CELULAR..... | 24 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| TABLA 1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS PRINCIPALES MODELOS IN VITRO EMPLEADOS EN HEPATOTOXICIDAD. | 6 |
| TABLA 2. COMPOSICIONES DE LOS MEDIOS PBMC, STEMPro™-34 SIN CITOQUINAS Y COMPLETE ESSENTIAL 8™ (THERMOFISHER, 2013). | 13 |
| TABLA 3. ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS EMPLEADOS EN INMUNOFLUORESCENCIA (TOLOSA ET AL., 2015)..... | 13 |
| TABLA 4. PRIMERS EMPLEADOS EN RT-PCR Y Q RT-PCR EN LA CARACTERIZACIÓN (TOLOSA ET AL., 2015)..... | 14 |
| TABLA 5. RATIOS MOLARES PARA EL INJERTO DE TYR. | 16 |
| TABLA 6. EJEMPLO DE COMPOSICIÓN DE UN HIDROGEL COL/HA 50/50. | 19 |
| TABLA 7. COMPUESTOS SELECCIONADOS PARA EVALUAR LA HEPATOTOXICIDAD MEDIANTE EL MODELO IN VITRO. CLASIFICADOS EN FUNCIÓN DE LA CLASE TERAPÉUTICA, LA CLASIFICACIÓN DEL DILI, LOS MECANISMOS Y LA CONCENTRACIÓN MÁXIMA (TOLOSA ET AL., 2019). | 28 |

Índice de ecuaciones

| | |
|--|----|
| ECUACIÓN 1. CÁLCULO DEL GRADO DE HINCHAMIENTO | 20 |
| ECUACIÓN 2. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR (CÉLULAS/ML) CON LA CÁMARA DE NEUBAUER..... | 21 |
| ECUACIÓN 3. CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE VIRUS EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS (THERMOFISHER, 2013)..... | 22 |

ABREVIATURAS

4S-StarPEG: Polietilenglicol de 4 brazos con glutarato de succinimidilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALB: Albúmina

ALT: Alanino aminotransferasa

ARN: Ácido ribonucleico

BMP4: Proteína morfogénica del hueso 4 – del inglés *bone morphogenic protein 4*

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

CDB: Tampón de disociación celular – del inglés *cell dissociation buffer*

CDM: Medio químicamente definido – del inglés *chemically defined medium*

CHIR99021: Inhibidor de la enzima GSK-3

Cl₂Ca: Cloruro de calcio

Col: Colágeno

CYP: Citocromo p450

DE: Endodermo definitivo – del inglés *definitive endoderm*

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

DMEM: Medio Eagle mínimo esencial – del inglés *Eagle's minimal essential medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPBS: Tampón salino con fosfatos de Dulbecco – del inglés *Dulbecco's phosphate buffered saline*

EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EWC: Contenido de agua en equilibrio – del inglés *equilibrium water content*

FA: Fosfatasa alcalina

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos – del inglés *fibroblast growth factor*

FLT-3: Receptor de tirosina quinasa FLT-3 – del inglés *Fms like tyrosine kinase 3*

FN Fibronectina

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HA: Ácido hialurónico – del inglés *hyaluronic acid*

HCM: Medio de cultivo de hepatocitos – del inglés *hepatic culture medium*

HCS: High-content screening

HEPES: del inglés *Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos – del inglés *hepatocyte growth factor*

HLCs: Hepatocyte like cells

HNF4 α : Factor nuclear de hepatocitos 4 α - del inglés *hepatocyte nuclear factor 4 α*

HRP: peroxidasa de rábano de tipo VI – del inglés *horseradish peroxidase*

ICG: Indocianina verde – del inglés *indocyanine green*

iDILI: DILI idiosincrásico

IL-3: Interleucina-3

IL-6: Interleucina-6

IPN: Red polimérica interpenetrada – del inglés *interpenetrating polymer network*

iPSCs: Células pluripotentes inducidas – del inglés *induced pluripotent stem cells*

KCl: Cloruro de potasio

KSR: del inglés *Knockout serum replacement*

LMW: Bajo peso molecular – del inglés *low molecular weight*

LSN: Límite superior normal

LY294002: Inhibidor de Fosfoinositol 3-quinasa

MB: Membrana basal

MEC: Matriz extracelular

Medio F12: Ham's F12/Leibovitz L-15

MEF: Fibroblastos embrionarios de ratón – del inglés *mouse embryonic fibroblast*

MEM: medio esencial mínimo – del inglés *minimal essential medium*

MES: ácido 2-(N- Morfolino)etanosulfónico

MgCl₂: Cloruro de magnesio

mARN: microARN

MWCO: Límite de peso molecular – del inglés *molecular weight cut-off*

Na₂HPO₄: Fosfato de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

NHS: N-Hidroxisuccinimida

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica – del inglés *peripheral blood mononuclear cells*

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

PI: Yoduro de propidio – del inglés *propidium iodide*

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa en tiempo real – del inglés *real-time quantitative reverse transcription PCR*

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*

SCF: Factor de células madre – del inglés *stem cell factor*

SFB: Suero fetal bovino

TMRM: Éster metílico tetrametilrodamina – del inglés *tetramethylrhodamine methyl ester*

Tyr: Tiramina – del inglés *tyramine*

UGT1A: Enzima UGT1A – del inglés *uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyl transferase 1A*

βFGF: β-Factor de crecimiento de fibroblastos – del inglés *β-fibroblast growth factor*

1. Introducción

1.1. El hígado

El hígado es un órgano vital localizado en la parte superior derecha abdominal bajo la caja torácica y el diafragma. Está dividido por el ligamento falciforme en dos lóbulos: derecho e izquierdo. En su cara inferior se encuentra la vesícula biliar y el hilio hepático que envuelve a los vasos sanguíneos. Concretamente, presenta un doble aporte sanguíneo ya que recibe sangre de la arteria hepática y de la vena porta. Está recubierto por una membrana fibrosa denominada cápsula de Glisson (Godoy et al., 2013; Silverthorn et al., 2007).

Histológicamente, el principal componente celular son los hepatocitos los cuales se estima que comprenden el 80% de la población celular. No obstante, aparecen otras células como, por ejemplo: células de Kupffer, células hepáticas estrelladas, células de Pit y células ductales. En el parénquima hepático, las células se disponen de manera específica formando la unidad básica funcional hepática conocida como lobulillo hepático. Estos lobulillos hepáticos presentan una vénula centrolobulillar localizada en el centro de la que salen radialmente trabéculas de hepatocitos separadas por los sinusoides hepáticos (Godoy et al., 2013; Silverthorn et al., 2007). En el espacio subsinusoidal se pueden encontrar células de soporte no parenquimatosas como células endoteliales ductales o células de Kupffer. A través de los vasos sinusoidales, la sangre oxigenada proveniente de la arteria hepática y la vena porta fluye en dirección a la vena central. Las trabéculas de hepatocitos se intercalan con matriz extracelular (MEC) en el espacio perisinusoidal, lugar donde se produce el intercambio de sustancias entre la sangre y los hepatocitos. El resultado son hepatocitos polarizados sometidos a gradiente de nutrientes, hormonas y factores. Éstos son capaces de interactuar con células no parenquimatosas a lo largo del tracto sinusoidal del lobulillo hepático para el transporte de sustancias (Bedossa & Paradis, 2003; Bhatia et al., 2014).

El tejido hepático está compuesto principalmente por células parenquimatosas y el tejido fibroso es muy reducido. Los hepatocitos se encuentran dispersos en una MEC de baja densidad que permite mantener la cohesión celular y aporta resistencia mecánica. La MEC juega un papel muy importante tanto en la fisiología como en la patología del hígado y cualquier modificación, ya sea cuantitativa o topográfica, tiene un efecto sobre las células hepáticas (Hansen et al., 2005). Se reduce a un 3% del área de una sección de hígado y se localiza en paredes sinusoidales, tractos venosos, venas centrales y en la cápsula de Glisson (Bedossa & Paradis, 2003). Su mantenimiento y disposición influye en la proliferación celular y la diferenciación, contribuyendo al fenotipo biomecánico y morfología de los hepatocitos (Gissen & Arias, 2015; Schuppan, 1990). Está compuesta por diferentes tipos de colágeno (I, II, III y IV), glicoproteínas (laminina, fibronectina (FN) y vitronectina) y proteoglicanos como, ácido hialurónico (HA) o heparán sulfato (HS) (Bedossa & Paradis, 2003). Cabe destacar que el hígado no presenta una membrana basal (MB) definida que separa los hepatocitos del espacio intersticial, además aparecen fenestraciones y huecos entre las células endoteliales sinusoidales. Esta estructura facilita el intercambio bidireccional de sustancias entre los hepatocitos y la sangre (*Figura 1*) (Martinez & Amenta, 1993).

Los componentes que constituyen la MEC hepática se distribuyen en diferentes localizaciones y concentraciones. El colágeno tipo I conforma el andamio estructural del lóbulo hepático proporcionando soporte físico. Sus fibras conectan las estructuras del hígado: cápsula de Glisson, espacios porta (lugar de confluencia de varios lobulillos), sinusoides, y espacios subsinusoidales. Después del colágeno tipo I, la FN es el segundo componente más abundante y aparece como un revestimiento continuo desde los sinusoides hasta las venas. La FN recubre las fibras de colágeno tipo I y se entrecruza con fibras de colágeno III, V y VI que aparecen en menor proporción. Conecta las células endoteliales y los hepatocitos al colágeno, creando un lobulillo

estable. El espacio subsinusoidal corresponde con el lugar de paso de las moléculas intercambiadas entre el plasma y los hepatocitos. La presencia de fibras es escasa, pero se pueden identificar fibras de colágeno tipo I en los espacios porta y las venas centrales donde se disponen con más simetría y mayor concentración (Martinez & Amenta, 1993).

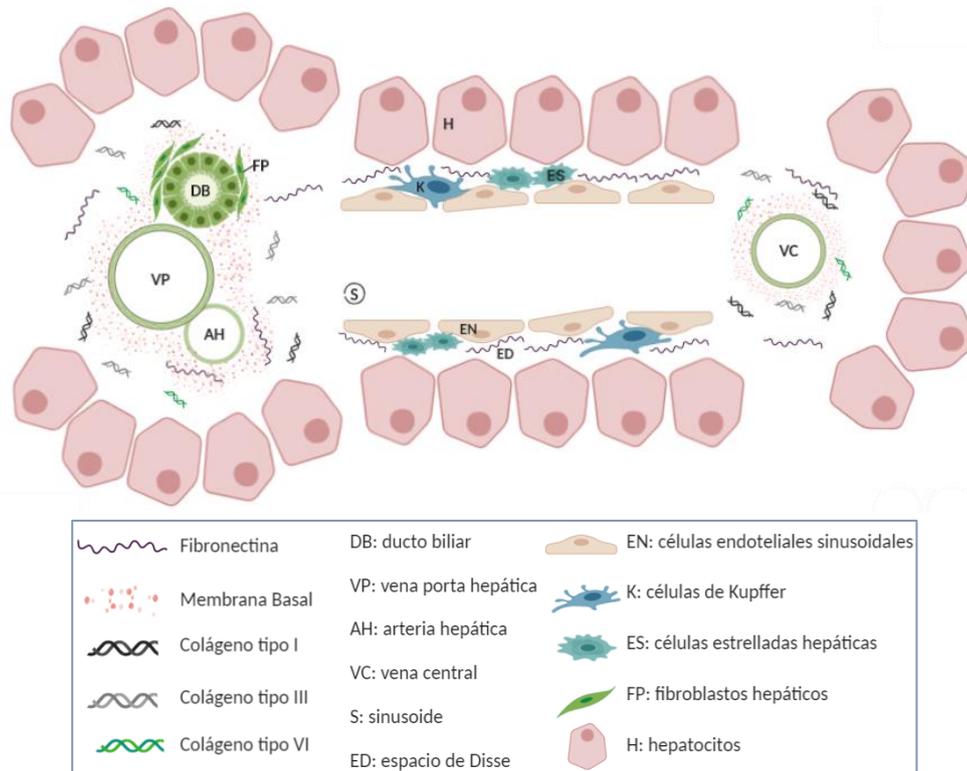


Figura 1. Canal sinusoidal hepático característico del lobulillo hepático y componentes específicos de la MEC.

Los tipos de colágeno restantes aparecen en menor cantidad y en localizaciones determinadas. Por ejemplo, el colágeno III aparece en una porción muy pequeña como fibras delgadas localizadas en las proximidades de los espacios porta y las regiones centrales. El colágeno tipo V se dispone alrededor de las células y su concentración aumenta en los septos y los espacios porta. El colágeno IV es capaz de unirse a laminina, entactina o HS formando una MB ligera junto a la pared de los sinusoides. La baja densidad de esta MB es imprescindible para asegurar una correcta difusión bidireccional de moléculas plasma-hepatocitos (Bedossa et al., 2003). La MEC hepática también contiene colágeno tipo VI, concretamente es abundante en el espacio subsinusoidal y aparece en forma de ligamentos finos asociados a colágeno tipo I, III y FN (Uygun et al., 2010). El HS aparece en regiones del espacio sinusoidal cercanas a la membrana celular de los hepatocitos. Además, forma una delgada MB junto a colágeno tipo IV y laminina próximo a las venas centrales, aunque no se considera una MB íntegra (Martinez & Amenta, 1993).

A nivel funcional destaca por su elevada complejidad y su alta actividad metabólica. Participa en el metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono a la vez que actúa de depósito de proteínas, glucógeno y vitaminas. Asimismo, interviene en la homeostasis de la sangre, en la producción de bilis y en la respuesta inmune. Este órgano destaca por su función principal en la detoxificación y metabolismo de fármacos. Su multifuncionalidad y sus elevadas tasas metabólicas lo convierten en un órgano diana a sufrir reacciones adversas (Silverthorn et al., 2007).

1.2. Daño Hepático Inducido por Fármacos

El daño hepático inducido por fármacos o DILI (del inglés *drug-induced liver injury*) se considera una de las afecciones hepáticas más complejas y la principal causa de insuficiencia hepática aguda en países occidentales (Lucena et al., 2011). En base al comunicado emitido por la FDA – US *Food and Drug Administration* - en 2011, la intoxicación por acetaminofén es la primera causa de insuficiencia hepática en pacientes sin hepatopatías previas (Food and Drug Administration, 2013). Asimismo, es una de las causas principales de retirada de fármacos en etapa de comercialización. Sin embargo, la incidencia real del DILI es difícil de estimar debido al subregistro de los casos y la falta de biomarcadores o modelos robustos que evalúen la hepatotoxicidad en fases preclínicas (Navarro & Senior, 2006).

La hepatotoxicidad puede clasificarse en reacciones intrínsecas y reacciones idiosincrásicas. Las reacciones intrínsecas dependen de la dosis del fármaco, por lo que son más predecibles y reproducibles. Se manifiestan con necrosis hepatocelular, inflamación leve o ausente, y suelen ser dosis-dependientes. Por otro lado, las reacciones idiosincrásicas son impredecibles y dependen de características propias del paciente, no dependen de la dosis y, por ello, no son reproducibles. La mayoría de los fármacos que producen hepatotoxicidad suelen producir reacciones idiosincrásicas que pueden clasificarse en inmunes, si la reacción se produce por hipersensibilidad al fármaco, o metabólicas, si la causa radica en un metabolito tóxico. Se distingue por lesiones hepáticas con signos claros de inflamación (Alempijevic et al., 2017; Navarro & Senior, 2006; Ramachandran & Kakar, 2009). Desde el punto de vista bioquímico se identifican tres patrones de daño hepático:

- **Hepatocelular:** se caracteriza por un aumento significativo de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y, en casos más graves, también puede producirse hiperbilirrubinemia y leves aumentos de la fosfatasa alcalina (FA). Se considera significativo cuando el aumento es mayor de dos veces el límite superior normal (LSN) o el ratio ALT/FA es mayor de 5. Los pacientes pueden sufrir ictericia, la función hepática se ve comprometida gravemente y la probabilidad de recuperación suele ser baja.
- **Colestásico:** se manifiesta por un aumento significativo de la concentración sérica de FA mayor de 2 veces el LSN o un ratio ALT/FA menor de 2. Presentan mejor pronóstico con mayor probabilidad de recuperación.
- **Mixto:** caracterizado por un aumento de ALT y FA mayor de 2 veces el LSN o un ratio ALT/FA comprendido entre 2-5.

Algunos fármacos tienden a producir un tipo de daño hepático en concreto. Disponer de esta información facilita el diagnóstico y el tratamiento, así como la valoración de la gravedad de la lesión (Navarro & Senior, 2006).

Las enzimas hepáticas se encargan de convertir los fármacos en derivados hidrofílicos para facilitar su excreción a través del aparato excretor. El proceso de conversión depende de la naturaleza del fármaco y puede comprender varias etapas, siendo el resultado final una molécula terapéutica inactiva (Moreno, 2002). En la primera fase, los fármacos sufren reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis mediante los enzimas de fase I (principalmente citocromo P450) formando grupos funcionales más hidrosolubles para facilitar su excreción. En determinados casos, el producto es una molécula bioactiva que requerirá de una fase II de metabolización. En esta segunda etapa, el fármaco se conjuga a otras moléculas (ácido glucurónico o sulfúrico) dando lugar a sustratos más hidrosolubles para detoxificarlo. Aunque la mayoría de los fármacos se detoxifican correctamente, en algunas ocasiones se generan metabolitos tóxicos que pueden inducir hepatotoxicidad (Navarro & Senior, 2006; Perdices et al., 2012). Sin embargo, éste no es el único mecanismo por el que se produce DILI idiosincrásico (iDILI), de hecho, los propios fármacos pueden provocarlo directamente.

El iDILI no comprende un origen biomolecular único, es decir, existen varios mecanismos moleculares que pueden provocarlo. Un fallo en el metabolismo de los fármacos puede originar moléculas bioactivas que reaccionan y desencadenan efectos dañinos para la célula. Por ejemplo, pueden interactuar con glutatión alterando la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS – del inglés *reactive oxygen species*) provocando estrés oxidativo. Esto puede afectar tanto a nivel de ADN, induciendo genotoxicidad y mutaciones, como a nivel mitocondrial. Asimismo, las moléculas bioactivas pueden unirse covalentemente a proteínas alterando el metabolismo y la homeostasis celular. También pueden unirse a receptores proteicos provocando desorganización en la membrana plasmática y la consiguiente muerte celular. Además, se pueden formar moléculas reactivas que desencadenan reacciones inmunes e induzcan la síntesis de citoquinas proinflamatorias que comprometen la viabilidad celular. Al final, el resultado es la muerte de los hepatocitos ya sea por apoptosis o necrosis (Gómez-Lechón et al., 2014a; Pelechá et al., 2017).

Uno de los retos de este tipo de hepatopatía es el diagnóstico. Hasta el momento, no existen marcadores bioquímicos o pruebas diagnósticas específicas para el iDILI. La mayoría de los fármacos asociados a él provocan anomalías asintomáticas más que lesiones clínicamente evidentes. Los síntomas son muy variables pudiendo provocar fallo hepático agudo e incluso hepatitis crónica (Khoury et al., 2015). Las hepatopatías previas o el consumo de fármacos concomitantes pueden dificultar el diagnóstico. Por estas razones, además de pruebas serológicas de concentración de ALT, FA y bilirrubina, se realiza un diagnóstico de exclusión de hepatopatías virales, autoinmunitarias, biliares, o alcohólicas (Navarro & Senior, 2006; Perdices et al., 2012).

Los factores de riesgo del iDILI son el género, edad, consumo de alcohol, tabaquismo, administración de otros fármacos, embarazo, hepatopatías previas y factores genéticos. Se han encontrado polimorfismos asociados a mayor riesgo de sufrir reacciones idiosincrásicas (Khoury et al., 2015). Eso resulta en una susceptibilidad variable entre pacientes que dificulta más la prevención y el diagnóstico (Perdices et al., 2012).

No hay tratamiento específico para el iDILI. El primer paso tras detectarlo es la suspensión inmediata de los fármacos prescindibles. En casos concretos se puede tratar con antagonistas como, por ejemplo, la administración de N-acetilcisteína para el tratamiento de la intoxicación por paracetamol (Navarro & Senior, 2006). Si la situación se agrava produciéndose ictericia y la disfunción hepática es grave, la recuperación es inviable y será necesario el trasplante de hígado (Perdices et al., 2012).

El principal problema del iDILI no subyace en el número de incidencias, sino en la gravedad de las lesiones y en el limitado potencial de reversibilidad. En muchas ocasiones el pronóstico del DILI es peor que el de hepatopatías víricas. Los datos revelan que más del 50 por ciento de las insuficiencias hepáticas agudas en Estados Unidos se deben a iDILI (Lee, 2003). Aunque se haya descrito una larga lista de fármacos asociados a hepatotoxicidad, la incidencia reportada es de 1 entre 10,000 y 1 entre un 100,000 (Food and Drug Administration, 2009; Navarro & Senior, 2006). Esta baja frecuencia puede deberse a la dificultad de encontrar un diagnóstico concluyente de iDILI. Debido a la baja frecuencia, la posibilidad de detectar hepatotoxicidad durante los ensayos clínicos se reduce considerablemente, pues sería necesario un número elevado de participantes. Un ensayo clínico en fase III comprende la participación de 3,000 pacientes lo que indica que serían necesarios 30,000 para poder detectar una reacción idiosincrásica (Lee, 2003).

1.3. Modelos de hepatotoxicidad *in vitro*

El hecho de que la hepatotoxicidad sea uno de los motivos más frecuentes de retirada de fármacos en ensayo clínico o comercializados, supone un peligro para la salud de los consumidores y un problema económico para las empresas farmacéuticas. Por estas razones, es imprescindible

identificar los fármacos hepatotóxicos en las etapas previas a la aprobación y comercialización del mismo. Sin embargo, esta evaluación está limitada por la falta de modelos *in vitro* que permitan evaluar diferentes compuestos en tiempos prolongados. Además, la baja incidencia y la variabilidad entre pacientes dificulta encontrar resultados significativos que permitan descartar un fármaco hepatotóxico. Esta situación ha derivado en un interés por el diseño de nuevas estrategias y nuevos modelos para la evaluación de toxicidad en fases precomercialización y con *high-throughput screening* (HTS). Los modelos han de simular el entorno hepático, las células han de preservar su morfología y deben mantenerse viables y funcionales para considerar que los resultados son concluyentes. (Gómez-Lechón et al., 2014a; Pelechá et al., 2017).

A pesar de disponer de ensayos animales para testar fármacos en fases preclínicas, el poder predictivo de estos modelos es reducido debido a las diferencias en la absorción en el transporte, en la excreción y en el metabolismo de fármacos entre el humano y los modelos animales. Sobre todo, aparecen diferencias en las isoformas de los citocromos que participan en el metabolismo farmacológico (Martignoni et al., 2006). Por este motivo, los modelos animales deben apoyarse con modelos *in vitro* para mejorar el poder de predicción. Hasta el momento, es inviable prescindir de ensayos con animales, pues sólo en estos ensayos es posible evaluar la toxicidad crónica ya que ningún modelo *in vitro* mantiene su viabilidad a tiempos largos (Pelechá et al., 2017).

El empleo de modelos *in vitro* permite reducir el número de animales en los ensayos preclínicos y evaluar diferentes fármacos bajo las mismas condiciones. Además, se puede emplear material de origen humano pudiendo personalizar el modelo y reduciendo el impacto de la variabilidad de respuesta entre pacientes. Un modelo *in vitro* permite ahorrar tiempo y reduce el coste económico de los ensayos preclínicos. También permiten a los investigadores estudiar el metabolismo químico, evaluar los mecanismos de toxicidad, medir la cinética enzimática y examinar las relaciones dosis-respuesta. No obstante, se han de considerar las limitaciones que presentan, pues no sustituyen por completo los ensayos *in vivo* y la extrapolación a humanos puede ser difícil o desacertada. Se debe hacer una correcta interpretación de los resultados, determinado el valor predictivo del modelo y su extrapolación (Soldatow et al., 2013; Vorrink et al., 2018).

Con el paso del tiempo, se han ido diseñando modelos cada vez más complejos. La estrategia que más se aproxima al hígado humano es el cultivo primario de hepatocitos humanos. Sin embargo, su viabilidad en cultivo es reducida por lo que únicamente son empleables en estudios de hepatotoxicidad a corto plazo. Los primeros modelos *in vitro* están basados en cultivo de explantes primarios de hígado y cultivos en monocapa 2D de hepatocitos primarios y líneas hepáticas inmortalizadas (Gómez-Lechón et al., 2014a; Gómez-Lechón et al., 2014b; Kyffin et al., 2018; Soldatow et al., 2013).

El desarrollo de nuevas técnicas de cultivo junto con el diseño de nuevos biomateriales y la ingeniería tisular ha permitido la evolución de los modelos *in vitro*. Los nuevos sistemas son modelos 3D más afines al tejido hepático. Mediante estos modelos se consigue reproducir las interacciones célula-célula y célula-matriz indispensables para mimetizar el microambiente del hígado. Destacan los cultivos 3D, co-cultivos, esferoides; scaffolds e hidrogeles que incorporan nuevos elementos y técnicas como los biorreactores o la microfluídica. En general, presentan mayor capacidad metabólica y recrean con mayor fidelidad el tejido hepático, lo que les convierte en la mejor opción para los ensayos *in vitro* de hepatotoxicidad. A pesar de tener ventajas sobre los modelos 2D, son necesarios más estudios que evalúen la sensibilidad y especificidad de los modelos (Gómez-Lechón et al., 2014a; Kuna et al., 2018; Soldatow et al., 2013; Vorrink et al., 2018). En la *Tabla 1* se exponen algunos de los modelos *in vitro* descritos hasta el momento junto a una breve descripción y sus principales ventajas e inconvenientes.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los principales modelos *in vitro* empleados en hepatotoxicidad.

| MODELO 2D | Ventajas | Desventajas | Ref. |
|--|--|---|---|
| CULTIVO EXPLANTE | Alto rendimiento Mantiene la estructura hepática Todos los tipos celulares Canalículos biliares funcionales Actividad CYP específica de la zona; mantiene mecanismos de toxicidad Enzimas fase II, producción albúmina y glucogénesis | Necrosis celular tras 48-72 h Disminución rápida de los niveles de CYP (6-72 h) Gradiente de difusión de fármacos limitado Disponibilidad de hígado Baja reproducibilidad | (Godoy et al., 2013; Kyffin et al., 2018; Soldatow et al., 2013) |
| SUSPENSIÓN HEPATOCITOS PRIMARIOS | Alto nivel de funcionalidad <i>in vitro</i> Alto nivel enzimático Buena difusión fármaco y oxígeno | Pérdida interacciones célula-célula y célula-matriz Pérdida polaridad de hepatocitos Sin canalículos biliares Uso a corto plazo (<4 h) | (Gómez-Lechón et al., 2014a; Soldatow et al., 2013) |
| CULTIVO HEPATOCITOS PRIMARIOS | Polaridad de hepatocitos Interacción célula-célula Conservación fenotipo y funcionalidad (2-4 días) Buena difusión de fármaco y oxígeno | Pérdida funcionalidad rápida Reducción expresión génica No funcionalidad a largo plazo No canalículos biliares funcionales Disponibilidad limitada Variabilidad entre donantes | (Godoy et al., 2013; Kyffin et al., 2018; Soldatow et al., 2013) |
| CULTIVO LINEAS CELULARES INMORTALIZADAS | Proliferación indefinida Mantiene enzimas fase I y II Reproducibilidad Gran disponibilidad Fácil manejo | Pérdida fenotipo hepático y funcionalidad del hepatocito variable Menor capacidad metabólica que hepatocitos Concentración baja de enzimas fase I y fase II | (Gómez-Lechón et al., 2014a; Pelechá et al., 2017; Soldatow et al., 2013; Verneti et al., 2017) |
| CULTIVO EN SÁNDWICH | Polarización de los hepatocitos Incorporan nuevos sistemas: formación canalículos y transporte oxígeno. Aumento viabilidad hepatocitos Mayor actividad CYP Mantiene el metabolismo y transporte de fármacos en tiempos cortos | Interacciones célula-célula débiles Disminución de expresión génica hepática con el tiempo | (Gómez-Lechón et al., 2014a; Nie et al., 2020; Verneti et al., 2017) |
| MODELO 3D | Ventajas | Desventajas | Ref. |
| CO-CULTIVOS | Función mejorada de hepatocitos y mayor longevidad en cultivo Reconstrucción de un microambiente más próximo al <i>in vivo</i> Interacción célula-célula Buena correlación con la toxicidad <i>in vivo</i> Co-cultivos de esferoides con NPCs prolongan viabilidad celular y se aproximan más al modelo <i>in vivo</i> | Amplia variabilidad en función del tipo celular Gran variación en función de las condiciones del cultivo Menor reproducibilidad Técnicas de cultivo más complejas | (Kyffin et al., 2018; Soldatow et al., 2013; Verneti et al., 2017) |
| MICROFLUÍDICA | Integración de múltiples elementos: biológicos, estructurales y físicos Hidrodinámica de la sangre Sistemas de perfusión y modulación de gradientes físico-químicos Ajustar flujos de metabolitos y fármacos modificar la concentración | Variabilidad en función de las condiciones de cultivo No mantiene más funcionalidad/viabilidad que otros modelos 3D Tecnología emergente | (Gómez-Lechón et al., 2014a; Nie et al., 2020; Verneti et al., 2017) |

| | | | |
|-----------------------------|---|---|--|
| | Mejor correlación con los resultados <i>in vivo</i> comparado con cultivos estáticos | Elevado coste económico y tiempo para diseñar circuitos con elevados rendimientos | |
| ESFEROIDES | Mantienen funcionalidad en tiempo prolongado Mayor sensibilidad que los modelos 2D Aumento expresión génica característica de hepatocitos. Se mantiene en tiempos prolongados. Fuertes interacciones célula-célula y célula-matriz Mantiene morfología cuboidal hepática | Limitación del diámetro Gradiente de difusión del fármaco variable en función del diámetro Menor producción urea, albúmina | (Bell et al., 2018; Godoy et al., 2013; Kyffin et al., 2018; Vorrink et al., 2018) |
| SCAFFOLDS | Disposición tridimensional similar al microambiente hepático Recreación de MEC comparable a la MEC hepática con diferentes biomateriales Diferentes tipos de scaffolds (naturales, sintéticos, descelularizados) y técnicas Gran variedad de biomateriales que permiten recrear MEC hepática | Dificultad en la recuperación celular Corta duración del cultivo Se pueden formar zonas necróticas Baja reproducibilidad y disponibilidad limitada en scaffold naturales y descelularizados | (Kyffin et al., 2018; Soldatow et al., 2013) |
| HIDROGELES | Buena interacción célula-célula Recreación de MEC comparable a la MEC hepática con diferentes biomateriales Modulación propiedades biomecánicas Fusión de hidrogeles y microesferas con características mejoradas | Dificultad en la recuperación celular Limitaciones en la transferencia de oxígeno y nutrientes | (Godoy et al., 2013; Kyffin et al., 2018; Sanmartín-Masiá, 2016) |
| HÍGADOS ARTIFICIALES | Heterogeneidad espacial Microambiente más similar al tejido <i>in vivo</i> Evaluación de hepatotoxicidad con sangre humana Inducir vascularización Simulación hepatopatías | Bajo rendimiento en comparación con otros modelos <i>in vivo</i> más simples Elevadas concentraciones de hepatocitos Relevancia clínica no evaluada No alarga la viabilidad celular Estructuras muy complejas | (Nie et al., 2020; Soldatow et al., 2013) |

ABREVIATURAS: MEC, matriz extracelular; CYP, Citocromo P450; NPCs, *non parenchymal cells*.

Debido a las limitaciones que presentan los hepatocitos primarios y las líneas inmortalizadas, en los últimos años ha crecido el interés por el uso iPSCs para su diferenciación a HLCs. El uso de las iPSCs para la obtención de HLCs proporciona una fuente celular ilimitada y facilita la creación de modelos *in vitro* de diferentes pacientes, así como modelos de enfermedad. Además, se ha comprobado que las HLCs presentan un fenotipo hepático más próximo al de un hepatocito primario que las líneas hepáticas inmortalizadas. No obstante, es importante llevar a cabo un análisis morfológico y funcional de las HLCs tras la diferenciación para asegurar la predictibilidad del modelo (Donato & Tolosa, 2019; Gao & Liu, 2017; Hannoun et al., 2016).

1.4. Hidrogeles como modelos 3D de hepatotoxicidad

Los hidrogeles son redes tridimensionales constituidos por cadenas poliméricas hidrofílicas capaces de absorber elevadas cantidades de agua. El mantenimiento de su estructura se basa en la unión por puntos de entrecruzamiento de las diferentes cadenas poliméricas. Gracias a estos puntos de unión, los hidrogeles no se disuelven en agua, lo que permite encapsular células y mantenerlas en tiempos prolongados (Natale et al., 2019; Sanmartín-Masiá, 2016).

La composición del hidrogel puede ser natural o sintética en función de los polímeros seleccionados. Por un lado, los polímeros sintéticos muestran mejores propiedades mecánicas y sus características pueden controlarse fácilmente. Sin embargo, pueden generar citotoxicidad y no presentan dominios de unión celulares, por lo que no se recrean las interacciones célula-matriz de forma análoga a la natural. Por otro lado, los polímeros naturales permiten simular el microambiente del tejido más miméticamente y permiten crear interacciones célula-matriz indispensables para el correcto mantenimiento del fenotipo celular. De esta manera, se favorece la adhesión, proliferación y diferenciación celular. El problema de los polímeros naturales son las propiedades mecánicas, las cuales suelen ser inferiores a las de los sintéticos. Por ello, muchos polímeros naturales requieren modificaciones para mejorarlas. Los biopolímeros más empleados son proteínas como el colágeno, la gelatina, la elastina o polisacáridos como el HA, el quitosano o la celulosa (Mahinroosta et al., 2018; Sanmartín-Masiá, 2016).

Los enlaces que se establecen entre las cadenas poliméricas pueden ser de diferente naturaleza y en ocasiones requieren de un entrecruzador – o *cross-linker*. El entrecruzamiento – o *cross-linking* - puede realizarse por dos mecanismos (Mahinroosta et al., 2018):

- **Entrecruzamiento físico:** se basan en interacciones hidrofóbica e iónicas y puentes de hidrógeno. Los enlaces tienden a ser más frágiles que los enlaces de hidrogeles químicos.
- **Entrecruzamiento químico:** se forman enlaces covalentes entre las cadenas del polímero durante la polimerización o empleando *cross-linkers*. El *cross-linking* de polímeros naturales o sintéticos se puede realizar a través de grupos funcionales como hidroxilos, carboxilos y aminas. El resultado es un hidrogel más resistente que el hidrogel físico.

Durante la síntesis del hidrogel es importante controlar variables como temperatura, pH, fuerza iónica y concentración de los polímeros. De esta manera, se asegura una distribución homogénea de los polímeros en el hidrogel (Sanmartín-Masiá, 2016). Asimismo, la elección de los materiales, el tipo de entrecruzamiento y los factores enumerados previamente, determinan sus características fisicoquímicas tales como propiedades mecánicas, distribución final, grado de entrecruzamiento, absorción de agua y biodegradabilidad (Natale et al., 2019).

El resultado es una amplia combinación de diferentes polímeros y *cross-linkers* que permiten producir hidrogeles diferentes con propiedades físico-mecánicas ajustables. Esta versatilidad ha generado un particular interés por el empleo de los hidrogeles en diferentes ámbitos de la biomedicina. Se han empleado como hidrogeles inteligentes para la liberación controlada de fármacos, en regeneración tisular y también como modelos *in vitro* de hepatotoxicidad (Godoy et al., 2013; Sanmartín-Masiá, 2016).

Los hidrogeles presentan una serie de características que los convierten en un potente modelo 3D de hepatotoxicidad. Entre esas características destacan la capacidad para reproducir la MEC hepática al poder combinar diferentes polímeros proteína-polisacárido. Así, en base a la composición de la matriz hepática se pueden combinar polímeros proteicos con polisacáridos. Además, favorecen la interacción célula-célula y célula-matriz y proporcionan un entorno tridimensional idóneo para el cultivo celular. Gracias a sus características viscoelásticas y la posibilidad de modificar otras propiedades mecánicas, las células pueden someterse a cargas que simulen el entorno natural. Todos estos factores evitan la desdiferenciación y pérdida del fenotipo hepático (Godoy et al., 2013; Gómez-Lechón et al., 2014; Yao et al., 2019).

No obstante, los hidrogeles presentan algunas limitaciones que pueden comprometer la eficacia del modelo *in vitro* y, por ello, se intentan mitigar. El principal problema radica en la escasa transferencia de nutrientes y oxígeno a través del hidrogel, pudiéndose crear zonas de necrosis celular o gradientes de concentración no deseados. Por otro lado, la recuperación celular del

hidrogel puede ser complicada. Por estos motivos, se ha de controlar el tamaño del hidrogel, grado de entrecruzamiento y considerar si es necesaria la extracción celular (Godoy et al., 2013).

En los últimos años se han ido desarrollando diferentes hidrogeles como modelos 3D de hepatotoxicidad. El primer hidrogel empleado fue Matrigel™ que se usó inicialmente para el cultivo en sándwich (Burkhardt et al., 2014; de Bruyn et al., 2013; Yao et al., 2019). Su composición es principalmente proteica y es producido por células de sarcoma de ratón. Sin embargo, esta aproximación no se considera modelo 3D pues los hepatocitos se cultivan en monocapa entre dos capas del hidrogel. Los hepatocitos mantienen la polaridad para el transporte de sales biliares y algunas funciones hepáticas concretas (actividad de citocromos y producción de albúmina) durante 3 semanas, pero las interacciones célula-célula son débiles, la concentración celular ha de ser elevada y el fenotipo hepático se pierde en tiempos cortos (Kisaalita, 2010).

El colágeno como componente principal de la MEC de hígado, junto al HA, han sido los biopolímeros base de muchos hidrogeles propuestos. Por ejemplo, Extracel™ está basado en una combinación semisintética de HA y gelatina modificados con grupos tiol. El cultivo de hepatocitos primarios humanos en Extracel™ se ha comparado con el cultivo en monocapa; los resultados revelan que los hepatocitos cultivados en Extracel™ mantienen la actividad de la isoforma CYP1A1 del citocromo P450 durante 17 días. Se observa una disminución significativa de la actividad hepática con el paso de los días, por lo que este modelo queda limitado a ensayos de hepatotoxicidad aguda (Lan et al., 2010). Se han propuesto otros hidrogeles basados en materiales naturales como el alginato. La encapsulación de hepatocitos primarios en hidrogeles de alginato ha demostrado que el material es biocompatible y los hepatocitos mantienen su actividad metabólica. También mantienen la expresión de enzimas como CYP1A1 y CYP3A4 durante 14 días y la actividad característica de fase II se conserva en cultivo 3D (Burkhardt et al., 2014).

Los materiales naturales podrían limitar la reproducibilidad de los modelos *in vitro* al existir cierta variabilidad entre lotes. Sin embargo, es evidente la biocompatibilidad y biomimética que se consigue con su uso. No obstante, se han empleado materiales sintéticos para el diseño de hidrogeles. Uno de los materiales sintéticos más empleado es el polietilenglicol (PEG). Los hepatocitos en hidrogeles de PEG muestran una síntesis continua de urea y mayor actividad de CYP3A4 en comparación cultivos 2D (Wang et al., 2008).

Otra alternativa son los hidrogeles de péptidos autoensamblables como Puramatrix™. Son hidrogeles capaces de conformar esferoides 3D en presencia de sales. Al compararlo con cultivo en sándwich, se observa que la secreción de albúmina y urea es mayor durante la primera semana, pero comienza a descender. Además, el potencial de membrana mitocondrial es mayor en Puramatrix™, lo que sugiere que el metabolismo se mantiene intacto en hepatocitos primarios de ratón. El ensayo con hepatocitos humanos ha revelado que se forman los canalículos biliares y se secreta más cantidad de albúmina y urea que en el cultivo en sándwich (Bachmann et al., 2015; Godoy et al., 2013). Además, se mantiene la actividad de CYP1A en hepatocitos de ratón durante 3 semanas. La problemática de este tipo de hidrogeles es el elevado coste económico, lo que limita su uso para ensayos de alto rendimiento (Burkhardt et al., 2014).

La literatura científica recoge que el principal inconveniente de los hidrogeles es la baja transferencia de nutrientes y oxígeno. Por esta razón, se han creado los microgeles, hidrogeles con menor tamaño que los hidrogeles convencionales que facilitan la difusión de nutrientes (Godoy et al., 2013). Al presentar dimensiones reducidas, pueden tener un uso multiplexado y de alto rendimiento al disponerlos en placas multipocillos. La mezcla de colágeno y PEG ha permitido diseñar microgeles para el cultivo de hepatocitos manteniendo el fenotipo hepático más de 4 semanas y con la expresión de enzimas de citocromos (Li et al., 2014). Sin embargo, los estudios con hepatocitos empleando este tipo de hidrogeles son escasos. Otra opción para el uso de

hidrogeles es el cultivo de esferoides. Sin embargo, mediante esta estrategia la estructura final no representa la organización en lobulillo específica de hígado y se pueden crear puntos de necrosis donde no llegan nutrientes (Hengstler et al., 2014).

Una de las alternativas propuestas en los últimos años es la de incorporar moléculas bioactivas a la superficie de los biomateriales. Estas moléculas pueden controlar la liberación de factores de crecimiento como, por ejemplo, la heparina, o puede intervenir en la unión celular como la FN o el péptido Arg-Gly-Asp (RGD) (Godoy et al., 2013). Los hepatocitos presentan afinidad específica por residuos de galactosa. Por ello, algunos hidrogeles sintéticos se han modificado uniendo galactosa para mejorar la adhesión y función de los hepatocitos. Por ejemplo, el PEG presenta grupos hidroxilo susceptibles de ser modificados para incorporar grupos funcionales o moléculas bioactivas. Los modelos de PEG se han mejorado incorporando nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) o uniendo moléculas como la heparina o el péptido RGD. Estas combinaciones han dado como resultado aumentos significativos en la síntesis de albúmina y urea en comparación al cultivo con PEG (Bachmann et al., 2015). Siguiendo esta misma estrategia con el alginato, al incorporar quitosano galactosilado o heparina, los resultados han mejorado respecto al cultivo con alginato (Bachmann et al., 2015; Godoy et al., 2013).

Con el objetivo de reproducir con la mayor similitud posible la MEC hepática, algunos modelos *in vitro* incorporan productos derivados de hígado fresco o factores que aparecen en el tejido hepático. Concretamente, se ha fusionado MEC de hígado descelularizado o de tejido hepático completo con polímeros como colágeno tipo I, HA o conjugados heparina-HA. Los hepatocitos primarios humanos cultivados en estas matrices muestran niveles constantes de albúmina y urea, obteniendo los mejores resultados con las matrices de HA y extracto de hígado durante 4 semanas (Skardal et al., 2012). También se pueden incorporar factores de crecimiento como, por ejemplo, el factor de crecimiento hepático – o *hepatocyte growth factor* (HGF) – una molécula de señalización importante en hígado. El cultivo de hepatocitos primarios de rata en matrices de heparina, con dominios de unión a HGF, muestra mayores niveles de albúmina y urea que en cultivo sin factores. La liberación se produce de manera controlada, pues mediante un ensayo ELISA se comprueba que sólo el 40% de las moléculas de HGF se liberan tras 30 días de cultivo (Godoy et al., 2013; Kim et al., 2010). Estos resultados abren un amplio abanico de opciones de diferentes factores que se pueden introducir en las matrices de hidrogeles.

El desarrollo de nuevas técnicas de ingeniería tisular ha permitido el diseño de modelos *in vitro* más complejos que los descritos hasta el momento. Destacan los dispositivos denominados *organ-on-chips* (OOC), que permiten imitar las características mecánicas, estructurales y bioquímicas de órganos, así como el microambiente celular *in vivo*. Los hidrogeles se han empleado en estos sistemas imitando la estructura del hígado – *liver-on-a-chip*. Requieren de técnicas más complejas como la bioimpresión 3D y diversas técnicas de microfabricación (Liu et al., 2019). Se ha descrito un *liver-on-a-chip* empleando un hidrogel HA-PEG modificado con péptidos RGD. Este sistema ha permitido el cultivo de hiPS-HEP favoreciendo la migración y crecimiento en 3D. Además, presentan mayor viabilidad celular y producción de albúmina en comparación con otros hidrogeles (Christofferson et al., 2018). Siguiendo la estrategia de los OOC e intentando aproximar los modelos *in vitro* al tejido *in vivo*, algunos autores apuestan por la vascularización en este tipo de sistemas. La gelatina metacrilada se emplea para fabricar tejidos con redes de microcanales con la ayuda de plantillas de agarosa. Se han construido redes vascularizadas en chip, concretamente cultivando células HepG2 junto a células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Liu et al., 2019).

Por último, destacar una novedosa estrategia basada en hepatotoxicidad zonal. Este modelo *in vitro* está basado en los patrones de expresión del citocromo P450, y consiste en un canal zonal hepático tridimensional. Las células HepaRG están distribuidas en canales de agarosa

con un gradiente de CHIR (inductor de la señalización Wnt/ β -catenina clave en la expresión de enzimas metabolizadoras de fármacos). La evaluación con diferentes fármacos revela que la hepatotoxicidad depende de la zona y del fármaco. Sin embargo, es el primer modelo de hepatotoxicidad zonal y no hay más información reportada (Ahn et al., 2019).

Muchos de los hidrogeles diseñados para simular el microambiente hepático, se basan en una combinación proteína-polisacárido, como el propuesto en el presente proyecto. Concretamente está compuesto por colágeno y por HA. El entrecruzamiento de ambos componentes es independiente y se basa en una reacción química, catalizada por la peroxidasa en presencia de oxígeno, entre moléculas de tiramina (Tyr) previamente injertadas en el HA y la reacción entre el *cross-linker* polietilenglicol de 4 brazos (4S-StarPEG) y el colágeno. La química del entrecruzamiento es sencilla y no se producen compuestos tóxicos que comprometan la viabilidad celular (Sanmartín-Masiá, 2016). Asimismo, permite que el colágeno se mantenga estable y no se desnaturalice (Collin et al., 2011; Kontturi et al., 2015). El hidrogel resultante de la mezcla de estos polímeros presenta características que le permiten ser inyectable y en el que las células pueden encapsularse. Además, permiten plantear la unión de fragmentos recombinantes de FN que pueden mejorar la adhesión y mantener el fenotipo hepático, proporcionando mayor potencial al modelo 3D propuesto.

Como modelo celular se propone el uso de iPSCs diferenciadas a HLCs. El modelo presenta diferentes ventajas frente a otros sistemas celulares ya que refleja la variabilidad poblacional y permite tener un número ilimitado de células. Además, permitiría el desarrollo de modelos personalizados que se podrían usar no sólo en el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos, sino en el diagnóstico personalizado de dicha patología.

En definitiva, el objetivo es proporcionar un ambiente óptimo para el cultivo de HLCs y emplearlo como modelo *in vitro* de hepatotoxicidad. Se espera que el modelo propuesto permita el cultivo de los hepatocitos en tiempos prolongados y pueda emplearse para ensayos de hepatotoxicidad crónica.

2. HIPÓTESIS

En este trabajo se plantea el diseño experimental de un nuevo modelo *in vitro* para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos apoyado en una revisión bibliográfica y trabajos publicados recientemente. Se espera que con la combinación de colágeno y HA para sintetizar el hidrogel, se consiga imitar la MEC del hígado y mantener el fenotipo de las HLCs durante el cultivo. Además, mediante el entrecruzamiento seleccionado se ha de generar una IPN con propiedades mecánicas próximas a las de la MEC hepática. Por un lado, se han de entrecruzar las cadenas de colágeno mediante el *cross-linker* 4S-StarPEG. Por otro lado, han de entrecruzar las cadenas de HA al reaccionar los grupos fenoles de la Tyr injertada en este. En base a la literatura científica, se presupone que incorporar HA al hidrogel permitirá obtener hidrogeles más resistentes y con mejores propiedades biomecánicas. Se espera que estos hidrogeles permitan encapsular células soportando las tensiones y fuerzas que estas puedan generar y permitan su cultivo prolongado en el tiempo. Para la puesta a punto se seleccionará un modelo celular menos complejo, como la línea celular HepG2 que permitirá establecer las mejores condiciones para el cultivo 3D. Por otro lado, siguiendo protocolos ya establecidos se prevé la obtención de HLCs a partir de iPSCs reprogramadas de PBMCs. Se espera que estas células expresen marcadores específicos y realicen funciones específicas hepáticas. Por último, se espera que el cultivo de estas HLCs permita realizar ensayos de *high-content screening* (HCS) mediante los cuales se pueda predecir la hepatotoxicidad de fármacos, así como determinar si el modelo propuesto es predictivo.

3. OBJETIVOS

La hepatotoxicidad causada por fármacos es uno de los principales motivos de retirada de medicamentos comercializados o en fase clínica. Estos hechos se producen por la falta de modelos *in vitro* lo suficientemente predictivos como para detectar fármacos que causen hepatotoxicidad en las fases preclínicas. Por ello, ha aumentado el interés por el diseño de modelos más robustos y precisos. Las técnicas de cultivo 3D han sido seleccionadas para prolongar el cultivo de células y conseguir modelos con mayor viabilidad celular y que permitan mantener el fenotipo de los hepatocitos. El objetivo general del presente proyecto es describir un diseño experimental basado en materiales novedosos, fundamentado en la literatura reciente, para poder llevarlo a cabo en el laboratorio en un futuro inmediato. Los objetivos concretos se describen a continuación.

El primer objetivo es describir detalladamente la preparación de los biopolímeros, la química del entrecruzamiento, el protocolo para la síntesis de hidrogeles tanto puros como las posibles combinaciones y su caracterización. Concretamente, se detalla cómo determinar el tiempo de gelificación por reometría, análisis mecánico a compresión y hinchado de equilibrio. En base a la literatura científica, se espera poder estimar cuál es la mejor composición del hidrogel.

El segundo objetivo es establecer los protocolos de reprogramación a iPSCs a partir de PBMCs y de diferenciación a HLCs, así como los ensayos de caracterización para ambos tipos celulares. Por otro lado, se describe el protocolo de encapsulación de la línea HepG2 y las HLCs en los hidrogeles y se plantea un ensayo de funcionalidad y hepatotoxicidad que permita evaluar la hepatotoxicidad de fármacos. Se plantea el uso de la línea HepG2 para la puesta a punto del cultivo 3D. Se pretende comparar el cultivo 3D de HLCs en hidrogeles frente al cultivo en monocapa para comprobar si el modelo 3D recrea más fielmente el ambiente *in vivo*. De esta manera, se puede comprobar si el modelo *in vitro* diseñado es capaz de predecir la hepatotoxicidad. Para ello se plantea un ensayo de hepatotoxicidad de HCS con 15 fármacos y se evalúan diferentes *endpoints*.

El último objetivo a alcanzar es el análisis crítico del potencial del modelo *in vitro* en base a los materiales empleados y a las ventajas que presenta frente a otras aproximaciones. No obstante, también se quieren exponer posibles limitaciones que puedan surgir y que deban ser solucionadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Biopolímeros

Los hidrogeles propuestos se basan en una combinación de dos biopolímeros: colágeno (Col) y HA. El colágeno seleccionado corresponde con la solución Fibricol® de 10 mg/mL de atelocolágeno bovino tipo I de la empresa Advanced BioMatrix. El HA propuesto es distribuido por la empresa Sigma Aldrich en formato de sal sódica y derivado de *Streptococcus equi*.

4.1.2. Síntesis y caracterización de hidrogeles

Los materiales necesarios para el injerto de Tyr son cloruro de sodio (NaCl), hidrocloreto de tiramina (98%), ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico (>99%, MES) y N-Hidroxisuccinimida (98%, NHS), todos de la casa comercial Sigma Aldrich. Además, se emplea N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) de Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Alemania.

El entrecruzamiento de los hidrogeles requiere de peróxido de hidrógeno (30% w/w en H₂O, H₂O₂), peroxidasa de rábano de tipo VI – *horseradish peroxidase* (HRP), polietilenglicol de 4 brazos

con glutarato de succinimidilo (4S-StarPEG), todos de Sigma Aldrich. También se emplea medio de cultivo completo Ham's F12/Leibovitz L-15 (1:1 v/v) de GIBCO, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Sigma Aldrich), azida de sodio (99.5%, ReagentPlus), tampón fosfato salino 1x y 10x (PBS 1x, PBS 10x) e hidróxido de sodio (NaOH 1 M). Además, serán necesario el equipo de espectrofotometría Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies), el reómetro Discovery HR-2 Hybrid (TA Instruments) y el equipo de análisis termomecánico EXSTAR TMA/ss6000 (Seiko Instruments Inc).

4.1.3. Materiales para el cultivo celular

El medio de cultivo para las células HepG2 es Ham's F12/Leibovitz L-15 (1:1 v/v) de GIBCO suplementado con L-Glutamina (BioChrom), suero fetal bovino (SFB, Linus), glucosa (Sigma Aldrich), albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Aldrich), bicarbonato sódico (Grifols) y penicilina-estreptomocina (GIBCO).

Para llevar a cabo la reprogramación se necesitan los vectores de reprogramación del kit *CytoTune™ 2.0 Sendai reprogramming*, PBMCs de sangre fresca o congeladas, Ficoll-Paque® Plus (Sigma Aldrich), gelatina (2% w/v), fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (MEF) y los medios PBMC, StemPro™-34 sin citoquinas y medio de iPSC cuyas composiciones están recogidas en la *Tabla 2*. Todos los reactivos necesarios para la reprogramación están descritos en el kit *CytoTune™ 2.0 Sendai reprogramming* y se adquieren de la casa comercial Thermo Fisher, excepto los MEF (Gibco). Puede ser necesario DMSO si se decide congelar las células y es opcional el uso de penicilina-estreptomocina o de bromuro de hexadimetrina (Sigma Aldrich).

Tabla 2. Composiciones de los medios PBMC, StemPro™-34 sin citoquinas y Complete Essential 8™ (Thermofisher, 2013).

| Medio PBMC | Medio StemPro™-34 sin citoquinas | Medio iPSC |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Medio StemPro™-34 | StemPro®-34 SFM | DMEM/F-12; GlutaMAX™; KSR |
| L-Glutamina | L-Glutamina | β-mercaptoetanol; MEM; βFGF |
| SCF; FLT-3; IL-3; IL-6 | StemPro®-34 Nutrient Supplement | Penicilina-Estreptomocina; |

Abreviaturas: SCF: *Stem cell factor*; FLT: fms like tyrosine kinase 3; IL-3: interleucina 3 ;IL-6: interleucina 6; MEM: minimal essential medium; KSR: knockout serum replacement ; βFGF: basic fibroblast growth factor.

La caracterización de iPSCs requiere medio FluoroBrite™ DMEM y el kit de inmunofluorescencia denominado *TRA-1-60 Mouse anti-human mAb AlexaFluor™ 488 Conjugate Kit for Live Cell Imaging*, ambos de Termo Fisher.

El protocolo para la diferenciación de iPSCs a HLCs requiere diferentes citoquinas y factores de crecimiento, todos ellos de Peprotech, excepto LY294002 de Cayman Chemical y CHIR99021 de STEMCELL technologies. Además, es necesario Corning®Matrigel®, medio de cultivo de hepatocitos (HCM, Lonza), medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Gibco) y medio químicamente definitivo (CDM). Este medio está compuesto por BSA, DMEM-F12, IMDM, concentrado de lípidos, tioglicerol, insulina, transferrina y penicilina-estreptomocina, todos ellos de Gibco (Hannan et al., 2013). Durante la diferenciación, se lleva a cabo la caracterización de los tipos celulares que se obtienen. La inmunofluorescencia necesita paraformaldehído, Triton X-100, suero fetal bovino (SFB), albúmina de suero bovino (BSA), los anticuerpos recogido en la *Tabla 3* y el microscopio Leica HMR (Leica Microsystems).

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunofluorescencia (Tolosa et al., 2015).

| Anticuerpo | Empresa | Número Ref. | Dilución |
|------------------|------------|-------------|----------|
| Primarios | | | |
| OCT4 | Santa Cruz | SC-5279 | 1:200 |
| NANGO | R&D | AF1997 | 1:100 |

| | | | |
|--------------------|-------------------|-----------------|--------|
| TRA-1-60 | Millipore | MAB4360 | 1:150 |
| GATA4 | Santa Cruz | SC-1237 | 1:200 |
| SOX17 | R&D | MAB1924 | 1:500 |
| FOXA2 | Santa Cruz | SC-6554 | 1:100 |
| HNF4 α | Santa Cruz | SC-8987 | 1:200 |
| CK19 | Dako | M0888 | 1:200 |
| HNF6 | Santa Cruz | SC-13050 | 1:200 |
| HNF1 α | Santa Cruz | SC-135939 | 1:200 |
| EPCAM | AbCys | ABC171 | 1:200 |
| AFP | Santa Cruz | SC-8399 | 1:200 |
| ALB | Cedarlane | CL2531A | 1:200 |
| CYP3A4 | Santa Cruz | SC-27639 | 1:100 |
| A1AT | Dako | A0012 | 1:400 |
| CLDN1 | Life Technologies | 187362 | 1:200 |
| CD81 | BD Pharmingen | 555675 | 1:200 |
| SRB1 | Novus Biologicals | NB400-131 | 1:100 |
| OPN | Santa Cruz | SC-21742 | 1:200 |
| HNF1 β | Santa Cruz | SC-7411 | 1:200 |
| CK7 | Dako | M7018 | 1:200 |
| CK18 | Chemicon | CBL185 | 1:100 |
| CFTR | AbCam | AB2784 | 1:500 |
| Secundarios | | | |
| Donkey anti-goat | Molecular Probes | A11055 - A11057 | 1:1000 |
| Donkey anti-rabbit | Molecular Probes | A32306 - A10042 | 1:1000 |
| Donkey anti-mouse | Molecular Probes | A21202 - A10037 | 1:1000 |

Por otro lado, se necesitan el kit comercial de Qiagen para la extracción de ARN y los reactivos de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR – del inglés real-time reverse transcription PCR). Concretamente, se necesita el *mix* de PCR SYBR Green I Master y el colorante RiboGreen®, ambos de Invitrogen™. Además, son necesarios los primers recogidos en la *Tabla 4* y el termociclador LigthCycler Relativa Quantification (Roche Applied Sciences). Para realizar la citometría de flujo es necesario la tinción 7AAD (Beckman coulter A01104) y el quipo Accuri C6 (BD biosciences).

Tabla 4. Primers empleados en RT-PCR y q RT-PCR en la caracterización (Tolosa et al., 2015).

| Primers empleados en RT-PCR de mRNAs humanos | | | | |
|--|-----------|------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| Gen | Dirección | Secuencia del primer 5' → 3' | Temperatura de annealing (°C) | Tamaño amplicón (pb) |
| HNF4 α | Forward | CGGGTGTCCATACGCATCCTTG | 60 | 347 |
| | Reverse | GACCCTCCCAGCAGCATCTCCT | | |
| AFP | Forward | AGCTTGGTGGTGGATGAAAC | 58 | 248 |
| | Reverse | CCCTCTTCAGCAAAGCAGAC | | |
| ALB | Forward | CCTTTGGCACAATGAAGTGGGTAACC | 58 | 354 |
| | Reverse | CAGCAGTCAGCCATTCACCATAGG | | |
| FOX1B | Forward | GGGCGCACGGCGGAAGATGAA | 63 | 493 |
| | Reverse | CCACTCTCCAAGGGAGGGCTC | | |
| LDLR | Forward | GGGCTGGAATTGCGCTGGACCGTC | 60 | 374 |
| | Reverse | TCACAGACGAACTGCCGAGAGATGC | | |
| β -ACTIN | Forward | GCACTCTCCAGCCTTCCTTCC | 60 | 521 |
| | Reverse | CTGCTGTCACCTTACCCTTCC | | |

Primers empleados en qRT-PCR de mRNAs humanos

| Gen | Dirección | Secuencia del primer 5' → 3' |
|----------------|-----------|------------------------------|
| OCT-4 | Forward | GGTATTCAGCCAAACGACCA |
| | Reverse | TTGCCTCTCACTCGGTTCTC |
| HNF-4 α | Forward | GCCTACCTCAAAGCCATCAT |
| | Reverse | GACCCTCCAGCAGCATCTC |
| ALBUMIN | Forward | TGAGAAAACGCCAGTAAGTGAC |
| | Reverse | TGCGAAATCATCCATAACAGC |
| OTC | Forward | GCTGATTACCTCACGCTCCA |
| | Reverse | TGGTTACTAGCATCCGGC |
| MRP | Forward | GCCGGTGGTCAGATTATCAT |
| | Reverse | GATCTTGGATTTCCGAAGCA |
| UGT1A1 | Forward | AGACGTACCCTGTGCCATTC |
| | Reverse | CCGTCAGCATGACATCAAAG |
| UGT2B7 | Forward | TCAGTTCTCTCTGGCTACTT |
| | Reverse | ACGTCAGCTTCCCATTTGTCTCAG |

Abreviaturas: RT-PCR: real-time reverse transcription PCR; qRT-PCR: real-time quantitative reverse transcription PCR; mRNA: microRNA.

El análisis de funcionalidad requiere kit Quantichrom™ Urea assay (Diur 500, Bioassay Systems), kit ELISA de albúmina humana (Bethyl Laboratories), HEPES salino (10 mM HEPES, 2 mM Cl_2Ca , 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM MgCl_2 , 10 mM glucosa), cloruro de amonio (NH_4Cl , 1 M), cloruro de calcio (NaCl, 87.5 mM) y el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies). Además, el kit de tinción de PAS (Sigma Aldrich), insulina (10^{-7} M), glucagón (10^{-6} M) y paraformaldehído 4%. Por otro lado, es necesario el colorante indocianina verde (ICG), medio HCM y el microscopio Leica HMR (Leica Microsystems). Por último, serán necesarios los sustratos fenacetina, diclofenaco, bufuralol, clorzoxanona y midazolam para la evaluación del citocromo P450, β -estradiol para el ensayo de UGT1A y disponer de un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia en tándem con espectrometría de masas (HPLC/MS).

La viabilidad celular tras la encapsulación se evalúa con el kit comercial *LIVE/DEAD Cell Viability Assay* (Invitrogen™). Por último, para el ensayo de hepatotoxicidad son necesarios los siguientes compuestos: amiodarona, azatioprina, betaína, clorpromazina, dexametasona, flutamida, isoniazida, isoproterenol, ketoconazol, ketotifeno, metotraxto, simvastatina, estrpetomicina, tacrina y valproato que se adquieren en Sigma Aldrich-Merck. Además, son necesarias las sondas fluorescentes Hoechst 33342 yoduro de propidio (PI) de Sigma Aldrich y TMRM, Fluo-4 AM y BODIPY 665/676 de Molecular Probes (Invitrogen).

4.2. Hidrogeles

4.2.1. Modificaciones químicas

4.2.1.1. Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular (HA-LMW)

El HA es un polímero de alto peso molecular y presenta una elevada viscosidad que dificulta su manipulación y filtrado para la esterilización. Por ello, se plantea la degradación del HA en uno de bajo peso molecular (LMW – del inglés *low molecular weight*) mediante degradación ácida.

Primero, se prepara una disolución de 50 mL 1% (w/v) de HA y se deja disolver en agitación y en nevera durante 24 h. Al día siguiente, se ajusta a pH 0.5 empleando HCl concentrado y se mantiene en agitación a 37°C durante 24 h para que se lleve a cabo la degradación del HA. A continuación, con el objetivo de detener la degradación ácida, se neutraliza la disolución empleando hidróxido de sodio (NaOH) y se procede a dializar la muestra para purificarla. La diálisis se realiza en agua desionizada durante 2 días con 3 cambios de agua al día. La membrana de diálisis

es de 3500 MWCO (del inglés *molecular weight cut-off*) y previamente ha de ser hidratada y lavada. Por último, la muestra se liofiliza durante 4 días obteniendo HA-LMW liofilizado (Poveda-Reyes et al., 2016; Sanmartín-Masiá, 2016). Las disoluciones de HA se mantienen en oscuridad o envueltas en papel de aluminio para evitar la degradación por la luz.

4.2.1.2. Síntesis de ácido hialurónico de bajo peso molecular con injerto de tiramina (HA-Tyr)

La reticulación del HA para el entrecruzamiento del hidrogel está basada en la oxidación de moléculas de Tyr (injertadas en el HA) catalizada por peroxidasa y peróxido de hidrógeno. Por esta razón, se necesita una etapa previa de inserción de Tyr en el HA, proporcionando grupos fenoles que posteriormente se oxidan para formar el hidrogel. La Tyr se incorpora a una disolución de HA y sus grupos amina reaccionan con los grupos carboxílicos presentes en las cadenas del HA (Figura 2) (Poveda-Reyes et al., 2016). El protocolo propuesto está basado en el procedimiento reportado por Darr & Calabro (2009) y los ratios molares recogidos en la Tabla 5.

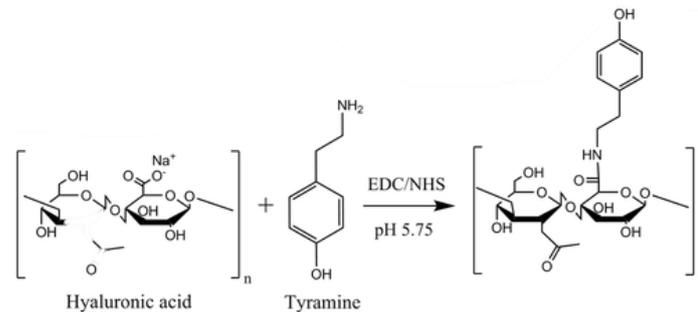


Figura 2. Reacción de injerto de Tyr en HA. EDC y NHS se emplean como catalizadores y activadores de la reacción (Lee et al., 2008; Sanmartín-Masiá, 2016).

Tabla 5. Ratios molares para el injerto de Tyr (Sanmartín-Masiá, 2016) .

| Tyr:COOH | EDC:COOH | EDC:Tyr | NHS:EDC |
|----------|----------|---------|---------|
| 2:1 | 1:1 | 1:2 | 1:10 |

Abreviaturas: COOH: grupos carboxilo del HA; EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; NHS: N-Hidroxisuccinimida.

Primero, se preparan 20 mL de disolución de agua miliQ junto a 175.3 mg de NaCl, 1.08 g de MES (0.276 M en la disolución final) y 0.3 mL de NaOH 5 M (75 mM en la disolución final). A continuación, se ajusta la disolución a pH 5.75 y se añaden 100 mg de HA-LMW (0.5% w/v) obtenido siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.1.1. Se deja la disolución en agitación durante 2 h a temperatura ambiente para asegurar la correcta disolución del HA.

Tras 2 h en agitación, se añaden 86.54 mg de Tyr y se deja agitando durante 15-20 min a temperatura ambiente. Se ajusta de nuevo el pH a 5.75 y se adicionan 47.77 mg de EDC y 2.87 mg de NHS que actúan como catalizadores y activadores de la reacción. Cuando los componentes están disueltos, se deja la disolución en agitación durante 24 h a 37°C. El siguiente paso consiste en dializar la disolución empleando membranas de 3500 MWCO durante 3 días con 3 cambios de agua al día. El primer día se dializa en una disolución 150 mM de NaCl y el resto de los lavados en agua desionizada. Una vez finalizada la diálisis, se liofiliza para obtener HA-Tyr liofilizado.

4.2.1.3. Determinación del grado de sustitución de tiramina

El grado de injerto de Tyr (número de moléculas de Tyr por cada 100 unidades disacáridas de HA) se puede determinar empleando diferentes técnicas como la resonancia magnética de protón (¹H-NMR) o por espectrofotometría (Lee et al., 2008; Sanmartín-Masiá, 2016). En este modelo, se propone medir la absorbancia por espectrofotometría UV de una muestra de HA-Tyr. Mediante una curva patrón con diferentes concentraciones conocidas de Tyr se extrapola el grado

de sustitución de Tyr de la muestra. Las mediciones se realizan a una longitud de onda de 275 nm característica de grupos fenoles, realizando las calibraciones oportunas (Sanmartín Masiá, 2016).

4.2.2. Entrecruzamiento

Por un lado, se produce el entrecruzamiento de las cadenas de HA mediante una reacción oxidativa catalizada por la HRP donde el H_2O_2 actúa como oxidante de los grupos fenoles de la Tyr (Figura 3). Por otro lado, el *cross-linker* 4S-StarPEG permite entrecruzar las cadenas de colágeno. Concretamente, los grupos NHS del 4S-StarPEG reaccionan con los grupos amina disponibles en la molécula de colágeno (Figura 4). Al generar estos entrecruzamientos simultáneamente se obtiene un hidrogel cuya organización corresponde con una red polimérica interpenetrada – o *interpenetrating polymer network* (IPN) – de Col/HA (Figura 5).

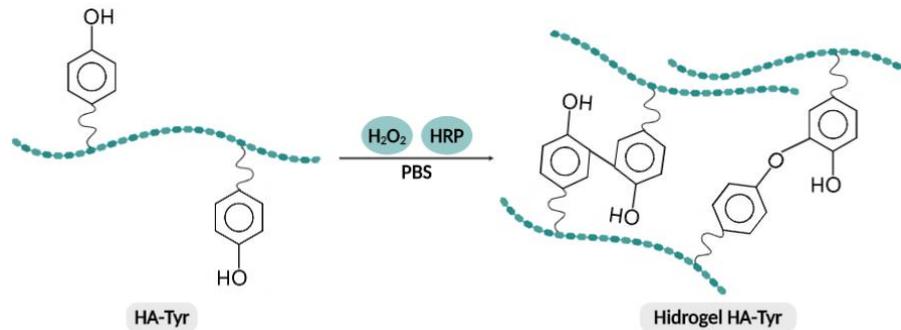


Figura 3. Entrecruzamiento enzimático mediante HRP en presencia de H_2O_2 de las cadenas de HA-Tyr.

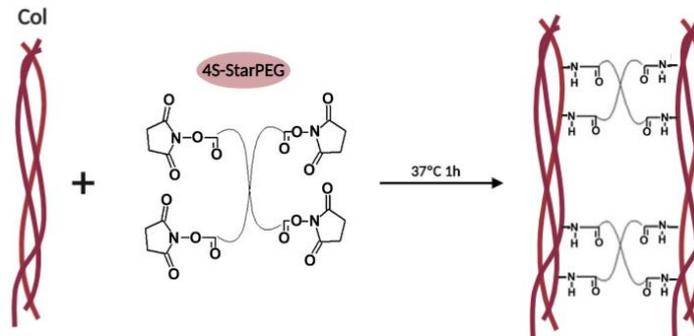


Figura 4. Reacción entre colágeno y 4S-StarPEG. Los grupos NHS del 4S-StarPEG reaccionan con los grupos amina del colágeno.

Las IPNs se conocen como redes poliméricas compuestas por la combinación de dos polímeros, en la que al menos uno se entrecruza en presencia de otro y en la que no aparecen enlaces entre los dos polímeros. De manera que para disgregar la red es necesario romper los enlaces del polímero entrecruzado (Raina et al., 2019; Shivashankar & Mandal, 2012).

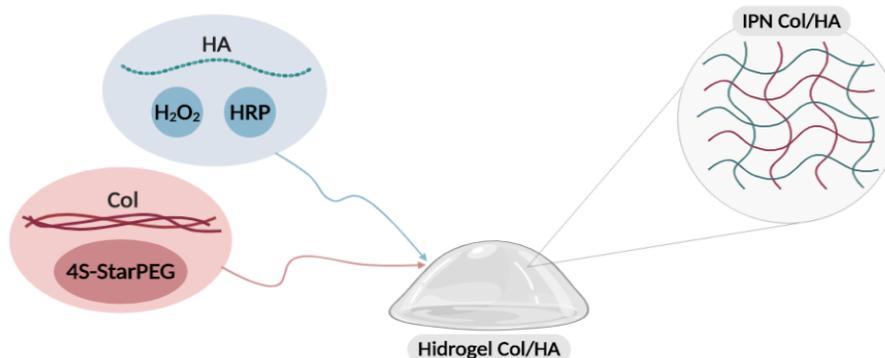


Figura 5. Entrecruzamiento de los polímeros para formar una IPN de Col/HA.

Los hidrogeles puros de HA se sintetizan siguiendo el procedimiento que describen Poveda-Reyes et al. (2016) y Sanmartín (2016). Primero, se prepara la disolución al 1% w/v de HA en medio F12 y se deja a 4°C durante 24 h para asegurar la completa disolución. Las proporciones volumétricas de un hidrogel puro de HA son:

- 80 % v/v de HA 1% w/v en medio F12.
- 10 % v/v de HRP 12.5 U/mL (concentración final en el hidrogel de 1.25 U/mL) en medio F12.
- 10 % v/v de H₂O₂ 20 mM (concentración final en el hidrogel de 2 mM) en medio F12.

Para generar los hidrogeles se emplea una placa de 48 pocillos. Previamente se preparan los reactivos con la concentración descrita previamente. Primero, se dispone el volumen de la disolución de HA, sobre ella el volumen de HRP y a continuación, pipeteando para homogeneizar, se dispone el volumen de H₂O₂.

Los hidrogeles puros de colágeno se sintetizan siguiendo el procedimiento descrito por Sallent et al. (2019) con algunas modificaciones. Primero, se prepara la disolución del entrecruzador 4S-StarPEG. Para ello se disuelven 25 mg de 4S-StarPEG en 125 µL PBS 1x. A esta disolución se añaden 210 µL de PBS 10x y 100 µL NaOH 1M. De esta manera, al añadir el entrecruzador al hidrogel se espera alcanzar un pH próximo a 7. Las proporciones del hidrogel puro de colágeno son:

- 82.8 % v/v de colágeno 1% w/v.
- 17.2 % v/v de la disolución de 4S-StarPEG.

El procedimiento de síntesis de hidrogeles puros de colágeno requiere un paso previo en el que se ajusta a 4 el pH de la disolución de colágeno al 1 % w/v empleando NaOH 1 M. Se emplean placas de 48 pocillos, sobre los que dispone primero el volumen de colágeno y sobre él, se deposita el volumen de 4S-StarPEG, pipeteando para que el hidrogel sea homogéneo.

El protocolo propuesto para la obtención de los hidrogeles Col/HA está basado en los procedimientos independientes de hidrogeles de colágeno y HA previamente descritos (Sallent et al., 2019; Sanmartín-Masiá, 2016). Se mantienen las proporciones establecidas en estos trabajos, pero se recalculan las concentraciones de los reactivos, teniendo en cuenta que el volumen final del hidrogel corresponde con la mezcla de ambos polímeros junto al 4S-StarPEG, HRP y H₂O₂. Se plantea el entrecruzamiento de hidrogeles de diferentes proporciones, así como hidrogeles puros de colágeno y HA. Se plantean las siguientes proporciones volumétricas de Col/HA: 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 y 0/100. El volumen de colágeno incluye también el de 4S-StarPEG y el volumen del HA incluye el H₂O₂ y la HRP manteniendo las proporciones de los hidrogeles puros.

Un hidrogel Col/HA 50/50 presentará un 50% v/v de los componentes del HA (incluyendo el HA, H₂O₂ y HRP) y el otro 50 % v/v de colágeno (incluyendo el colágeno y el 4S-StarPEG). De esta manera, si se quieren mantener las proporciones de los hidrogeles puros de HA (80% v/v HA, 10% v/v H₂O₂ y 10 % v/v HRP) y colágeno (82.8 v/v colágeno 1% y 17.2 v/v de 4S-StarPEG) en el hidrogel final, las composiciones finales han de ser las recogidas en la *Tabla 6*.

De este modo, se calculan los porcentajes para los hidrogeles 27/75 y 75/25. En el primer caso, estará compuesto por 25 % v/v de colágeno y 4S-StarPEG, concretamente, 20.7 % v/v de colágeno 1 % w/v y 4.3 % v/v de 4S-StarPEG, mientras que constará de un 75% de HA, H₂O₂ y HRP. Este 75% incluye un 60 % v/v de la disolución de HA, 7.5 % v/v de H₂O₂ y 7.5 % v/v de HRP. En el segundo caso, el hidrogel estará compuesto por un 75 % v/v de los componentes del colágeno

(62.1 % v/v de colágeno 1 % w/v y 12.9 % v/v de 4S-StarPEG) y un 25 % v/v de la porción de HA (20 % v/v de HA 1 % w/v, 2.5 % de H₂O₂ y 2.5 % v/v de HRP).

Tabla 6. Ejemplo de composición de un hidrogel Col/HA 50/50.

| Compuesto | Porcentaje v/v | Concentración en el hidrogel |
|-------------------------------|----------------|------------------------------|
| HA-Tyr | 40% | 0.4 % w/v |
| HRP | 5% | 1.25 U/mL |
| H ₂ O ₂ | 5% | 2 mM |
| Colágeno | 41.4% | 0.41 % w/v |
| 4S-StarPEG | 8.6% | 1 mM |

A continuación, se describe el procedimiento para obtener un hidrogel Col/HA 50/50. Para el resto de las combinaciones, se han de preparar los materiales a la concentración inicial adecuada para mantener las concentraciones finales (Tabla 5). Por un lado, se preparan los componentes del HA. Primero, una disolución al 1% w/v de HA en medio F12 que se deja durante 24 h a 4°C para que se disuelva completamente. A continuación, se prepara la disolución de HRP 25 U/mL en medio F12 y la disolución de H₂O₂ 40 mM en medio F12. Por otro lado, para la fracción del colágeno se prepara la disolución de 4S-StarPEG 11.5 mM adicionando 25 mg de 4S-StarPEG a 62.5 µL PBS 1x, 105 µL PBS 10x y 50 µL NaOH 1 M. Además, se ajusta a 4 el pH de la alícuota de colágeno 1% w/v empleando NaOH 1M. El objetivo de ajustar el pH a 4 es evitar que se produzca una gelificación prematura del colágeno y pueda ser inyectable.

Se propone preparar hidrogeles de 100 µL de volumen total. Por un lado, se mezclan 40 µL de HA 1 % w/v, 5 µL HRP 25 U/mL y 8.6 µL de 4S-StarPEG 11.5 mM. Por otro lado, se prepara la disolución compuesta por 41.4 µL de colágeno 1% w/v y 5 µL de H₂O₂ 40 mM. A continuación, sobre una placa de 48 pocillos se dispone la primera disolución y sobre ella, pipeteando varias veces, se dispone la segunda asegurando la correcta homogeneización. Los hidrogeles se introducen en la estufa a 37°C durante 30 min para inducir la gelificación.

4.2.3. Tiempo de gelificación y propiedades biomecánicas

Los hidrogeles diseñados han de presentar unas propiedades biomecánicas adecuadas para el cultivo celular, es decir, que permitan la encapsulación celular manteniendo su integridad. Sin embargo, más allá de la encapsulación se debe intentar reproducir lo más miméticamente posible el microambiente hepático recreando el ambiente mecánico del tejido (Lee et al., 2008). Por estas razones, determinar las propiedades del hidrogel es un paso indispensable para seleccionar la composición idónea. Se plantea la caracterización de los hidrogeles Col/HA a diferentes concentraciones mediante ensayos de reología empleando el reómetro Discovery HR-2. Para el ensayo se emplea la geometría de 20 mm y se establece una distancia entre el plato y el vástago de 750 µm. Además, se establece una temperatura de 37°C. Acoplado al dispositivo, se incluye el sistema *solvent trap* que permite minimizar la pérdida de solvente durante el ensayo. Las muestras se someten a tres barridos: barrido en tiempo oscilatorio, barrido de deformación y barrido de frecuencia (Ghosh et al., 2005; Zuidema et al., 2014).

El tiempo de gelificación se determina con un barrido en tiempo oscilatorio mediante deformación por cizalla. El reómetro se programa en barrido oscilatorio con 1% de deformación y 1 Hz de frecuencia durante 30 min y se recogen los valores para el módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdidas (G''). Así se consigue seguir la cinética de gelificación para determinar el tiempo necesario para completar la reticulación del hidrogel.

Por otro lado, para confirmar que al 1% de deformación el material se encuentra en su rango viscoelástico lineal, se propone medir el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdidas (G'') en un barrido de deformación a 1 Hz y deformación entre 0.01 – 10 %. Por último, se caracterizan las propiedades mecánicas (G' y G'') de los hidrogeles ya gelificados mediante un barrido de frecuencia entre 0.01 – 10 Hz al 1% de deformación (si resulta estar en el rango lineal).

Para determinar el tiempo de gelificación, la gelificación se produce *in situ* sobre el plato del reómetro siguiendo las proporciones establecidas en apartado 4.2.2. Primero, se preparan los reactivos siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.2. A continuación, se deposita el volumen correspondiente de la disolución que contiene el HA, la HRP y el 4S-StarPEG y sobre este se dispone el volumen de la disolución del colágeno y el H₂O₂. Se pipetea y homogeniza para asegurar una distribución uniforme de los polímeros en todo el hidrogel.

La caracterización de los hidrogeles también se lleva a cabo realizando ensayos de compresión sobre hidrogeles previamente moldeados, con el objetivo de determinar el módulo de Young. Los hidrogeles se sintetizan sobre moldes cilíndricos de agarosa de 8 mm de diámetro siguiendo el procedimiento descrito previamente. Tras incubarlos durante 1 h a 37°C para inducir la gelificación, se extraen del molde de agarosa. Se equilibran en DPBS durante 24 h. Para medir el módulo de Young se someten al ensayo de compresión en inmersión en DPBS mediante el equipo EXSTAR TMA/ss6000. Primero, sufren una predeformación del 2% seguido de una compresión a 50 $\mu\text{m}/\text{min}$ hasta alcanzar un 90% de deformación. Por último, se obtiene el módulo de Young calculando la pendiente en la región lineal de las curvas tensión-deformación.

4.2.4. Hinchado de equilibrio

Los hidrogeles pueden hincharse sin disolverse siendo capaces de incorporar elevadas cantidades de agua (Sanmartín-Masiá, 2016). Por ello se determina el hinchado de equilibrio sumergiendo las IPNs previamente entrecruzadas en DPBS (0.02 % azida) durante 24 h. Al siguiente día, se retira el exceso de agua de la superficie de los hidrogeles, se someten a 3-4 lavados de 10 minutos cada uno para eliminar las sales del DPBS y se pesan para determinar el peso en estado hinchado (m_w). A continuación, se liofilizan los hidrogeles hinchados y se vuelven a pesar para determinar el peso seco (m_d) (Sanmartín-Masiá, 2016). El contenido de agua de equilibrio (*Equilibrium Water Content* – EWC) se calcula empleando la *Ecuación 1*.

$$EWC = \frac{m_w - m_d}{m_d} \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo del grado de hinchamiento (Sanmartín-Masiá, 2016).

4.3. Células

4.3.1. Línea HepG2

La línea HepG2 es una línea hepática inmortalizada derivada de hepatoma humano, lo que significa que tiene una disponibilidad ilimitada y, además, presenta un fenotipo estable y es fácil de cultivar y manipular. Sin embargo, presenta limitaciones como una baja expresión de enzimas hepáticas y no representa la funcionalidad compleja de un hepatocito (Gómez-Lechón et al., 2014a; Mueller et al., 2013). No obstante, es una de las líneas inmortalizadas más empleadas en hepatotoxicidad y por ello, se ha seleccionado para la puesta a punto previa al cultivo las HLCs (Gómez-Lechón et al., 2014a; Tolosa et al., 2012).

Las HepG2 se cultivan en medio completo Ham's F12/Leibovitz L15 suplementado con L-glutamina (2 mM), 7% de SBF, glucosa (0.01 M), BSA (1 mg/ml), bicarbonato (0.01 M) y penicilina/estreptomina (Tolosa et al., 2012). Primero, las células en monocapa se lavan con PBS estéril asegurando que se reparte por toda la superficie. A continuación, se añade la tripsina y se

incuba a 37°C durante 2-3 min. Se añade el medio completo para inactivar la tripsina y se lava la superficie en la que estaban adheridas las células. Se recoge todo el volumen y se centrifuga a 1500 rpm durante 3 min. Se descarta el sobrenadante y se resuspende en medio de cultivo. A continuación, se lleva a cabo el conteo celular cargando 10 µL de la suspensión celular en la cámara de Neubauer. Se calcula la concentración celular siguiendo la *Ecuación 2* y se calcula el volumen necesario para la siembra. Se pasa el volumen a una placa nueva con medio fresco y se incuban a 37°C y 5% CO₂.

$$\text{Concentración celular } \left(\frac{\text{céls}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{Total células contadas} \times \text{dilución}}{\text{Número de cuadrados}} \times 10^4$$

Ecuación 2. Cálculo de la concentración celular (células/mL) con la cámara de Neubauer.

4.3.2. Hepatocitos derivados de *induced Pluripotent Stem Cells* (iPSCs)

El modelo propuesto emplea células hepáticas derivadas de iPSCs, conocidas como HLCs. Las iPSCs provienen de la reprogramación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). El procedimiento requiere la extracción de las células mononucleares, su reprogramación a iPSCs y la consiguiente diferenciación a células hepáticas. Esta aproximación permite establecer una fuente estable de HLCs para modelos *in vitro* de hepatotoxicidad (Donato et al., 2013).

4.3.2.1. *Reprogramación de PBMCs a iPSCs*

El procedimiento para obtener las iPSCs está descrito en el protocolo de *CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming kit* de Thermo Fisher para PBMCs (*Figura 6*) (Thermofisher, 2013).

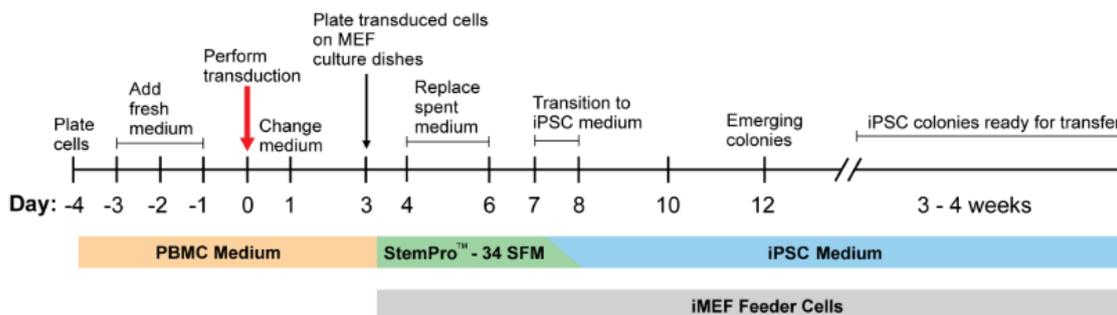


Figura 6. Time-line del protocolo de reprogramación de PBMCs de *CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming kit* (Thermofisher, 2013).

La extracción de PBMCs puede realizarse mediante un método de separación por gradiente de densidad como, por ejemplo, Ficoll-Paque (Sharma et al., 2018). Las muestras de sangre de paciente se obtienen bajo el consentimiento informado de los pacientes y bajo las normas establecidas por el Comité Ético de Investigación Clínica de La Fe. Primero, se prepara la solución tampón PBMC mezclando PBS con EDTA 2 mM. Se mezclan 10 mL de sangre con 30 mL de tampón PBMC y en un tubo estéril se vierten 15 mL de Ficoll-Paque Plus. Sobre el Ficoll se disponen 35 mL de la mezcla de sangre y medio y se centrifuga a 400 xg durante 45 min. A continuación, con la micropipeta se absorbe la interfase entre la primera capa (plasma) y el Ficoll. Se transfiere a un tubo estéril al que se añaden 45 mL de tampón PBMC fresco y se centrifuga a 250 xg durante 15 min a temperatura ambiente. Se retira el sobrenadante, se resuspenden en 45 mL de tampón PBMC fresco y se centrifuga de nuevo. Se recupera el pellet y se resuspende en 1 mL de medio fresco PBMC. Las PBMCs se pueden congelar en SFB con 10 % DMSO.

El primer paso del protocolo de reprogramación comprende la descongelación de las PBMCs 4 días antes de la transducción y su paso a un eppendorf que contiene 5-10 mL de medio PBMC

previamente calentado. Se realiza el recuento celular preparando una alícuota con Trypan Blue 1:1. Se cargan 10 μL en la cámara Neubauer y se calcula la concentración celular teniendo en cuenta la dilución con Trypan Blue empleando la *Ecuación 2*. Tras realizar el conteo celular, se determina la viabilidad y se centrifuga a 200 xg durante 10 min. Se retira el sobrenadante y se resuspenden con medio PBMC a una concentración de 5×10^5 células/mL. A continuación, se añade 1 mL de esta suspensión en placas de 24 pocillos y se incuban a 37°C y 5% CO_2 . Durante los próximos 3 días, se retiran 0.5 mL del medio de cada pocillo y se reemplaza por 0.5 mL de medio PBMC fresco.

Tras 4 días en cultivo, se procede a la transducción de las PMBCs establecido en el protocolo como día 0. Primero, se realiza el recuento celular y se calcula el volumen de virus necesario para alcanzar los MOI (del inglés *multiplicity of infection* – índice que relaciona el número de partículas víricas con el número de células diana) deseados mediante la *Ecuación 3*. A continuación, se atemperan los tubos de CytoTune™ 2.0 Sendai que se encuentran a -80°C , pasándolos al baño de agua a 37°C y después a temperatura ambiente. Se recogen las células, que se encuentran en suspensión, de todos los pocillos en un falcon de 15 mL. Se realiza el recuento celular y se separan en fracciones de 250,000 células. Se centrifugan estos tubos a 200 xg durante 10 min. Se retira el sobrenadante y se resuspenden con medio PBMC y los volúmenes de los virus calculado previamente hasta un volumen final de 300 μL . A continuación, se siembran 2.5×10^5 células en 300 μL de medio PBMC en nuevos pocillos de placas de 24. Se incuba la placa *overnight* en un incubador a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO_2 .

$$\text{Volumen de virus } (\mu\text{L}) = \frac{\text{MOI} \left(\frac{\text{CIU}}{\text{célula}} \right) \times \text{número de células}}{\text{concentración de virus (CIU/mL)} \times 10^{-3} (\text{mL}/\mu\text{L})}$$

Ecuación 3. Cálculo de concentración de virus en función del número de células (ThermoFisher, 2013).

Al siguiente día, se recoge el medio con las células en falcon de 15 mL para centrifugarlo a 200 xg durante 10 min, se retira el sobrenadante y se resuspenden en 0.5 mL de medio completo PBMC. Concretamente, se resuspende en 300 μL , se pasa al pocillo y con los otros 200 μL se terminan de resuspender los posibles restos del eppendorf asegurando que no se pierden células. Mediante este paso se consiguen retirar el virus Sendai de la suspensión. Se cultivan las células a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO_2 durante 2 días.

El siguiente paso requiere el cultivo previo de MEF irradiados sobre los que se cultivarán las PMBCs. Para ello se gelatiniza la placa de 6 pocillos con 700 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de gelatina 0.1 % w/v (se prepara disolviendo gelatina al 2 % precalentada a 37°C en agua miliQ). La placa se cultiva a 37°C y 5% CO_2 durante 30 min. A continuación, se calienta el medio MEF y se descongela el vial con los MEFs. Se pasan 4 mL de medio MEF en un falcon, se añaden los MEFs del vial y se centrifuga a 200 xg durante 5 min. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 5 mL de medio MEF. Tras hacer un recuento celular con Trypan Blue 1:1 con la cámara Neubauer, se siembran 250,000 cels/pocillo en 1 mL/pocillo y se incuban la placa a 37°C y 5% CO_2 . Al siguiente día, se comprueba que los MEFs se encuentren entorno al 70% de confluencia y se siembran las PMBCs para continuar con la reprogramación.

Primero, se recogen las PMBCs de las placas de 24 pocillos en un falcon de 15 mL, lavando cada pocillo con 500 μL de medio Stem-Pro™-34 sin citoquinas que se introduce también en el falcon. Se realiza el recuento celular con Trypan Blue 1:1 y se siembran 1×10^4 - 1×10^5 células por pocillo en las placas de 6 pocillos con los MEFs. Se añade 2 mL de medio completo StemPro™-34 sin citoquinas y se incuban a 37°C y 5% CO_2 durante 3 días (día 3 a día 6). Cada dos días, se reemplaza la mitad del medio por medio StemPro™-34 sin citoquinas. Para ello el medio que se

retira del pocillo se centrifuga a 200 xg durante 10 min para no perder las células. Se elimina el sobrenadante, se resuspende el pellet con medio fresco y se añade al pocillo correspondiente.

En el día 7 se retira 1 mL del medio StemPro™-34 y se reemplaza por medio iPSC. Tras 24 h, se cambia completamente el medio por medio fresco iPSC y a partir del día 8, se reemplaza el medio una vez al día y se monitoriza el avance de las células. La aparición de agregaciones indica que se han reprogramado y a las 15 días ya se empiezan a ver colonias de iPSCs que pueden transferirse a placas previamente cubiertas de Matrigel®. Para ello se atempera una alícuota de Matrigel® y se añade a 24 mL de DMEM/F12 frío en un falcon. Se mezcla e inmediatamente, se vierte sobre las placas de cultivo moviéndola para asegurar que cubre toda la superficie (para una placa de 6 pocillos se añade 1 mL por placa). A continuación, las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 h antes de ser empleadas y se elimina el exceso de la disolución de Corning® Matrigel® que pueda quedar.

4.3.2.2. Caracterización de iPSCs

Existen diferentes métodos para la caracterización de iPSCs (Martí et al., 2013). Entre ellos destaca el estudio de la expresión de proteínas de pluripotencialidad mediante inmunofluorescencia, el ensayo de fosfatasa alcalina, el estudio del cariotipo, ensayos de metilación del ADN o el potencial de diferenciación de las iPSCs.

En este proyecto, se propone la caracterización de las iPSCs mediante la detección por inmunofluorescencia de proteínas de membrana como Tra1-60 o Tra1-81 características de células madre embrionarias (ESCs). El procedimiento está establecido en la guía de *CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming kit* (Thermofisher, 2013). Primero, se prepara medio de cultivo que contiene el anticuerpo anti-Tra-1-60 o anti-Tra-1-80 en dilución 1:50. A continuación, se retira el medio de cultivo de las placas que contienen las colonias de iPSCs y se añade el medio con anticuerpo y se incuba durante 30 min a 37°C. A continuación, se elimina la solución y se lavan las células 2-3 veces con FluoroBrite™ DMEM. Por último, se visualizan las células mediante el microscopio Leica HMR (Leica Microsystems) para identificar y/o seleccionar las células positivas. Si las células se van a utilizar posteriormente, es importante que los anticuerpos se mantengan estériles. Se reemplaza el medio FluoroBrite™ DMEM por medio de cultivo fresco y se incuban a 37°C.

4.3.2.3. Diferenciación de iPSCs a HLCs

El proceso de diferenciación de iPSCs a HLCs es un proceso multietapa. La primera etapa corresponde con la diferenciación a células de endodermo definitivo (DE – del inglés *definitive endoderm*), la segunda con la evolución a células progenitoras hepáticas – denominadas hepatoblastos – y, por último, a HLCs. Conforme las células pasan por cada uno de estos estados, su expresión génica varía, lo que puede emplearse para la caracterización del estado de madurez en el que se encuentran. Sin embargo, las células resultantes de la diferenciación pueden encontrarse en un estado intermedio entre células hepáticas fetales y células adultas, por ello reciben el nombre de *HLCs* (Hannan et al., 2013). El protocolo descrito a continuación está basado en el procedimiento de Tolosa et al. (2015). Este procedimiento a su vez está basado en el protocolo de Hannan et al. (2013), pero con ligeras modificaciones (*Figura 7*).

El protocolo comienza con la siembra de las iPSCs en placas gelatinizadas. Para realizar la siembra de células a diferenciar se necesitan células individuales, por lo que se realiza un pase utilizando CDB (del inglés, *cell dissociation buffer*). Primero, se retira el medio, se lava con PBS atemperado, se añade CDB durante 5 min y se adiciona medio para levantar las células. A continuación, se centrifuga la suspensión a 1000 rpm durante 5 min y se resuspende el pellet. Se siembran las células en medio de mantenimiento de iPSCs y cuando el cultivo de iPSCs ha

alcanzado una confluencia de 80-90 % se inicia la diferenciación. Primero, se incuba durante 24 h con Activina A (100 ng/mL), β FGF (100 ng/mL), BMP4 (10 ng/mL), LY294002 (10 μ M) y CHIR99021 (3 μ M) en medio CDM. En el día 2, las células se incuban con la misma combinación de citoquinas, excepto a CHIR99021. Por último, en el día 3 se les administra Activina A (100 ng/mL) y β FGF (100 ng/mL) en medio RPMI/B27, con el objetivo de inducir la diferenciación a DE. Así, finaliza la primera etapa de diferenciación y se procede a caracterizar las células para determinar la eficiencia de inducción a DE mediante inmunofluorescencia de Sox17, FOXA2 y GATA4, y citometría de flujo para CXCR4 (ver apartado 4.3.2.4 para inmunofluorescencia y citometría de flujo). Para ello las células se levantan con CDB siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Si los cultivos presentan un porcentaje de células CXCR-4 positivas mayor o igual a 85 se continúa con la diferenciación. Las células se levantan con CDB y se subcultivan en placas recubiertas de colágeno. Primero, se exponen a Activina A (50 ng/mL) durante 3 días y 4 días con BMP4 (10 ng/mL) y FGF10 (10 ng/mL) en medio RPMI/B27 para inducir la diferenciación hepática. A continuación, se levantan las células con CDB siguiendo el protocolo explicado previamente y se caracterizan las células para comprobar que se ha alcanzado el estado hepatoblasto. Concretamente, se analizan el factor nuclear de hepatocitos (HNF)4 α , CK19 y alfa-fetoproteína (AFP) empleando inmunofluorescencia. Además, por citometría de flujo se determina la molécula de adhesión epitelial (EpCAM) (ver apartado 4.3.2.4 para inmunofluorescencia y citometría de flujo).

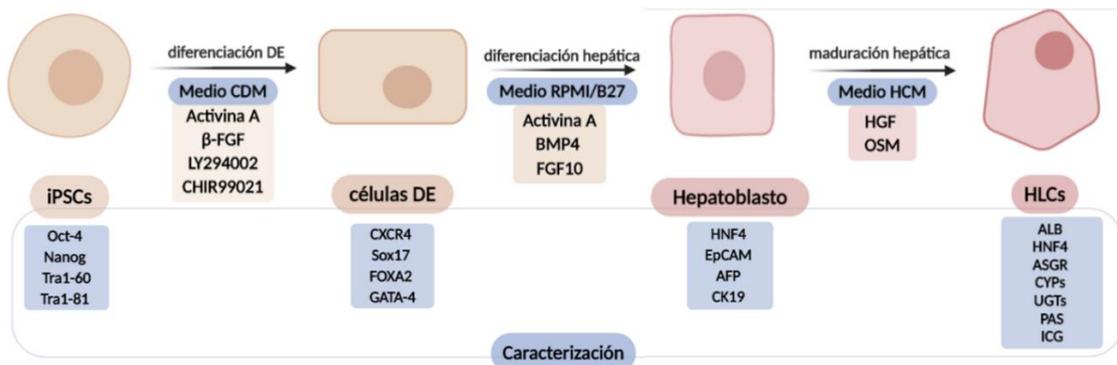


Figura 7. Citoquinas empleadas en la diferenciación de iPSCs a HLCs y los marcadores para la caracterización celular.

Los hepatoblastos caracterizados se subcultivan levantando las células con CDB conforme se ha explicado previamente y se cultivan en placas recubiertas con colágeno. Se cultivan durante 3 días en presencia de HGF (50 ng/mL) sobre placas de cultivo previamente tratadas con colágeno y con medio HCM. Además, el medio contiene HGF y OSM. Finalmente, las células se mantienen en medio HCM con HGF (20 ng/mL) hasta el día 30. Por último, se caracterizan las HLCs para comprobar que la diferenciación se ha producido correctamente. Primero, se calcula la eficacia de diferenciación con el porcentaje de células positivas para el receptor de asialoglicoproteínas (ASGR). No obstante, también se recomienda determinar marcadores hepáticos como la albúmina (ALB) y HNF4 (ver apartado 4.3.2.4 para inmunofluorescencia y citometría de flujo).

4.3.2.4. Caracterización celular

La caracterización celular se lleva a cabo empleando diferentes técnicas que permiten determinar si la diferenciación se está produciendo correctamente. Evalúan las HLCs finales comprobando si la diferenciación se ha llevado a cabo. El primer paso en la caracterización es evaluar la morfología celular. Si se han diferenciado a HLCs deben tener una morfología poligonal y un incremento del citoplasma que transporta el núcleo a la periferia. Una vez comprobada la morfología, se puede realizar inmunofluorescencia o citometría de flujo para marcadores

hepáticos. Además, la expresión de genes específicos puede medirse empleando PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR – del inglés real-time quantitative reverse transcription PCR). Por último, debido a las altas tasas metabólicas y las diferentes funciones que realiza un hepatocito, un análisis funcional específico de células hepáticas permite comprobar si se tratan de HLCs (Gómez-Lechón & Tolosa, 2016). Los protocolos aquí descritos para la caracterización están basados en el trabajo de Tolosa et al., (2015).

Para el ensayo de inmunofluorescencia, las células se fijan con un 4% de paraformaldehído durante 15 min a temperatura ambiente y se permeabilizan con 0.5% de Triton X-100 durante 15 min. Se incuban en 3% de BSA-PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyen en BSA-PBS al 1% y se incuban overnight a 4°C. Los anticuerpos primarios se diluyen en BSA-PBS al 1% y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se visualizan las muestras con el microscopio Leica HMR. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados en la caracterización para cada uno de los marcadores están recogidos en la *Tabla 5*.

El ensayo de citometría de flujo comprende un paso previo de disociación celular y resuspensión en BSA-PBS al 3%. A continuación, se incuban con SSEA4-PE, CXCR4-APC o EpCAM-FITC y los isótopos control durante 30 min a 4°C. Las células se lavan con PBS, se centrifugan y se suspenden en PBS-BSA al 1% para el análisis. El análisis se realiza en el citómetro de flujo modelo Accuri C6 en los canales FL2 y FL4. Las células muertas se eliminan con la tinción 7AAD. Para el análisis ASGR, las células se incuban con el anticuerpo anti-ASGR Alexafluor 488 en oscuridad durante 30 min y a temperatura ambiente. Se someten las células a dos lavados y se suspenden en PBS-BSA al 1% para el análisis.

Por otro lado, se lleva a cabo un análisis de expresión génica mediante RT-qPCR. Primero, se extrae el ARN de los hepatocitos empleando el kit comercial de Qiagen, siguiendo el protocolo de sus recomendaciones. El ARN extraído se somete a ensayo de cuantificación por fluorescencia RiboGreen y se determina su pureza mediante el ratio de absorbancia 260/280 nm por espectrofotometría. A continuación, se lleva a cabo la RT-PCR empleando SYBR Green I Master con los primers específicos recogidos en la *Tabla 6* en un dispositivo de PCR (LightCycler 480 instrument). Durante el ensayo, se analiza la expresión de la b-actina humana como control interno para la normalización. Asimismo, se incluye una muestra positiva que pueda emplearse como calibrador para normalizar todas las muestras y que permite tener un punto de calibración constante. Todo el análisis se realiza mediante el termociclador LightCycler Relative Quantification empleando los primers de la *Tabla 6*.

4.4. Cultivo 3D

4.4.1. Encapsulación celular

Se han planteado procedimientos para la encapsulación de diferentes tipos celulares en hidrogeles de Col/HA como los propuestos en este proyecto (Collin et al., 2011; Kontturi et al., 2015). Así, se plantea la encapsulación de la línea HepG2 y de las HLCs en medio F12. Las HLCs empleadas se encuentran a 25 días después del inicio de la diferenciación para asegurar que se han diferenciado correctamente. Estas se cultivan en medio F12 y medio HCM, respectivamente. La encapsulación se realiza en los hidrogeles propuestos en el apartado 4.2.2 de diferentes composiciones Col/HA: 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 y 0/100. Las proporciones y volúmenes de los componentes de los hidrogeles están descrito en el apartado 4.2.2.

Primero, se preparan los biopolímeros disolviendo la cantidad de colágeno y HA necesario en medio F12. A continuación, se preparan las disoluciones de 4S-StarPEG, H₂O₂ y HRP. Por un lado, se mezcla el colágeno junto con el H₂O₂. Por otro lado, se combina el HA con la HRP y el 4S-

StarPEG y se filtra la mezcla. Empleando tripsina, se levantan las células de la placa y se realiza el recuento celular preparando una alícuota 1:1 con Trypan Blue. En un eppendorf, se centrifuga a 1500 rpm durante 3 min la cantidad de células totales, teniendo en cuenta que se cultivan 200,000 células/hidrogel. Se resuspende el pellet en la mezcla de HA, HRP y 4S-StarPEG y se dispone sobre el pocillo el volumen correspondiente para el hidrogel. Por último, se añade la de colágeno con el H₂O₂ y tras 30 min de gelificación, se añade el medio de cultivo F12 si son células de la línea HepG2 y medio HCM si son HLCs.

4.4.2. Viabilidad y funcionalidad celular

La encapsulación celular en el hidrogel puede inducir la muerte celular o alterar las funciones hepáticas. Siendo el principal objetivo de este proyecto emplear los hidrogeles con HLCs como modelo *in vitro* de hepatotoxicidad, es imprescindible asegurar la viabilidad celular y la funcionalidad de las HLCs. De esta manera, se valora si el modelo *in vitro* diseñado puede emplearse como herramienta en la detección de fármacos hepatotóxicos. Por esta razón, se plantea la evaluación de la viabilidad celular tras la encapsulación y la valoración de diversas funciones hepáticas.

4.4.2.1. Viabilidad celular

Existen ensayos, como *AlarmBlue* o *LIVE/DEAD*, con diferentes marcadores de fluorescencia para la evaluación de la viabilidad celular (Collin et al., 2011; Kontturi et al., 2015; Tolosa et al., 2012). Los hidrogeles con células de la línea HepG2 y HLCs se someten al ensayo de LIVE/DEAD[®] de Invitrogen[™] siguiendo el protocolo del kit. Concretamente, emplea dos marcadores de fluorescencia: la calceína AM y el homodímero de etidio. Las células vivas presentan esterasas activas en la membrana plasmática, de manera que al transportar la calceína AM a través de la membrana la transforman en calceína fluorescente. Por otro lado, el homodímero de etidio entra en las células muertas y se une a los ácidos nucleicos. Por lo tanto, la tinción permite diferenciar las células dañadas teñidas con el homodímero de etidio de las células vivas con calceína AM.

Primero, se retira el medio del pocillo donde están los hidrogeles para eliminar esterasas que interfieran en el ensayo y se lava con PBS. A continuación, se añaden los reactivos diluidos en medio de cultivo, siguiendo las proporciones del kit comercial, y se incuban a 37°C durante 30 min. Para visualizar las muestras, se emplea el sistema INCELL 6000 a 515 nm para la calceína AM y 635 nm para el homodímero de etidio.

4.4.2.2. Funcionalidad celular

La expresión de marcadores hepáticos no es suficiente para confirmar que las HLCs obtenidas tras la diferenciación son funcionales y se pueden emplear en el modelo *in vitro* de hepatotoxicidad. Varios autores defienden la necesidad de llevar a cabo más de un ensayo para evaluar las HLCs. Para ello se pueden evaluar funciones específicas de los hepatocitos como la capacidad metabólica mediante el estudio de las actividades de enzimas de fase I (citocromo P450) o fase 2 (UGTs), capacidad ureogénica, gluconeogénesis o la captura y secreción específica del colorante verde de indocianina (Donato et al., 2010; Tolosa et al., 2015).

El ensayo de ureogénesis se realiza midiendo la formación de urea a partir de amonio siguiendo el procedimiento descrito en Donato et al. (2008). La urea es el principal producto de detoxificación del amonio y se emplea como indicador del grado de preservación de las mitocondrias (Tolosa et al., 2015). Las HLCs se cultivan en los pocillos con una mezcla de HEPES salino, CaCl₂ (concentración final 1 mM) y NH₄Cl (concentración final 2 mM) y se incuban a 37°C durante diferentes intervalos de tiempo. Se recoge el medio de cada pocillo y se centrifuga a 5000 xg durante 5 min. El sobrenadante se congela individualmente para ser evaluado siguiendo el protocolo del kit colorimétrico QuantinChrom[™] Urea assay.

Mediante el ensayo de PAS se evalúa la capacidad de las HLCs de sintetizar y acumular glucógeno, así como su capacidad de responder a hormonas o de acumular azúcares, incubando las células con glucosa e insulina. El colorante PAS es incoloro y cambia de color al entrar en contacto con grupos aldehídos. Se lleva a cabo incubando las células en insulina (10^{-7} M) y/o glucagón (10^{-6} M) durante 24 h. A continuación, las células se fijan en paraformaldehído al 4% y se analizan siguiendo el protocolo del kit de tinción PAS.

Por otro lado, la técnica ICG permite comprobar la maduración hepática de las HLCs ya que esta sonda orgánica es biotransformada y metabolizada específicamente por hepatocitos. Para el test ICG, las células se incuban en medio con ICG (1 mg/mL) durante 60 min a 37°C. Se someten a 3 lavados con medio HCM y se añade medio HCM fresco. Tras 24 h, se analiza la muestra empleando el microscopio de fluorescencia.

La actividad del citocromo P450 se evalúa con una mezcla con sustratos para 5 isoformas diferentes del citocromo P450. La mezcla está compuesta por 10 μ M fenacetina (CYP1A2), 10 μ M diclofenaco (CYP2C9), 10 μ M bufuralol (CYP2D6), 50 μ M clorzoxazona (CYP2E1) y 5 μ M midazolam (CYP3A4). Las muestras se incuban con la mezcla a 37°C durante 24 h y se recupera el medio para su posterior análisis metabólico. Así, se puede realizar una cuantificación de diferentes metabolitos específicos empleando HPLC/MS siguiendo el protocolo establecido en el trabajo de Lahoz et al. (2007).

La actividad del enzima UGT1A se mide incubando las células en medio que contiene β -estradiol (15 μ M) durante 24 h. Pasado este tiempo, se recupera el medio y se congela para el posterior análisis de los conjugados mediante HPLC/MS según lo establecido en el estudio de Donato et al. (2010).

Por último, se evalúa la capacidad de producción de albúmina de las HLCs, una función específica de hepatocitos adultos (Hannan et al., 2013). Para ello se lleva a cabo un ELISA tipo sandwich empleando el kit de albúmina humana siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección se basa en la medida de absorbancia que es proporcional a la concentración de albúmina. De esta manera, mediante una curva patrón se puede extrapolar los resultados de absorbancia y calcular la concentración de albúmina.

4.4.3. Estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos

El modelo *in vitro* planteado en este proyecto se emplea para la evaluación de hepatotoxicidad de fármacos mediante un ensayo de HCS. El ambiente hepático y la alta tasa metabólica de los hepatocitos deriva en un número elevado de variables y componentes que se han de tener en cuenta. Los métodos convencionales de evaluación de hepatotoxicidad se basan en el análisis de la viabilidad celular y suelen estar basados en la evaluación de un único punto final o *endpoint*. Esto limita su poder de predicción y reduce la sensibilidad del modelo. Con el objetivo de mitigar estas limitaciones, surgen estrategias multiparamétricas como el HCS. Su uso permite realizar un ensayo de hepatotoxicidad de diferentes compuestos midiendo simultáneamente varios cambios preletales a nivel celular. Mediante esta técnica se consigue un modelo de HTS con mayor sensibilidad. Emplean técnicas complejas, como citometría de flujo y análisis de imagen celular, que permiten realizar un seguimiento celular individualizado. Además, juega un papel importante en la clasificación de los fármacos en función del mecanismo de acción (Donato et al., 2017; Kuna et al., 2018; Tolosa et al., 2012; Zanella et al., 2010). La seguridad y toxicidad de un fármaco no puede evaluarse con un único ensayo, por ello se plantea evaluar diferentes *endpoints* (Tolosa et al., 2015). Algunos autores destacan el estrés oxidativo, el daño

mitocondrial y los niveles intracelulares de glutatión como los ensayos más importantes en la predicción de la hepatotoxicidad (Zanella et al., 2010).

En este proyecto se plantea un HCS multiparamétrico para la evaluación de hepatotoxicidad de diferentes compuestos basado en el trabajo de Tolosa et al. (2012). Se miden simultáneamente la morfología nuclear, alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, viabilidad celular, concentración intracelular de calcio y estrés oxidativo. Para ello, se diseña un sistema de marcaje multiplexado y se emplean técnicas de imagen potentes que permiten identificar los mecanismos de acción de hepatotoxicidad de los medicamentos.

La encapsulación celular y reticulación de los hidrogeles se lleva a cabo en placas de 48 pocillos siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 4.4.1. El objetivo de este apartado es evaluar la idoneidad del modelo para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos por lo que se ha seleccionado fármacos modelo clasificados en función del mecanismo de hepatotoxicidad *Tabla 7* (Tolosa et al., 2019). Se trabaja en un amplio rango de concentraciones para determinar los efectos preletales y letales. Así, las células encapsuladas se incuban con diferentes concentraciones de los fármacos seleccionados (1, 10, 100 y 1000 μM) durante 3 h y 24 h realizando 3 réplicas por condición. Las disoluciones stock de los fármacos se preparan en DMSO, pero las concentraciones finales se preparan en medio de cultivo sin exceder el 0.5% v/v de DMSO. Para evitar variaciones, los controles positivos se preparan con el mismo solvente en las mismas condiciones.

Tabla 7. Compuestos seleccionados para evaluar la hepatotoxicidad mediante el modelo in vitro. Clasificados en función de la clase terapéutica, la clasificación del DILI, los mecanismos y la concentración máxima (Tolosa et al., 2019).

| Compuesto | Clase terapéutica | Clasificación del DILI (1) | Etiqueta (2) | Cmax (μM) (3) | Mecanismos (4) |
|----------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------|----------------------------|-----------------|
| Amiodarona | Antiarrítmicos | Grave | Bw | 2.2 | ET, FL, DM |
| Azatioprina | Inmunosupresor | Elevada precaución | Wp | 0.34 | CO,EO, DM |
| Betaína | Suplemento de aminoácidos | No reportado daño hepático | Nm | 92.7 | |
| Clorpromazina | Antipsicótico | DILI reportado | Ar | 0.5 | CO, ET, FL, DM |
| Dexametasona | Corticoesteroide | Elevaciones de ALT | Ar | 0.23 | |
| Flutamida | No esteroideo Antiandrógeno | Grave | Bw | 6 | BA, DM |
| Isoniazida | Antimicobacteriano | Grave | Bw | 40 | BA, DM, EO |
| Isoproterenol | Adrenérgicos | No reportado daño hepático | Nm | 0.95 | |
| Ketoconazol | Antifúngico | Grave | Bw | 7 | DM, ROS, FL, ET |
| Ketotifeno | Antihistamínico | DILI reportado | Nd | 0.0001 | |
| Metotrexato | Antineoplásico | Grave | Bw | 0.4 | DN, ET |
| Simvastatina | Antihiperlipidémico | No determinado | Wp | 0.02 | AP, DM |
| Estreptomina | Antibacteriano | No reportado daño hepático | Nm | 34 | |
| Tacrina | Colinérgicos | Elevada precaución | Wp | 0.1 | BA, DM, EO |
| Valproato | Antiepiléptico | Grave | Bw | 481 | BA, DM, EO, ET |

(1) (Gustafsson et al., 2014). Los fármacos se clasifican en función de la gravedad de las reacciones que producen. Grave: producen fallo hepático agudo; Elevada precaución: producen fallo hepático no fulminante; DILI reportado: se han descrito casos de DILI, pero con menor frecuencia; Elevaciones ALT: no se produce daño hepático, pero se producen elevaciones en los niveles de ALT; No reportado daño hepático.

(2)(Chen et al., 2011) (Los fármacos se etiquetan a modo de advertencia en función de la gravedad . BW: Boxed Warning, WP: Warning and Precautions; AR: Adverse Reactions; ND: No determined; NM: No Match;)

(3) (Atienzar et al., 2014; Garside et al., 2014; Tolosa et al., 2012).

(4) AP: apoptosis; BA: bioactivación; CO: colestasis; DM: disfunción mitocondrial; EO: estrés oxidativo; FL: fosfolipidosis; ET: esteatosis; ROS: especies de oxígeno reactivo – del inglés reactive oxygen species –.

La estrategia diseñada es un sistema multiplexado basado en el uso de diferentes sondas fluorescentes, permitiendo evaluar diferentes *endpoints* funcionales y morfológicos. El colorante Hoechst 33342 se emplea como marcador permanente del núcleo celular al unirse al ADN (Crissman et al., 1988). Permite identificar células con elevada sensibilidad, así como distinguir aquellas que han entrado en apoptosis y tienen el núcleo picnótico. El colorante PI se emplea para detectar las células muertas. Estas presentan alteraciones en el transporte a través de la membrana, por lo que el PI es capaz de entrar y marcar el núcleo (Juan et al., 1994). De esta manera, las células muertas presentarán fluorescencia roja en el núcleo y se puede evaluar la citotoxicidad de un fármaco. El potencial de membrana mitocondrial se evalúa empleando la sonda TMRM (Gomez-Lechon et al., 2008). Concretamente, es una sonda catiónica lipofílica fluorescente capaz de difundir a través de la membrana plasmática y entrar en la mitocondria, acumulándose en función del potencial de membrana. El siguiente *endpoint* a medir es el daño causado por estrés oxidativo. Este se evalúa mediante la peroxidación de lípidos con la sonda lipofílica BODIPY 665/676 que emite fluorescencia al reaccionar con radicales libres de oxígeno (Naguib, 2000). Por último, el marcaje con Fluo-4 AM mide la concentración de calcio citoplasmático libre (Kvist et al., 2018). Este marcador permanente difunde a través de la membrana y es hidrolizado en el citoplasma. Emite fluorescencia al unirse a Ca^{2+} libre, siendo proporcional a la concentración de Ca^{2+} disponible (Lim et al., 2006).

El procedimiento de incubación y análisis está basado en el trabajo de Tolosa et al. (2012). Primero, se prepara el medio de incubación que contiene 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342, 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI, 75 ng/mL TMRM, 0.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fluo-4 AM y 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BODIPY 665/676. Se incuban los hidrogeles durante 30 min a 37°C con el medio de cultivo que contiene las sondas fluorescentes. Tras el periodo de incubación, se retira el medio y se reemplaza por medio fresco. Mediante INCELL6000 Analyzer (GE, Healthcare) se toman imágenes para evaluar más de 500 células. Las imágenes se toman filtrando con longitudes de onda de excitación y emisión de los fluoróforos, ajustando los tiempos para evitar el solapamiento de emisión de las diferentes sondas. Mediante el módulo de análisis de INCELL se mide la intensidad de fluorescencia asociada a los compartimentos nucleares y citoplasmáticos descritos con anterioridad.

Antes de cuantificar las intensidades y analizar las imágenes, se elimina el ruido de fondo. El núcleo se define empleando un algoritmo de detección de bordes. Gracias a las sondas empleadas, se detectan y descartan las células muertas que han incorporado PI. El resto de las evaluaciones se realizan sobre las células vivas. Mediante un algoritmo de intensidad se mide la fluorescencia de las sondas con un umbral establecido. Una vez finalizadas las mediciones, se calculan las medias de las réplicas de los diferentes tratamientos, normalizando los resultados con la media de los controles.

Finalmente, se obtienen las medias de los valores para los controles sin tratar y los cultivos tratados a 3 h y 24 h para diferentes concentraciones de los fármacos con sus réplicas correspondientes. La variación se calcula comparando los valores obtenidos tras el tratamiento frente a los controles sin tratar y serán los valores que se emplearán para las curvas de toxicidad en las que se representa la dosis en función de la respuesta (% de variación). Se establece como *threshold* un 20 % de variación para considerarlo como cambio significativo en la intensidad de fluorescencia o en los parámetros morfológicos. Además, se calcula la concentración mínima efectiva (MEC) que es la concentración más baja a la que se produce un cambio significativo en los *endpoints* medidos, es decir, cuando el p-value es menor de 0.05. Al final, se obtienen datos del cultivo 3D de HLCs en los hidrogeles y datos de los cultivos en monocapa. La comparación de los resultados para ambos modelos permite determinar si el modelo propuesto es predictivo o no.

Los resultados se analizan estadísticamente con un ANOVA seguido de un t-test considerando los resultados estadísticamente significativos si el *p-value* es menor de 0.05.

5. DISCUSIÓN

Actualmente, el DILI es una de las principales causas de retirada de fármacos de los ensayos clínicos o de fármacos ya comercializados. Este hecho supone una pérdida económica importante para las empresas farmacéuticas y pone en riesgo la salud de los pacientes. El problema surge en la incapacidad de detección de hepatotoxicidad en fases preclínicas por la falta de modelos *in vitro* que permitan detectar que fármacos producen este tipo de lesión. Por ello, en los últimos años ha aumentado la demanda de modelos *in vitro* con un elevado poder de predicción. En las fases preclínicas la hepatotoxicidad se evalúa mediante ensayos con animales. Sin embargo, el poder de predicción es reducido ya que existen grandes diferencias entre el metabolismo de humanos y el de animales. Por lo tanto, el diseño de un buen modelo *in vitro* permitiría predecir los fármacos con mayor sensibilidad y especificidad y, además, reduciría el uso de animales en experimentación que siempre va asociado a conflictos éticos (Gómez-Lechón et al., 2014a; Gómez-Lechón et al., 2014b; Kuna et al., 2018; Pelechá et al., 2017). Mediante la encapsulación de las HLCs en los hidrogeles Col/HA propuesta en este diseño experimental, se pretende obtener un modelo *in vitro* que permita evaluar la hepatotoxicidad de fármacos en fases preclínicas. A continuación, se expone detalladamente la justificación del diseño y componentes del modelo. Se plantean las limitaciones que pueden surgir y los inconvenientes de otros modelos que se intentan solventar, así como su uso potencial en el cribado de fármacos hepatotóxicos.

Los hepatocitos son células dependientes de anclaje y necesitan de una matriz extracelular que permita mantener sus funciones hepáticas específicas. Si la matriz extracelular no es adecuada, o si no se mantienen los contactos célula-célula, los hepatocitos pueden perder sus funciones específicas. Por estos motivos, reproducir el microambiente hepático es indispensable para asegurar el correcto funcionamiento hepático (Godoy et al., 2013; Hengstler et al., 2014). En el modelo propuesto, los biomateriales que componen el hidrogel son el colágeno y el HA. El colágeno se ha seleccionado por ser uno de los principales componentes de la matriz extracelular hepática y por el impacto fisiológico en los hepatocitos. Las adhesiones focales y la unión a integrinas determinan la expresión de quinasas que modulan el crecimiento celular, el metabolismo y previenen la apoptosis (Deegan et al., 2016; Martinez & Amenta, 1993). Éste se une a las integrinas de los hepatocitos activando cascadas de señalización que pueden provocar cambios en el fenotipo hepático, lo que puede comprometer el grado de diferenciación del hepatocito e incluso acelerar o detener el ciclo celular (Hansen et al., 2005). Además, es el biopolímero base de los primeros hidrogeles sintetizados para el cultivo de hepatocitos. En ellos, se observa que el mantenimiento del fenotipo hepático se prolonga en el tiempo en comparación al cultivo en monocapa de hepatocitos primarios (Godoy et al., 2013). Asimismo, el colágeno presenta el motivo RGD de unión a integrinas indispensables para el mantenimiento celular y la unión célula-matriz. Su estructura y secuencia peptídica permite unir ligandos que mejoren la adhesión, favoreciendo la diferenciación y progresión del ciclo celular. Por lo tanto, con el colágeno como biopolímero base existe la posibilidad de unión de fragmentos recombinantes de FN, otro de los componentes principales de la matriz hepática, que mejoren la adhesión y el mantenimiento en cultivo 3D al presentar también el motivo RGD (Bhadriraju & Hansen, 2000; Skardal et al., 2012). Por otro lado, se emplea HA por ser un componente principal de la matriz extracelular de diferentes órganos y por aportar resistencia a la compresión gracias a capacidad de retención de elevadas cantidades de agua al deformarse. Con la presencia del HA en el hidrogel se pretende prolongar en el tiempo los hepatocitos funcionales al mejorar las propiedades biomecánicas (Poveda-Reyes et al., 2016; Wells, 2008). Además, es un proteoglicano biocompatible y ya se han diseñado hidrogeles de HA con propiedades elásticas similares a las del tejido hepático (Deegan et al., 2016). La combinación de ambos polímeros no debe generar

ninguna sustancia tóxica que comprometa la viabilidad celular ya que en el trabajo de Collin et al. (2011), en el que se describe la síntesis y caracterización de un hidrogel compuesto por los mismos biopolímeros, no se reporta ningún efecto adverso. El *cross-linker* 4S-StarPEG tampoco debe resultar citotóxico en base a los resultados del trabajo de Sallent et al. (2019), al igual que la reacción catalizada por la HRP en presencia de H₂O₂ (Poveda-Reyes et al., 2016).

El hidrogel Col/HA propuesto se obtiene mediante el entrecruzamiento químico de las cadenas de HA en presencia de colágeno y el *cross-linker* 4S-StarPEG. Se descarta el entrecruzamiento físico porque las células pueden verse sometidas al estrés mecánico y se altere su fenotipo. Además, el resultado del entrecruzamiento químico es un hidrogel más estable y resistente que uno obtenido por entrecruzamiento físico (Lee et al., 2008). Se consigue una IPN capaz de absorber elevadas cantidades de agua sin disolverse. De esta manera, se puede llevar a cabo el cultivo de células encapsuladas en el hidrogel en tiempos prolongados, asegurando el mantenimiento de la estructura del hidrogel para emplearlo como modelo *in vitro* de hepatotoxicidad crónica. El entrecruzamiento mediante la reacción de HRP en presencia de H₂O₂ facilita el control de las propiedades mecánicas, el tiempo de gelificación y la densidad de entrecruzamiento en función de las concentraciones empleadas (Lee et al., 2008).

La composición y las propiedades mecánicas de la MEC tienen un gran impacto en el fenotipo y función de los hepatocitos (Hansen et al., 2005). Determinar las propiedades mecánicas de la matriz hepática es un proceso complejo ya que depende de si hay fibrosis hepática, la resistencia vascular y de la presión de la vena porta (Yin et al., 2007). Por ello, los valores del módulo elástico de la matriz del hígado van desde 600 Pa a 5 kPa (Wells, 2008; Xia et al., 2018; Yeh et al., 2002; Yin et al., 2007). Sin embargo, los estudios revelan que los hepatocitos cambian su comportamiento en función de la rigidez de la matriz. Si la matriz es rígida y presenta un módulo elástico elevado, se promueve el avance del ciclo celular de los hepatocitos, pero comienzan a desdiferenciarse perdiendo el fenotipo hepático. Sin embargo, si la matriz presenta un módulo bajo y es blanda se promueve la diferenciación hepática, pero se detiene el ciclo celular (Wells, 2008). En el trabajo de Deegan et al. (2016) se miden las propiedades de un hidrogel de HA con elementos de la MEC hepática. Los resultados revelan que a medida que aumenta la rigidez, se incrementa el anclaje y la organización del citoesqueleto, pero a 4.3 kPa los hepatocitos muestran una disminución en la expresión de albúmina y HNF4 α . Así, el estudio establece que los hepatocitos muestran las mejores tasas de funcionalidad hepática en el hidrogel de 1.2 kPa. En base a los resultados del trabajo y la necesidad de obtener un módulo de compromiso que mantenga la diferenciación y promueva la proliferación, el presente estudio pretende obtener un hidrogel con un módulo elástico de 1.2 kPa.

La elección de los componentes y de sus concentraciones en el hidrogel se apoya en los resultados de trabajos previos. El colágeno presenta propiedades mecánicas más bajas que el HA. Los hidrogeles de colágeno 5 mg/mL entrecruzados con 4S-StarPEG (concentración final 1 mM) alcanzan los 630 Pa (Collin et al., 2011). En la combinación 50/50 Col/HA propuesta en este proyecto, la concentración de colágeno es aproximada a 5 mg/mL por lo que las propiedades mecánicas proporcionadas este solo alcanzaría a 630 Pa. Por este motivo, se incorpora HA al hidrogel para proporcionar resistencia mecánica. El entrecruzamiento químico para el HA es idéntico al empleado por Poveda-Reyes et al. (2016). En este trabajo comprueban que conforme aumenta la concentración de HA, aumenta la resistencia del hidrogel. Sus resultados demuestran la posibilidad de sintetizar hidrogeles de HA (20 mg/mL) de hasta 7 kPa. Así, la combinación 50/50 Col/HA estaría compuesto por HA (5 mg/mL aproximadamente) con un módulo menor que el obtenido en el trabajo de Poveda-Reyes et al. (2016). Por lo tanto, se espera que mediante las diferentes combinaciones de Col/HA posibiliten la obtención de un hidrogel con módulo elástico próximo a 1.2 kPa. Por último, respecto al EWC los hidrogeles con mayor contenido de agua son capaces de recrear mejor la MEC nativa al facilitar el control de las propiedades biomecánicas (Liu

et al., 2019). En el hidrogel propuesto, el EWC alcanzable ha de ser elevado pues los resultados obtenidos en el trabajo de Poveda-Reyes et al. (2016) revelan un EWC de aproximadamente 8800% para el hidrogel puro de HA. Estos resultados se deben a la baja densidad de entrecruzamiento en los hidrogeles de HA, lo que permite absorber mayores cantidades de agua y ejercer más resistencia a las deformaciones por compresión. Por este motivo, conforme aumenta la concentración de HA, aumenta el módulo de Young, dando lugar a hidrogeles más resistentes e incompresibles (Poveda-Reyes et al., 2016).

La estrategia seleccionada para la obtención de HLCs mediante la diferenciación de iPSCs, ya ha sido empleada por otros autores (Hannan et al., 2013; Tolosa et al., 2015). En base a los resultados de estos trabajos se espera obtener una población homogénea de hepatocitos maduros que muestren funciones hepáticas específicas. Siguiendo el protocolo descrito de diferenciación se pueden obtener hasta 15 millones de HLCs a partir de 600,000 iPSCs. En el día 25 del protocolo las HLCs deben expresar ALB y HNF4, así como mostrar la producción de albúmina evaluada mediante un ensayo ELISA. Además, deben mostrar funciones asociadas con el metabolismo de fármacos como, la actividad del citocromo P450, el almacenamiento de glucógeno evaluado con la tinción de PAS o la biotransformación de la sonda ICG. Para el día 25 se espera que el 80% de la población celular exprese marcadores hepáticos como ALB o HNF4. Sin embargo, es importante destacar que siguen expresando algunos marcadores fetales, mientras que algunas funciones hepáticas específicas, como la producción de albúmina, irán aumentando, alcanzando su máxima expresión en el día 35 (Hannan et al., 2013). Las HLCs obtenidas siguiendo el protocolo de Tolosa et al. (2015) expresan marcadores hepáticos comparables a los de hepatocitos maduros y no presentan signos de tumorigenicidad.

Las iPSCs son células pluripotentes y, por tanto, presentan capacidad de proliferación indefinida. Son capaces de diferenciarse en diferentes tipos celulares por lo que proporcionan un suministro ilimitado de hepatocitos, evitando así la proliferación limitada de los hepatocitos primarios. De esta manera, permiten tener una fuente ilimitada de células con diferente *background* y, además, posibilitan la personalización de modelos. Así, se pueden producir modelos *in vitro* de pacientes susceptibles a sufrir hepatotoxicidad o aquellos que vayan a ser sometidos a un tratamiento específico. Además, la fuente de origen de las iPSCs empleada en esta estrategia son las PBMCs, células sanguíneas de fácil obtención mediante una extracción sanguínea. La morbilidad causada al donante es menor que la de una biopsia hepática e incluso una biopsia de piel, lo que facilita la personalización de los modelos. Por otro lado, se puede evaluar el efecto de los polimorfismos genéticos en la hepatotoxicidad, generando modelos que representen diferentes polimorfismos como, por ejemplo, los encontrados en los genes CYP. Por último, es importante destacar que con las iPSCs no surgen los conflictos éticos que pueden surgir con las ESCs y si se consiguen fabricar buenos modelos *in vitro* robustos y predictivos se podría reducir el número de animales necesarios en ensayos preclínicos (Gao & Liu, 2017; Gómez-Lechón et al., 2014b; Gómez-Lechón & Tolosa, 2016; Tolosa et al., 2015).

No obstante, esta estrategia presenta algunas limitaciones que se han de solucionar para poder llevarla a la industria farmacéutica y emplearla en los ensayos preclínicos. Hasta el momento no se ha conseguido la criopreservación de HLCs sin provocar daño celular y comprometer la viabilidad y funcionalidad. Además, las HLCs obtenidas siguen expresando marcadores fetales, por lo que es necesario una estandarización y maduración completa que asegure la obtención de una población homogénea de hepatocitos adultos, aunque se espera que el cultivo tridimensional mejore la funcionalidad de las células. La capacidad predictiva de un modelo depende en gran medida del comportamiento de las células empleadas, por ello es importante comprobar que las HLCs mantienen el fenotipo y funcionalidad en el tiempo (Pelechá et al., 2017). Por otro lado, teniendo en cuenta que es un proceso lento y costoso

económicamente, se debe optimizar para poder ser empleado en la industria farmacéutica (Gómez-Lechón & Tolosa, 2016).

Actualmente, los hepatocitos primarios siguen siendo el *gold standard* en la evaluación de fármacos hepatotóxicos pues presentan todas las funciones hepáticas. Sin embargo, su estabilidad fenotípica y viabilidad a largo plazo son reducidas y existe gran variabilidad entre pacientes. Además, es necesario disponer de hígado fresco para poder obtener muestras. Como alternativa a los hepatocitos primarios, surgen las líneas hepáticas inmortalizadas que se mantienen en cultivo durante más tiempo. No obstante, en las líneas inmortalizadas algunas funciones hepáticas están limitadas e incluso son inexistentes (Godoy et al., 2013; Gómez-Lechón et al., 2014b; Li et al., 2014; Pelechá et al., 2017). Por estos motivos, las HLCs se están convirtiendo en células con gran potencial en la evaluación de la hepatotoxicidad (Gómez-Lechón & Tolosa, 2016). En este trabajo, las HepG2 se emplean principalmente como paso previo al cultivo de las HLCs. Esta línea permite poner a punto el cultivo estableciendo la densidad celular para encapsular las células y evaluar la viabilidad celular del modelo. El cultivo de las HLCs en los hidrogeles y en monocapa permite hacer una comparación para valorar si el cultivo 3D representa mejor tejido *in vivo* y puede predecir con mayor especificidad y sensibilidad la hepatotoxicidad.

Mediante el modelo *in vitro* propuesto en este proyecto, se espera que el cultivo 3D en los hidrogeles de Col/HA permita mantener el fenotipo de las HLCs a tiempos prolongados. Se pretende simular la MEC hepática con el colágeno como principal componente de la misma y aportar rigidez a la matriz incorporando el HA. De esta manera, el hidrogel ha de ser capaz de soportar el cultivo de las HLCs y lo convierte en una herramienta potencial para el cribado de fármacos hepatotóxicos. Aunque ya se han realizado ensayos de hepatotoxicidad basados en HLCs derivadas de iPSCs, estos solo evalúan un único *endpoint* (Gómez-Lechón & Tolosa, 2016). Se espera que la combinación del cultivo 3D en hidrogeles junto al ensayo de HCS de lugar a un modelo *in vitro* predictivo de hepatotoxicidad que se pueda usar en ensayos preclínicos, pudiendo determinar los mecanismos moleculares asociados a cada fármaco.

6. CONCLUSIONES

Después de realizar el presente trabajo bibliográfico, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se han establecido los protocolos para la síntesis de hidrogeles puros de colágeno e hidrogeles puros de HA. Del mismo modo, que los protocolos para hidrogeles compuestos por Col/HA de diferentes proporciones: 72/25, 50/50 y 25/75.
- En base a la literatura, se ha seleccionado la combinación 50/50 como mejor composición del hidrogel, pues se espera que permita alcanzar un módulo elástico de 1.2 kPa próximo al de la MEC hepática.
- Se han descrito los protocolos de obtención de PBMCs, su reprogramación a iPSCs y su posterior diferenciación a HLCs.
- Se han seleccionado las PBMCs por ser células cuya obtención no produce una morbilidad grave en el paciente. Esto permitiría el desarrollo de modelos personalizados que permitan un diagnóstico diferencial del iDILI. Además, el hecho de disponer de HLCs derivadas de diferentes pacientes reflejaría la variabilidad poblacional y por tanto podrían reflejar los diferentes

polimorfismos en enzimas del metabolismo de fármacos y que pueden mostrar una mayor sensibilidad.

- El método de reprogramación a iPSCs ya ha sido empleado previamente, obteniendo iPSCs bien caracterizadas y con capacidad de diferenciación a HLCs mediante un protocolo ya empleado por otros autores. Estas HLCs han mostrado marcadores específicos hepáticos y presentan funciones específicas como la producción de albúmina o actividad del citocromo P450.
- Se ha detallado el procedimiento de encapsulación de la línea HepG2 como prueba de concepto para confirmar las condiciones óptimas y de las HLCs en los hidrogeles.
- Se ha descrito el ensayo de hepatotoxicidad para llevarlo a cabo con el cultivo 3D de HLCs en paralelo al cultivo de las mismas células en monocapa (2D). Por un lado, se han seleccionado un total de 15 fármacos que recogen los diferentes mecanismos moleculares implicados en el DILI en base a la literatura científica. Por otro lado, se ha seleccionado un ensayo multiparamétrico que permite detectar cambios preletales indicadores de daño y que han mostrado ser más predictivos del daño hepático inducido por fármacos.
- La comparación de los resultados entre el cultivo 3D y el cultivo en monocapa debe permitir determinar si el modelo propuesto es predictivo.
- En base a las características del modelo propuesto y en comparación con otros modelos *in vitro*, se espera que el modelo *in vitro* permita la evaluación de la hepatotoxicidad con una mayor especificidad y sensibilidad que los modelos descritos en la literatura hasta el momento.

7. BIBLIOGRAFÍA

AHN, J.; AHN, J. H.; YOON, S.; NAM, Y. S.; SON, M. Y. & OH, J. H. (2019). Human three-dimensional in vitro model of hepatic zonation to predict zonal hepatotoxicity. *Journal of Biological Engineering*, 13(1):1–15.

ALEMPIJEVIC, T.; ZEC, S. & MILOSAVLJEVIC, T. (2017). Drug-induced liver injury: Do we know everything? In *World Journal of Hepatology* 9(10):491–502.

ATIENZAR, F. A.; NOVIK, E. I.; GERETS, H. H.; PAREKH, A.; DELATOUR, C.; CARDENAS, A.; MACDONALD, J.; YARMUSH, M. L. & DHALLUIN, S. (2014). Predictivity of dog co-culture model, primary human hepatocytes and HepG2 cells for the detection of hepatotoxic drugs in humans. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 275(1):44–61.

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.

BEDOSSA, P. & PARADIS, V. (2003). Liver extracellular matrix in health and disease. *Journal of Pathology*, 200(4):504–515.

BELL, C. C.; DANKERS, A. C. A.; LAUSCHKE, V. M.; SISON-YOUNG, R.; JENKINS, R.; ROWE, C.; GOLDRING, C. E.; PARK, K.; REGAN, S. L.; WALKER, T.; SCHOFIELD, C.; BAZE, A.; FOSTER, A. J.; WILLIAMS, D. P.; VAN DE VEN, A. W. M.; JACOBS, F.; HOUDT, J. VAN; LÄHTEENMÄKI, T.; SNOEYS, J.; JUHILA S.; RICKERT L. & INGELMAN-SUNDBERG, M. (2018). Comparison of Hepatic 2D Sandwich Cultures and 3D Spheroids for Long-term Toxicity Applications: A Multicenter Study. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 162(2):655–666.

BHADRI RAJU, K. & HANSEN, L. K. (2000). Hepatocyte adhesion, growth and differentiated function on RGD-containing proteins. *Biomaterials*, 21(3):267–272.

BHATIA, S. N.; UNDERHILL, G. H.; ZARET, K. S. & FOX, I. J. (2014). Cell and tissue engineering for liver disease. *Science Translational Medicine*, 6(245):245sr2.

BURKHARDT, B.; MARTINEZ-SANCHEZ, J. J.; BACHMANN, A.; LADURNER, R. & NÜSSLER, A. K. (2014). Long-term culture of primary hepatocytes: New matrices and microfluidic devices. *Hepatology International*, 8(1):14–22.

CHEN, M.; VIJAY, V.; SHI, Q.; LIU, Z.; FANG, H. & TONG, W. (2011). FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury. *Drug Discovery Today*, 16(15–16):697–703.

CHRISTOFFERSSON, J.; ARONSSON, C.; JURY, M.; SELEGÅRD, R.; AILI, D. & MANDENIUS, C.F. (2018). Fabrication of modular hyaluronan-PEG hydrogels to support 3D cultures of hepatocytes in a perfused liver-on-a-chip device. *Biofabrication*, 11(1):015013.

COLLIN, E. C.; GRAD, S.; ZEUGOLIS, D. I.; VINATIER, C. S.; CLOUET, J. R.; GUICHEUX, J. J.; WEISS, P.; ALINI, M. & PANDIT, A. S. (2011). An injectable vehicle for nucleus pulposus cell-based therapy. *Biomaterials*, 32(11):2862–2870.

CRISSMAN, H. A.; WILDER, M. E. & TOBEY, R. A. (1988). Flow cytometric localization within the cell cycle and isolation of viable cells following exposure to cytotoxic agents. *Cancer Research*, 48(20):5742–5746.

DARR, A. & CALABRO, A. (2009). Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(1):33–44.

DE BRUYN, T.; CHATTERJEE, S.; FATTAH, S.; KEEMINK, J.; NICOLAÏ, J.; AUGUSTIJNS, P. & ANNAERT, P. (2013). Sandwich-cultured hepatocytes: Utility for in vitro exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 9(5):589–616.

DEEGAN, D. B.; ZIMMERMAN, C.; SKARDAL, A.; ATALA, A. & SHUPE, T. D. (2016). Stiffness of hyaluronic acid gels containing liver extracellular matrix supports human hepatocyte function and alters cell morphology. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 55:87–103.

DONATO, M.; JOVER, R. & GÓMEZ-LECHÓN, M. (2013). Hepatic Cell Lines for Drug Hepatotoxicity Testing: Limitations and Strategies to Upgrade their Metabolic Competence by Gene Engineering. *Current Drug Metabolism*, 14(9):946–968.

DONATO, M. T.; LAHOZ, A.; MONTERO, S.; BONORA, A.; PAREJA, E.; MIR, J.; CASTELL, J. V. & GÓMEZ-LECHÓN, M. J. (2008). Functional assessment of the quality of human hepatocyte preparations for cell transplantation. *Cell Transplantation*, 17(10–11):1211–1219.

DONATO, M. T.; MONTERO, S.; CASTELL, J. V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. & LAHOZ, A. (2010). Validated assay for studying activity profiles of human liver UGTs after drug exposure: Inhibition and induction studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6):2251–2263.

DONATO, M. T. & TOLOSA, L. (2019). Stem-cell derived hepatocyte-like cells for the assessment of drug-induced liver injury. *Differentiation*, 106:15–22.

DONATO, M. T.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. & TOLOSA, L. (2017). Using high-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in preclinical studies. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(2):201–211.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. (2009). Guidance for Industry Drug-Induced Liver Injury: Premarketing Clinical Evaluation. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/drug-induced-liver-injury-premarketing-clinical-evaluation>.

GAO, X. & LIU, Y. (2017). A transcriptomic study suggesting human iPSC-derived hepatocytes potentially offer a better in vitro model of hepatotoxicity than most hepatoma cell lines. *Cell Biology and Toxicology*, 33(4):407–421.

GARSDIE, H.; MARCOE, K. F.; CHESNUT-SPEELMAN, J.; FOSTER, A. J.; MUTHAS, D.; GERRY KENNA, J.; WARRIOR, U.; BOWES, J. & BAUMGARTNER, J. (2014). Evaluation of the use of imaging parameters for the detection of compound-induced hepatotoxicity in 384-well cultures of HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 28(2):171–181.

GHOSH, K.; SHU, X. Z.; MOU, R.; LOMBARDI, J.; PRESTWICH, G. D.; RAFAILOVICH, M. H. & CLARK, R. A. F. (2005). Rheological characterization of in situ cross-linkable hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules*, 6(5):2857–2865.

GISSEN, P. & ARIAS, I. M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of Hepatology*, 63(4):1023–1037.

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.; DAMM G.; DIRSCH O.; DONATO M.T.; DONG J.; DOOLEY S.; DRASDO D.; EAKINS R.; FERREIRA K.S.; FONSA TO V.; FRACZEK J.; GEBHARDT R.; GIBSON A.; GLANEMANN M.; GOLDRING C.E.; GÓMEZ-LECHÓN M.J.; GROOTHUIS G.M.; GUSTAVSSON L.; GUYOT C.; HALLIFAX D.; HAMMAD S.; HAYWARD A.; HÄUSSINGER D.; HELLERBRAND C.; HEWITT P.; HOEHME S.; HOLZHÜTTER H.G.; HOUSTON J.B.; HRACH J.; ITO K.; JAESCHKE H.; KEITEL V.; KELM J.M.; KEVIN PARK B.; KORDES C.; KULLAK-UBLICK G.A.; LECLUYSE E.L.; LU P.; LUEBKE-WHEELER J.; LUTZ A.; MALTMAN D.J.; MATZ-SOJA M.; MCMULLEN P.; MERFORT I.; MESSNER S.; MEYER C.; MWINYI J.; NAISBITT D.J.; NUSSLER A.K.; OLINGA P.; PAMPALONI F.; PI J.; PLUTA L.; PRZYBORSKI S.A.; RAMACHANDRAN A.; ROGIERS V.; ROWE C.; SCHELCHER C.; SCHMICH K.; SCHWARZ M.; SINGH B.; STELZER EH.; STIEGER B.; STÖBER R.; SUGIYAMA Y.; TETTA C.; THASLER W.E.; VANHAECKE T.; VINKEN M.; WEISS T.S.; WIDERA A.; WOODS C.G.; XU J.J.; YARBOROUGH K.M. & HENGSTLER JG (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 signalling and ADME. In *Archives of Toxicology* 87(8):1315-1530.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J. & TOLOSA, L. (2016). Human hepatocytes derived from pluripotent stem cells: a promising cell model for drug hepatotoxicity screening. *Archives of Toxicology*, 90(9):2049–2061.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; TOLOSA, L.; CONDE, I. & DONATO, M. T. (2014). Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 10(11):1553–1568.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; TOLOSA, L. & DONATO, M. T. (2014). Cell-based models to predict human hepatotoxicity of drugs. *Rev. Toxicol.*, 31:149–156.

GOMEZ-LECHON, M. J.; O'CONNOR, J.; LAHOZ, A.; CASTELL, J. & DONATO, M. T (2008). Identification of Apoptotic Drugs: Multiparametric Evaluation in Cultured Hepatocytes. *Current Medicinal Chemistry*, 15(20):2071–2085.

GUSTAFSSON, F.; FOSTER, A. J.; SARDA, S., BRIDGLAND-TAYLOR, M. H. & KENNA, J. G. (2014). A correlation between the in vitro drug toxicity of drugs to cell lines that express human p450s and their propensity to cause liver injury in humans. *Toxicological Sciences*, 137(1):189–211.

HANNAN, N. R. F.; SEGERITZ, C.; TOUBOUL, T. & VALLIER, L. (2013). Production of hepatocyte like cells from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 8(2):430–437.

HANNOUN, Z.; STEICHEN, C.; DIANAT, N.; WEBER, A. & DUBART-KUPPERSCHMITT, A. (2016). The potential of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 65(1):182–199.

HANSEN, L. K.; WILHELM, J. & FASSETT, J. T. (2005). Regulation of Hepatocyte Cell Cycle Progression and Differentiation by Type I Collagen Structure. *Current Topics in Developmental Biology*, 72(05):205–236.

HENGSTLER, J. G.; HAMMAD, S.; GHALLAB, A.; REIF, R. & GODOY, P. (2014). In Vitro Systems for Hepatotoxicity Testing. *In Vitro Toxicology Systems*, 27–44.

JUAN, G.; CAVAZZONI, M.; SÁEZ, G. T. & O’CONNOR, J. E. (1994). A fast kinetic method for assessing mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes with rhodamine 123 and flow cytometry. *Cytometry*, 15(4):335–342.

KHOURY, T.; RMEILEH, A. A.; YOSHA, L.; BENSON, A. A.; DAHER, S. & MIZRAHI, M. (2015). Drug Induced Liver Injury: Review with a Focus on Genetic Factors, Tissue Diagnosis, and Treatment Options. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 3(2):99–108.

KIM, M.; LEE, J. Y.; JONES, C. N.; REVZIN, A. & TAE, G. (2010). Heparin-based hydrogel as a matrix for encapsulation and cultivation of primary hepatocytes. *Biomaterials*, 31(13):3596–3603.

KISAALITA, W. S. (2010). 3D cell-based biosensors in drug discovery programs: Microtissue engineering for high throughput screening. In *3D Cell-Based Biosensors in Drug Discovery Programs: Microtissue Engineering for High Throughput Screening*. CRC Press, 1-386.

KONTTURI, L. S.; COLLIN, E. C.; MURTOMÄKI, L.; PANDIT, A. S.; YLIPERTTULA, M. & URTTI, A. (2015). Encapsulated cells for long-term secretion of soluble VEGF receptor 1: Material optimization and simulation of ocular drug response. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 95: 387–397.

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.

KVIST, A. J.; KANEBRATT, K. P.; WALENTINSSON, A.; PALMGREN, H.; O’HARA, M.; BJÖRKBOM, A.; ANDERSSON, L. C.; AHLQVIST, M. & ANDERSSON, T. B. (2018). Critical differences in drug metabolic properties of human hepatic cellular models, including primary human hepatocytes, stem cell derived hepatocytes, and hepatoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 155:124–140.

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.

LAHOZ, A.; DONATO, M. T.; PICAZO, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. & CASTELL, J. V. (2007). Determination of major human cytochrome P450s activities in 96-well plates using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicology in Vitro*, 21(7):1247–1252.

LAN, S. F.; SAFIEJKO-MROCZKA, B. & STARLY, B. (2010). Long-term cultivation of HepG2 liver cells encapsulated in alginate hydrogels: A study of cell viability, morphology and drug metabolism. *Toxicology in Vitro*, 24(4):1314–1323.

LEE. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine*, 349(5):474–485.

LEE, F.; CHUNG, J. E. & KURISAWA, M. (2008). An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid-tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate. *Soft Matter*, 4(4):880–887.

LI, C. Y.; STEVENS, K. R.; SCHWARTZ, R. E.; ALEJANDRO, B. S.; HUANG, J. H. & BHATIA, S. N. (2014). Micropatterned cell-cell interactions enable functional encapsulation of primary hepatocytes in hydrogel microtissues. *Tissue Engineering*, 20(15–16):2200–2212.

LIM, M. S.; LIM, P. L. K.; GUPTA, R. & BOELSTERLI, U. A. (2006). Critical role of free cytosolic calcium, but not uncoupling, in mitochondrial permeability transition and cell death induced by diclofenac oxidative metabolites in immortalized human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(3):322–331.

- LIU, H.; WANG, Y.; CUI, K., GUO, Y.; ZHANG, X. & QIN, J. (2019). Advances in Hydrogels in Organoids and Organs-on-a-Chip. *Advanced Materials*, 31(50):1–28.
- LUCENA, M. I.; COHEN, H.; HERNÁNDEZ, N.; BESSONE, F.; DACOLL, C.; STEPHENS, C.; BORRAZ, Y.; ULZURRUN, E.; BRUGUERA, M. & ANDRADE, R. J. (2011). Hepatotoxicidad, un problema global con especificidades locales: hacia la creación de una Red Hispano Latinoamericana de Hepatotoxicidad. *Gastroenterología y Hepatología*, 34(5):361–368.
- MAHINROOSTA, M.; JOMEH FARSANGI, Z.; ALLAHVERDI, A. & SHAKOORI, Z. (2018). Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry*, 8:42–55.
- MARTÍ, M.; MULERO, L.; PARDO, C.; MORERA, C.; CARRIÓ, M.; LARICCHIA-ROBBIO, L.; ESTEBAN, C. R. & IZPISÚA BELMONTE, J. C. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 8(2):223–253.
- MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M. M. & DE KANTER, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2(6):875–894.
- MARTINEZ, A.; & AMENTA, P. S. (1993). The hepatic extracellular matrix. Components and distribution in normal liver. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*, 423(1):1–11.
- MORENO, R. (2002). Hepatotoxicidad por fármacos. *Revista Española de Reumatología*, 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.
- NAGUIB, Y. M. A. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4):1150–1154.
- NATALE, A.; VANMOL, K.; ARSLAN, A.; VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL, P.; VAN ERPS, J.; THIENPONT, H.; BUZGO, M.; BOECKMANS, J.; DE KOCK, J.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V. & RODRIGUES, R. M. (2019). Technological advancements for the development of stem cell-based models for hepatotoxicity testing. *Archives of Toxicology*, 93(7):1789–1805.
- NAVARRO, V. J. & SENIOR, J. R. (2006). Drug-related hepatotoxicity. In *New England Journal of Medicine*, 354(7):731–739.
- NIE, J.; GAO, Q.; FU, J. & HE, Y. (2020). Grafting of 3D Bioprinting to In Vitro Drug Screening: A Review. In *Advanced Healthcare Materials*, 9(7).
- PELECHÁ, M.; GÓMEZ-LECHÓN M.J.; TOLOSA, L. y DONATO M.T. (2017). Hepatocitos Humanos Upcytes como modelo experimental in vitro para el estudio del daño hepático inducido por fármacos a largo plazo. 34:109–117.
- PERDICES, E. V.; MARTÍN-OCAÑA, F.; LUCENA, M. I. y ANDRADE, R. J. (2012). Factores de riesgo y mecanismos de toxicidad hepática. Daño hepático inducido por medicamentos y tóxicos (excluido el alcohol). *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(10):573–580.
- POVEDA-REYES, S.; MOULISOVA, V.; SANMARTÍN-MASIÁ, E.; QUINTANILLA-SIERRA, L.; SALMERÓN-SÁNCHEZ, M.; & GALLEGO, G. (2016). Gelatin—Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterbalance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation. *Macromolecular Bioscience*, 16(9): 1311–1324.
- RAINA, N.; RANI, R.; KHAN, A.; NAGPAL, K. & GUPTA, M. (2019). Interpenetrating polymer network as a pioneer drug delivery system: a review. *Polymer Bulletin*.
- RAMACHANDRAN, R. & KAKAR, S. (2009). Histological patterns in drug-induced liver disease. *Journal of Clinical Pathology*, 62(6):481–492.

- SALLEN, I.; CAPELLA-MONSONÍS, H. & ZEUGOLIS, D. I. (2019). Production and characterization of chemically cross-linked collagen scaffolds. In *Methods in Molecular Biology*, 1944:23–38.
- SANMARTÍN-MASIÁ, E. (2016). Síntesis y caracterización de hidrogeles inyectables inspirados en la matriz extracelular para la regeneración de tejidos blandos. Trabajo Fin de Máster en Ingeniería Química. Univ. Politècnica de València.
- SCHUPPAN, D. (1990). Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: Collagens and glycoproteins. In *Seminars in Liver Disease* 10(1):1–10.
- SHARMA, A.; MÜCKE, M. & SEIDMAN, C. E. (2018). Human Induced Pluripotent Stem Cell Production and Expansion from Blood using a Non-Integrating Viral Reprogramming Vector. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1):1–14.
- SHIVASHANKAR, M. & MANDAL, B. K. (2012). A review on interpenetrating polymer network. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(5):1–7.
- SILVERTHORN, D. U.; OBER, W. C.; GARRISON, C. W.; SILVERTHORN, A. C. & JOHNSON, B. R. (2007). *Fisiología humana: Un enfoque integrado*. Editorial Panamericana. Madrid. (4a. ed.).
- SKARDAL, A.; SMITH, L.; BHARADWAJ, S.; ATALA, A.; SOKER, S. & ZHANG, Y. (2012). Tissue specific synthetic ECM hydrogels for 3-D in vitro maintenance of hepatocyte function. *Biomaterials*, 33(18): 4565–4575.
- SOLDATOW, V. Y.; LECLUYSE, E. L.; GRIFFITH, L. G. & RUSYN, I. (2013). In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicology Research*, 2(1):23–39.
- THERMOFISHER. (2013). CytoTune™ iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit USER GUIDE. https://assets.thermofisher.com/TFS-ssets/LSG/manuals/cytotune_ips_2_0_sendai_reprog_kit_man.pdf
- TOLOSA, L.; CARON, J.; HANNOUN, Z.; ANTONI, M.; LÓPEZ, S.; BURKS, D.; CASTELL, J. V.; WEBER, A.; GOMEZ-LECHON, M. J. & DUBART-KUPPERSCHMITT, A. (2015). Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1):1–17.
- TOLOSA, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. & DONATO, M. T. (2015). High-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in cell models. *Archives of Toxicology*, 89(7):1007–1022.
- 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.
- TOLOSA, L.; PINTO, S.; DONATO, M. T.; LAHOZ, A.; CASTELL, J. V.; O'CONNOR, J. E. & GÓMEZ-LECHÓN, M. J. (2012). Development of a multiparametric cell-based protocol to screen and classify the hepatotoxicity potential of drugs. *Toxicological Sciences*, 127(1):187–198.
- VERNETTI, 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.
- VORRINK, S. U.; ZHOU, Y.; INGELMAN-SUNDBERG, M. & LAUSCHKE, V. M. (2018). Prediction of drug-induced hepatotoxicity using long-term stable primary hepatic 3D spheroid cultures in chemically defined conditions. *Toxicological Sciences*, 163(2):655–665.
- WANG, S.; NAGRATH, D.; CHEN, P. C.; BERTHIAUME, F. & YARMUSH, M. L. (2008). Three-dimensional primary hepatocyte culture in synthetic self-assembling peptide hydrogel. *Tissue Engineering - Part A*, 14(2):227–236.
- WELLS, R. G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology*, 47:1394–1400.

- XIA, T.; ZHAO, R.; LIU, W.; HUANG, Q.; CHEN, P.; WAJU, Y. N.; AL-ANI, M. K.; LV, Y. & YANG, L. (2018). Effect of substrate stiffness on hepatocyte migration and cellular Young's modulus. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9):6996–7006.
- YAO, T.; ZHANG, Y.; LV, M.; ZANG, G.; NG, S. S. & CHEN, X. (2019). Three-dimensional cell culture model for hepatocytes opens a new avenue of real world research on liver.
- YEH, W. C.; LI, P. C.; JENG, Y. M.; HSU, H. C.; KUO, P. L.; LI, M. L.; YANG, P. M. & PO, H. L. (2002). Elastic modulus measurements of human liver and correlation with pathology. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 28(4):467–474.
- YIN, M.; TALWALKAR, J. A.; GLASER, K. J.; MANDUCA, A.; GRIMM, R. C.; ROSSMAN, P. J.; FIDLER, J. L.; & EHMAN, R. L. (2007). Assessment of Hepatic Fibrosis With Magnetic Resonance Elastography. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(10):1207–1213.
- ZANELLA, F.; LORENS, J. B. & LINK, W. (2010). High content screening: Seeing is believing. *Trends in Biotechnology*, 28(5):237–245.
- ZUIDEMA, J. M.; RIVET, C. J.; GILBERT, R. J. & MORRISON, F. A. (2014). A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 102(5):1063–1073.