



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la
hepatotoxicidad idiosincrática

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Pons Andrés, Neus

Tutor/a: Gallego Ferrer, Gloria

Cotutor/a: Tolosa Pardo, Laia

Cotutor/a externo: VILLANUEVA BADENAS, ESTELA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a las tres personas que han dirigido mi Trabajo de Fin de Grado: la Dra. Gloria Gallego, por darme la oportunidad de centrar mi TFG en el ámbito de la ingeniería tisular; la investigadora Laia Tolosa, por confiar en mí, permitirme desarrollar el proyecto en la Unidad Mixta de Investigación en Hepatología Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), y por su completa predisposición a ayudarme durante todos estos meses. En especial quisiera agradecer a la investigadora predoctoral Estela Villanueva su paciencia y guía en todo momento, mostrando una pasión por su trabajo que para mí ha sido de gran admiración.

Me gustaría hacer también una mención especial a Nuria Jiménez, por iniciarme y enseñarme las competencias básicas de laboratorio durante tantos meses; así como al resto de personal del IIS La Fe, por su simpatía y por ofrecer su ayuda siempre.

Asimismo, no quisiera olvidar a mis compañeros de la carrera, y sobre todo dar las gracias a mis amigas Carla y Raquel, por estos cuatro años juntas y por ser, sin duda, de las mejores cosas que me llevo.

Aparte de ellos, agradecer a mi pareja Carles por estar siempre presente y acompañarme durante toda mi etapa universitaria.

Por último, siempre estaré muy agradecida a mi familia por el apoyo incondicional que han mostrado y que ha hecho posible mi trayectoria hasta aquí.

RESUMEN

El hígado es el mayor órgano glandular del cuerpo, que desempeña una elevada cantidad de funciones vitales.

Una de las principales alteraciones asociadas a dicho órgano es la hepatotoxicidad inducida por fármacos (DILI), que se refiere a la lesión hepática resultante de la exposición del organismo a un medicamento o sustancia tóxica. Concretamente el de tipo idiosincrático (iDILI) es la principal causa de retirada de fármacos tanto en fases de desarrollo como ya comercializados, suponiendo un gran impacto social y económico.

Dicho problema ha sido abordado previamente a través de estudios preclínicos con animales de experimentación, pero estos presentan una baja predictividad debida, en parte, a las diferencias metabólicas entre las diferentes especies. Por ello, ha sido necesaria la búsqueda de nuevos modelos *in vitro* que permitan una mejor comprensión de los mecanismos que subyacen al iDILI para reducir su impacto. La mayoría de los modelos clásicos propuestos están basados en el cultivo de hepatocitos, pero no permiten modelar sus interacciones con las células no parenquimáticas como las células de Kupffer, que son macrófagos residentes en el hígado que han demostrado estar implicados en la hepatotoxicidad mediada a través del sistema inmunitario.

En el presente trabajo se ha optimizado y caracterizado un modelo de co-cultivo de hepatocitos y macrófagos proinflamatorios, derivados de líneas celulares inmortalizadas (HepG2 y THP-1, respectivamente) para el estudio de la hepatotoxicidad idiosincrática. El modelo ha mostrado un adecuado mantenimiento de la viabilidad celular, expresión génica y funcionalidad hepática.

Asimismo, la idoneidad del co-cultivo como plataforma de detección de fármacos que inducen iDILI ha sido evaluada a través de su exposición a dos medicamentos asociados con este, el trovafloxacino y la troglitazona. Los resultados obtenidos han probado su mayor sensibilidad y activación de las rutas metabólicas que conducen al iDILI, frente a los sistemas de monocultivo utilizados tradicionalmente.

Palabras clave: hígado, hepatotoxicidad, cultivo celular, macrófagos, modelos *in vitro*, fármacos, viabilidad, expresión génica y funcionalidad celular.

RESUM

El fetge és el major òrgan glandular del cos, que realitza una elevada quantitat de funcions vitals.

Una de les principals alteracions associades amb aquest òrgan és la hepatotoxicitat induïda per fàrmacs (DILI), que fa referència a la lesió hepàtica resultant de l'exposició de l'organisme a un medicament o substància tòxica. Concretament, el de tipus idiosincràtic (iDILI) és la principal causa de retirada de fàrmacs tant en fases de desenvolupament com ja comercialitzats, suposant un gran impacte social i econòmic.

Este problema ha sigut prèviament abordat a través d'estudis preclínic amb animals d'experimentació, però aquests presenten una baixa capacitat predictiva deguda, en part, a les diferències metabòliques entre diferents espècies. Per això, ha sigut necessària la cerca de nous models *in vitro* que permeten una millor comprensió dels mecanismes que subjauen al iDILI per a reduir el seu impacte. La majoria dels models clàssics proposats estan basats en el cultiu d'hepatòcits, però no permeten modelar les seues interaccions amb les cèl·lules no parenquimàtiques com les cèl·lules de Kupffer, que són macròfags residents en el fetge que han demostrat estar implicats en la hepatotoxicitat mediada a través del sistema immunitari.

En el present treball s'ha optimitzat i caracteritzat un model de co-cultiu d'hepatòcits i macròfags proinflamatoris, derivats de línies cel·lulars immortalitzades (HepG2 i THP-1, respectivament) per a l'estudi de l'hepatotoxicitat idiosincràtica. El model ha mostrat un manteniment adequat de la viabilitat cel·lular, expressió gènica i funcionalitat hepàtica.

Així mateix, la idoneïtat del co-cultiu com a plataforma d'identificació de fàrmacs que indueixen al iDILI ha estat avaluada per mitjà de la seva exposició a dos medicaments associats amb aquest, el trovafloxacino i la troglitazona. Els resultats obtinguts han provat la seua major sensibilitat i activació de les rutes metabòliques que condueixen a l'iDILI, front als sistemes de monocultiu utilitzats tradicionalment.

Paraules clau: fetge, hepatotoxicitat, cultiu cel·lular, macròfags, models *in vitro*, fàrmacs, viabilitat, expressió gènica i funcionalitat cel·lular.

ABSTRACT

The liver is the largest glandular organ in the body, which performs a large number of vital functions.

One of the main disorders associated with this organ is drug-induced hepatotoxicity (DILI), which refers to liver injury resulting from exposure of the body to a drug or toxic substance. Specifically, the idiosyncratic type (iDILI) is the main cause of drug withdrawal both in development phases and already commercialised, which involves a profound social and economic impact.

This problem has previously been addressed through preclinical studies with experimental animals, but they have low predictive capacity, in part, due to the metabolic variations between different species. Therefore, it has been necessary the research of new *in vitro* models that supply a better understanding of the mechanisms underlying iDILI to reduce its impact. Most of the proposed classical models are based on the culture of hepatocytes, but they do not model their interactions with non-parenchymal cells such as Kupffer cells, which are liver-resident macrophages that have been shown to participate in hepatotoxicity mediated by the immune system.

In the present thesis, a model of co-culture of hepatocytes and proinflammatory macrophages, derived from immortalized cell lines (HepG2 and THP-1, respectively) has been optimized and characterized for the study of idiosyncratic hepatotoxicity. The model has demonstrated an adequate maintenance of cell viability, gene expression and liver functionality.

Likewise, the suitability of co-culture as a detection platform for drugs that induce iDILI has been evaluated through its exposure to two drugs associated with it, trovafloxacin and troglitazone. The results obtained have proven its greater sensitivity and activation of the metabolic pathways that lead to iDILI, compared to the hepatocyte monoculture traditionally used.

Keywords: liver, hepatotoxicity, cell culture, macrophages, *in vitro* models, drugs, viability, gene expression and cell functionality.

ÍNDICE GENERAL

DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TFG

- Documento I: Memoria
- Documento II: Presupuesto

ÍNDICE DEL DOCUMENTO I: MEMORIA

1. MOTIVACIÓN
2. OBJETIVOS
3. ANTECEDENTES
4. JUSTIFICACIÓN
5. NORMATIVA
6. MATERIALES Y MÉTODOS
7. RESULTADOS
8. DISCUSIÓN
9. CONCLUSIONES
10. BIBLIOGRAFÍA
11. ANEXO

ÍNDICE DEL DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN
2. CUADRO DE PRECIOS DE MANO DE OBRA
3. CUADRO DE PRECIOS DE MATERIALES
4. CUADRO DE PRECIOS DE MAQUINARIA
5. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS
6. CUADRO DE PRESUPUESTOS PARCIALES
7. PRESUPUESTO DE BASE DE LICITACIÓN

DOCUMENTO I: MEMORIA

ÍNDICE DE LA MEMORIA

1. MOTIVACIÓN	16
2. OBJETIVOS	17
3. ANTECEDENTES	18
3.1. El hígado	18
3.1.1. Estructura anatómica y funcional del hígado	19
3.1.2. Funciones	22
3.2. Daño hepático inducido por fármacos	22
3.2.1. iDILI	24
3.2.2. Mecanismos del iDILI	24
3.3. Modelos <i>in vitro</i> para el estudio del DILI	26
3.3.1. Principales modelos <i>in vitro</i> para el estudio del iDILI	27
<i>Modelos de monocultivo</i>	27
<i>Modelos de co-cultivo</i>	28
<i>Modelos tridimensionales</i>	29
4. JUSTIFICACIÓN	34
5. NORMATIVA	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1. Materiales	36
6.2. Métodos	37
6.2.1. Cultivos celulares	37
<i>Cultivo HepG2</i>	37
<i>Cultivo THP-1</i>	38
<i>Diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos M1</i>	38
<i>Co-cultivos</i>	39
6.2.2. Inmunofluorescencia	40
6.2.3. Cuantificación de albúmina	41
6.2.4. Capacidad ureogénica	42
6.2.5. qPCR	43
6.2.6. Ensayo de viabilidad MTT	45

6.3. Análisis estadístico	46
7. RESULTADOS	47
7.1. Caracterización del proceso de diferenciación a macrófagos M1.....	47
7.2. Co-cultivos HepG2 con células THP-1 diferenciadas a macrófagos M1	50
7.2.1. Caracterización del co-cultivo	50
7.2.2. Evaluación de la funcionalidad del co-cultivo	54
7.3. Hepatotoxicidad inducida por fármacos	55
8. DISCUSIÓN	60
9. CONCLUSIONES	64
10. BIBLIOGRAFÍA	65
11. ANEXO	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DEL SUMINISTRO ARTERIAL Y VENOSO EN EL HÍGADO. ADAPTADO DE <i>TERAPIA DE EMBOLIZACIÓN PARA EL CÁNCER DE HÍGADO</i> HTTPS://WWW.CANCER.ORG/ES/CANCER/TIPOS/CANCER-DE-HIGADO/TRATAMIENTO/TERAPIA-DE-EMBOLIZACION.HTML	18
FIGURA 2. ANATOMÍA MORFOLÓGICA Y DIVISIÓN FUNCIONAL O CRITERIO DE COUINAUD DEL HÍGADO. ADAPTADO DE LA FUENTE SIBULESKY, 2013.	19
FIGURA 3. ESQUEMA DE LA ARQUITECTURA INTERNA DEL HÍGADO, LAS “ZONIFICACIÓN HEPÁTICA” Y LOS TIPOS CELULARES QUE LO FORMAN. SE HA MARCADO CON FLECHAS EL SENTIDO DE LA CIRCULACIÓN DE LA BILIS Y DE LA SANGRE. ADAPTADO DE MA Y OTROS, 2023.....	20
FIGURA 4. ESQUEMA DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS QUE CONDUCEN AL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS IDIOSINCRÁTICO. (DAMP: PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS AL DAÑO; APC: CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS; ROS: ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO; GSH: GLUTATIÓN REDUCIDO). ELABORACIÓN PROPIA MEDIANTE BIORENDER (GÓMEZ-LECHÓN Y OTROS, 2007; HOLT Y JU, 2006; SEGOVIA-ZAFRA Y OTROS, 2021; JEE Y OTROS, 2021).	26
FIGURA 5. ESQUEMA DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS THP-1 A MONOCITOS M0 Y MACRÓFAGOS M1. EXPERIMENTO PARA LA COMPROBACIÓN DE LA DESDIFERENCIACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS M1. FUENTE PROPIA CREADA MEDIANTE BIORENDER.	39
FIGURA 6. PROCESO SEGUIDO EN LA ELABORACIÓN DE LOS CO-CULTIVOS. FUENTE PROPIA CREADA MEDIANTE BIORENDER.....	40
FIGURA 7. CRONOLOGÍA SEGUIDA PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS THP-1 DIFERENCIADAS A MACRÓFAGOS M1. EN COLOR MORADO SE EXPONEN LAS MUESTRAS QUE SE HAN ANALIZADO POSTERIORMENTE MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA, QPCR Y MTT. ELABORACIÓN PROPIA MEDIANTE BIORENDER.....	47
FIGURA 8. IMÁGENES DE INMUNOFLUORESCENCIA OBTENIDAS DURANTE EL PROCESO DE ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS THP-1 A MACRÓFAGOS DE FENOTIPO M1. EL MARCADOR CD68 APARECE EN COLOR ROJO, MIENTRAS QUE EL MARCAJE VERDE SE CORRESPONDE CON EL CD163 Y EL AZUL IDENTIFICA LOS NÚCLEOS CELULARES. A) CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON PMA DURANTE 72 HORAS Y NO TRATADAS DURANTE LAS 24 HORAS SIGUIENTES. B) CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON PMA DURANTE 72 HORAS Y CON LPS LAS 24 HORAS SIGUIENTES. C) CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON PMA DURANTE 72 HORAS Y CON LPS E IFN- γ LAS 24 HORAS SIGUIENTES. LA BARRA DE ESCALA REPRESENTA UNA DIMENSIÓN DE 100 μ M EN TODAS LAS IMÁGENES.....	48
FIGURA 9. EXPRESIÓN DE LOS GENES CARACTERÍSTICOS CXCL10, TNF- α , IL-1 β Y CD206 EN MUESTRAS DE CÉLULAS THP-1 DIFERENCIADAS A MACRÓFAGOS M1, PASADAS 72 HORAS SIN ESTIMULACIÓN (M1 72 H), CON ESTIMULACIÓN DE 1 μ G/ML DE LPS (M1 72H + LPS) Y CON 1 μ G/ML DE LPS Y 20 NG/ML DE IFN- γ (M1 72H + LPS + IFN- γ). SE REPRESENTA LA INTENSIDAD RELATIVA (I.R.) CON RESPECTO A LA EXPRESIÓN DE LOS MISMOS EN LOS MACRÓFAGOS DE FENOTIPO M0, NO ACTIVADOS A M1. SE HA INDICADO CON * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=3, TEST ONE-WAY ANOVA JUNTO CON EL POST-TEST TUKEY) RESPECTO LOS MACRÓFAGOS M1 TRAS 24 HORAS SIN EXPOSICIÓN A LPS NI IFN- γ	49

- FIGURA 10.** ENSAYO MTT REALIZADO SOBRE MONOCULTIVOS DE HEPG2 Y M1 TRATADOS CON 1 $\mu\text{g}/\text{ML}$ DE LPS Y 20 NG/ML DE $\text{IFN-}\gamma$. NO SE HAN IDENTIFICADO DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DE LOS CULTIVOS TRATADOS CON RESPECTO A LOS NO TRATADOS (N=5, TEST TWO-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY). 50
- FIGURA 11.** VIABILIDAD DE LOS CO-CULTIVOS, PASADAS 24 HORAS DE ESTIMULARLAS CON LPS O LPS+ $\text{IFN-}\gamma$ DESDE LA SIEMBRA DE LOS HEPG2, A LAS TRES PROPORCIONES CELULARES PREVIAMENTE DESCRITAS. NO SE HAN IDENTIFICADO DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DE LOS CULTIVOS ESTIMULADOS CON CITOQUINAS RESPECTO A LOS NO ESTIMULADOS (N=5, TEST TWO-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY)..... 51
- FIGURA 12.** IMÁGENES DE INMUNOFUORESCENCIA REALIZADAS SOBRE LOS CO-CULTIVOS A LAS PROPORCIONES DE: A) 1:10 (M1:HEPG2), B) 1:5 (M1:HEPG2), Y C) 1:2 (M1:HEPG2). LA ALBÚMINA SE EXPRESA EN LAS CÉLULAS HEPG2 EN COLOR VERDE, MIENTRAS QUE EL MARCADOR CD68 APARECE EN ROJO E IDENTIFICA LOS MACRÓFAGOS. EL COLOR AZUL TIÑE LOS NÚCLEOS CELULARES. LA BARRA DE ESCALA REPRESENTA UNA DIMENSIÓN DE 100 μM EN TODAS LAS IMÁGENES..... 51
- FIGURA 13.** EXPRESIÓN (I.R.) DE LOS MARCADORES ALB, AFP Y HNF-4 DE HEPATOCITO TRAS EL MANTENIMIENTO DE LOS MONOCULTIVOS Y LOS CO-CULTIVOS CON EL MEDIO DE CULTIVO ESTIMULADOR DURANTE 24 HORAS. SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE HEPG2, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=4, TEST ONE-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY). 52
- FIGURA 14.** EXPRESIÓN (I.R.) DE LOS MARCADORES CXCL10, IL-1 β Y TNF- α DE MACRÓFAGOS PROINFLAMATORIOS TRAS EL MANTENIMIENTO DE LOS MONOCULTIVOS Y LOS CO-CULTIVOS CON EL MEDIO DE CULTIVO ESTIMULADOR DURANTE 24 HORAS. SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE M1, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=4, TEST ONE-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY)..... 52
- FIGURA 15.** EXPRESIÓN (I.R.) DE LOS CITOCROMOS CYP1A2 Y CYP3A5 TRAS EL MANTENIMIENTO DE LOS MONOCULTIVOS Y LOS CO-CULTIVOS CON EL MEDIO DE CULTIVO ESTIMULADOR DURANTE 24 HORAS. SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE HEPG2, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=4, TEST ONE-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY). 53
- FIGURA 16.** EXPRESIÓN (I.R.) DE LAS ENZIMAS DE METABOLISMO DE FASE II HEPÁTICAS, UGT1A1, UGT2B7, GSTT1 Y GSTT2, TRAS EL MANTENIMIENTO DE LOS MONOCULTIVOS Y LOS CO-CULTIVOS CON EL MEDIO DE CULTIVO ESTIMULADOR DURANTE 24 HORAS. SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE HEPG2, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=4, TEST ONE-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY)..... 53
- FIGURA 17.** GRÁFICA DE SECRECIÓN DE ALBÚMINA (NG EN 24 HORAS/ μg RNA) POR LOS CO-CULTIVOS DE CÉLULAS HEPG2 Y THP-1 DIFERENCIADAS A MACRÓFAGOS. LOS * REPRESENTAN LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LA PRODUCCIÓN MEDIA DE ALBÚMINA DE CADA TIPO DE CO-CULTIVO Y EL MONOCULTIVO DE HEPG2 SEMBRADAS A 150000 CÉLULAS/POCILLO, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=4, TEST ONE-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY)..... 54
- FIGURA 18.** CAPACIDAD UROGÉNICA (NG UREA/ μg RNA/HORA) DE LOS MONOCULTIVOS SEMBRADOS ÚNICAMENTE CON CÉLULAS HEPG2, Y DE LOS CO:CULTIVOS CON PROPORCIONES 1:10, 1:5 Y 1:2. SE HA INDICADO CON * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LA UROGÉNESIS MEDIA POR HORA DE CADA TIPO DE CO-CULTIVO Y EL MONOCULTIVO DE HEPG2 SEMBRADAS A 150000 CÉLULAS/POCILLO, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=4, TEST ONE-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY)..... 55

FIGURA 19. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CO-CULTIVOS TRATADOS CON TVX (IZQUIERDA) Y CON SU ANÁLOGO NO HEPATOTÓXICO LVX (DERECHA). SE HA SEÑALADO MEDIANTE EL SÍMBOLO “*” LA DISMINUCIÓN ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CO-CULTIVOS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE HEPG2, CON *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 Y ****P < 0.0001 (N=2, TEST TWO-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY). ASIMISMO, SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS TAMBIÉN ENTRE LOS CO-CULTIVOS A LA PROPORCIÓN 1:2 Y 1:10 (P=0,0076) EN EL CASO DEL TVX; Y ENTRE LOS CO-CULTIVOS 1:10 Y 1:5 (P=0,0061), ASÍ COMO 1:5 Y 1:2 (P=0,0008) AL SER TRATADOS CON LVX..... 55

FIGURA 20. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CO-CULTIVOS TRATADOS CON TGZ (IZQUIERDA) Y SU MEDICAMENTO ANÁLOGO NO HEPATOTÓXICO RGZ (DERECHA). SE HA INDICADO CON * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CO-CULTIVOS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE CÉLULAS HEPG2, CON *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 Y ****P < 0.0001 (N=3, TEST TWO-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY). TAMBIÉN EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAMENTE ESTADÍSTICAS ENTRE LOS CO-CULTIVOS 1:10 Y 1:2 AL SER TRATADOS CON TGZ (P=0,0041). 56

FIGURA 21. EXPRESIÓN DE LOS GENES CHOP, ATF6, ATF4, CAT, SOD1, SOD2, NRF2, GCLC Y GCLM EN LOS MONOCULTIVOS DE HEPG2 Y LOS CO-CULTIVOS M1:HEPG2 TRATADOS DURANTE 24 HORAS CON 25 µM DE TVX Y LVX . SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DE CADA CULTIVO CON RESPECTO SU ANÁLOGO NO TRATADO CON FÁRMACO (CONTROL), CON *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 Y ****P < 0.0001 (N=2, TEST TWO-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY). 58

FIGURA 22. EXPRESIÓN DE LOS GENES CHOP, ATF6, ATF4, CAT, SOD1, SOD2, NRF2, GCLC Y GCLM EN LOS MONOCULTIVOS DE HEPG2 Y LOS CO-CULTIVOS M1:HEPG2 DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LOS FÁRMACOS TGZ Y RGZ A LA CONCENTRACIÓN DE 100 µM DURANTE 24 HORAS. SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DE CADA CULTIVO CON RESPECTO SU ANÁLOGO NO TRATADO CON FÁRMACO (CONTROL), CON *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 Y ****P < 0.0001 (N=2, TEST TWO-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY). 59

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PRINCIPALES CÉLULAS DEL HÍGADO, SU LOCALIZACIÓN Y SU FUNCIÓN. ELABORACIÓN PROPIA (ARZUMANIAN Y OTROS, 2021; GODOY Y OTROS, 2013).	21
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DEL DILI EN FUNCIÓN DEL AUMENTO DE AMINOTRANSFERASA (ALT) Y FOSFATASA ALCALINA (ALP), EN RELACIÓN AL LÍMITE SUPERIOR DE LA NORMALIDAD (LSN) (HUSSAINI Y FARRINGTON, 2007).....	23
TABLA 3. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS PRINCIPALES MODELOS IN VITRO PARA EL ESTUDIO DEL IDILI, ORDENADOS DE MENOR A MAYOR COMPLEJIDAD. LOS MODELOS CON MENOR COMPLEJIDAD SE ASOCIAN CON UN MENOR COSTE, UNA MAYOR FACILIDAD EN SU PRODUCCIÓN Y MAYOR REPRODUCIBILIDAD, PERO PRESENTAN MENOR EFECTIVIDAD.	30
TABLA 4. MATERIALES NECESARIOS PARA EL CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR HEPG2 Y LA LÍNEA MONOCÍTICA THP-1.	36
TABLA 5. ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS UTILIZADOS EN EL PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA.	41
TABLA 6. VOLÚMENES DE PATRÓN Y H ₂ O UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN.	42
TABLA 7. CEBADORES UTILIZADOS EN LA qPCR.	44
TABLA 8. INFORMACIÓN DETALLADA DE LOS FÁRMACOS DE REFERENCIA UTILIZADOS EN EL ESTUDIO (GRANITZNY Y OTROS, 2017).....	45

ÍNDICE DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1. FÓRMULA PARA CALCULAR LA CONCENTRACIÓN CELULAR MEDIANTE LA CÁMARA DE NEUBAUER.	38
--	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

AFP: Alfafetoproteína

ALB: Albúmina

ATF4: factor de transcripción activador 4

ATF6: factor de transcripción activador 6

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

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CNP: células no parenquimáticas

CT: umbral de ciclos (del inglés *cycle threshold*)

CXCL10: quimiocina C-X-C ligando 10

CYP: citocromo P-450

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

DMSO: dimetilsulfóxido (del inglés *dimethyl sulfoxide*)

dNTP's: desoxirribonucleótido trifosfato (del inglés *deoxyribonucleotide triphosphat*)

DTT: Ditiotreitól (del inglés *dithiothreitol*)

ECM: Matriz extracelular (del inglés *extracellular matrix*)

GCLC: Glutamato-cisteína ligasa catalítica

GCLM: Glutamato-cisteína ligasa moduladora

GST: glutatión S transferasa

HNF-4: Factor nuclear de hepatocito 4

iDILI: daño hepático inducido por fármacos de tipo idiosincrático

IFN- γ : interferón gamma humano

IIS La Fe: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

IL-1 β : interleuquina 1 β

KC: células de Kupffer (del inglés *Kupffer cells*)

LPS: lipopolisacárido

LVX: Levofloxacino

M-MLV RT: por sus siglas en inglés *moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

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

NRF2: Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (del inglés *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

P/S: Pen-Strep Penicillin y Streptomycin

PBS: tampón fosfato salino (del inglés *phosphate buffer saline*)

PFA: paraformaldehído

PHH: hepatocitos humanos primarios (del inglés *primary human hepatocytes*)

PMA: forbol-12 miristato-13-acetato

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RGZ: rosiglitazona

RNA: ácido ribonucleico (del inglés *ribonucleic acid*)

Rpm: revoluciones por minuto

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute (del inglés *Roswell Park Memorial Institute medium*)

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

SBF: suero bovino fetal

SOD: superóxido dismutasa

TGZ: Troglitazona

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α (del inglés *tumor necrosis factor*)

TVX: Trovafloxacin

Tween: polietilenglicol sorbitano monolaurato

UGT: UDP-glucuronosiltransferasa

1. MOTIVACIÓN

La realización del Trabajo Final de Grado (TFG) en el ámbito de la ingeniería tisular fue motivado por mi inquietud por conocer y aprender más sobre el campo y acerca de las soluciones que éste puede generar a los problemas de salud actuales. Mi motivación por la ingeniería siempre ha ido acompañada de un importante componente biológico, por lo que en cuanto supe de la posibilidad de seguir por dicho camino, no lo dudé y contacté con Gloria, tutora del presente TFG, quien me acogió con los brazos abiertos para realizar el proyecto en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) en colaboración con el Instituto de Investigación Sanitaria de La Fe (IIS La Fe).

Ha sido una experiencia muy enriquecedora durante la cual he adquirido gran cantidad de habilidades y conocimientos, gracias a todos los integrantes de la Unidad Mixta en Hepatología Experimental del IIS La Fe, que me serán de gran utilidad en mi futuro profesional:

- Búsqueda de información en la literatura científica.
- Cultivos celulares.
- Análisis de expresión génica.
- Análisis de hepatotoxicidad inducida por fármacos.
- Análisis de viabilidad.
- Caracterización funcional de cultivos.
- Análisis estadístico de datos.

El presente trabajo ha sido focalizado en un órgano esencial, el hígado, que realiza una elevada cantidad de funciones vitales, entre las cuales destacan la filtración de la sangre y el metabolismo de los xenobióticos.

El daño hepático puede producirse por múltiples factores, siendo uno de los más comunes la hepatotoxicidad inducida por fármacos, que puede resultar en insuficiencia hepática aguda y la necesidad de trasplante hepático. Especialmente la hepatotoxicidad de carácter idiosincrático, que no puede ser predicha a través de los modelos animales ni durante los ensayos clínicos, ha ocasionado la retirada de múltiples medicamentos del mercado.

Por esta razón, se han desarrollado numerosos modelos celulares *in vitro* con la finalidad de simular el comportamiento hepático humano y poder detectar la hepatotoxicidad de los fármacos previamente a su comercialización, con una rapidez y coste factibles. No obstante, no existe ninguno que haya sido totalmente establecido para su uso en la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática. Esta es la motivación que ha conllevado al desarrollo del proyecto en cuestión.

2. OBJETIVOS

Debido a la ausencia de modelos apropiados capaces de predecir eficientemente la hepatotoxicidad idiosincrática inducida por fármacos, surge la necesidad de desarrollar e investigar un nuevo sistema que reproduzca la fisiología del hígado y que pueda servir de fundamento para el desarrollo de futuros modelos más complejos.

Por ello, el objetivo principal del presente trabajo es el desarrollo y caracterización de un modelo de estudio del daño hepático inducido por fármacos de tipo idiosincrático, haciendo uso del co-cultivo de células de la línea celular de hepatoma humano HepG2, en contacto directo con macrófagos diferenciados a partir de la línea celular monocítica THP-1.

Los objetivos concretos del proyecto son los siguientes:

- Optimizar y evaluar el mantenimiento del co-cultivo, utilizando diferentes estímulos proinflamatorios centrandose especial atención en evitar la desdiferenciación del fenotipo de macrófago M1 durante todo el periodo de tiempo experimental.
- Evaluar la funcionalidad de los co-cultivos que mimeticen una situación fisiológica o inflamatoria.
- Comprobar la idoneidad del modelo *in vitro* desarrollado para estudiar la hepatotoxicidad inducida por fármacos (iDILI).

3. ANTECEDENTES

3.1. El hígado

El hígado es un órgano multicelular y dinámico, localizado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, debajo de los pulmones y protegido por las costillas inferiores de la caja torácica, cuyo peso se corresponde con aproximadamente el 2% del peso corporal del individuo adulto (Johns Hopkins Medicine). Su crucial importancia queda patente por la gran cantidad de funciones metabólicas que éste realiza y/o controla, entre las cuales destacan la filtración de la totalidad de la sangre corporal para su detoxificación y la producción de la bilis, que participa en el proceso de la digestión de las grasas en el intestino delgado (Kostadinova y otros, 2013).

Por una parte, el suministro de sangre se caracteriza por ser dual, dado que ésta es suministrada al hígado por la arteria hepática, que proporciona el 80% de la sangre, y la vena porta, que aporta el 20% restante (Godoy y otros, 2013). La primera provee esencialmente oxígeno, mientras que la segunda proporciona los nutrientes y las sustancias tóxicas que serán metabolizadas, provenientes de la vena esplénica y el tracto gastrointestinal. Dicho fluido discurre a través de los capilares hepáticos o sinusoides donde es filtrado, y finalmente drena a las diferentes venas centrales que se unen formando las venas hepáticas izquierda, media y derecha, las cuales a su vez se fusionan con la vena hepática, que extrae la sangre del órgano (Kaplan y otros, 2017).

Por otra parte, por lo que respecta a la bilis secretada, ésta abandona el hígado por medio del conducto hepático común situado en el hilio hepático, el cual recauda la bilis secretada a través de los canalículos biliares localizados entre los hepatocitos, para ser almacenada en la vesícula biliar. Tanto la arteria hepática y la vena porta, como el conducto biliar, se ramifican hasta alcanzar el parénquima hepatocelular formando estructuras denominadas triadas portales, cada una de las cuales presenta una rama de cada tipo de conducto. Esta organización permite una circulación lenta de la sangre por el interior hepático, que hace posible el intercambio de sustancias mediado por las células hepáticas (*Figura 1*) (Kaplan y otros, 2017; Godoy y otros, 2013).

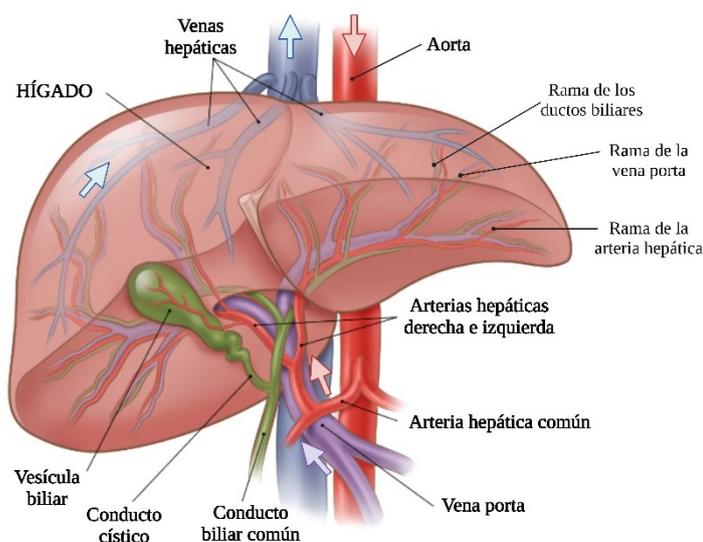


FIGURA 1. ESQUEMA DEL SUMINISTRO ARTERIAL Y VENOSO EN EL HÍGADO. ADAPTADO DE *TERAPIA DE EMBOLIZACIÓN PARA EL CÁNCER DE HÍGADO* [HTTPS://WWW.CANCER.ORG/ES/CANCER/TIPOS/CANCER-DE-HIGADO/TRATAMIENTO/TERAPIA-DE-EMBOLIZACION.HTML](https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-higado/tratamiento/terapia-de-embolizacion.html).

3.1.1. Estructura anatómica y funcional del hígado

La estructura del hígado se caracteriza por estar altamente organizada, y puede clasificarse de dos formas diferentes: atendiendo a la anatomía morfológica de dicho órgano, o respecto a su anatomía funcional. En términos generales, consta de cuatro lóbulos, los cuales a su vez se dividen en segmentos en función del suministro sanguíneo.

Según su anatomía morfológica, se distinguen dos lóbulos principales separados por el ligamento falciforme: el lóbulo derecho, de mayor tamaño, y el lóbulo izquierdo. Asimismo, se diferencian otros dos lóbulos de menor tamaño, que son el lóbulo caudado, localizado entre la hendidura del ligamento venoso y la vena cava inferior; y el lóbulo cuadrado, situado entre la fisura del ligamento redondo y la vesícula biliar.

En cuanto a la división funcional del órgano o clasificación de Couinaud, divide al hígado en ocho segmentos funcionales independientes (Sibulesky, 2013), determinados por las primeras y segundas divisiones de la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar. Cada uno de ellos está irrigado por una rama de estos tres vasos principales. La vena hepática derecha secciona el lóbulo derecho en los segmentos anterior y posterior, mientras que la vena hepática izquierda fracciona el lóbulo izquierdo en los segmentos medial y lateral (Kaplan y otros, 2017; Sibulesky, 2013) (Figura 2).

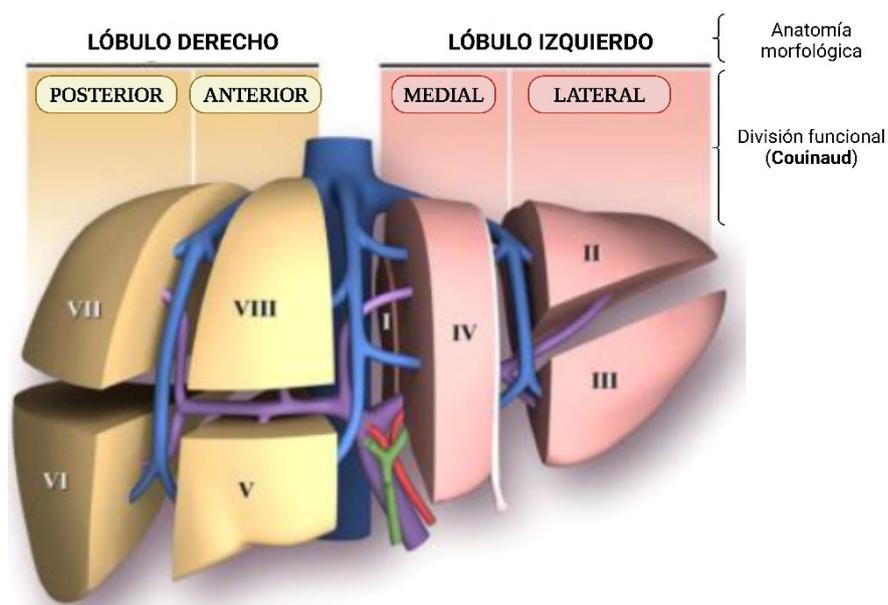


FIGURA 2. ANATOMÍA MORFOLÓGICA Y DIVISIÓN FUNCIONAL O CRITERIO DE COUINAUD DEL HÍGADO. ADAPTADO DE LA FUENTE SIBULESKY, 2013.

A nivel interno, el hígado presenta dos constituyentes básicos: los lobulillos hepáticos y los acinos hepáticos (Figura 3).

HÍGADO

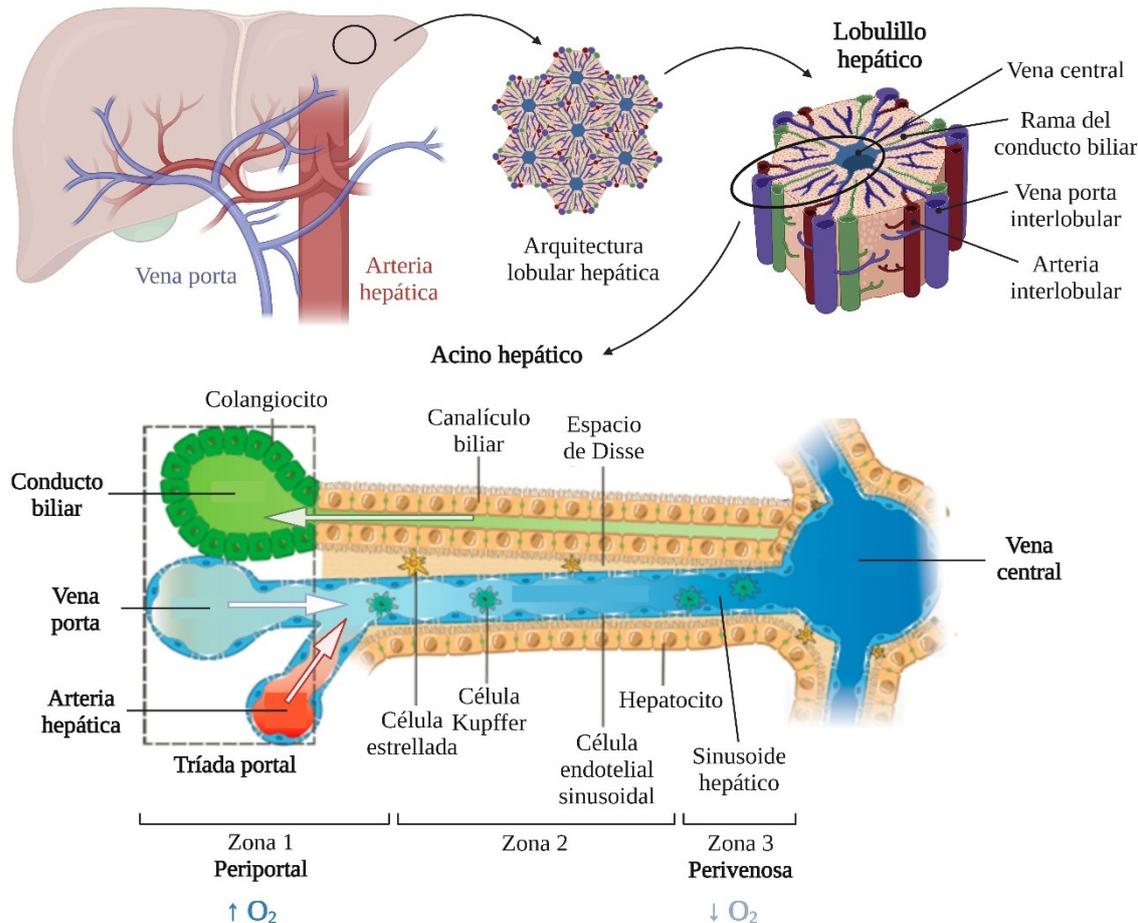


FIGURA 3. ESQUEMA DE LA ARQUITECTURA INTERNA DEL HÍGADO, LAS “ZONIFICACIÓN HEPÁTICA” Y LOS TIPOS CELULARES QUE LO FORMAN. SE HA MARCADO CON FLECHAS EL SENTIDO DE LA CIRCULACIÓN DE LA BILIS Y DE LA SANGRE. ADAPTADO DE MA Y OTROS, 2023.

El lobulillo hepático es una unidad estructural bien definida, presenta una morfología hexagonal con un diámetro aproximado de 1 mm y espesor de 2 mm (Godoy y otros, 2013). Cada lobulillo se organiza alrededor de una vena central, desde la cual los hepatocitos se organizan en monocapa y uniones estrechas formando las placas hepáticas hasta el exterior de los mismos, donde se localiza la tríada portal en cada uno de ellos, la cual, como ya se ha comentado, comprende una rama de la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar, separados por tejido conectivo. Entre las placas hepáticas se localizan los sinusoides, revestidos de las células endoteliales sinusoidales, que son los conductos a través de los cuales se produce la circulación sanguínea y el intercambio de sustancias gracias a los poros presentes en dichas placas de hepatocitos. Asimismo, entre el endotelio sinusoidal hepático y la placa hepática se localiza el espacio de Disse o espacio perisinusoidal (Godoy y otros, 2013; Lv y otros, 2022).

El acino hepático es la unidad funcional microcirculatoria, que presenta una forma elíptica la cual abarca los hepatocitos de dos lóbulos contiguos, siendo su eje corto la conexión entre las dos tríadas portales y su eje largo el enlace entre las dos venas centrales. Se divide en tres zonas: la periportal, la de transición y la perivenosa (Godoy y otros, 2013), cada una de las cuales presenta hepatocitos con una expresión génica, metabólica y función ligeramente distintas, como consecuencia de la

“zonificación metabólica” (Trefts y otros, 2017). Dicha partición es resultado de los gradientes de oxígeno, nutrientes y deshechos que se establecen en las células del hígado en función de su ubicación cuando la sangre circula a través de cada lobulillo, dado que la sangre se desoxigena y capta los subproductos metabólicos a medida que avanza hacia la vena central. Dicha heterogeneidad funcional queda justificada por el hecho que permite al órgano optimizar la energía para poder abarcar la totalidad de las funciones anabólicas y catabólicas que realiza.

Por otra parte, la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*) resulta crucial para la regulación de la homeostasis, la remodelación y la regeneración tisular, además de proporcionarle al órgano la forma y estructura óptimas, a pesar de no ser abundante. Los principales componentes de la ECM son el colágeno de tipo I, III, IV y V; algunas glicoproteínas como la laminina y la fibronectina; y proteoglicanos como el heparán sulfato, dermatán sulfato, o el ácido hialurónico (Lv y otros, 2022).

En cuanto a las células presentes en el hígado, estas son mayoritariamente hepatocitos dispuestos en trabéculas interconectadas, es decir, células parenquimáticas, en un 80% (Godoy y otros, 2013), que realizan la mayoría de las funciones; y el 20% restante son células no parenquimáticas (CNP) que sirven de soporte a las anteriores y son las células de Kupffer (KC, del inglés *Kuffer cells*), las células endoteliales sinusoidales y biliares, y las células estrelladas o células de Ito (*Tabla 1*). La interacción y actuación conjunta de todos los tipos celulares regula la función hepática.

TABLA 1. PRINCIPALES CÉLULAS DEL HÍGADO, SU LOCALIZACIÓN Y SU FUNCIÓN. ELABORACIÓN PROPIA (ARZUMANIAN Y OTROS, 2021; GODOY Y OTROS, 2013).

<i>Células</i>	<i>Localización</i>	<i>Función</i>
Hepatocitos (80%)	Delimitan los sinusoides hepáticos formando monocapas mediante uniones estrechas.	Secreción de albúmina y otras proteínas. Control de la homeostasis de los triglicéridos de glucosa o glucógeno, los ácidos biliares, el colesterol, así como las vitaminas A y D.
Células endoteliales sinusoidales (3%)	Recubren los sinusoides hepáticos, separando las células sanguíneas de los hepatocitos y las células de Ito.	Dan soporte funcional y estructural a los hepatocitos.
Colangiocitos o células endoteliales biliares (5%)	Recubren los conductos que forman el tracto biliar.	Formación de los conductos biliares.
Células estrelladas hepáticas o células de Ito (10%)	Espacio perisinusoidal o espacio de Disse.	Metabolismo de la vitamina A, almacenamiento de la grasa y producción de ECM.
Células de Kupffer (15%)	Son los macrófagos residentes en el hígado, adsorbidos a las células endoteliales.	Eliminación de sustancias nocivas gracias a su capacidad fagocítica.

		<p>Son activadas tras el daño hepático, como consecuencia, entre otros factores, de la unión a compuestos como el LPS o el IFN-γ.</p> <p>Secretan citoquinas proinflamatorias (p.ej. TNF-α e IL-1β), las cuales, a su vez, atraen las células inmunes presentes.</p>
--	--	---

3.1.2. Funciones

Las funciones primordiales del hígado se enumeran a continuación.

- Metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas.
- Secreción de factores de coagulación.
- Síntesis y secreción de proteínas como albúmina (60 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Khalil y otros, 2001); fibrinógeno (6-14 $\mu\text{g}/\text{día}$) y transferrina (5,2-8,78 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Acharya y Dimichele, 2008; Bates y McClain, 1981).
- Ureogénesis para la eliminación de las moléculas nitrogenadas reactivas dañinas (Khalil y otros, 2001; Rudman y otros, 1973).
- Detoxificación de xenobióticos.
- Almacenamiento de glucógeno y vitaminas.
- Procesamiento y secreción de bilis.
- Soporte al sistema inmunológico.

Dichas funciones se alteran cuando se produce alguna lesión sobre alguna de las tres estructuras principales, es decir, los hepatocitos, los vasos sanguíneos o los conductos biliares. A pesar de ello, se trata de un órgano con elevada reserva funcional y gran capacidad regenerativa, resultando en insuficiencia hepática cuando la capacidad funcional erosionada alcanza entre el 80% y 90%. Generalmente, el daño inicial afecta a los hepatocitos, pero posteriormente se produce una respuesta por parte de las CNP y las del sistema inmune, empeorando así la situación.

3.2. Daño hepático inducido por fármacos

Una de las principales dificultades a las que se enfrentan tanto la salud pública como las agencias reguladoras y las empresas farmacéuticas es la predicción de las reacciones adversas a medicamentos durante el desarrollo de fármacos, y previamente a que éstos sean incorporados en el mercado (Shaw y otros, 2010). A pesar de que estas reacciones pueden afectar a diferentes tejidos, el tejido hepático es normalmente de los más recurrentes (Kaitin, 2005), en cuyo caso la afección recibe el nombre de daño hepático inducido por fármacos (DILI, del inglés *drug induced liver injury*).

El DILI ha sido designado como la causa principal de trasplantes e insuficiencia hepática aguda, ya que ha provocado aproximadamente el 50% del total de casos de dicha patología (Ostapowicz y otros, 2002), dando lugar de esta manera a una mortalidad significativa. En consecuencia, es actualmente el motivo más frecuente de la retirada de fármacos del mercado después de su

comercialización, ya sea por parte de las agencias reguladoras de alimentos y medicamentos o por parte de las compañías farmacéuticas (Temple y Himmel, 2002); así como de la difusión de avisos de advertencia contra ciertos productos (Lasser y otros, 2002).

En función de su origen, el DILI puede clasificarse en intrínseco e idiosincrático. El primero se caracteriza por desencadenar la minoría de las reacciones hepáticas adversas, dado que estas son dependientes de la dosis y, por lo tanto, predecibles y evitables. Este daño ocurre cuando el fármaco es administrado en altas dosis, es resultado del daño directo a los hepatocitos inducido por el propio mecanismo tóxico del fármaco y tiene lugar pasado un periodo de latencia corto. Normalmente, el DILI intrínseco es revelado durante los ensayos clínicos, por lo que el impacto clínico es mínimo. El medicamento más conocido que puede provocar DILI intrínseco es el paracetamol (Yamashita y otros, 2017). Sin embargo, el DILI idiosincrático (iDILI) es impredecible, multifactorial y puede ocurrir pasado un periodo de latencia prolongado y variable, de semanas a meses. Este hecho, sumado a su dependencia con diferentes factores de susceptibilidad individual, tales como la edad, el sexo, diferentes factores genéticos y ambientales, así como las enfermedades hepáticas preexistentes (Kaplowitz, 2005; Hussaini y Farrington, 2007), dificultan su detección durante las pruebas preclínicas y convierten este problema en una dificultad importante para el desarrollo farmacéutico (Hussaini y Farrington, 2007; Gómez-Lechón y otros, 2007; Corsini y otros, 2012; Segovia-Zafra y otros, 2021). Una de las principales diferencias entre ambos tipos es la dosis a la cual se produce el daño hepático, siendo en el primer caso muy superior al rango terapéutico del mismo, mientras que en el segundo caso los valores suelen estar situados dentro de este rango (Jee y otros, 2021).

En la clínica, según el aumento de la alanina aminotransferasa y la fosfatasa alcalina, el DILI se puede dividir en tres patrones: hepatocelular, colestásico y daño hepático mixto. Cada categoría está determinada por un “valor R” propio, que se define tal y como muestra la *Tabla 2*. El patrón colestásico normalmente necesita un mayor periodo de tiempo para resolverse tras la privación del fármaco, pudiendo desarrollar una colestasis progresiva crónica; pero es menos grave que la lesión hepatocelular, que suele generar necrosis hepatocelular. El patrón mixto expresa propiedades tanto del DILI hepatocelular como del colestásico (Hussaini y Farrington, 2007; Holt y Ju, 2006). No obstante, un mismo fármaco puede exhibir valores de R y características clínicas variables en diferentes sujetos con iDILI (Yamashita y otros, 2017).

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DEL DILI EN FUNCIÓN DEL AUMENTO DE AMINOTRANSFERASA (ALT) Y FOSFATASA ALCALINA (ALP), EN RELACIÓN AL LÍMITE SUPERIOR DE LA NORMALIDAD (LSN) (HUSSAINI Y FARRINGTON, 2007).

<i>Patrón de lesión hepática</i>	<i>Valor R = (ALT/LSN):(ALP/LSN)</i>
Hepatocelular	> 5
Colestásico	<2
Mixto	∈ [2,5]

3.2.1. iDILI

La lesión hepática idiosincrática inducida por fármacos sucede únicamente en una minoría de pacientes, pero explica la mayor parte de las restricciones de uso de los medicamentos comercializados (Shaw y otros, 2010). Las patologías clínicas que genera incluyen desde anomalías bioquímicas mínimas hasta la insuficiencia hepática aguda (Ostapowicz, y otros, 2002; Björnsson y Olsson, 2006). En cuanto a la incidencia de la iDILI, se sitúa en valores muy bajos y alrededor de 19 casos anualmente de cada 100.000 habitantes. Por consiguiente, puesto que los ensayos clínicos previos a la salida de los fármacos al mercado solamente incluyen un rango de entre 1000 y 3000 individuos, resulta prácticamente imposible identificar el iDILI durante dichas pruebas (Roth y Ganey, 2010).

Existe una elevada cantidad de fármacos que han sido eliminados del mercado debido a su asociación con el iDILI, como son la troglitazona (Graham y otros, 2003; Murphy y otros, 2000) o el bromofenaco (Hunter y otros, 1999); y otros que han dado lugar a advertencias en su uso, como por ejemplo el trovafloxacino (Lazarczyk y otros, 2001). En general, el 60% de los casos de iDILI son debidos a medicamentos antiepilépticos y antibióticos, pero se ha detectado una incidencia creciente del iDILI asociado con los suplementos herbales y dietéticos (Yamashita y otros, 2017).

La mayor parte de las reacciones idiosincráticas suceden entre los 5 y 90 días posteriores a la ingesta del fármaco, pero puede extenderse más tiempo. Es por ello por lo que el iDILI es conocido por presentar una relación temporal inconsistente con la exposición al medicamento (Shaw y otros, 2010; Hussaini y Farrington, 2007). Normalmente los síntomas que aparecen son inespecíficos, como náuseas, fatiga o dolor abdominal; pero pueden producirse síntomas de mayor importancia como la ictericia, la encefalopatía y la ascitis.

El diagnóstico del iDILI es complejo dado que se obtiene a través del análisis riguroso del historial clínico correspondiente a un periodo de tiempo de mínimo un año, incluyendo los medicamentos recetados y de venta libre, así como los suplementos dietéticos; y la exclusión del resto de enfermedades hepáticas que pueden causar la disfunción de éste (Hussaini y Farrington, 2007). Concretamente se emplea la "Regla de Hy", según la cual un valor de aminotransferasa superior a 3 veces el límite superior de la normalidad se considera como un marcador de lesión hepática y un riesgo de mortalidad del 10%. Por tanto, el principal marcador del iDILI son los niveles de enzimas hepáticas (Holt y Ju, 2006; Yamashita y otros, 2017).

Una vez detectado el iDILI, dado que no hay ningún tratamiento definitivo, la toma de medicamentos es suspendida, y posteriormente a ello, menos del 10% de los pacientes desarrollan insuficiencia hepática aguda. Estos generalmente presentan síntomas graves tales como encefalopatía o ictericia, esto es, niveles altos de bilirrubina; y pueden llegar a necesitar un trasplante de hígado (Yamashita y otros, 2017). La reexposición al fármaco tras dicha afección puede dar lugar al daño hepático o ser incluso mortal.

3.2.2. Mecanismos del iDILI

Los mecanismos subyacentes al iDILI aún no se conocen de manera clara a pesar de su impacto (Shaw y otros, 2010). Aunque se ha postulado cómo diferentes mecanismos pueden estar implicados en el iDILI (*Figura 4*), probablemente no existe un único mecanismo, y múltiples factores pueden contribuir a su desencadenamiento.

Por una parte, el iDILI inmunomediado relaciona la patogénesis con la participación del sistema inmune innato y adaptativo (Holt y Ju, 2006). Para su adecuada comprensión, debe tenerse en cuenta el papel activo del hígado en el metabolismo de xenobióticos. A través de una primera fase (Fase I), este órgano modifica químicamente estas moléculas por medio de reacciones de oxidación-reducción catalizadas por enzimas de la familia del citocromo P-450 (CYP) o la enzima monooxigenasa flavina, hasta obtener metabolitos más polares, los cuales pueden ser excretados directamente o unidos a moléculas endógenas para aumentar su solubilidad y poder ser eliminadas a través de la orina o la bilis (reacciones de Fase II) (Gómez-Lechón y otros, 2007).

Sin embargo, este proceso puede verse modificado en presencia de determinados fármacos, cuya estructura química provoca la bioactivación metabólica de sus moléculas (normalmente compuestos carbonílicos insaturados, epóxidos, aldehídos, conjugados de sulfato y glucorónidos) en metabolitos reactivos a través de la Fase I. Dichos metabolitos se conjugan covalentemente con proteínas, como el CYP u otras enzimas, o con moléculas de ADN, que pueden modificar el funcionamiento celular provocando así toxicidad. En concreto, la unión del metabolito reactivo al CYP forma un neoantígeno y en consecuencia se inicia una respuesta inmunitaria (Gómez-Lechón y otros, 2007; Hussaini y Farrington, 2007).

Asimismo, el estrés y/o daño hepático generado, así como la formación del neoantígeno, puede resultar en la activación de las células del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, como consecuencia de la liberación al espacio intercelular de patrones moleculares asociados al daño. En el primer caso, las células de Kupffer y otros tipos celulares, además de reclutar otras células del sistema inmune, secretan citoquinas y otros factores que, en el caso de las citoquinas inflamatorias (el factor de cirrosis tumoral, TNF- α ; el interferón γ (IFN- γ); y la interleuquina 1 β (IL-1 β)) conllevarán al daño hepático y a la activación y proliferación de las células T CD4⁺ (iniciando la respuesta del sistema inmune adaptativo), mientras que la liberación de las interleuquinas IL-10, IL-6 y algunas prostaglandinas, resolverán el daño y el tejido será reparado (Holt y Ju, 2006; Segovia-Zafra y otros, 2021). En el segundo caso, el sistema inmune adaptativo también puede iniciar su actividad tal y como indica la “hipótesis del hapteno”, aunque será necesaria la liberación de patrones moleculares asociados al daño para que ello se produzca. Según dicho mecanismo, el neoantígeno producido es o bien reconocido por las células B o bien presentado a las células T por medio de las células presentadoras de antígenos. A continuación, se produce la activación y proliferación de las células T CD4⁺, que darán lugar o bien a la limitación de la lesión hepática o bien al inicio del iDILI (Jee y otros, 2021; Segovia-Zafra y otros, 2021; Holt y Ju, 2006).

Por otra parte, en la ruta metabólica del “estrés oxidativo”, la interacción del metabolito reactivo con moléculas de oxígeno (O₂) puede dar lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno provocando el estrés oxidativo debido a la disminución del glutatión reducido y el aumento de la actividad del CYP. Estas especies pueden interrumpir los gradientes iónicos y alterar las reservas intracelulares de calcio, dando lugar a la disfunción mitocondrial, peroxidación lipídica, y a la consecuente muerte celular por apoptosis citotóxica y posible insuficiencia hepática (Holt y Ju, 2006, Gómez-Lechón y otros, 2007).

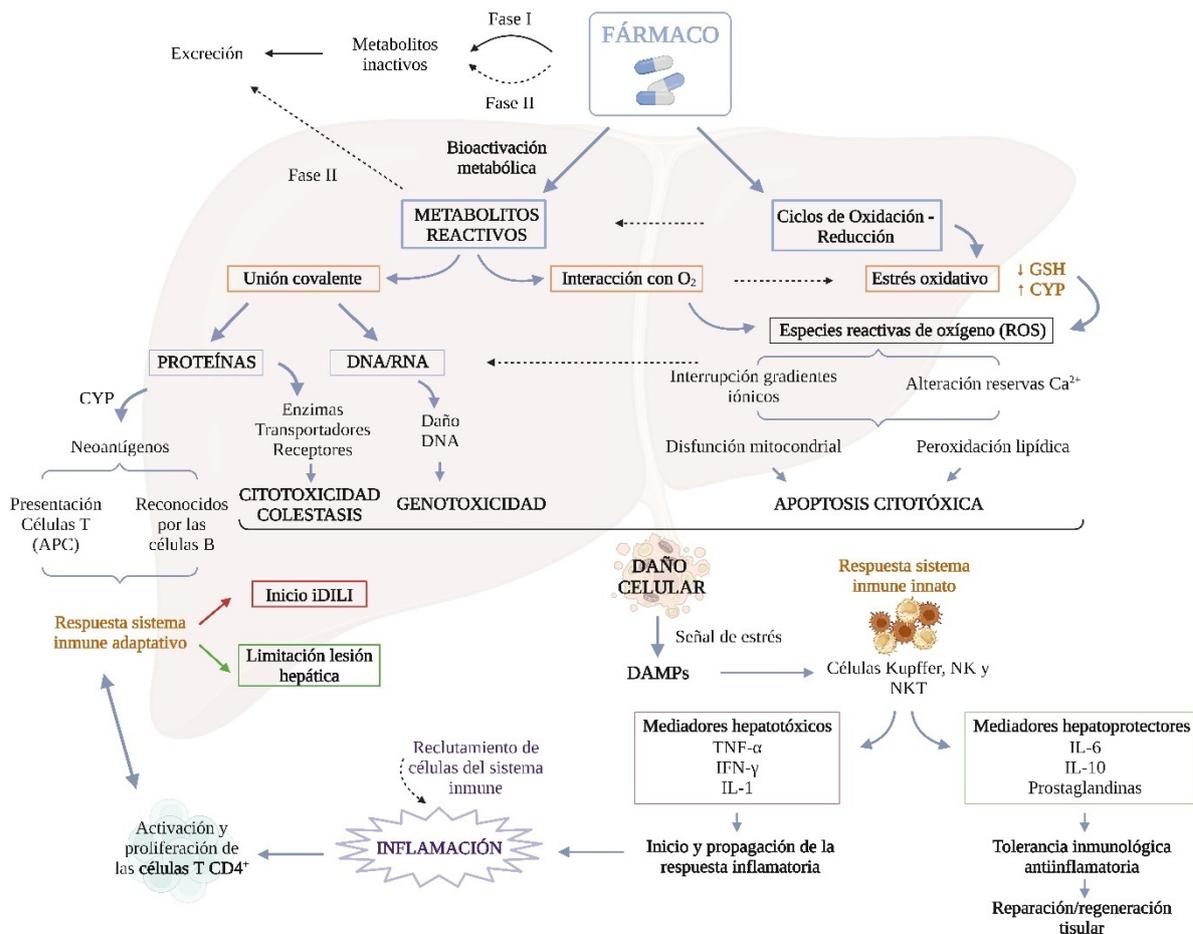


FIGURA 4. ESQUEMA DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS QUE CONDUCEN AL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR FÁRMACOS IDIOSINCRÁTICO. (DAMP: PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS AL DAÑO; APC: CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS; ROS: ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO; GSH: GLUTATIÓN REDUCIDO). ELABORACIÓN PROPIA MEDIANTE BIORENDER (GÓMEZ-LECHÓN Y OTROS, 2007; HOLT Y JU, 2006; SEGOVIA-ZAFRA Y OTROS, 2021; JEE Y OTROS, 2021).

3.3. Modelos *in vitro* para el estudio del DILI

Tradicionalmente, los modelos empleados para el estudio del DILI han sido tres especies animales, el roedor y el perro o mono. No obstante, los resultados obtenidos con estos modelos *in vivo* no son extrapolables al DILI en humanos, debido a las diferencias en las rutas metabólicas entre ambas especies. Además, dado que el iDILI ocurre con una incidencia muy baja y extensa en el tiempo, se requiere un alto número de animales de experimentación, lo que también conlleva un elevado coste económico. Todo ello sumado al creciente interés en la aplicación del “Principio de las tres R: Reemplazo, Reducción y Refinamiento de la experimentación animal”, que busca reducir el uso de animales en investigación, mediante la sustitución de los mismos por otros modelos *in vitro* (Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008; Corsini y otros, 2012; Shaw y otros, 2010; Tasnim y otros, 2021), ha generado la necesidad de establecer modelos celulares de origen humano capaces de determinar el riesgo de ingerir un determinado medicamento previamente a la comercialización del mismo (Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008).

Los modelos *in vitro* son sistemas, normalmente formados por células dispuestas bidimensional (2D) o tridimensionalmente (3D), especialmente útiles para analizar la hepatotoxicidad y los mecanismos que la subyacen (Segovia-Zafra y otros, 2021).

Sin embargo, actualmente no se conoce ningún modelo *in vitro* o *in silico* que permita detectar la hepatotoxicidad inducida por fármacos en las fases preclínicas de su desarrollo, y que haya sido aceptado por las agencias reguladoras de medicamentos, ya que, entre otras razones, no son capaces de mantener su funcionalidad en el tiempo (Segovia-Zafra y otros, 2021; Pelechá y otros, 2017).

En el caso del iDILI, debido a la ausencia de biomarcadores que permitan su adecuada predicción y diagnóstico, resulta de especial interés la búsqueda y/o fabricación de modelos para estudiar sus mecanismos, de manera que su identificación en pacientes reales sea facilitada y se evite la administración de medicamentos que puedan provocarlo (Segovia-Zafra y otros, 2021).

3.3.1. Principales modelos *in vitro* para el estudio del iDILI

Los sistemas empleados para el estudio del iDILI *in vitro* abarcan desde cultivos de uno o varios tipos celulares en monocapa, hasta complejas estructuras tridimensionales. Un cultivo es un sistema formado por células y tejido en el cual se mimetiza *in vitro* el ambiente que está presente en el organismo *in vivo*, permitiendo así la manipulación y evaluación de las células que incorpora bajo unas condiciones concretas (LeCluyse y otros, 2012). Existe una extensa variedad de configuraciones posibles de cultivo desarrolladas en los últimos años para la obtención de los modelos *in vitro* hepatotóxicos, cuyas principales características e inconvenientes se resumen en la *Tabla 3*.

Modelos de monocultivo

Los modelos más simples son los monocultivos, es decir, aquellos en los que se cultiva un único tipo celular, ya sea mediante una configuración 2D o 3D.

El cultivo de hepatocitos humanos primarios (PHH, del inglés *primary human hepatocytes*) ha sido el más estudiado durante los últimos años y es considerado el modelo *in vitro* más adecuado, dado que estas son las principales células del hígado y son capaces de formar metabolitos similares a los formados *in vivo* cuando son expuestos a determinados fármacos (Maurel, 2010; Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008). Los PHH pueden obtenerse a partir de biopsias o secciones de hígado (Segovia-Zafra y otros, 2021), los cuales poseen la estructura y la mayoría de las funciones de los hepatocitos *in vivo*. Sin embargo, presentan múltiples desventajas, entre las cuales destaca la gran variabilidad inherente de células de distintos donantes humanos, su escasa disponibilidad, la desdiferenciación rápida que sufren a las pocas horas de ser cultivados, que da lugar a cambios en su estructura, polaridad y morfología, así como su corta supervivencia, que es de aproximadamente una hora cuando están en suspensión y unos pocos días cuando crecen en forma de monocultivo (Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008; Segovia-Zafra y otros, 2021).

Por dichas razones, ha sido indispensable la búsqueda de fuentes celulares alternativas (Ramboer y otros, 2015). En este sentido, por una parte, se pueden obtener hepatocitos derivados de líneas celulares de hepatoma, que son células de linaje inmortal aisladas de tumores, capaces de proliferar de manera indefinida bajo las condiciones adecuadas (LeCluyse y otros, 2012). Si bien es cierto que presentan una alta disponibilidad, fácil manejo y un fenotipo estable durante largos periodos de tiempo independiente del donante; su genotipo suele ser inestable y expresan menos funciones

metabólicas que los PHH, ya que no contienen la totalidad de las enzimas que sí poseen los hepatocitos (Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008; Donato y otros, 2015; LeCluyse y otros, 2012; Segovia-Zafra y otros, 2021; Guillouzo, 1998). Las principales líneas celulares disponibles de hepatocitos son HepG2, HepaRG, Huh7 y Fa2N-4. Por otra parte, existe una tercera vía para la obtención de hepatocitos, basada en la diferenciación de células madre embrionarias pluripotentes o células madre adultas multipotentes, ya sea hepáticas o extrahepáticas, tales como las células madre mesenquimales de la médula ósea o las células madre pluripotentes inducidas humanas. Poseen un potencial de propagación ilimitado, así como capacidad de autorrenovación. Pueden diferenciarse a células similares a hepatocitos, aunque los protocolos actuales sólo permiten obtener un fenotipo inmaduro (Guillouzo, 1998; Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008; Segovia-Zafra y otros, 2021).

La principal desventaja de los monocultivos es que estos no mimetizan las interacciones dinámicas y complejas entre los hepatocitos y las células no parenquimáticas, especialmente con las KC, por lo que no permiten la evaluación de la hepatotoxicidad mediada por el sistema inmune (Rose y otros, 2016). Asimismo, algunos estudios han evidenciado que dichas interacciones heterotípicas y homotípicas, además, contribuyen en el aumento de la supervivencia de los hepatocitos cultivados (Guguen-Guillouzo, 1986). Consecuentemente, debido su limitado rendimiento predictivo, los monocultivos centrados en un único tipo celular no son modelos apropiados para el estudio del iDILI (Kostadinova y otros, 2013; Segovia-Zafra y otros, 2021).

Modelos de co-cultivo

Con el objetivo de optimizar los sistemas, se ha trabajado en el desarrollo de co-cultivos *in vitro* de hepatocitos con CNP, siendo las KC el centro de interés dada su abundancia en el hígado y papel en la hepatotoxicidad. Numerosos estudios han demostrado mayor competencia metabólica y estabilidad de estos modelos frente a los monocultivos (Rose y otros, 2016; Kostadinova y otros, 2013). Cabe destacar la relevancia de conseguir un contacto directo entre los hepatocitos y las KC en los co-cultivos ya que, tal y como demostraron Hoebe y otros (2001), dichas uniones simulan las extensiones citoplasmáticas presentes *in vivo*, favoreciendo así la producción de citoquinas por parte de las KC así como la viabilidad de ambos tipos celulares.

Además, también se ha propuesto el uso de otro tipo de células no parenquimáticas, como las células endoteliales sinusoidales, de forma que el co-cultivo de hepatocitos, KC y células endoteliales sinusoidales hepáticas ha demostrado una mejor mimetización de la estructura hepática y, por tanto, una mayor funcionalidad del sistema para el análisis del iDILI (Ahmed y otros, 2017). Asimismo, el cultivo de hepatocitos junto con células estrelladas hepáticas ha resultado útil para el estudio de la fibrosis hepática que en ocasiones es resultado del estrés oxidativo producido durante el iDILI (Urtasun y Nieto, 2007; Ahamet y otros, 2017).

Al igual que en los monocultivos con hepatocitos primarios, el reto actual al que se enfrentan este tipo de sistemas es la ausencia de una fuente celular funcional y relativamente ilimitada, por lo que la disponibilidad de células primarias es muy reducida (Segovia-Zafra y otros, 2021; Tasnim y otros, 2021). Por esta razón, las investigaciones más recientes se han centrado también en el uso de células no parenquimáticas procedentes de líneas celulares inmortalizadas, las cuales proporcionan una mayor preservación y estabilidad de las funciones realizadas por los hepatocitos *in vitro*. En el caso de la KC, se pueden generar a partir de la diferenciación a macrófagos de la línea celular monocítica

de leucemia humana THP-1 (Dixon y otros, 2013; Rose y otros, 2016; Chanput y otros, 2014; Ramboer y otros, 2015).

Modelos tridimensionales

Finalmente, con el objetivo de mimetizar con mayor precisión la estructura hepática, y dadas las dificultades de los sistemas bidimensionales de mantener la configuración fisiológica y supervivencia de los hepatocitos, se han propuesto algunos modelos tridimensionales (*Tabla 3*). Estos han demostrado una actividad metabólica más prolongada en el tiempo y una reproducción más fiel de la arquitectura del hígado, exhibiendo una mejor capacidad predictiva del iDILI, pero ninguno de ellos ha sido implementado debido a su elevada complejidad (Guillouzo, 1998; Segovia-Zafra y otros, 2021; Ma y otros, 2023). Para simular el entorno extracelular real de los hepatocitos se han empleado tanto hidrogeles naturales y biocompatibles, tales como alginato, ácido hialurónico, gelatina, colágeno y la ECM descelularizada, como materiales sintéticos (Lv y otros, 2022).

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

TABLA 3. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS PRINCIPALES MODELOS *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DEL IDILI, ORDENADOS DE MENOR A MAYOR COMPLEJIDAD. LOS MODELOS CON MENOR COMPLEJIDAD SE ASOCIAN CON UN MENOR COSTE, UNA MAYOR FACILIDAD EN SU PRODUCCIÓN Y MAYOR REPRODUCIBILIDAD, PERO PRESENTAN MENOR EFECTIVIDAD.

<i>Modelos bidimensionales</i>			
Modelos	Características/Ventajas	Desventajas	Ref.
<p>Suspensión PHH</p> <p>Cultivo de PHH en inmersión en un medio líquido</p>	<p>Facilidad de uso</p> <p>Inicialmente presentan funciones similares a las de los hepatocitos <i>in vivo</i></p> <p>Posible criopreservación</p>	<p>Rápida desdiferenciación</p> <p>Corto periodo de vida (2-4 horas)</p> <p>No se reproducen las interacciones de los hepatocitos con las CNP</p> <p>Dificultad de obtención y alta variabilidad</p> <p>Ausencia de formación de canaliculos biliares</p>	<p>(Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008)</p> <p>(Guillouzo, 1998)</p> <p>(Segovia-Zafra y otros, 2021)</p>
<u>Monocultivos 2D</u>			
<p>Cultivo en monocapa de PHH</p> <p>Crecimiento de los hepatocitos adheridos a un sustrato</p>	<p>Mayor viabilidad de los hepatocitos que cuando se cultivan en suspensión</p> <p>Posible inducción o inhibición de las enzimas metabólicas</p> <p>Facilidad de uso</p>	<p>No se reproducen las interacciones de los hepatocitos con las CNP</p> <p>Dificultad de obtención y alta variabilidad</p> <p>Rápidos cambios fenotípicos con el tiempo de cultivo</p> <p>Canaliculos biliares alterados</p>	<p>(Segovia-Zafra y otros, 2021)</p> <p>(Guillouzo, 1998)</p>
<p>Cultivo en monocapa de HepG2</p> <p>Línea celular inmortal proveniente de un carcinoma hepatocelular diferenciado</p>	<p>Secreción de proteínas plasmáticas hepáticas</p> <p>Soporte a la transducción de CYP mediada por adenovirus</p> <p>Morfología epitelial al ser cultivadas en una superficie</p> <p>Su polarización permite la estructuración de las células en canaliculos biliares</p> <p>Es la línea celular más empleada y mejor caracterizada</p> <p>Metabolismo del colesterol, triglicéridos, lipoproteínas</p>	<p>Niveles de expresión y actividad reducida de las enzimas y transportadores para el metabolismo de fármacos</p> <p>Diferencias sustanciales en la expresión génica respecto PHH</p>	<p>(Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008)</p> <p>(Donato y otros, 2015)</p> <p>(LeCluyse y otros, 2012)</p> <p>(Segovia-Zafra y otros, 2021)</p>

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

	Síntesis de ácidos biliares, glucógeno y señalización de la insulina Fácil mantenimiento		
Cultivo en monocapa de HepaRG Línea celular inmortal proveniente de un tumor hepático con hepatitis C crónica	Alta expresión de las enzimas de CYP Adecuadas para estudios de metabolismo y toxicidad hepáticas Mantenimiento adecuado de su polaridad Reproducible	Son derivadas de un solo individuo, por lo que pueden verse alteradas por los polimorfismos Origen tumoral	(Guillaouzo y Guguen-Guillouzo, 2008) (Marion y otros, 2010) (LeCluyse y otros, 2012) (Segovia-Zafra y otros, 2021)
Configuración en Sandwich Células incrustadas sobre una matriz formada por Colágeno I, y recubrimiento del sistema con una capa de ECM gelificada	Aumento de la actividad enzimática de CYP Viabilidad, diferenciación y capacidad funcional celular prolongada Formación gradual de canaliculos biliares Posibilidad de emplear células primarias, diferenciadas de células madre o provenientes de líneas celulares inmortalizadas Interacciones celulares con la ECM circundante	Organización tridimensional limitada Degradable Consistencia variable	(Kostadinova y otros, 2013) (Guillouzo, 1998) (Keemink y otros, 2015) (Godoy y otros, 2013)
Co-cultivos 2D			
Co-cultivos de hepatocitos y células no parenquimales	Mayor mimetización del fenotipo y condiciones hepáticas Interacciones célula-célula	Dificultad para expandir las células <i>in vitro</i> Distribución aleatoria de las células Mayor mortalidad celular Ausencia de protocolos estandarizados y validados	(Segovia-Zafra y otros, 2021) (Rose y otros, 2016) (Tasnim y otros, 2021)
	Co-cultivo hepatocitos y KC		
	Buena competencia metabólica y elevada estabilidad	Baja disponibilidad de las células humanas primarias	(Rose y otros, 2016)

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

	Apropiado para el estudio de las reacciones inmunomediadas inducidas por fármacos		(Nguyen y otros, 2015)
Co-cultivo de hepatocitos y fibroblastos			
	Mayor duración de la viabilidad y función celular (hasta 6 semanas)	No permiten un estudio apropiado de la hepatotoxicidad	(Khetani y Bhatia, 2008)
Co-cultivo de HepG2 y THP-1			
	Modelo potencial para el estudio del iDILI: aumento de la sensibilidad en presencia de THP-1 diferenciadas a macrófagos	No es un modelo eficiente cuando las células THP-1 están en fenotipo monocítico	(Granitzny y otros, 2017)
Modelos tridimensionales			
Cortes de hígado	Presentan la arquitectura tridimensional del hígado Mantenimiento de las interacciones células-célula y célula-ECM Apropiado para estudios a corto plazo	Las funciones metabólicas no se mantienen estables en el tiempo (uso limitado a 1 o 2 días) Baja viabilidad Requiere de cirugía o sacrificio de muestras No puede analizarse el flujo biliar por separado Disponibilidad reducida No aplicables al cribado de alto rendimiento	(Guillouzo, 1998) (Segovia-Zafra y otros, 2021) (Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008) (Kostadinova y otros, 2013)
Esferoides Autoagregación de células	Mayor viabilidad celular y mantenimiento de las funciones hepáticas Establecimiento de interacciones célula-célula Facilidad de obtención Pueden emplearse con distintos tipos celulares	Fusión de los esferoides con el tiempo Muerte celular en la región central por el limitado suministro de nutrientes y oxígeno Variabilidad en tamaños	(Guillouzo, 1998) (Segovia-Zafra y otros, 2021)
Scaffolds	Mimetizan la ECM nativa Buenas interacciones célula-célula Aumentan la viabilidad celular y mantienen las funciones hepáticas	La amplia variedad de materiales dificulta el establecimiento de un protocolo reproducible Problemas en la recuperación de las células	(Segovia-Zafra y otros, 2021)

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

	Pueden emplearse con distintos tipos celulares Buen control de la porosidad	Consistencia variable	
Biorreactores	Permiten simular la zonificación hepática proporcionando un flujo de nutrientes e intercambio metabólico Fenotipo diferenciado de los hepatocitos durante varias semanas Formación de interacciones celulares y canalículos biliares	Dificultades asociadas con la perfusión continua inherente al modelo Posible estrés mecánico que puede alterar la dinámica fisiológica de los hepatocitos	(Olsavsky y otros, 2010) (Kostadinova y otros, 2013)
Hígado en un chip Simulación del entorno hepático	Intercambio molecular continuo de nutrientes y oxígeno entre los diferentes compartimentos Recrean el esfuerzo cortante fisiológico al que está sometido el hígado	Su potencial de predicción de iDILI no está validado	(Segovia-Zafra y otros, 2021) (Ma y otros, 2023)
Hígado bioimpreso en 3D Impresión de células hepáticas parenquimáticas y CNP sobre <i>scaffolds</i> 3D	Mantenimiento de la función normal de hepatocitos y viabilidad durante periodos de tiempo largos Reproducción de la estructura hepática	Elevada complejidad Baja porosidad Dificultad para controlar los cambios de medio No reproduce la anisotropía del hígado	(Segovia-Zafra y otros, 2021)

4. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de la tecnología durante los últimos años ha permitido el avance de la medicina a velocidad vertiginosa y ha tenido un efecto notable en la investigación biomédica, haciendo posible la obtención de nuevas sustancias farmacológicas y dietéticas. Una de las principales consecuencias que ello conlleva es el aumento de la esperanza de vida, por lo que cada vez es mayor la población envejecida, y hay un aumento creciente en la demanda de medicamentos.

El daño hepático idiosincrático inducido por fármacos es un problema grave que está en aumento en la sociedad actual. Dada la dificultad de ser detectado durante el cribado de fármacos en los ensayos preclínicos, sumado a las crecientes iniciativas por reducir la experimentación animal, se han desarrollado diferentes sistemas de cultivo celular *in vitro*, tanto 2D como 3D, que permiten mimetizar las condiciones *in vivo* y servir de modelos para el estudio de la hepatotoxicidad provocada por los medicamentos en humanos.

En este sentido, el propósito del trabajo ha sido proporcionar un modelo *in vitro* basándose en el co-cultivo de hepatocitos junto con las células no parenquimáticas inmunológicas del hígado, es decir, las células de Kupffer. Sin embargo, debido al alto coste y a la falta de disponibilidad de estas células primarias, se ha optado por la utilización de dos líneas celulares alternativas: las células HepG2, que son derivadas a hepatocitos; junto con las células THP-1, que son diferenciadas a macrófagos polarizados o pro-inflamatorios para mimetizar las KC.

El objetivo es conseguir un sistema fisiológicamente equiparable al tejido hepático, capaz de inducir una respuesta mediada por las células inmunológicas al tratarlo con diferentes concentraciones de fármacos, para analizar cómo se comporta ante dichos estímulos y predecir, de esta manera, una posible hepatotoxicidad.

El estudio se ha realizado en co-cultivos con diferentes proporciones de hepatocitos y macrófagos, simulando tres situaciones hepáticas distintas. Por una parte, el ratio 1:10 (THP-1:HepG2) contiene un 9% de células THP-1 diferenciadas a macrófagos proinflamatorios y representa el estado fisiológico del hígado. Por otra parte, el co-cultivo 1:5, en el cual el 17% de células son THP-1 diferenciadas a macrófagos, reproduce un estado intermedio de transición hacia el estado de inflamación. Este último es imitado co-cultivando las células a la proporción 1:2, de forma que se tiene la mitad de macrófagos M1 que de hepatocitos simulando el estado inflamatorio.

La validación del modelo se ha llevado a cabo estudiando la toxicidad inducida por dos fármacos conocidos por causar iDILI (la troglitazona y el trovafloxacin) y dos análogos que no producen iDILI (la rosiglitazona y el levofloxacin, respectivamente).

Pese al notable avance de la investigación en este ámbito, el principal interés del presente proyecto reside en el establecimiento de un co-cultivo bidimensional capaz de reproducir la fisiología hepática y desencadenar los mecanismos presentes en el iDILI. Se considera que, partiendo de un adecuado afianzamiento de los sistemas "base" bidimensionales, será posible el desarrollo e implementación de modelos 3D de mayor complejidad que representen de forma óptima el comportamiento hepático ante la presencia de un fármaco.

5. NORMATIVA

La normativa que engloba el presente trabajo es la recogida por el Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST), englobada dentro de la Normativa de Prevención de Riesgos Laborales. Concretamente, se ha asegurado el cumplimiento de las normas relacionadas con la manipulación de sustancias y residuos químicos y biológicos. Así mismo, el Instituto proporciona múltiples guías técnicas de prevención relacionadas con este ámbito que ha sido conveniente tener en cuenta.

- Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de Riesgos Laborales («BOE» núm. 269, de 10 de noviembre de 1995, páginas 32590 a 32611).
- Ley 33/2011, de 4 de octubre, General de Salud Pública («BOE» núm. 240, de 5 de octubre de 2011, páginas 104593 a 104626).
- Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo («BOE» núm. 104, de 1 de mayo de 2001, páginas 15893 a 15899).
- Real Decreto 39/1997, de 17 de enero, sobre el Reglamento de los Servicios de Prevención («BOE» número 27, de 31 de enero de 1997).
- Real Decreto 486/1997, de 14 de abril, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud en los lugares de trabajo («BOE» núm. 97, de 23/04/1997).
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo («BOE» núm. 124, de 24 de mayo de 1997, páginas 16100 a 16111).
- Real Decreto 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos («BOE» núm. 128, de 29/05/1993).
- Real Decreto 840/2015, de 21 de septiembre, por el que se aprueban medidas de control de los riesgos inherentes a los accidentes graves en los que intervengan sustancias peligrosas («BOE» núm. 251, de 20 de octubre de 2015, páginas 97531 a 97567).
- Real Decreto 952/1997, de 20 de junio, por el que se modifica el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, de 14 de mayo, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos, aprobado mediante Real Decreto 833/1988, de 20 de julio («BOE» núm. 160, de 5 de julio de 1997, páginas 20871 a 20880).
- UNE-CWA 16393:2014: Gestión del riesgo biológico en el laboratorio. Guía para la aplicación del CWA 15793:2008.
- UNE-ISO 35001:2021: Gestión del riesgo biológico en laboratorios y otras organizaciones relacionadas

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

En el proceso de realización de los cultivos celulares, se utilizaron medios de cultivo y complementos adquiridos mayoritariamente de GIBCO (Gibco BRL, Paisley, UK) y otras casas comerciales (*Tabla 4*).

TABLA 4. MATERIALES NECESARIOS PARA EL CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR HEPG2 Y LA LÍNEA MONOCÍTICA THP-1.

<i>Cultivo de la línea celular HepG2</i>	
Material	Referencia
Medio de cultivo F12	Gibco Ref 21765-029
Medio de cultivo L15	Gibco Ref 11415-049
L-Glutamina	Biochrom K0283
Suero Bovino Fetal (SBF)	LINU-8460
Glucosa	Sigma G7021
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma A4503
Bicarbonato Comercial	Grifols
Antibiótico Pen-Strep Penicillin y Streptomycin (P/S)	Gibco 15140-122
Tripsina	Gibco 0,25% Trypsin EDTA 1X
Tampón fosfato salino (PBS) 1X	Sigma Ref 806552
Línea celular HepG2	ATCC HB-8065
<i>Cultivo de la línea monocítica THP-1</i>	
Línea celular THP-1	ATCC TIB-202
Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Glutamax	Gibco Ref 12027599
Suero Bovino Fetal (SBF)	LINU-8460
Antibiótico Pen-Strep Penicillin y Streptomycin (P/S)	Gibco 15140-122

En cuanto al proceso para la diferenciación de las células THP-1 desde su fase de monocitos, a su estado de macrófagos M0 y posteriormente M1, se requirió de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma P8139-1MG), así como lipopolisacárido (LPS) (Sigma Ref L5293-2ML) e interferón (IFN- γ) (Peprotech Cat #300-02100UG).

En lo que concierne a los ensayos de caracterización, se empleó la inmunofluorescencia, para la cual se dispuso de paraformaldehído (PFA), PBS, Triton X100, BSA, polietilenglicol sorbitano monolaurato (Tween) (Sigma P1379) y la solución Hoechst (Thermo Scientific™ 62249), así como de los anticuerpos primarios y secundarios necesarios, dispuestos en la *Tabla 5*. Tras la realización del protocolo se adquirieron las imágenes mediante el microscopio Leica HMR del fabricante Leica Microsystems.

Para el análisis de la viabilidad celular se empleó el reactivo MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (Sigma M2128-1G), el cual se diluyó en PBS 1X hasta 5 mg/mL, así como dimetilsulfóxido (DMSO). Se utilizaron los fármacos trovafloxacino (TVX) (Sigma Ref. PZ0015-5MG), levofloxacino (LVX) (Sigma T2573-5MG), troglitazona (TGZ) (Sigma Ref. 40922-100MG) y rosiglitazona (RGZ) (Sigma Ref. R2408-10 MG), y el lector de placas Synergy H1 (BioTek) para la lectura de la absorbancia.

Por lo que respecta a las pruebas de urea, se realizaron empleando el protocolo comercial QuantiChrom™ Urea Assay Kit adquirido del fabricante Bioassays Systems y una placa de 96 pocillos proporcionada por el mismo. La incubación en este caso se hizo empleando medio DMEM sin rojo fenol (Gibco Ref. 21063-029). La prueba de albúmina se realizó mediante el protocolo ELISA utilizando el kit Human Albumin ELISA kit (BETHYL E88-129). Ambas pruebas requirieron del uso del lector de absorbancia Synergy H1 (BioTek).

Para la extracción de RNA se dispuso del RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Madrid, Spain) y se cuantificó en el espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 de Thermo Scientific. Para la posterior RT-PCR se utilizaron los reactivos M-MLV (Sigma Aldrich), RNase Out (Invitrogen), desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP's), el 5X buffer, el ditiotreitól (DTT), el primer oligo dT14 y H₂O destilada.

Por último, para la PCR se necesitaron los reactivos PCR SYBR Green Master (LightCycler® 480 SYBR® Green I Master 04887352001), el colorante QY amarillo, TE, el colorante XC azul (Xilene Cyanole) y los *primers* específicos para cada gen, los cuales se exponen en la *Tabla 7*. Se utilizó el termociclador LightCycler 480 Real-Time PCR System de la casa comercial Roche Applied Sciences para obtener los resultados.

6.2. Métodos

6.2.1. Cultivos celulares

Todos los procedimientos relacionados con el cultivo celular y el tratamiento de las células se desarrollaron en una cámara de flujo laminar, la cual asegura trabajar con las condiciones de esterilidad tanto de los materiales como de las células.

Cultivo HepG2

La línea celular HepG2 es una línea de células hepáticas inmortalizadas que crecen en monocapa, derivada a partir del tejido hepático de un hepatoma humano, la cual imita el comportamiento de los hepatocitos humanos.

Las células se almacenaron criopreservadas en el medio de congelación (SBF + 10% v/v DMSO) en nitrógeno líquido, y fueron proporcionadas por el fabricante en forma de crio-viales. Tras su descongelación, se cultivaron a una densidad de aproximadamente 1.500.000 células en su medio de cultivo. Dicho medio se preparó a partir de los medios comerciales F12 y L15 en proporción 1:1 v/v, al cual se le añadió L-Glutamina (concentración final 2,5 mM), 7% SBF, Glucosa (concentración 5 mM), BSA (concentración 2 mM), Bicarbonato (concentración final 12 mM) y el antibiótico P/S formado por 10000 U/mL Penicillin y 10000 µg/mL de Streptomycin. Las células se han mantenido en el incubador a 37°C y una concentración del 5% de CO₂.

El mantenimiento celular se realizó aproximadamente 2 veces a la semana. Para el subcultivo, el protocolo que se siguió consiste, en primer lugar, en la eliminación del medio de cultivo y en el posterior lavado de la monocapa con PBS para eliminar restos de medio y los restos celulares; en segundo lugar, se añade la enzima Tripsina y se incuba a 37°C entre 2 y 3 minutos, periodo de tiempo durante el cual se rompen los enlaces de las células sobre la superficie del frasco. En tercer lugar, se recogen las células en medio de cultivo completo de las HepG2 y se centrifuga durante 3 min a la velocidad de 1500 rpm. Se retira el sobrenadante y el pellet obtenido es resuspendido en medio de cultivo completo de las HepG2.

La concentración celular presente en dicho volumen se calculó haciendo uso de la Cámara de Neubauer, sobre la cual se introdujeron por capilaridad 10 µL de la suspensión celular obtenida en el espacio entre la cámara y el cubreobjetos, y se realizó el conteo utilizando el Microscopio Óptico. La fórmula que ha sido empleada para realizar el conteo viene dada por la *Ecuación 1*, la cual permite calcular la cantidad de células presentes en cada mL. De esta manera ha sido posible determinar el volumen de suspensión necesario que debe ser sembrado para lograr la densidad celular deseada.

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

ECUACIÓN 1. FÓRMULA PARA CALCULAR LA CONCENTRACIÓN CELULAR MEDIANTE LA CÁMARA DE NEUBAUER.

Cultivo THP-1

A diferencia de las anteriores, que crecen formando una monocapa adherida al frasco, las células THP-1 fueron cultivadas en suspensión en el interior de un frasco vertical, con el medio comercial RPMI Glutamax suplementado con un 10% de SBF y el antibiótico P/S formado por 10000 U/mL Penicillin y 10000 µg/mL de Streptomycin y se mantuvieron en la incubadora a 37 °C con una concentración de CO₂ del 5%. Para mantener su viabilidad fue necesario realizar un subcultivo a la semana, así como añadir medio de cultivo dos veces por semana.

Dicho subcultivo se realizó centrifugando la suspensión de células a 1500 rpm durante 3 minutos. Pasado este tiempo, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en el medio de cultivo. La concentración celular en el subcultivo se pudo conocer a través de la *Ecuación 1* haciendo uso de la Cámara de Neubauer.

Diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos M1

Inicialmente, las células THP-1 no diferenciadas presentaban un fenotipo monocítico. Por dicha razón, fue necesaria su diferenciación a un fenotipo equiparable al de los macrófagos. Para ello, se

empleó el protocolo que fue puesto a punto en el trabajo de fin de grado realizado por Colomer Merino, L. (2022) y que consiste la siembra en una placa de 12 pocillos de una suspensión de células THP-1 a la densidad celular de 150.000 células/pocillo, con su medio de cultivo y 20 ng/mL de PMA, el cual hace posible la diferenciación de las células monocíticas al fenotipo de macrófago M0, es decir, macrófagos inactivos, con una morfología estrellada y adheridos a la base del pocillo. Dicho tratamiento se mantiene 72 horas. Pasado este tiempo, se sustituye el medio de cultivo de la línea monocítica THP-1 con PMA por el medio de cultivo de macrófagos estimulador de M1, preparado añadiendo al medio de cultivo estándar de THP-1 la endotoxina LPS (1 µg/mL) y la citoquina IFN-γ (20 ng/mL), y se mantiene durante 24 horas. De esta manera, los M0 fueron activados a macrófagos proinflamatorios M1 cuya morfología es más estrellada.

Con el objetivo de realizar el seguimiento temporal de los macrófagos M1 para comprobar si se mantenía su diferenciación durante el tiempo de experimentación, se sembraron dichas células especializadas bajo tres condiciones diferentes durante 48 horas: (1) la primera con el medio de cultivo de las células THP-1, es decir, RPMI Glutamax suplementado con SBF y P/S; (2) la segunda condición consistió en el cultivo de las células M1 con el medio previamente mencionado pero además estimulado con 1µg/mL de LPS; (3) y finalmente una tercera condición en la cual se empleó el medio inicial estimulado con 1µg/mL de LPS y 20 ng/mL de IFN-γ. Con ello se pretendía estudiar si el mantenimiento del LPS e IFN-γ en el medio de las THP-1 evitaba la desdiferenciación de las células con fenotipo M1 durante un periodo de tiempo adecuado para realizar los posteriores experimentos con co-cultivos. Se caracterizaron mediante PCR, MTT e inmunofluorescencia tomando como referencia las células THP-1 diferenciadas a macrófagos M0. En la *Figura 5* se ha esquematizado el proceso seguido.

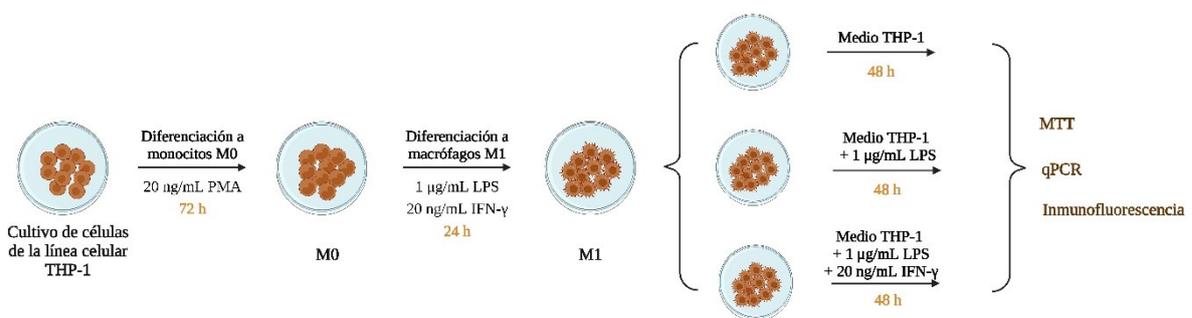


FIGURA 5. ESQUEMA DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS THP-1 A MONOCITOS M0 Y MACRÓFAGOS M1. EXPERIMENTO PARA LA COMPROBACIÓN DE LA DESDIFERENCIACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS M1. FUENTE PROPIA CREADA MEDIANTE BIORENDER.

Co-cultivos

Los co-cultivos se efectuaron empleando células de tipo HepG2 y macrófagos M1 obtenidos a partir de la diferenciación de las células THP-1, siguiendo el protocolo explicado anteriormente para dicho fin.

Se utilizaron diferentes ratios de HepG2 y THP-1 para mimetizar diferentes condiciones. En primer lugar, se sembraron las células THP-1 en diferentes placas de 12 pocillos cada una con la densidad correspondientes a cada proporción celular, siendo el total de células del co-cultivo de 150.000

células/pocillo, y se diferenciaron al fenotipo de macrófago M1, siguiendo el protocolo expuesto para el cultivo de dicho tipo celular y su diferenciación. En segundo lugar, una vez transcurrido el tiempo de diferenciación, se sembraron las células HepG2 sobre los macrófagos ya adheridos a los pocillos en la densidad apropiada para cada uno de ellos. El medio utilizado consistió en la mezcla 1:1 v/v de los medios de ambos tipos celulares, teniendo en cuenta, en base a los resultados obtenidos en el primer experimento, que en el medio de cultivo de los macrófagos era necesario mantener el estímulo pro-inflamatorio a través de la adición de $1\mu\text{g/mL}$ de LPS y 20 ng/mL de IFN- γ . Finalmente, se requirieron 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO_2 para asegurar la correcta estabilización del co-cultivo.

Asimismo, se realizaron dos cultivos de control: uno de ellos sembrando únicamente hepatocitos, y el otro solamente con células THP-1 diferenciadas a macrófagos M1, utilizando en ambos casos el mismo medio de cultivo que para los co-cultivos.

El proceso de elaboración de los co-cultivos se ha esquematizado en la *Figura 6*.

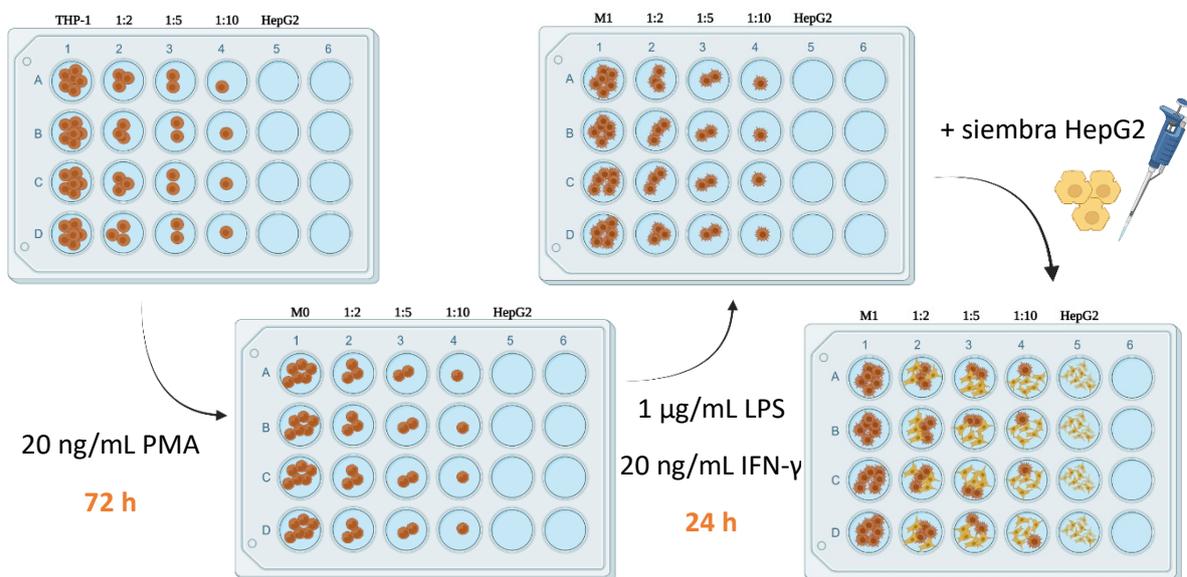


FIGURA 6. PROCESO SEGUIDO EN LA ELABORACIÓN DE LOS CO-CULTIVOS. FUENTE PROPIA CREADA MEDIANTE BIORENDER.

Las muestras obtenidas de los cultivos, una vez establecidos, se caracterizaron mediante pruebas de viabilidad y funcionalidad celular, las cuales serán explicadas a continuación.

6.2.2. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se fundamenta en el marcaje de determinadas moléculas de interés mediante anticuerpos a través de un microscopio de fluorescencia.

Las células se sembraron previamente en placas de 12 pocillos a la densidad de 150.000 células/pocillo. Se utilizaron los anticuerpos específicos descritos en la *Tabla 5*.

TABLA 5. ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS UTILIZADOS EN EL PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA.

Tipo celular	Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
HepG2	Albúmina	<i>Goat anti-Human Albumin</i> (A80-229A, Bethyl)	<i>Alexa fluor 488 donkey anti-Goat</i> (A11055, Invitrogen)
THP-1	CD68 (marcador de membrana)	<i>Recombinant anti-CD68 mouse antibody</i> (AB233172, ABCAM)	<i>Alexa fluor 594 donkey anti-mouse</i> (R37115, Invitrogen)
	CD163 (marcador de membrana)	<i>Recombinant Alexa anti-CD163 rabbit antibody</i> (AB218293, ABCAM)	<i>Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit IgG</i> (A21206, Invitrogen)

El protocolo que se utilizó consta de cinco fases. La fijación es la primera, que permite detener el metabolismo celular, y se realiza lavando, primeramente, los pocillos con PBS 1X tras haber aspirado el medio de cultivo; a continuación, se añade PFA al 4% diluido en PBS 1X en el interior de una campana de extracción y se deja incubar durante 20 minutos; para posteriormente retirarlo y lavar tres veces con PBS 1X. La placa se puede almacenar a 4°C cubierta con PBS 1X.

En segundo lugar, se aspira el PBS 1X y se lleva a cabo la permeabilización de la membrana, mediante la incubación de la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos con Tritón X100 al 0,5% en PBS. Seguidamente, se lava tres veces con PBS 1X y se procede a la etapa de bloqueo, que consiste en la incubación de la placa con PBS/BSA 3% durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación, se añaden los anticuerpos primarios diluidos en PBS/BSA 1% a una dilución 1:200, se incuba la placa *over night* en agitación a 4°C, y posteriormente se realizan tres lavados con PBS/BSA 1%-Tween 1%. En la última etapa se incorporan los anticuerpos secundarios conjugados a las moléculas fluorescentes en PBS/BSA 1% y se incuba la placa durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se retiran los anticuerpos secundarios, se realiza un lavado con PBS/BSA 1% con Hoechst (1:500) y dos lavados con PBS/BSA 1% con Tween 0,1%, y se cubren los pocillos con PBS 1X. Las imágenes se adquirieron por medio del microscopio de fluorescencia Leica HMR.

6.2.3. Cuantificación de albúmina

La cuantificación de albúmina se realizó en los medios de cultivo de las diferentes condiciones de estudio tras 24 horas de cultivo.

Se utilizó el Kit Human Albumin ELISA, que se basa en la unión de la albúmina humana a un anticuerpo específico previamente pre-adsorbido a la superficie de los pocillos de la placa de 96 pocillos, sobre el cual se añade un anticuerpo de detección que se vincula a la albúmina capturada en la muestra. A continuación, se produce una reacción colorimétrica con el substrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbencidina catalizada por la enzima *streptavidin-conjugated horseradish peroxidase*, que da lugar a un producto azul que se transforma a amarillo cuando se le añade ácido sulfúrico, cuya absorbancia se mide mediante el lector de placas.

Las muestras adquirieron finalmente una coloración amarilla cuya absorbancia fue medida a la longitud de onda de 450 nm mediante el lector de placas Synergy H1.

La concentración de albúmina de cada muestra fue cuantificada posteriormente interpolando los valores obtenidos a la curva patrón generada durante el proceso, teniendo en cuenta que los valores de absorbancia duplicados no debían diferir en más de un 10%. Por último, los datos de albúmina obtenidos en unidades de masa obtenidos fueron normalizados con respecto a la cantidad de RNA de cada muestra.

6.2.4. Capacidad ureogénica

Para medir la capacidad ureogénica de los cultivos, se utilizó el kit de urea de BioAssays Systems, que permite medir la urea directamente de las muestras biológicas. Para ello, emplea un reactivo cromogénico que se une específicamente a la urea, y cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de dicha sustancia en la muestra.

Las muestras a valorar se sembraron en placas de 12 pocillos a 150.000 células/pocillo y se incubaron, una vez establecido el co-cultivo, con 500 μ L de medio de cultivo DMEM sin rojo fenol, para que este componente no generase interferencias. Se realizó una primera incubación durante 30 minutos y pasado este tiempo se tomó una primera muestra de 100 μ L, correspondiente al tiempo 0 (t_0). A continuación, se incubó durante 5 horas más, y posteriormente se obtuvo otra muestra de los 400 μ L restantes, el tiempo t_5 .

El protocolo seguido fue el proporcionado por el fabricante, pero adaptado por el laboratorio. En primer lugar, se preparó la curva patrón, diluyendo el *Standard* proporcionado en H₂O destilada el patrón facilitado por el Kit, obteniendo una concentración resultante de 0,1 mg/mL. Esta se pipeteó por duplicado en una placa de 96 pocillos siguiendo la distribución de volúmenes indicada en la *Tabla 6*.

TABLA 6. VOLÚMENES DE PATRÓN Y H₂O UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN.

Volumen (μL) de <i>Standard</i> de 50 mg/mL	0	3	6	12	18	24
Agua destilada (μL)	30	27	24	18	12	6

En segundo lugar, se descongelaron las muestras y fueron centrifugadas durante 3 minutos a 8000 rpm.

En tercer lugar, se pipetearon en puntos dobles 30 μ L del sobrenadante, y el mismo volumen en otros dos pocillos de medio de incubación para determinar el blanco.

Se continuó el protocolo según las instrucciones de la casa comercial y finalmente se midió la absorbancia de cada pocillo a la longitud de onda de 520 nm haciendo uso del lector Synergy H1.

Mediante los valores de absorbancia obtenidos se aproximó la cantidad de urea secretada por cada muestra, a partir de la ecuación de la recta patrón obtenida por el ajuste lineal de los valores de absorbancia de los pocillos de patrón. Finalmente, se normalizó dicha cantidad de urea producida por cada muestra respecto a la cantidad de RNA presente en ésta.

6.2.5. qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) fue empleada para la caracterización de la transcriptómica de las muestras tanto de los monocultivos con las células THP-1 diferenciadas a macrófagos M1, como de los monocultivos de HepG2 y los co-cultivos establecidos no tratados con fármaco y tratados durante 24 horas con 25 μ M de TVX y LVX, y con 100 μ M de TGZ y RGZ.

La extracción del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) se realizó con el Kit RNeasy Plus del fabricante Qiagen, y el protocolo proporcionado por el mismo. Las muestras fueron lisadas previamente mediante el Buffer de lisis RLT. De manera resumida, el procedimiento consta de una serie de lavados con los Buffers incluidos en el Kit y centrifugados. Finalizado el protocolo, se cuantificó el RNA adquirido utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 de Thermo Scientific.

A continuación, se retrotranscribió el RNA con el objetivo de obtener ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA), empleando el protocolo para la RT elaborado por el Laboratorio. Se tomó de referencia o blanco la muestra de la que mayor cantidad de RNA se disponía. Primeramente, se pipeteó 1 μ g de RNA en 10 μ L de H₂O, tanto de las muestras como del blanco. Seguidamente, se preparó un tubo Eppendorf de *pool* con los reactivos necesarios para todas las reacciones, excepto las enzimas, tal que para cada reacción:

- 5,25 μ L H₂O
- 3,75 μ L dNTP's a la concentración de 4 mM
- 6 μ L de 5X buffer
- 3 μ L de DTT a la concentración de 0,1 M
- 0,75 μ L del primer oligo dT14 a la concentración de 120 μ M

Tras mezclarlo, se incorporaron 18,75 μ L del *pool* y 1,25 μ L de H₂O al tubo Eppendorf que contenía el blanco. Posteriormente, las enzimas requeridas para el total de reacciones fueron añadidas al *pool*, es decir, para cada reacción:

- 1 μ L de M-MLV a la concentración de 200 unidades/ μ L
- 0,25 μ L de RNasaOUT a la concentración de 20 unidades/ μ L

Se incorporaron 20 μ L de *pool* a cada tubo de muestra.

A continuación, cada muestra se incubó durante 60 minutos a 42°C y tras ello, 15 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

Por último, el cDNA se diluyó a la proporción 1/30 en TE 0,1X con 2X del colorante QY amarillo y se procedió a la realización del protocolo de la qPCR. El protocolo utilizado fue proporcionado por el laboratorio y consistió en, inicialmente, la preparación de un tubo Eppendorf con los reactivos necesarios para cada gen, tal que para cada reacción se necesitaron:

- 2,5 μ L de DNA 1/30
- 1,6 μ L de H₂O
- 0,8 μ L de *Primer Forward* a la concentración de 6 mM
- 0,8 μ L de *Primer Reverse* a la concentración de 6 mM

Las secuencias de *primers* específicas utilizadas para la detección de cada gen se exponen en la *Tabla 7*.

A continuación, se pipetearon 2,5 µL de DNA de cada muestra en una placa de 384 pocillos, se incorporaron en cada *pool* 3,6 µL/reacción de DNA master SYBR GREEN (2x) y 0,2 µL/reacción de colorante XC azul previamente diluido 1/20 en SYBR, y se pipetearon 7 µL de cada *pool* en los pocillos correspondientes. Tras ello, se selló la placa y se centrifugó durante 2 minutos a 2500 rpm.

Finalmente, se hizo uso del termociclador para amplificar el cDNA y realizar la recogida de datos.

TABLA 7. CEBADORES UTILIZADOS EN LA qPCR.

Gen	Primer Forward (5' → 3')	Primer Reverse (3' → 5')
PBGD	CGGAAGAAAACAGCCCAAAGA	TGAAGCCAGGAGGAAGC CAGT
TBP	AAAATGGTGTGCACAGGAGCC	CACATCACAGCTCCCCACCAT
ACTIN	CGTACCACTGGCATCGTGAT	GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG
RPLP0	TGGTCATCCAGCAGGTGTTCTGA	ACAGACACTGGCAACATTGCCGG
ALBUMIN	CACAGAATCCTTGGTGAACAGG	TGCGAAATCATCCATAACAGC
HNF4	GCCTACCTCAAAGCCATCAT	GACCCTCCCAGCAGCATCTC
AFP	GCTTGGTGGTGGATGAAACA	TCCTCTGTTATTTGTGGCTTTTG
TNFα	GCAACAAGACCACCACTTCG	GATCAAAGCTGTAGGCCCCA
IL-1β	GCAGAAGTACCTGAGCTCGC	TCCATGGCCACAACAACCTGA
CXCL10	GCTTCCAAGGATGGACCACA	GCAGGGTCAGAACATCCACT
CD206	CGTTCCTTTGGACGGATGGA	CCTCGTTTACTGTGCGCAGGT
CYP1A2	CCTTCGCTACCTGCCTAACC	CTCTAGGCCCTTCTTGCTG
CYP3A5	CTCCTCTATCTATATGGGACCCG	TGACCTTCATACGTTCCCCAC
UGT1A1	TGCGACGTGGTTTATCCCC	AGGCTTCAAATTCCTGGGATAGTG
UGT2B7	AGGAGCTAAACACCTTCGGG	TGCTGGAATAAACTGAAGTAGTCTC
GSTT1	ACGGGGACTTCACCTTGAC	GTACTIONTCCACACGGGCAC
GSTT2	CGACGCTCAAGGATGGTGA	CTCCTCCAGGGCCATGAGAT
CHOP	ATGAACGGCTCAAGCAGGAA	GGGAAAGGTGGGTAGTGTGG

ATF6	GTATCAGGAACTCAGGGAGTG	GCAGGTGATCCCTTCGAAAT
ATF4	GAAGCGATTTAACGAGCGCC	ATCTTGGTTCCTGCCACGTT
CAT	TCAGGTGCGGGCATTCTATG	TGATGAGCGGGTTACACGGA
SOD1	ACAAAGATGGTGTGGCCGAT	CGACTTCCAGCGTTTCCTGT
SOD2	CTCAGGTTGGGGTTGGCTTG	TGCTCCCACACATCAATCCC
NFE2L2	GCGACGGAAAGAGTATGAGC	TACAAACGGGAATGTCTGCG
GCLC	TCAATGGGAAGGAAGGTGTGT	TGGTTTGCATAAACTCCCTCA
GCLM	AATCTGCCTCCTGCTGTGTG	ACTCGTGCGCTTGAATGTCAG

El análisis de los resultados de la PCR se llevó a cabo por medio del método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Este permite cuantificar la expresión génica a partir del umbral de ciclos (CT) obtenido en el lector de placas, que es el número de ciclos a partir del cual la señal fluorescente es detectada y, por tanto, el número de ciclos a partir del cual se identifica la amplificación del gen.

6.2.6. Ensayo de viabilidad MTT

La prueba MTT se realizó, en primer lugar, para comprobar el efecto sobre la viabilidad celular tanto del protocolo de diferenciación de células THP-1 a macrófagos M1 como de los co-cultivos realizados con estas células junto con HepG2; así como para el análisis de la hepatotoxicidad provocada por fármacos sobre los co-cultivos propuestos, con el objetivo de evaluar la funcionalidad del modelo *in vitro* planteado.

Los medicamentos seleccionados para la valoración de la hepatotoxicidad fueron el TVX, el LVX, la TGZ y la RGZ.

Se preparó una solución madre de cada fármaco disolviéndolo en DMSO y se realizaron las diluciones seriadas a las concentraciones descritas en la *Tabla 8* para evitar la toxicidad debida al DMSO, rango que ha sido previamente descrito en la literatura para estudiar el efecto hepatotóxico de dichos fármacos.

TABLA 8. INFORMACIÓN DETALLADA DE LOS FÁRMACOS DE REFERENCIA UTILIZADOS EN EL ESTUDIO (GRANITZNY Y OTROS, 2017).

Fármaco	Clase de fármaco	iDILI/no-iDILI	Concentración stock (mM) a 200x	Concentraciones testadas (μM)
TVX	Fluoroquinolonas	iDILI (no a la venta)	160	800-750-500-250-125-75-50-25
LVX		No-iDILI	200	800-750-500-250-125-75-50-25

TGZ	Tiazolidinedionas	iDILI (no a la venta)	100	250-225-200-175-150-100-75-50
RGZ		No-iDILI	100	250-225-200-175-150-100-75-50

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, a la densidad de 15.000 células/pocillo, y pasadas 24 horas desde su siembra fueron tratadas con el fármaco diluido en DMSO, tomando un conjunto de muestras como control a las cuales solamente se les incorporó DMSO. Pasadas 24 horas de incubación a 37°C, se llevó a cabo el ensayo MTT para analizar la viabilidad celular.

El ensayo se fundamenta en la reacción de reducción de la sal de tetrazolio (MTT) soluble y amarilla, en el precipitado insoluble de color azul intenso llamado formazán. Dicha reacción tiene lugar en el interior celular y es ejecutada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa.

El protocolo fue proporcionado por el laboratorio, y requirió de la preparación del reactivo MTT como una solución stock a la concentración de 5 mg/mL en PBS, que se esterilizó por filtración y fue almacenado a 4°C en una botella de vidrio opaco. Tras ello, la solución stock se diluyó a la proporción 1:10 con el medio de cultivo correspondiente a 37°C.

Los cultivos previamente tratados con el fármaco fueron lavados con 100 µL de PBS 1X a 37°C. A continuación, se pipetearon 100 µL a cada pocillo de la dilución del reactivo MTT con el medio de cultivo y se incubó la placa entre 2 y 3 horas a 37°C.

Posteriormente, se aspiró el medio de la placa y se incorporaron 100 µL de DMSO a cada pocillo, para resuspender el formazán. La placa se incubó 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y finalmente se realizó la lectura de la absorbancia a la longitud de onda de 550 nm haciendo uso del lector de placas Synergy H1.

En el caso del estudio de la viabilidad celular en el proceso de activación de las células THP-1 y en el establecimiento de los co-cultivos, el protocolo seguido fue el mismo, pero en dicho caso los cultivos no fueron tratados previamente con fármacos.

Los datos obtenidos fueron procesados y convertidos en porcentajes referidos al control de cada placa, es decir, los pocillos de células que no tratadas con el fármaco y que solamente contenían DMSO.

6.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las diferentes pruebas fueron estudiados e interpretados haciendo uso del análisis ANOVA *One-way* y *Two-way*, considerando como cierta la hipótesis de homocedasticidad. El intervalo de confianza utilizado fue del 95% y se llevó a cabo por medio del Software GraphPad Prism 8.0.2. Conjuntamente con dicho análisis, se realizó la prueba de Tukey como post-test, que permite identificar los subconjuntos de datos con diferencias estadísticamente significativas. También se utilizó el test de Dunnett para realizar comparaciones múltiples. Dichas diferencias han sido representadas mediante el símbolo “*” (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001).

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización del proceso de diferenciación a macrófagos M1

El primer objetivo del presente proyecto consistió en el establecimiento de las condiciones apropiadas para el mantenimiento de las células THP-1 diferenciadas a macrófagos proinflamatorios, es decir, de fenotipo M1, durante el tiempo de experimentación. Para ello, en primer lugar, posteriormente al tratamiento de las THP-1 con 20 ng/mL de PMA, se realizaron inmunofluorescencias pasadas 24 horas, en diferentes condiciones. En segundo lugar, tras 48 horas en esas mismas condiciones, se llevó a cabo la qPCR para estudiar la expresión genética y la MTT para analizar la viabilidad celular pasado el periodo de tiempo de experimentación. La *Figura 7* ilustra la cronología seguida.

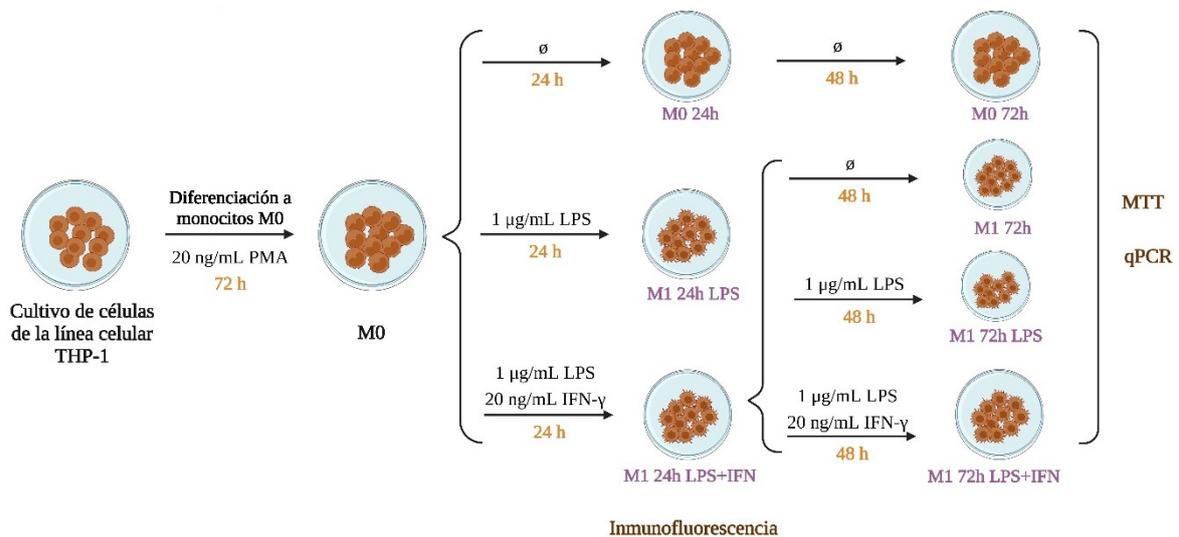


FIGURA 7. CRONOLOGÍA SEGUIDA PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS THP-1 DIFERENCIADAS A MACRÓFAGOS M1. EN COLOR MORADO SE EXPONEN LAS MUESTRAS QUE SE HAN ANALIZADO POSTERIORMENTE MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA, qPCR Y MTT. ELABORACIÓN PROPIA MEDIANTE BIOENDER.

El análisis de la expresión mediante inmunofluorescencia permitió valorar la expresión de marcadores de macrófagos (CD68 y CD163) en las diferentes condiciones analizadas (*Figura 8*).

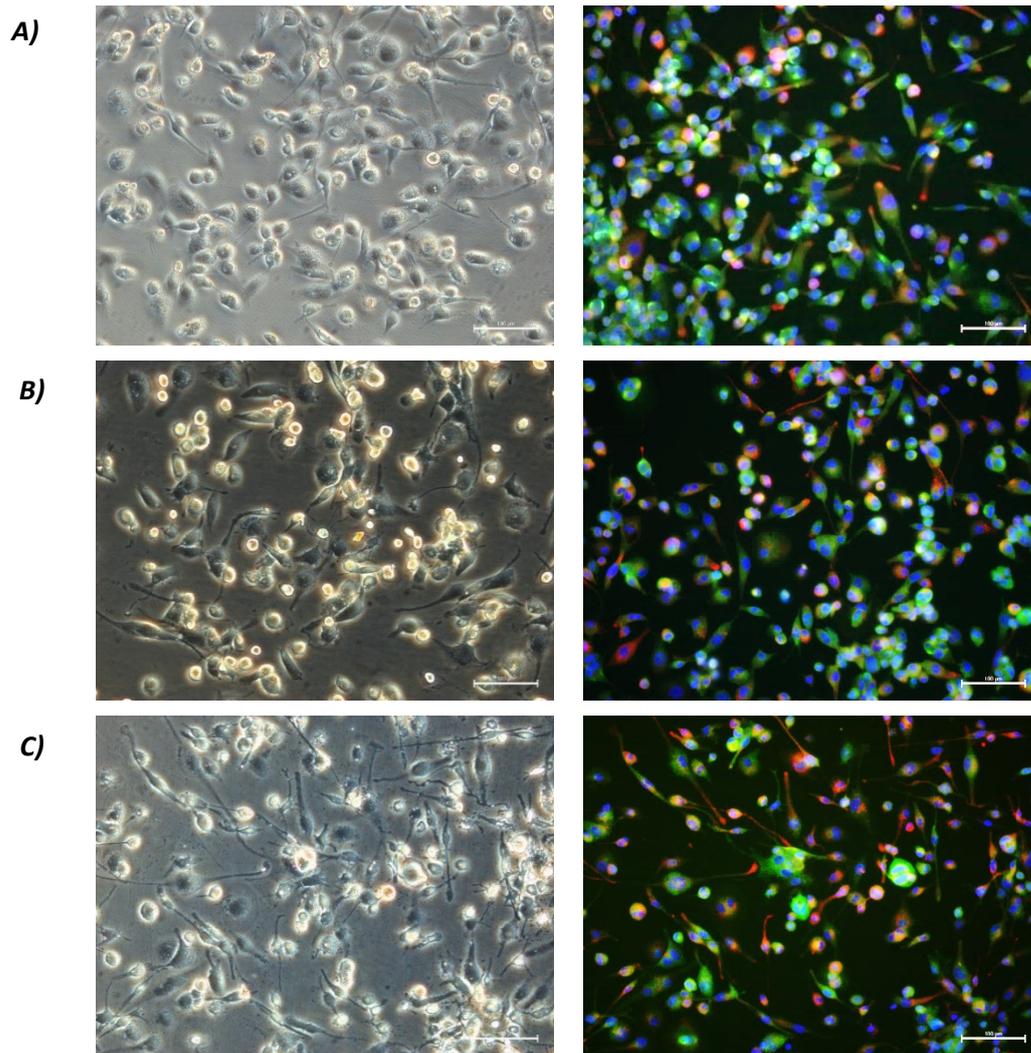


FIGURA 8. IMÁGENES DE INMUNOFLUORESCENCIA OBTENIDAS DURANTE EL PROCESO DE ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS THP-1 A MACRÓFAGOS DE FENOTIPO M1. EL MARCADOR CD68 APARECE EN COLOR ROJO, MIENTRAS QUE EL MARCAJE VERDE SE CORRESPONDE CON EL CD163 Y EL AZUL IDENTIFICA LOS NÚCLEOS CELULARES. A) CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON PMA DURANTE 72 HORAS Y NO TRATADAS DURANTE LAS 24 HORAS SIGUIENTES. B) CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON PMA DURANTE 72 HORAS Y CON LPS LAS 24 HORAS SIGUIENTES. C) CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON PMA DURANTE 72 HORAS Y CON LPS E IFN- γ LAS 24 HORAS SIGUIENTES. LA BARRA DE ESCALA REPRESENTA UNA DIMENSIÓN DE 100 μ M EN TODAS LAS IMÁGENES.

Se observó que el tratamiento de las células THP-1 con PMA, hace que las células se adhieran al fondo del pocillo y alcancen una morfología estrellada característica de los macrófagos M1. Este hecho se magnificaba cuando se mantenía el estímulo de LPS o LPS junto con la citoquina IFN- γ (Figura 8, B y C). Por lo que respecta a los marcadores de los macrófagos, se observó que estos se expresaban de manera homogénea en las tres condiciones.

Pasadas 48 horas desde la diferenciación de las células THP-1 al fenotipo de macrófago M1, bajo diferentes condiciones de tratamiento (Figura 9), se realizó el análisis de la expresión de genes característicos de macrófagos. Estos genes fueron el *CXCL10*, *TNF- α* y *IL-1 β* para el fenotipo M1, y *CD206* para el fenotipo M0, y se emplearon como *Housekeeping* los genes *PBGD*, *Actina* y *TBP* para realizar la normalización de su expresión.

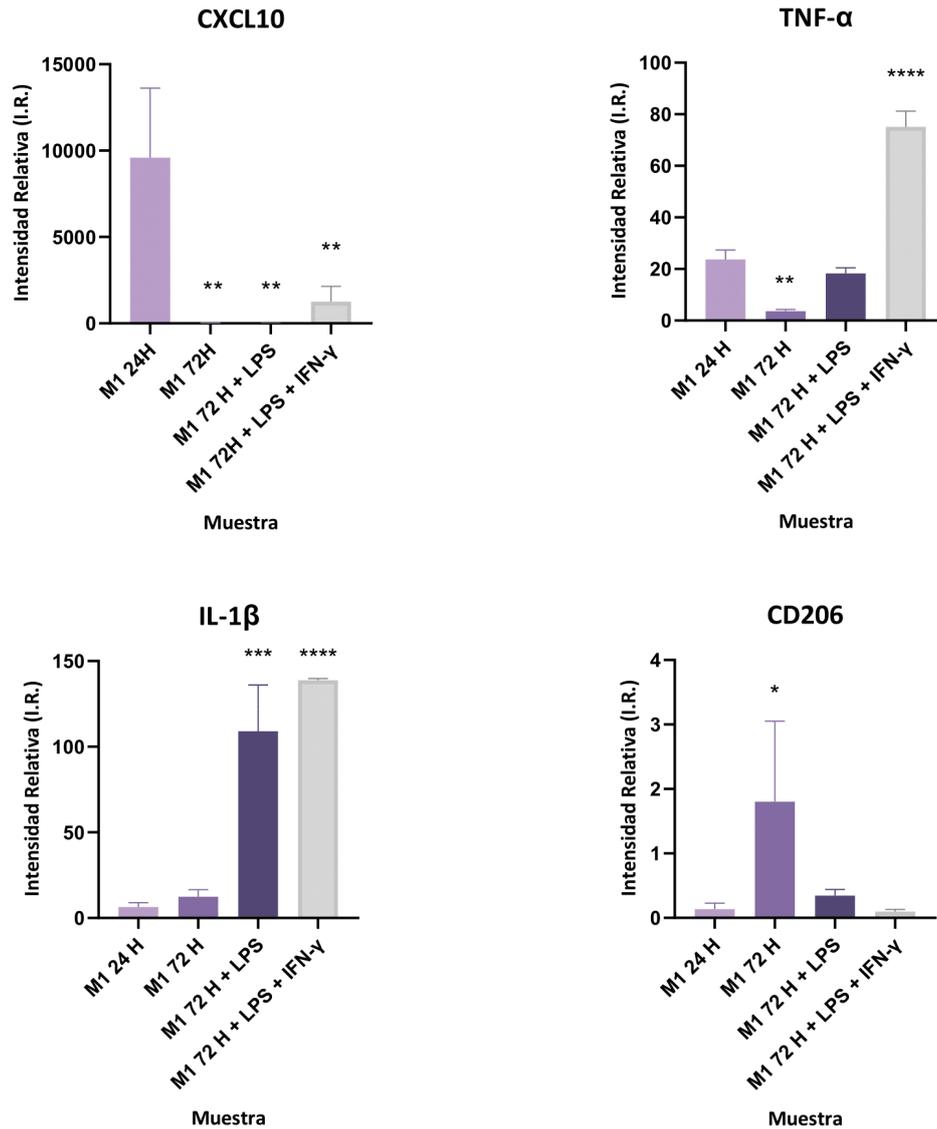


FIGURA 9. EXPRESIÓN DE LOS GENES CARACTERÍSTICOS *CXCL10*, *TNF-α*, *IL-1β* Y *CD206* EN MUESTRAS DE CÉLULAS THP-1 DIFERENCIADAS A MACRÓFAGOS M1, PASADAS 72 HORAS SIN ESTIMULACIÓN (M1 72 H), CON ESTIMULACIÓN DE 1 μG/ML DE LPS (M1 72H + LPS) Y CON 1 μG/ML DE LPS Y 20 NG/ML DE IFN-γ (M1 72H + LPS + IFN- γ). SE REPRESENTA LA INTENSIDAD RELATIVA (I.R.) CON RESPECTO A LA EXPRESIÓN DE LOS MISMOS EN LOS MACRÓFAGOS DE FENOTIPO M0, NO ACTIVADOS A M1. SE HA INDICADO CON * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=3, TEST *ONE-WAY* ANOVA JUNTO CON EL POST-TEST *TUKEY*) RESPECTO LOS MACRÓFAGOS M1 TRAS 24 HORAS SIN EXPOSICIÓN A LPS NI IFN-γ.

Tanto la expresión de los genes *IL-1β* como *TNF-α* se vio incrementada a las 72 horas de tratamiento del cultivo de las THP-1 con LPS e IFN-γ respecto a los macrófagos M1 sin este estímulo, siendo estadísticamente significativa dicha diferencia cuando fue estimulado con LPS e IFN-γ a la vez ($p < 0,0001$). En cambio, la expresión del gen *CXCL10* disminuyó significativamente bajo las mismas condiciones para todas las muestras en comparación con los macrófagos M1 activados a las 24 horas. Cabe destacar que sí se expresó en los macrófagos estimulados con LPS e IFN-γ durante 72 horas, pero no cuando se analizó en las otras dos condiciones. Mientras que en el caso del gen *CD206*, se observó un aumento significativo en su expresión cuando el cultivo no fue estimulado con LPS ni IFN-γ ($p = 0,0469$), y apenas se expresó en caso contrario.

Por último, se estudió el efecto de la estimulación con la endotoxina LPS y la citoquina IFN- γ de las células HepG2 y THP-1 diferenciadas a macrófagos M1, ambas en monocultivo, sobre la viabilidad celular con el fin de determinar si esta se ve comprometida bajo dichas condiciones (*Figura 10*). A través del Test *One-way* ANOVA, y en un intervalo de confianza del 95%, utilizando conjuntamente la prueba post-hoc de Tukey, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

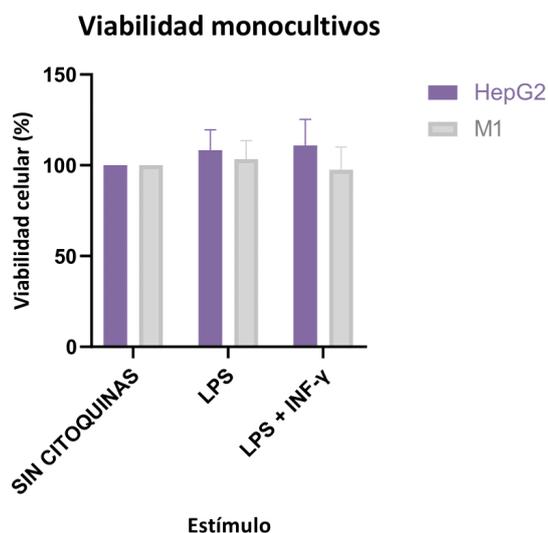


FIGURA 10. ENSAYO MTT REALIZADO SOBRE MONOCULTIVOS DE HEPG2 Y M1 TRATADOS CON 1 μ G/ML DE LPS Y 20 NG/ML DE IFN- γ . NO SE HAN IDENTIFICADO DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DE LOS CULTIVOS TRATADOS CON RESPECTO A LOS NO TRATADOS (N=5, TEST *TWO-WAY* ANOVA, POST-TEST TUKEY).

7.2. Co-cultivos HepG2 con células THP-1 diferenciadas a macrófagos M1

7.2.1. Caracterización del co-cultivo

Analizada la viabilidad y mantenimiento de los macrófagos diferenciados a fenotipo M1 a partir de las células THP-1 por medio del tratamiento con LPS e IFN- γ , se realizaron los co-cultivos de dichas células con HepG2. Estos se llevaron a cabo utilizando las tres proporciones celulares propuestas. 24 horas después de la siembra de las células HepG2 sobre los macrófagos M1, se llevaron a cabo análisis de viabilidad, morfológicos y de expresión génica, para determinar su correcto establecimiento, por medio de la MTT, la inmunofluorescencia y la qPCR, respectivamente.

En primer lugar, el estudio de la viabilidad demostró que no había diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de los diferentes co-cultivos tratados con LPS e IFN- γ respecto a los no tratados (*Figura 11*), por lo que se decidió que era posible mantener el estímulo pro-inflamatorio para tener macrófagos polarizados M1 sin afectar a las células HepG2.

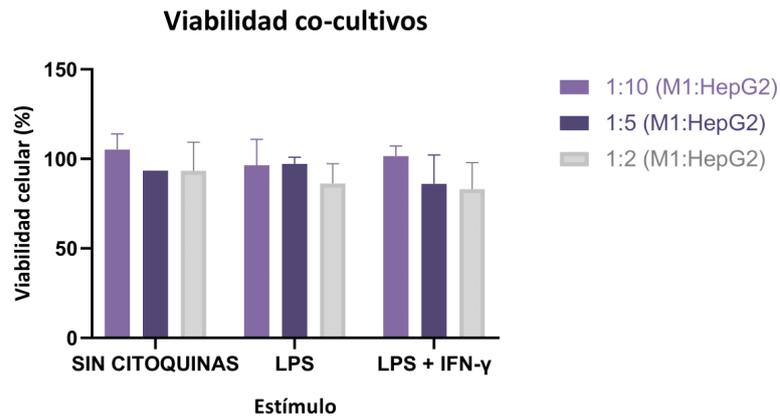


FIGURA 11. VIABILIDAD DE LOS CO-CULTIVOS, PASADAS 24 HORAS DE ESTIMULARLAS CON LPS O LPS+IFN- γ DESDE LA SIEMBRA DE LOS HEPG2, A LAS TRES PROPORCIONES CELULARES PREVIAMENTE DESCRITAS. NO SE HAN IDENTIFICADO DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DE LOS CULTIVOS ESTIMULADOS CON CITOQUINAS RESPECTO A LOS NO ESTIMULADOS (N=5, TEST TWO-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY).

En segundo lugar, en los estudios de inmunofluorescencia se observó un aumento del marcaje CD68 en rojo, a medida que aumentaba la proporción de macrófagos en el co-cultivo, y una disminución en el marcaje de Albúmina, que identifica las células HepG2 (Figura 12).

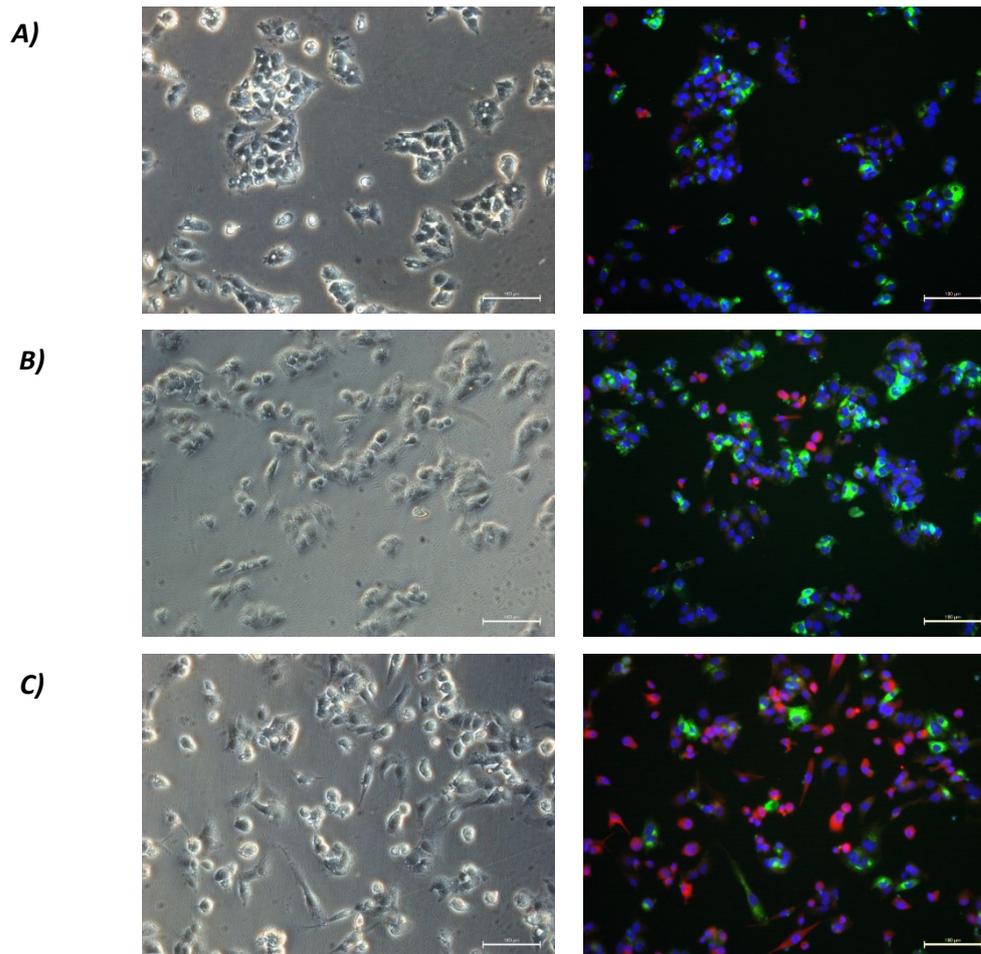


FIGURA 12. IMÁGENES DE INMUNOFLUORESCENCIA REALIZADAS SOBRE LOS CO-CULTIVOS A LAS PROPORCIONES DE: A) 1:10 (M1:HEPG2), B) 1:5 (M1:HEPG2), Y C) 1:2 (M1:HEPG2). LA ALBÚMINA SE EXPRESA EN LAS CÉLULAS HEPG2 EN COLOR VERDE, MIENTRAS QUE EL MARCADOR CD68 APARECE EN ROJO E IDENTIFICA LOS MACRÓFAGOS. EL COLOR AZUL TIÑE LOS NÚCLEOS CELULARES. LA BARRA DE ESCALA REPRESENTA UNA DIMENSIÓN DE 100 μ m EN TODAS LAS IMÁGENES.

En tercer lugar, en el análisis de la expresión génica se estudiaron 4 grupos de genes:

- Marcadores génicos de hepatocitos: albúmina (*ALB*), alfafetoproteína (*AFP*) y el factor nuclear de hepatocito (*HNF-4*).
- Marcadores génicos de macrófagos proinflamatorios: factor de necrosis tumoral (*TNF-α*), interleuquina 1 (*IL-1β*) y la quimiocina C-X-C ligando 10 (*CXCL10*).
- Los citocromos de la familia P-450: *CYP3A5* y *CYP1A2*.
- Enzimas del metabolismo de Fase II del hígado: las enzimas UDP-glucuronosiltransferasa 1A1 y 2B7 (*UGT1A1* y *UGT2B7*) y el glutatión S transferasa Theta-1 y Theta-2 (*GSTT1* y *GSTT2*).

Se emplearon los genes *TBP* y *PBGD* como *Housekeeping* para normalizar su expresión. La intensidad relativa de la expresión de cada gen se muestra en las Figuras 13, 14, 15, y 16.

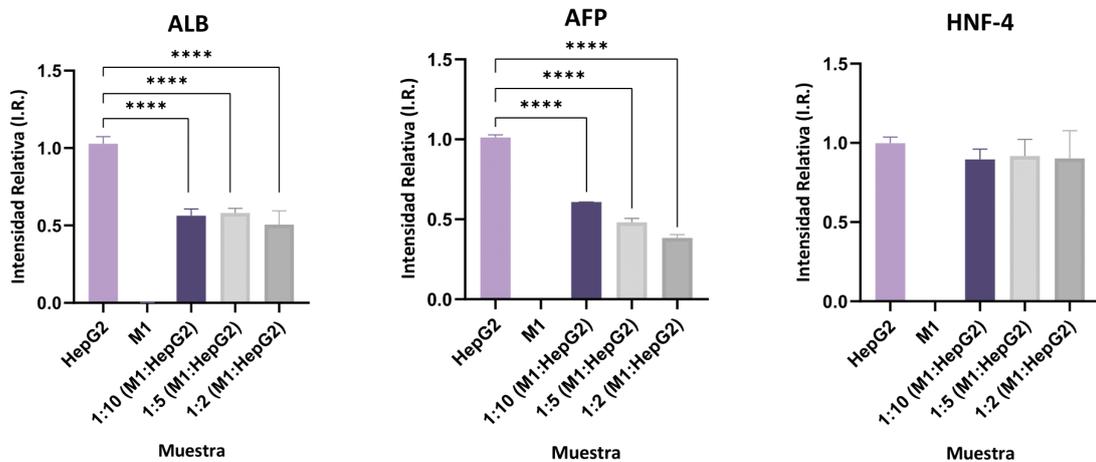


FIGURA 13. EXPRESIÓN (I.R.) DE LOS MARCADORES *ALB*, *AFP* Y *HNF-4* DE HEPATOCITO TRAS EL MANTENIMIENTO DE LOS MONOCULTIVOS Y LOS CO-CULTIVOS CON EL MEDIO DE CULTIVO ESTIMULADOR DURANTE 24 HORAS. SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE HEPG2, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ ($N=4$, TEST *ONE-WAY ANOVA*, POST-TEST *TUKEY*).

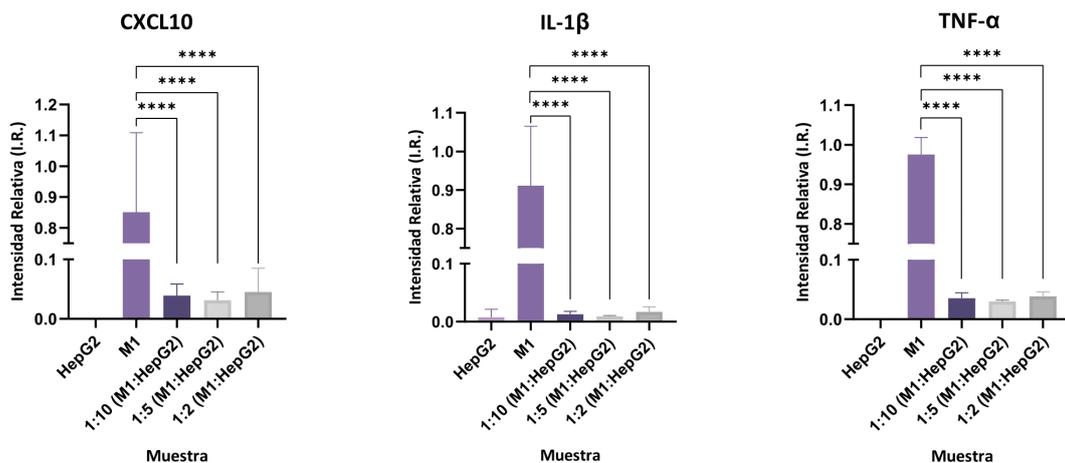


FIGURA 14. EXPRESIÓN (I.R.) DE LOS MARCADORES *CXCL10*, *IL-1β* Y *TNF-α* DE MACRÓFAGOS PROINFLAMATORIOS TRAS EL MANTENIMIENTO DE LOS MONOCULTIVOS Y LOS CO-CULTIVOS CON EL MEDIO DE CULTIVO ESTIMULADOR DURANTE 24 HORAS. SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE M1, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ ($N=4$, TEST *ONE-WAY ANOVA*, POST-TEST *TUKEY*).

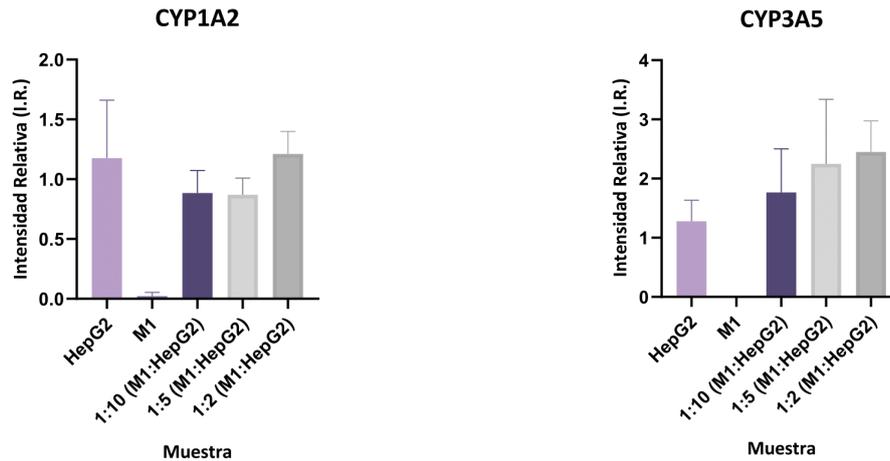


FIGURA 15. EXPRESIÓN (I.R.) DE LOS CITOCROMOS *CYP1A2* Y *CYP3A5* TRAS EL MANTENIMIENTO DE LOS MONOCULTIVOS Y LOS CO-CULTIVOS CON EL MEDIO DE CULTIVO ESTIMULADOR DURANTE 24 HORAS. SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE HEPG2, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=4, TEST *ONE-WAY ANOVA*, POST-TEST TUKEY).

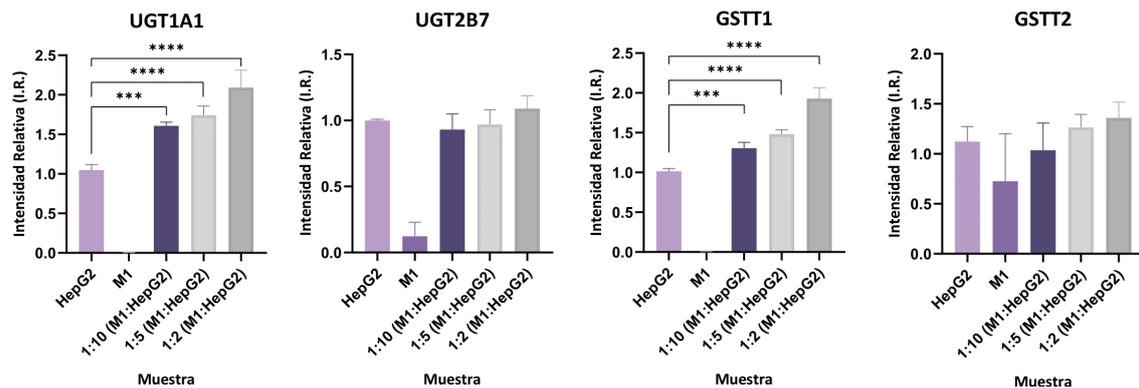


FIGURA 16. EXPRESIÓN (I.R.) DE LAS ENZIMAS DE METABOLISMO DE FASE II HEPÁTICAS, *UGT1A1*, *UGT2B7*, *GSTT1* Y *GSTT2*, TRAS EL MANTENIMIENTO DE LOS MONOCULTIVOS Y LOS CO-CULTIVOS CON EL MEDIO DE CULTIVO ESTIMULADOR DURANTE 24 HORAS. SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE HEPG2, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=4, TEST *ONE-WAY ANOVA*, POST-TEST TUKEY).

Se observó una disminución significativa de los marcadores de hepatocitos *ALB* y *AFP* en los co-cultivos con respecto al monocultivo HepG2, que se hace más notable para mayor proporción de macrófago en el co-cultivo (Figura 13). En cambio, *HNF-4* no mostró variaciones de expresión significativas en ningún co-cultivo con respecto al monocultivo de HepG2.

Los marcadores de macrófagos disminuyeron significativamente (Figura 14), aunque siguieron expresándose, en los co-cultivos con respecto al monocultivo de macrófagos M1.

Por otra parte, los citocromos *CYP1A2* y *CYP3A5* (Figura 15), no sufrieron diferencias significativas en su expresión con respecto a los monocultivos de HepG2, aunque en el caso de la *CYP3A5* se observó un ligero aumento en su expresión a medida que la proporción de macrófagos en el co-cultivo era mayor.

En el caso de las enzimas de metabolismo (*Figura 16*), se identificó un aumento significativo en su expresión respecto de los monocultivos de HepG2 en el caso de la *UGT1A1* y la *GSTT1*, a medida que aumentaba la cantidad de macrófagos en el co-cultivo. Estas enzimas no se expresaron en el monocultivo de M1. En cambio, los genes *UGT2B7* y *GSTT2*, sí que se expresaron ligeramente en el monocultivo de M1, y sufrieron un ligero aumento en los co-cultivos, con la misma tendencia que en el caso anterior, pero sin tener éste significancia estadística.

7.2.2. Evaluación de la funcionalidad del co-cultivo

Tras la caracterización del co-cultivo, se procedió al análisis de su funcionalidad. Para ello, en primer lugar, se cuantificó la albúmina producida por los cultivos a las tres proporciones (M1:HepG2) estudiadas, durante un periodo temporal de 24 horas (*Figura 17*).

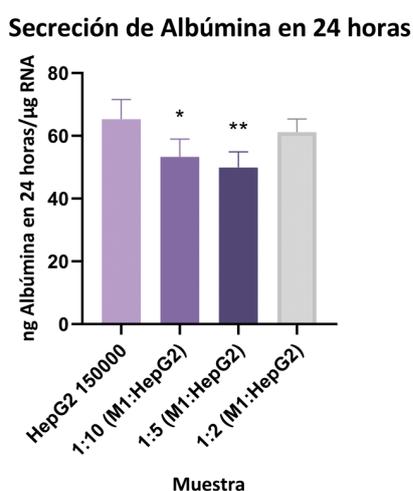


FIGURA 17. GRÁFICA DE SECRECIÓN DE ALBÚMINA (NG EN 24 HORAS/ μ G RNA) POR LOS CO-CULTIVOS DE CÉLULAS HEPG2 Y THP-1 DIFERENCIADAS A MACRÓFAGOS. LOS * REPRESENTAN LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LA PRODUCCIÓN MEDIA DE ALBÚMINA DE CADA TIPO DE CO-CULTIVO Y EL MONOCULTIVO DE HEPG2 SEMBRADAS A 150000 CÉLULAS/POCILLO, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ ($n=4$, TEST ONE-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY).

Aunque se observaron valores similares de producción de albúmina en todas las condiciones analizadas, en los co-cultivos 1:10 y 1:5, se observó una ligera disminución significativa respecto a los monocultivos de HepG2.

En segundo lugar, se cuantificó la producción de urea de los co-cultivos (*Figura 18*). Se observó un aumento de la capacidad ureogénica en los co-cultivos comparado con los monocultivos de HepG2, aunque ese aumento sólo fue significativo en los co-cultivos con la mayor proporción de M1 (1:2).

Capacidad ureogénica por hora

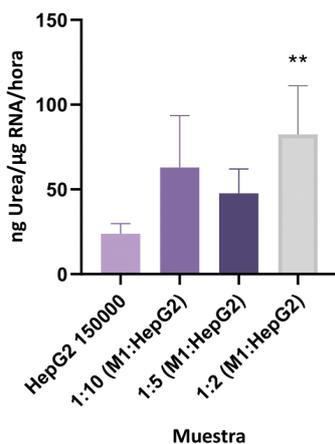


FIGURA 18. CAPACIDAD UROGÉNICA (NG UREA/μG RNA/HORA) DE LOS MONOCULTIVOS SEMBRADOS ÚNICAMENTE CON CÉLULAS HEPG2, Y DE LOS CO:CULTIVOS CON PROPORCIONES 1:10, 1:5 Y 1:2. SE HA INDICADO CON * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LA UROGÉNESIS MEDIA POR HORA DE CADA TIPO DE CO-CULTIVO Y EL MONOCULTIVO DE HEPG2 SEMBRADAS A 150000 CÉLULAS/POCILLO, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=4, TEST ONE-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY).

7.3. Hepatotoxicidad inducida por fármacos

Una vez establecido el co-cultivo y comprobada su funcionalidad, se evaluó la idoneidad del modelo *in vitro* propuesto para el estudio del iDILI. Los cultivos fueron tratados con los fármacos trovafloxacino y levofloxacino, así como troglitazona y rosiglitazona; siendo el primero de cada par hepatotóxico y el segundo, su análogo no hepatotóxico. Posteriormente, se realizó el ensayo de la MTT para analizar la viabilidad celular ante la exposición a dichos fármacos (Figuras 19 y 20).

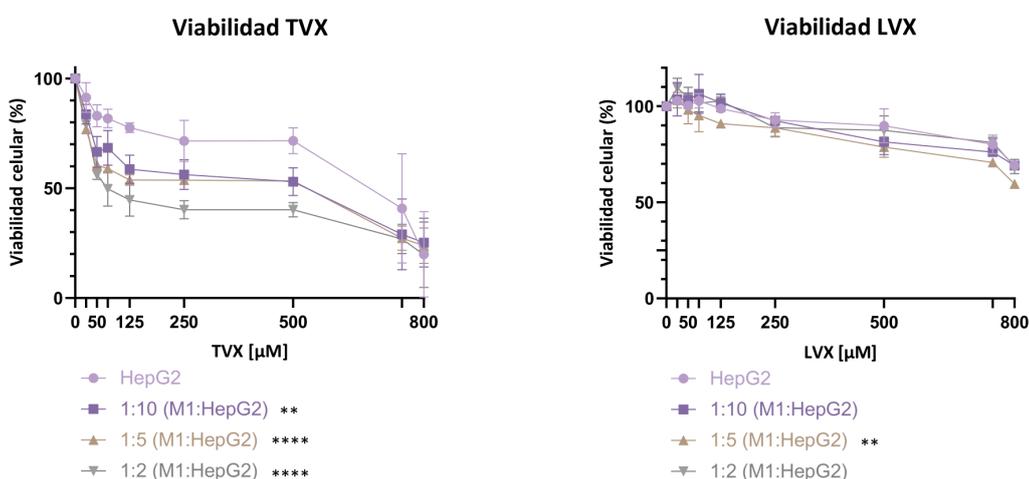


FIGURA 19. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CO-CULTIVOS TRATADOS CON TVX (IZQUIERDA) Y CON SU ANÁLOGO NO HEPATOTÓXICO LVX (DERECHA). SE HA SEÑALADO MEDIANTE EL SÍMBOLO “*” LA DISMINUCIÓN ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CO-CULTIVOS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE HEPG2, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=2, TEST TWO-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY). ASIMISMO, SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS TAMBIÉN ENTRE LOS CO-CULTIVOS A LA PROPORCIÓN 1:2 Y 1:10 ($p=0,0076$) EN EL CASO DEL TVX; Y ENTRE LOS CO-CULTIVOS 1:10 Y 1:5 ($p=0,0061$), ASÍ COMO 1:5 Y 1:2 ($p=0,0008$) AL SER TRATADOS CON LVX.

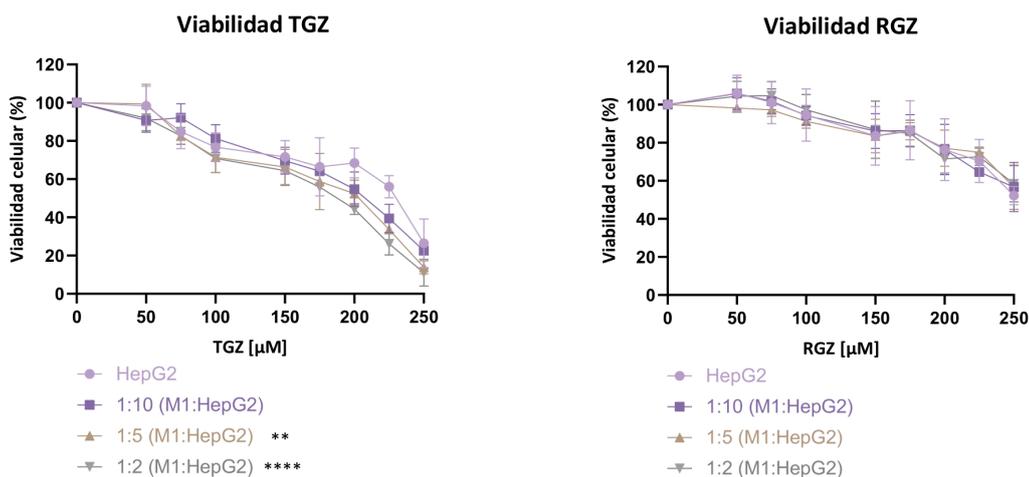


FIGURA 20. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CO-CULTIVOS TRATADOS CON TGZ (*IZQUIERDA*) Y SU MEDICAMENTO ANÁLOGO NO HEPATOTÓXICO RGZ (*DERECHA*). SE HA INDICADO CON * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS CO-CULTIVOS CON RESPECTO AL MONOCULTIVO DE CÉLULAS HEPG2, CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ ($N=3$, TEST *TWO-WAY* ANOVA, POST-TEST TUKEY). TAMBIÉN EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAMENTE ESTADÍSTICAS ENTRE LOS CO-CULTIVOS 1:10 Y 1:2 AL SER TRATADOS CON TGZ ($p=0,0041$).

En el caso de los cultivos expuestos a TVX, se observó una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración en todos los cultivos, siendo esta estadísticamente más acusada en el caso de los co-cultivos en comparación con el monocultivo de HepG2, especialmente los de ratio 1:5 y 1:2, lo cual indica una mayor sensibilidad de estos al fármaco frente a los monocultivos. En cambio, su homólogo no hepatotóxico, el LVX, generó una disminución de la viabilidad menos notable en todos los cultivos, siendo más acusada en el co-cultivo 1:5, aunque con menor significancia estadística que la causada por el TVX (*Figura 19*).

Por lo que respecta a las muestras tratadas con TGZ y su análogo no hepatotóxico RGZ, las diferencias en la viabilidad celular no fueron tan notables entre los diferentes tipos de cultivos en comparación el TVX (*Figura 20*). Pese a ello, sí que se observó una disminución de la viabilidad celular provocada por la TGZ más acusada en los co-cultivo de proporción 1:5 y 1:2, siendo este último el más sensible dado que sufrió una mayor mortalidad. La disminución de la viabilidad provocada por la RGZ fue similar en todos los cultivos.

Asimismo, se ejecutó el test de Dunnett, con $\alpha=0,05$, para comparar la viabilidad celular observada, para cada tipo de cultivo realizado, a las diferentes concentraciones de fármaco con respecto a los cultivos no tratados, es decir, con concentración cero (*Anexo Tabla 1*). De esta manera, se identificaron disminuciones estadísticamente significativas en la viabilidad celular a partir de la concentración de 50 μM de TVX en los co-cultivos 1:10 (M1:HepG2) y 1:2 (M1:HepG2), y 25 μM de TVX en el co-cultivo 1:5, frente a los 250 μM de TVX observados en el monocultivo HepG2 respecto a sus análogos de concentración cero. Por el contrario, en el caso del LVX, fue a partir de 750 μM y 500 μM cuando se observaron disminuciones estadísticamente significativas en la viabilidad celular para los cuatro tipos de cultivos en comparación con sus análogos no tratados. Por lo que respecta a los cultivos expuestos a TGZ y a RGZ, la concentración mínima a la cual se observaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular con respecto a las muestras sin tratar fue de 75 μM en los co-cultivos 1:5 y 1:2 tratados con TGZ, y de 100 μM en el caso del co-cultivo 1:10, al

igual que en el monocultivo de células HepG2. En el caso de la RGZ, dicho valor fue 200 μM tanto para los co-cultivos como para los monocultivos.

Finalmente, se analizó la expresión génica de los cultivos tratados durante 24 horas con una concentración de fármaco seleccionada, siendo ésta de 25 μM en el caso del TVX y el LVX, y de 100 μM para la TGZ y RGZ. La finalidad de este último estudio fue poder dar una explicación a la diferencia observada en la sensibilidad de los diferentes co-cultivos para la detección de la toxicidad hepática inducida por el TVX y la TGZ. Para ello, se analizaron los siguientes genes implicados en diferentes vías de señalización que están implicadas en el iDILI, tal y como se explicó en el apartado 3.2.2 del presente documento:

- Genes implicados en la apoptosis: *CHOP*, el factor de transcripción activador 6 (*ATF6*) y el factor de transcripción activador 4 (*ATF4*).
- Genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo: la catalasa (*CAT*), las enzimas superóxido dismutasa 1 y 2 (*SOD1* y *SOD2*), el factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (*NRF2*) y las dos subunidades de la enzima glutamato cisteína ligasa, la catalítica (*GCLC*) y la moduladora (*GCLM*).

Los resultados para los cultivos tratados con dichos fármacos se muestran en la *Figura 21* en el caso del TVX y LVX, y en la *Figura 22* para los tratados con TGZ y RGZ. Se analizaron los dos pares de fármacos de manera separada dado que su mecanismo metabólico de acción no es necesariamente el mismo.

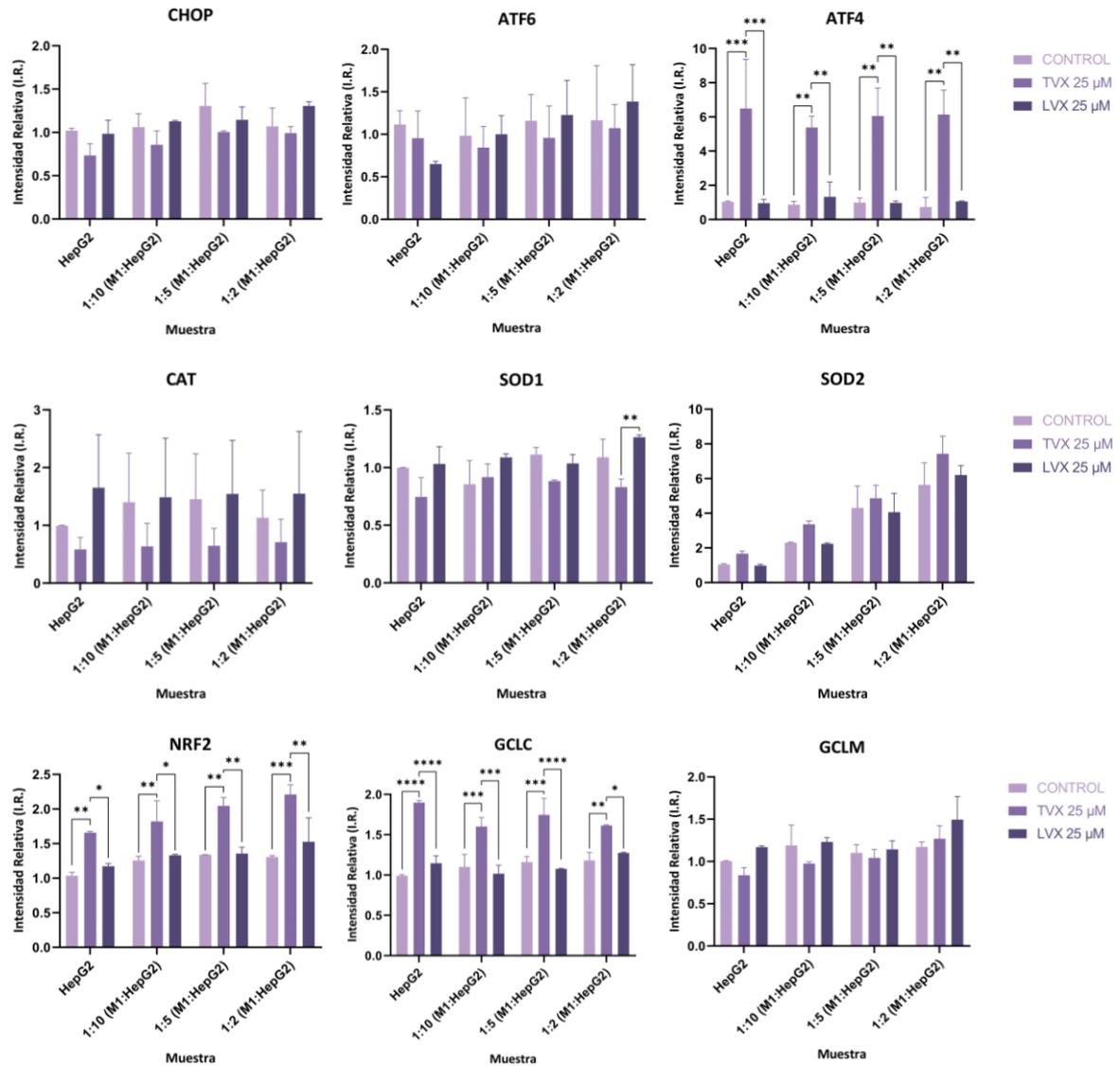


FIGURA 21. EXPRESIÓN DE LOS GENES *CHOP*, *ATF6*, *ATF4*, *CAT*, *SOD1*, *SOD2*, *NRF2*, *GCLC* Y *GCLM* EN LOS MONOCULTIVOS DE HEPG2 Y LOS CO-CULTIVOS M1:HEPG2 TRATADOS DURANTE 24 HORAS CON 25 μM DE TVX Y LVX . SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DE CADA CULTIVO CON RESPECTO SU ANÁLOGO NO TRATADO CON FÁRMACO (CONTROL), CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ (N=2, TEST TWO-WAY ANOVA, POST-TEST TUKEY).

En los cultivos tratados con 25 μM de TVX y LVX, en cuanto a los genes implicados en el mecanismo de apoptosis, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes *CHOP* y *ATF6* en los cultivos tratados con dichos fármacos respecto a sus análogos sin tratar. En cambio, la expresión del gen *ATF4* se incrementó de manera significativa en los cuatro cultivos con respecto al control ($p < 0,01$). Por lo que respecta a los genes y enzimas implicados en la respuesta al estrés oxidativo, solamente se observó un aumento estadísticamente significativo del factor nuclear *NRF2* y de la enzima *GCLC* en todos los cultivos tratados con TVX con respecto a sus análogos no tratados con fármaco. Cabe destacar que en todos los casos descritos la expresión de dichos genes en los cultivos tratados con LVX no fue significativa con respecto a sus análogos no tratados.

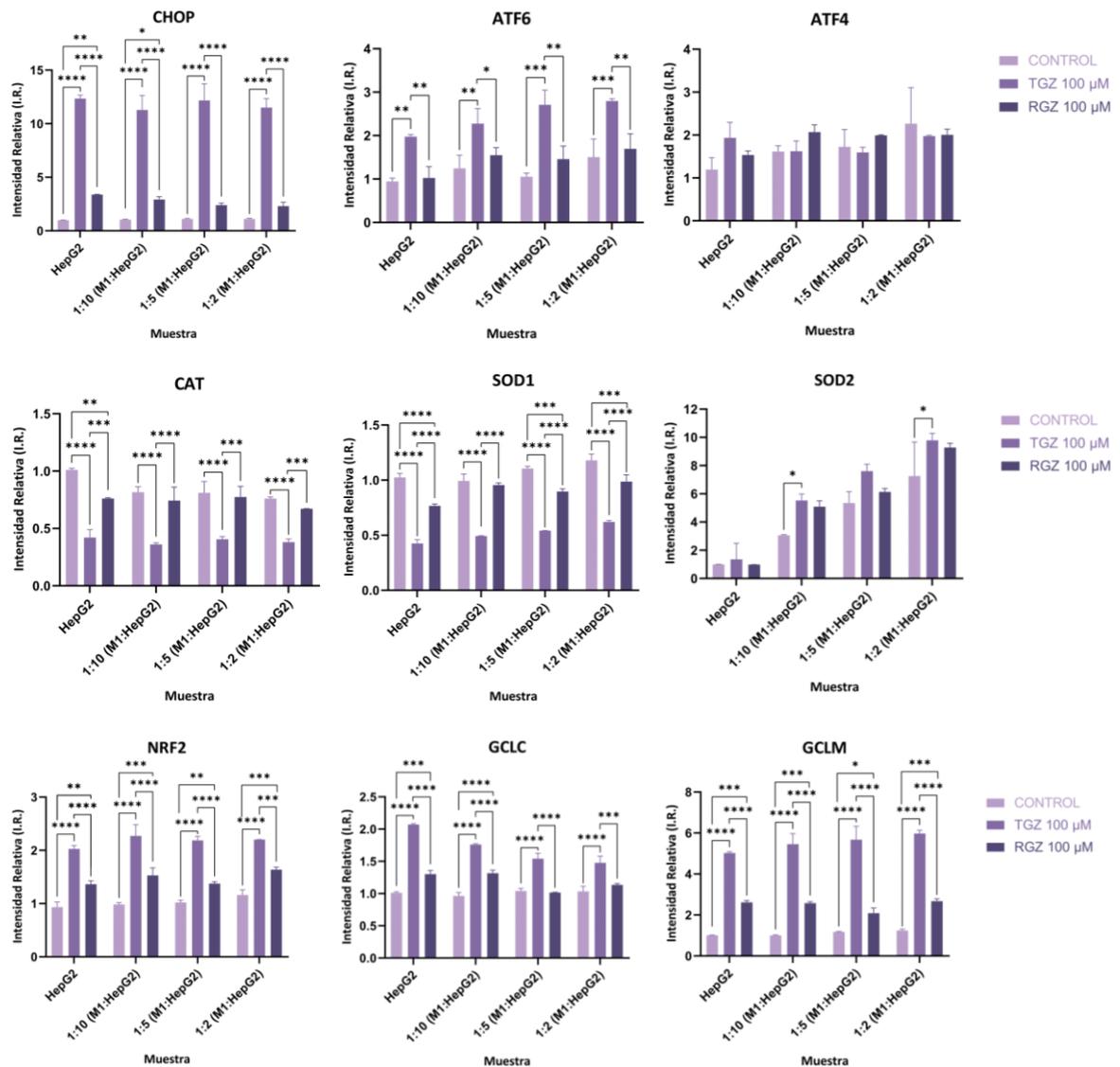


FIGURA 22. EXPRESIÓN DE LOS GENES *CHOP*, *ATF6*, *ATF4*, *CAT*, *SOD1*, *SOD2*, *NRF2*, *GCLC* Y *GCLM* EN LOS MONOCULTIVOS DE HEPG2 Y LOS CO-CULTIVOS M1:HEPG2 DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LOS FÁRMACOS TGZ Y RGZ A LA CONCENTRACIÓN DE 100 μM DURANTE 24 HORAS. SE HA INDICADO MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DE CADA CULTIVO CON RESPECTO SU ANÁLOGO NO TRATADO CON FÁRMACO (CONTROL), CON * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ Y **** $p < 0.0001$ ($N=2$, TEST *TWO-WAY ANOVA*, POST-TEST *TUKEY*).

Por otra parte, en los cultivos tratados con 100 μM de TGZ, se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión del gen *CHOP* y *ATF6* en todos los cultivos, pero *ATF4* no sufrió cambios significativos (Figura 22). En cuanto a los genes que participan en la respuesta al estrés oxidativo celular, se identificó una disminución estadísticamente significativa, en un intervalo de confianza del 95%, de la *CAT* y del *SOD1* en los cultivos tratados con TGZ con respecto a sus análogos no tratados. En cambio, el factor nuclear *NRF2* y las enzimas *GCLC* y *GCLM* incrementaron de manera estadísticamente significativa su expresión en todos los cultivos tratados con TGZ con respecto a los no expuestos a dicho fármaco. Asimismo, en los cultivos tratados con RGZ, en comparación con los no expuestos a dicho fármaco, se percibió una disminución estadísticamente significativa de la expresión del gen *SOD1*; mientras que los genes *NRF2* y *GCLM* aumentaron su expresión tanto en los monocultivos como en los co-cultivos.

8. DISCUSIÓN

La aparición de hepatotoxicidad idiosincrática inducida por ciertos medicamentos u otros productos químicos es un problema grave para el cual todavía no se ha hallado una solución efectiva. En consecuencia, gran cantidad de fármacos siguen siendo retirados del mercado después de su comercialización dado que su efecto dañino sobre el hígado, a pesar de ser administrados en dosis terapéuticas, no es identificado durante los ensayos clínicos ya que es independiente de la dosis y depende de diferentes factores específicos del paciente, como la edad, el sexo, la obesidad o la enfermedad hepática crónica subyacente. Además, no existen biomarcadores que hagan posible tanto su predicción, como su diagnóstico y pronóstico (Kaplowitz, 2005; Segovia-Zafra y otros, 2021; Jee y otros, 2021).

Existe una evidente falta de conocimiento tanto en la detección como en el diagnóstico del iDILI, por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevos modelos que permitan una mejor predicción y comprensión de los mecanismos subyacentes para disminuir los riesgos en el proceso de desarrollo de fármacos (Segovia-Zafra y otros, 2021). Aunque el sistema inmunitario se ha implicado en la patogenia del iDILI, no existe un método estándar para identificar compuestos que puedan producir iDILI inmunitario (Segovia-Zafra y otros, 2021). En el presente trabajo hemos caracterizado completamente un sistema de co-cultivo directo para la detección de fármacos que producen iDILI inmunomediados que podrían adaptarse fácilmente como herramienta de detección para ensayos de alto rendimiento para la detección temprana de compuestos causantes de iDILI.

Con la idea de mimetizar lo que ocurre *in vivo*, el sistema ideal sería cultivar de manera conjunta KC con hepatocitos. No obstante, debido a la escasa disponibilidad y la elevada variabilidad detectada en las células humanas primarias (Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008), se optó por la utilización de dos líneas celulares inmortales en sustitución de los tipos celulares primarios: las células HepG2, que poseen las principales características de los hepatocitos; y las células monocíticas THP-1, cuya diferenciación hacia macrófagos proinflamatorios, es decir, de fenotipo M1, permite reemplazar a las células Kupffer primarias (Rose y otros, 2016; Guillouzo y Guguen-Guillouzo, 2008; Ramboer, 2015; Donato y otros, 2015). Se pretendía que dicho modelo permitiese estudiar la respuesta inflamatoria mediada por los macrófagos.

El protocolo de diferenciación de las células monocíticas THP-1 a macrófagos con fenotipo M1 fue inicialmente probado por Colomer Merino, L. (2022) basándose en la literatura, en el cual los monocitos son diferenciados mediante PMA a macrófagos inactivos, es decir, de fenotipo M0, y posteriormente estimulados con LPS e IFN- γ para provocar su activación a M1. Dicho fenotipo se caracteriza por tener un comportamiento proinflamatorio, en contraposición con el fenotipo de macrófagos M2, que presenta características antiinflamatorias y, en consecuencia, está involucrado en la resolución de la inflamación y la curación del tejido.

La satisfactoria activación de las células THP-1 a macrófagos quedó demostrada mediante el estudio de la expresión de sus marcadores específicos CD68 y CD163 en las tres condiciones probadas para el mantenimiento del cultivo (*Figura 8*). La menor cantidad de marcaje CD163 en el cultivo estimulado con LPS e IFN- γ , dado que se ha observado que dicho marcador tiene una mayor expresión en el fenotipo anti-inflamatorio (Kwiecień y otros, 2019), es un indicio que demuestra que dichas condiciones de citoquinas en el medio de cultivo son necesarias para mantener los

macrófagos especializados al tipo pro-inflamatorio. Por otra parte, se observó una notable evolución de la morfología celular en los cultivos, siendo más redondeada en ausencia de las citoquinas, y más alargada y con ramificaciones cuando las muestras son tratadas con LPS e IFN- γ durante 24 horas (*Figura 8*). Esta morfología es característica de los macrófagos con fenotipo M1 (Heinrich y otros, 2017).

El mantenimiento del fenotipo proinflamatorio (M1) de las células THP-1 durante el periodo de experimentación se demostró a través de la mayor expresión de las citoquinas *IL-1 β* (se expresa en presencia de LPS), *TNF- α* y *CXCL10*, y de la menor expresión del gen *CD206*, en los cultivos de M1 tratados con LPS e IFN- γ en comparación con el cultivo de macrófagos M1 sin tratar (*Figura 9*). Los tres primeros genes se expresan únicamente en los macrófagos proinflamatorios (Tasnim y otros, 2021), mientras que el gen *CD206* es un marcador que identifica el fenotipo M2 anti-inflamatorio (Xu y otros, 2019), por lo que no se expresa en los macrófagos proinflamatorios. De esta manera, se confirmó que la presencia de LPS e IFN- γ en el medio de cultivo evitaba la desdiferenciación de los macrófagos proinflamatorios, pero la ausencia de estos provocaba su desdiferenciación a un estadio anti-inflamatorio. Además, los resultados de los ensayos de viabilidad (*Figura 10*) mostraron un efecto nulo del LPS e IFN- γ sobre la viabilidad celular de los monocultivos tanto de HepG2 como de células THP-1 diferenciadas a macrófagos M1.

Otros estudios han utilizado el co-cultivo indirecto (en el que diferentes tipos de células están separadas por una membrana permeable) para estudiar los efectos de factores como las citoquinas liberadas por KC en los hepatocitos (Granitzny y otros, 2017; Yang y otros, 2022) o incluso el uso de medios acondicionados de células promielocíticas (Oda y otros, 2016). Sin embargo, el co-cultivo directo de células HepG2 y macrófagos activados imitaría mejor las interacciones célula-célula que se producen *in vivo*, razón por la cual se empleó dicho tipo de cultivo en el presente estudio.

24 horas después de la siembra, los co-cultivos mantuvieron una adecuada viabilidad (*Figura 11*) y la expresión tanto de los marcadores hepáticos como de los marcadores proinflamatorios de las células THP-1 diferenciadas a macrófagos M1 (*Figura 12*). La disminución en la expresión de los genes exclusivos de hepatocitos *ALB* y *AFP* con el aumento de la proporción de macrófagos en el co-cultivo (*Figura 13*), así como el aumento de la expresión de los marcadores de M1 *CXCL10*, *IL-1 β* y *TNF- α* en los co-cultivos confirmó la presencia de macrófagos activados (proinflamatorios) en los mismos. Asimismo, todos los cultivos expresaron las principales enzimas presentes en el metabolismo de fármacos y otras sustancias químicas. Por una parte, los citocromos *CYP1A2* y *CYP3A5*, que catalizan las reacciones REDOX durante la fase I del iDILI inmunomediado, por medio de las cuales las moléculas de los xenobióticos son modificadas químicamente y transformadas en neoantígenos; su presencia en el co-cultivo demostró la capacidad metabólica del modelo planteado, que es básica para poder estudiar la hepatotoxicidad (Gómez-Lechon y otros, 2007; Hussaini y Farrington, 2007). Por otra parte, la expresión de los genes *UGT1A1*, *GSTT1*, *UGT2B7* y *GSTT2* en los co-cultivos, permitió comprobar que las enzimas de metabolismo de fase II del hígado, las cuales se encargan de la detoxificación y eliminación de los metabolitos tóxicos obtenidos en la fase I (Congiu y otros, 2002), estaban presentes en el modelo planteado.

Asimismo, las funciones hepáticas específicas estudiadas, concretamente la ureogénesis y la síntesis de albúmina, también se mantuvieron en los co-cultivos. Aunque diferentes estudios han demostrado que la adición de células no parenquimáticas al cultivo de hepatocitos o células similares a hepatocitos (p.ej. HepG2) aumenta la funcionalidad hepática (Takebe y otros, 2013; Ware

y Khetani, 2017), los sistemas desarrollados en el presente trabajo no mostraron una mejora en la producción de albúmina. Esto podría deberse al hecho de que la funcionalidad se evaluó 24 horas después de la siembra.

En cuanto a la capacidad ureogénica, función crucial del hígado, el aumento en la cantidad de urea producida en los co-cultivos con respecto al monocultivo de HepG2 (*Figura 18*), puede ser explicado por la mayor cantidad de macrófagos presentes. Numerosos estudios han demostrado que la proteína TNF- α , liberada por los macrófagos activados, es un mediador responsable del aumento de la producción de urea por parte del hígado (Thomsen y otros, 2013; Thomsen y otros, 2010). En el presente trabajo, se demuestra la expresión del factor TNF- α en los co-cultivos en la *Figura 14*. La reproducción del efecto de la inflamación sobre la producción de urea en el hígado es crucial para mimetizar el funcionamiento del mismo en situaciones de daño hepático.

En definitiva, los resultados obtenidos mostraron la obtención de co-cultivos bien establecidos, con funcionalidad hepática mantenida, y con expresión tanto de los genes y marcadores propios de los hepatocitos y los macrófagos, como de las principales enzimas presentes en el metabolismo hepatotóxico, proporcionando las interacciones celulares adecuadas para poder desarrollar el iDILI.

Cuando se estudió la idoneidad de los sistemas desarrollados para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos *in vitro*, se observó, a través del estudio de la viabilidad celular, una posible actuación sinérgica del TVX junto con los macrófagos proinflamatorios M1 en los co-cultivos, ya que la disminución de la viabilidad celular respecto a las muestras sin tratar dependiente de la concentración, se produjo a una concentración mucho menor en el caso de los co-cultivos (los cuales contienen macrófagos proinflamatorios) que en los monocultivos de HepG2 sin macrófagos M1, siendo el de proporción 1:2 el cultivo más sensible. Este hecho no sucedió con su análogo no asociado con el iDILI, el LVX.

En el caso de la TGZ, se identificó su posible efecto sinérgico con los macrófagos activados M1 dado que la concentración observada a la cual la diferencia en la viabilidad celular de cada cultivo respecto a su análogo sin tratar era estadísticamente significativa, fue menor en el caso de los co-cultivos con mayor proporción de macrófagos, hecho que explicaría que el co-cultivo de ratio 1:2 fuese el más sensible. Al igual que en el caso anterior, este hecho no sucedió con la RGZ, su medicamento análogo no asociado con el iDILI.

La toxicología mecanística es actualmente fundamental en los estudios preclínicos de las compañías farmacéuticas, ya que proporciona mejores predicciones, reducción de efectos secundarios, así como el descubrimiento y aplicación de nuevos biomarcadores DILI. El estudio de los posibles mecanismos implicados en la toxicidad inducida por TVX reveló un aumento en todos los cultivos del factor de transcripción *ATF4*, cuya función es la translocación al núcleo y la posterior inducción de los genes requeridos para poder restablecer la homeostasis celular y evitar la apoptosis (Szegezdi y otros, 2006; Wortel y otros, 2017); así como del factor nuclear *NRF2*, que es crucial para la respuesta al estrés oxidativo y xenobiótico celular, dado que se activa en presencia de las especies reactivas del oxígeno e induce la formación de las subunidades *GCLC* y *GCLM*. Posteriormente, estas sintetizan, con ayuda de la enzima glutatión sintetasa, el glutatión, que tiene una función antioxidante dado que metaboliza las especies reactivas de oxígeno evitando así el inicio de determinadas patologías como el iDILI (He y otros, 2020; Carvajal, 2019). La enzima *GCLC* también aumentó su expresión, pero no lo hizo la *GCLM*. Por ello, a pesar de que se intuye la activación de

la ruta del estrés oxidativo, no se ha podido explicar la falta de un aumento significativo en la expresión de la *GLCM*.

En cuanto a la expresión génica en los cultivos tratados con TGZ, la activación de la ruta apoptótica se identificó gracias al aumento en la expresión de los genes *CHOP* y *ATF6* en estos cultivos, siendo el primero pro-apoptótico y el segundo una vía de supervivencia frente a la apoptosis (Szegezdi y otros, 2006). Por lo que respecta a la vía del estrés oxidativo, también fue activada por la exposición de los cultivos a TGZ, lo cual se comprobó gracias a la expresión en todos los cultivos de *CAT* y *SOD1*, implicadas en la degradación de las especies reactivas de oxígeno (Takeuchi y otros, 2005; Younus y otros, 2018); y a través del aumento estadísticamente significativo de la expresión de *NRF2*, *GCLC* y *GCLM*, que actúan conjuntamente en la respuesta al estrés oxidativo.

En definitiva, el modelo *in vitro* propuesto mostró resultados prometedores para el estudio de la hepatotoxicidad idiosincrática, dado que permite ver cambios en vías de señalización implicada en el iDILI. Se ha podido demostrar una mayor sensibilidad de los co-cultivos a los fármacos asociados con el iDILI (TVX y TGZ), en comparación con los monocultivos de HepG2, y que es mayor cuanto mayor es la proporción de macrófagos proinflamatorios (M1) presentes en el sistema. Asimismo, se ha demostrado que este fenómeno no sucede cuando el modelo es tratado con LVX y RGZ, medicamentos no asociados con el iDILI.

No obstante, no se ha podido explicar la razón por la cual los co-cultivos de ratio 1:2 presentan una mayor sensibilidad frente a los co-cultivos de ratio 1:10 y 1:5, ya que se ha observado que tanto el TVX como la TGZ ejercen una modulación de los genes implicados en los mecanismos subyacentes al iDILI que es similar tanto para los monocultivos de HepG2 como para los co-cultivos. En cambio, cabría esperar una mayor activación de dichas vías en los co-cultivos más sensibles, es decir, los de ratio 1:2 (M1:HepG2).

Para resolverlo, sería conveniente llevar a cabo otros estudios modificando parámetros como la concentración de fármaco a la cual se realiza el tratamiento de las células, o el tiempo durante el cual se lleva a cabo la incubación. Asimismo, sería favorable el establecimiento de modelos de mayor complejidad, empezando por ejemplo por aquellos modelos tridimensionales más simples como son los esferoides. Con ello ya se estaría mejorando la mimetización del entorno hepático y de su estructura, y en consecuencia posiblemente se obtendrían resultados más concluyentes.

Sin embargo, cabe destacar que el estudio de la activación de las vías moleculares ante la generación de un estrés celular por la presencia de un fármaco es un problema de abordaje muy complejo, dado que la respuesta de dichas células a la lesión depende de otros factores que van más allá de la interacción con otros tipos celulares, tales como los microambientes locales creados en el interior del hígado, y puede ser, por tanto, dinámica. Asimismo, la recreación de las funciones hepáticas clave sigue siendo un desafío (LeCluyse y otros, 2012).

Por dicha razón, el satisfactorio establecimiento del modelo *in vitro* propuesto, que incorpora tanto el componente celular parenquimático como el inflamatorio, y que ha demostrado ser capaz de simular la hepatotoxicidad inducida por los fármacos TVX y TGZ, asociados con el iDILI, es la base para el desarrollo de sistemas más completos que añadan complejidad a través de la incorporación de nuevos componentes celulares y estructuras.

9. CONCLUSIONES

El modelo *in vitro* propuesto para la evaluación de la hepatotoxicidad ha sido caracterizado y evaluado durante el periodo de tiempo englobado por el presente Trabajo de Fin de Grado. Concretamente, se analizó su correcto mantenimiento, funcionalidad y la predicción de la hepatotoxicidad inducida por dos fármacos asociados con el iDILI, el trovafloxacino y la troglitazona.

Las conclusiones que se pueden extraer a partir de los resultados son las siguientes:

1. El co-cultivo de células HepG2 y células THP-1 diferenciadas a macrófagos de fenotipo proinflamatorio, M1, se ha establecido correctamente y se ha optimizado su mantenimiento durante el tiempo de experimentación, gracias su estimulación mediante la incorporación de LPS e IFN- γ en el medio de cultivo.
2. Los co-cultivos mantienen la expresión de los marcadores específicos de los hepatocitos y de las KC, así como la adecuada conservación de la viabilidad celular y presentan capacidad funcional (capacidad ureogénica y síntesis de albúmina) propia del hígado.
3. El sistema de co-cultivo desarrollado permite evaluar el papel del componente inmune en iDILI, ya que al incubarlo con TVX y TGZ, se observó una mayor sensibilidad de los co-cultivos frente a dichos fármacos.
4. Se ha demostrado la utilidad de un co-cultivo directo de hepatocitos y macrófagos activados para explorar los mecanismos implicados en iDILI. La activación de las rutas de apoptosis y estrés oxidativo han sido identificadas en el modelo *in vitro* tras el tratamiento de éste con los fármacos, mostrando así una respuesta por parte del modelo similar a la que sucede en el hígado durante el inicio del iDILI.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Misih, S. R., & Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surgical Clinics*, *90*(4), 643-653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- Acharya, S. S., & Dimichele, D. M. (2008). Rare inherited disorders of fibrinogen. *Haemophilia*, *14*(6), 1151-1158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01831.x>
- Ahmed, H. M. M., Salerno, S., Morelli, S., Giorno, L., & De Bartolo, L. (2017). 3D liver membrane system by co-culturing human hepatocytes, sinusoidal endothelial and stellate cells. *Biofabrication*, *9*(2), 025022. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa70c7>
- Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*, *5*, 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- Arzumanian, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. V. (2021). The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. *International journal of molecular sciences*, *22*(23), 13135. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, *47*(1), 22-31. <https://doi.org/10.1007/BF02041244>
- Bates, J., & McClain, C. J. (1981). The effect of severe zinc deficiency on serum levels of albumin, transferrin, and prealbumin in man. *The American journal of clinical nutrition*, *34*(9), 1655-1660. <https://doi.org/10.1093/ajcn/34.9.1655>
- Baxter, E. W., Graham, A. E., Re, N. A., Carr, I. M., Robinson, J. I., Mackie, S. L., & Morgan, A. W. (2020). Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *Journal of Immunological Methods*, *478*, 112721. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721>
- Björnsson, E., & Olsson, R. (2006). Suspected drug-induced liver fatalities reported to the WHO database. *Digestive and liver disease*, *38*(1), 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2005.06.004>
- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, *36*(1), 91-100.
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology*, *23*(1), 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Clària, J., & Titos, E. (2004). La célula de Kupffer. *Gastroenterología y hepatología*, *27*(4), 264-273. [https://doi.org/10.1016/S0210-5705\(03\)70457-9](https://doi.org/10.1016/S0210-5705(03)70457-9)
- Colomer Merino, L. (2022). Nuevos modelos in vitro para el estudio de la hepatotoxicidad inducida por fármacos. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/188363>

- Congiu, M., Mashford, M. L., Slavin, J. L., & Desmond, P. V. (2002). UDP glucuronosyltransferase mRNA levels in human liver disease. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 30(2), 129–134. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.2.129>
- Corsini, A., Ganey, P., Ju, C., Kaplowitz, N., Pessayre, D., Roth, R., ... & Bortolini, M. (2012). Current challenges and controversies in drug-induced liver injury. *Drug safety*, 35, 1099-1117. <https://doi.org/10.1007/BF03261997>
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 785. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>.
- Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. *Protocols in in vitro hepatocyte research*, 77-93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5
- Elijah Trefts, Maureen Gannon, & David H. Wasserman (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1145-R1147. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>.
- Feldman, D. (2011). Adhesion and hemostasis in surgery. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, 38-43. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043152-6/00007-3>
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., ... & Hengstler, J. G. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of toxicology*, 87, 1315-1530. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>.
- Gómez-Lechón, M. J., Castell, J. V., & Donato, M. T. (2007). Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chemico-biological interactions*, 168(1), 30-50. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.10.013>
- Graham, D. J., Green, L., Senior, J. R., & Nourjah, P. (2003). Troglitazone-induced liver failure: a case study. *The American journal of medicine*, 114(4), 299-306. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01529-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01529-2)
- Granitzny, A., Knebel, J., Müller, M., Braun, A., Steinberg, P., Dasenbrock, C., & Hansen, T. (2017). Evaluation of a human in vitro hepatocyte-NPC co-culture model for the prediction of idiosyncratic drug-induced liver injury: a pilot study. *Toxicology reports*, 4, 89-103. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.02.001>
- Guguen-Guillouzo, C. (1986). Role of homotypic and heterotypic cell interactions in expression of specific functions by cultured hepatocytes. *Research in isolated and cultured hepatocytes*
- Guillouzo, A. (1998). Liver cell models in in vitro toxicology. *Environmental health perspectives*, 106(suppl 2), 511-532. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106511>
- Guillouzo, A., & Guguen-Guillouzo, C. (2008). Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 4(10), 1279-1294. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.10.1279>
- Harris, J. A., Jain, S., Ren, Q., Zarineh, A., Liu, C., & Ibrahim, S. (2012). CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical Hodgkin lymphoma. *Diagnostic pathology*, 7(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-12>

- He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4777. <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
- Heinrich, F., Lehmbecker, A., Raddatz, B. B., Kegler, K., Tipold, A., Stein, V. M., ... & Spitzbarth, I. (2017). Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages in vitro. *PLoS one*, 12(8), e0183572. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183572>
- Hígado: Anatomía, porta hepática y aspectos clínicos | Kenhub. (n.d.). Retrieved May 1, 2023, from <https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/higado>
- Hoebe, K. H., Witkamp, R. F., Fink-Gremmels, J., Van Miert, A. S., & Monshouwer, M. (2001). Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(4), G720-G728. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.4.G720>
- Holt, M. P., & Ju, C. (2006). Mechanisms of drug-induced liver injury. *The AAPS journal*, 8, E48-E54. <https://doi.org/10.1208/aapsj080106>
- Hunter, E. B., Johnston, P. E., Tanner, G., Pinson, C. W., & Awad, J. A. (1999). Bromfenac (Duract)-associated hepatic failure requiring liver transplantation. *The American journal of gastroenterology*, 94(8), 2299-2301. [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(99\)00377-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(99)00377-9)
- Hussaini, S. H., & Farrington, E. A. (2007). Idiosyncratic drug-induced liver injury: an overview. *Expert opinion on drug safety*, 6(6), 673-684. <https://doi.org/10.1517/14740338.6.6.673>
- Inside the liver | Hepatitis C Trust. (n.d.). Retrieved May 6, 2023, from <http://hepctrust.org.uk/information/liver/inside-liver>
- Jee, A., Sernoskie, S. C., & Uetrecht, J. (2021). Idiosyncratic drug-induced liver injury: mechanistic and clinical challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2954. <https://doi.org/10.3390/ijms22062954>
- Kaitin, K. I. (2005). Drug safety withdrawals in the US not linked to speed of FDA approval. *Tufts Center for the Study of Drug Development Impact Report*, 7(5)
- Kaplan, J. B., Kalra, A., & Biggins, S. W.(Eds.). (2017). *Liver Anatomy and Function*.
- Kaplowitz, N. (2005). Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature reviews Drug discovery*, 4(6), 489-499. <https://doi.org/10.1038/nrd1750>
- Keemink, J., Oorts, M., & Annaert, P. (2015). Primary hepatocytes in sandwich culture. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, 175-188. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_12
- Khalil, M., Shariat-Panahi, A., Tootle, R., Ryder, T., McCloskey, P., Roberts, E., ... & Selden, C. (2001). Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *Journal of hepatology*, 34(1), 68-77. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)00080-5)
- Khetani, S. R., & Bhatia, S. N. (2008). Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nature biotechnology*, 26(1), 120-126. <https://doi.org/10.1038/nbt1361>

- Kostadinova, R., Boess, F., Applegate, D., Suter, L., Weiser, T., Singer, T., ... & Roth, A. (2013). A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 268(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.012>.
- Kwiecień, I., Polubiec-Kownacka, M., Dziedzic, D., Wołosz, D., Rzepecki, P., & Domagała-Kulawik, J. (2019). CD163 and CCR7 as markers for macrophage polarization in lung cancer microenvironment. *Central-European journal of immunology*, 44(4), 395–402. <https://doi.org/10.5114/ceji.2019.92795>
- Lasser, K. E., Allen, P. D., Woolhandler, S. J., Himmelstein, D. U., Wolfe, S. M., & Bor, D. H. (2002). Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. *Jama*, 287(17), 2215-2220. <https://doi.org/10.1001/jama.287.17.2215>
- Lazarczyk, D. A., Goldstein, N. S., & Gordon, S. C. (2001). Trovafloxacin hepatotoxicity. *Digestive diseases and sciences*, 46(4), 925-926. <https://doi.org/10.1023/a:1010741510046>
- LeCluyse, E. L., Witek, R. P., Andersen, M. E., & Powers, M. J. (2012). Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Critical reviews in toxicology*, 42(6), 501-548. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.682115>
- Liver: Anatomy and Functions | Johns Hopkins Medicine*. (n.d.). Retrieved May 5, 2023, from <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/liver-anatomy-and-functions>
- Lv, W., Zhou, H., Aazmi, A., Yu, M., Xu, X., Yang, H., ... & Ma, L. (2022). Constructing biomimetic liver models through biomaterials and vasculature engineering. *Regenerative Biomaterials*, 9. <https://doi.org/10.1093/rb/rbac079>.
- Ma, Y., Hu, L., Tang, J., Guo, W., Feng, Y., Liu, Y., & Tang, F. (2023). Three-Dimensional Cell Co-Culture Liver Models and Their Applications in Pharmaceutical Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6248. <https://doi.org/10.3390/ijms24098235>
- March, S., Ramanan, V., Trehan, K., Ng, S., Galstian, A., Gural, N., ... & Bhatia, S. N. (2015). Micropatterned coculture of primary human hepatocytes and supportive cells for the study of hepatotropic pathogens. *Nature protocols*, 10(12), 2027-2053. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.128>
- Marion, M. J., Hantz, O., & Durantel, D. (2010). The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Hepatocytes: methods and protocols*, 261-272. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_13
- Maurel, P. [Ed.] (2010). *Hepatocytes: methods and protocols*. Humana.
- Mills, J. B., Rose, K. A., Sadagopan, N., Sahi, J., & de Morais, S. M. (2004). Induction of drug metabolism enzymes and MDR1 using a novel human hepatocyte cell line. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(1), 303-309. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.061713>
- Murphy, E. J., Davern, T. J., Shakil, A. O., & Shick, L. (2000). Troglitazone-induced fulminant hepatic failure. *Digestive diseases and sciences*, 45(3), 549.

- Nguyen, T. V., Ukairo, O., Khetani, S. R., McVay, M., Kanchagar, C., Seghezzi, W., ... & Evers, R. (2015). Establishment of a hepatocyte-kupffer cell coculture model for assessment of proinflammatory cytokine effects on metabolizing enzymes and drug transporters. *Drug metabolism and disposition*, 43(5), 774-785. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.061317>
- Oda, S., Matsuo, K., Nakajima, A., & Yokoi, T. (2016). A novel cell-based assay for the evaluation of immune-and inflammatory-related gene expression as biomarkers for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicology letters*, 241, 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.029>
- Olsavsky Goyak, K. M., Laurenzana, E. M., & Omiecinski, C. J. (2010). Hepatocyte differentiation. *Hepatocytes: Methods and Protocols*, 115-138. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_6
- Ostapowicz, G., Fontana, R. J., Schiødt, F. V., Larson, A., Davern, T. J., Han, S. H., ... & US Acute Liver Failure Study Group*. (2002). Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Annals of internal medicine*, 137(12), 947-954. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-12-200212170-00007>
- Pelechá, M., Gómez-Lechón, M., Tolosa, L., & Donato, M. (2017). Hepatocitos Humanos Upcytes como modelo experimental in vitro para el estudio del daño hepático inducido por fármacos a largo plazo. *Revista de Toxicología*, 34, 109-117
- Ramboer, E., Vanhaecke, T., Rogiers, V., & Vinken, M. (2015). Immortalized human hepatic cell lines for in vitro testing and research purposes. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, 53-76. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_4
- Roberts, R. A., Ganey, P. E., Ju, C., Kamendulis, L. M., Rusyn, I., & Klaunig, J. E. (2007). Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 96(1), 2-15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl173>
- Rose, K. A., Holman, N. S., Green, A. M., Andersen, M. E., & LeCluyse, E. L. (2016). Co-culture of hepatocytes and Kupffer cells as an in vitro model of inflammation and drug-induced hepatotoxicity. *Journal of pharmaceutical sciences*, 105(2), 950-964. [https://doi.org/10.1016/s0022-3549\(15\)00192-6](https://doi.org/10.1016/s0022-3549(15)00192-6)
- Roth, R. A., & Ganey, P. E. (2010). Intrinsic versus idiosyncratic drug-induced hepatotoxicity—two villains or one?. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(3), 692-697. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.162651>
- Rudman, D., DiFulco, T. J., Galambos, J. T., Smith, R. B., Salam, A. A., & Warren, W. D. (1973). Maximal rates of excretion and synthesis of urea in normal and cirrhotic subjects. *The Journal of clinical investigation*, 52(9), 2241-2249. <https://doi.org/10.1172/jci107410>
- Segovia-Zafra, A., Di Zeo-Sánchez, D. E., López-Gómez, C., Pérez-Valdés, Z., Garcia-Fuentes, E., Andrade, R. J., ... & Villanueva-Paz, M. (2021). Preclinical models of idiosyncratic drug-induced liver injury (iDILI): Moving towards prediction. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.11.013>

- Shaw, P. J., Ganey, P. E., & Roth, R. A. (2010). Idiosyncratic drug-induced liver injury and the role of inflammatory stress with an emphasis on an animal model of trovafloxacin hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, *118*(1), 7-18. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq168>
- Sibulesky, L. (2013). Normal liver anatomy. *Clinical liver disease*, *2*(Suppl 1), S1. <https://doi.org/10.1002%2Fclld.124>.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*, *7*(9), 880-885. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400779>
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., ... & Taniguchi, H. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, *499*(7459), 481-484. <https://doi.org/10.1038/nature12271>
- Takeuchi, A., Miyamoto, T., Yamaji, K., Masuho, Y., Hayashi, M., Hayashi, H., & Onozaki, K. (1995). A human erythrocyte-derived growth-promoting factor with a wide target cell spectrum: identification as catalase. *Cancer Research*, *55*(7), 1586-1589
- Tasnim, F., Huang, X., Lee, C. Z. W., Ginhoux, F., & Yu, H. (2021). Recent advances in models of immune-mediated drug-induced liver injury. *Frontiers in Toxicology*, *3*, 605392. <https://doi.org/10.3389/ftox.2021.605392>
- Temple, R. J., & Himmel, M. H. (2002). Safety of newly approved drugs: implications for prescribing. *Jama*, *287*(17), 2273-2275. <https://doi.org/10.1001/jama.287.17.2273>
- Thomsen, K. L., Jessen, N., Møller, A. B., Aagaard, N. K., Grønbaek, H., Holst, J. J., & Vilstrup, H. (2013). Regulation of urea synthesis during the acute-phase response in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *304*(7), G680-G686. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00416.2012>
- Thomsen, K. L., Nielsen, S. S., Aagaard, N. K., Sandahl, T. D., Grønbaek, H., Frystyk, J., Flyvbjerg, A., & Vilstrup, H. (2010). Tumor necrosis factor-alpha acutely up-regulates urea synthesis in vivo in rats--a hepatic component of inflammatory catabolism?. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, *70*(3), 151-157. <https://doi.org/10.3109/00365511003599537>
- Urtasun, R., & Nieto, N. (2007). Células estrelladas hepáticas y estrés oxidativo. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, *99*(4), 223-230. <https://doi.org/1130-0108/2007/99/4/223-230>
- Ware, B. R., & Khetani, S. R. (2017). Engineered liver platforms for different phases of drug development. *Trends in biotechnology*, *35*(2), 172-183. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.001>
- Wortel, I. M., van der Meer, L. T., Kilberg, M. S., & van Leeuwen, F. N. (2017). Surviving stress: modulation of ATF4-mediated stress responses in normal and malignant cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *28*(11), 794-806. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.07.003>
- Xu, J. J., Henstock, P. V., Dunn, M. C., Smith, A. R., Chabot, J. R., & de Graaf, D. (2008). Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury. *Toxicological sciences*, *105*(1), 97-105. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn109>

- Xu, Z. J., Gu, Y., Wang, C. Z., Jin, Y., Wen, X. M., Ma, J. C., Tang, L. J., Mao, Z. W., Qian, J., & Lin, J. (2019). The M2 macrophage marker *CD206*: a novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology*, *9*(1), 1683347. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1683347>
- Yamashita, Y. I., Imai, K., Mima, K., Nakagawa, S., Hashimoto, D., Chikamoto, A., & Baba, H. (2017). Idiosyncratic drug-induced liver injury: A short review. *Hepatology Communications*, *1*(6), 494-500. <https://doi.org/10.1002/hep4.1064>
- Yang, H., Park, T., Park, D., & Kang, M. G. (2022). Trovafloxacin drives inflammation-associated drug-induced adverse hepatic reaction by changing macrophage polarization. *Toxicology in Vitro*, *82*, 105374. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105374>
- Younus H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International journal of health sciences*, *12*(3), 88–93

11. ANEXO

TABLA 1. RESULTADO DEL TEST DUNNETT SOBRE LOS RESULTADOS DE LA MTT DE LOS CO-CULTIVOS SE REPRESENTAN MEDIANTE * LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LA VIABILIDAD CELULAR EN EL CULTIVO A CADA CONCENTRACIÓN Y EL CONTROL, ES DECIR, SU CULTIVO ANÁLOGO NO TRATADO CON FÁRMACO (0 μ M) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). SE IDENTIFICA DE COLOR MORADO LA ESTADÍSTICA CORRESPONDIENTE AL FÁRMACO SUPERIOR, ASOCIADO CON EL IDILI, MIENTRAS QUE SU ANÁLOGO NO HEPATOTÓXICO SE REPRESENTA DE COLOR ROJO.

	TVX								TGZ							
Concentración [μ M]	25	50	75	125	250	500	750	800	50	75	100	150	175	200	225	250
HepG2					**	**	****	****			**	****	****	****	****	****
							***	****						*	**	****
1:10 (M1:HepG2)		**	**	****	****	****	****	****			*	****	****	****	****	****
						**	****	****						*	***	****
1:5 (M1:HepG2)	*	****	***	****	****	****	****	****		*	****	****	****	****	****	****
						**	****	****						*	*	****
1:2 (M1:HepG2)		****	****	****	****	****	****	****		*	****	****	****	****	****	****
							**	****						**	*	****
	LVX								RGZ							

DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1.	INTRODUCCIÓN.....	76
2.	CUADRO DE PRECIOS DE MANO DE OBRA.....	76
3.	CUADRO DE PRECIOS DE MATERIALES	77
4.	CUADRO DE PRECIOS DE MAQUINARIA	80
5.	CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS.....	81
6.	CUADRO DE PRESUPUESTOS PARCIALES	88
7.	PRESUPUESTO DE BASE DE LICITACIÓN	90

1. INTRODUCCIÓN

En este documento se ha realizado el análisis económico del proyecto a través de una serie de cálculos que se muestran a continuación. El objetivo ha sido calcular el presupuesto del presente proyecto para poder estudiar su viabilidad económica.

Su realización se ha basado principalmente en los recursos empleados y mencionados en el apartado 6, “Materiales y métodos” del primer documento del trabajo. En este sentido, estos han sido clasificados en cuatro grupos, según si forman parte de la mano de obra, los equipos de protección individual, los materiales, o la maquinaria utilizada. Los códigos asociados a cada tipo de recurso se muestran en la *Tabla 1*.

TABLA 1. TIPOS DE RECURSOS EMPLEADOS EN EL PROYECTO Y SUS CORRESPONDIENTES CÓDIGOS.

Código	Recurso
MO.	Mano de obra
MAT.	Materiales
EPI.	Equipos de protección individual
MAQ.	Maquinaria

Se han elaborado tres cuadros de precios, correspondientes a la mano de obra, los materiales y la maquinaria requerida, en cada uno de los cuales se ha especificado el precio de cada unidad, la cantidad utilizada y el precio total de cada recurso.

Posteriormente, se ha elaborado el cuadro de precios descompuestos y a partir de ello se ha calculado el presupuesto parcial para cada capítulo.

A continuación, se ha obtenido el presupuesto de ejecución material, el presupuesto de ejecución por contrata y finalmente el presupuesto de base de licitación necesario que ha sido necesario para el proyecto.

2. CUADRO DE PRECIOS DE MANO DE OBRA

El precio de la mano de obra requerida para la realización del proyecto se presenta en la *Tabla 2*. Aunque a pesar de que la autora del trabajo ha sido incluida como estudiante de ingeniería biomédica en calidad de ingeniera biomédica *junior*, no ha recibido remuneración económica alguna por ello.

El cálculo del coste por hora de cada trabajador se ha calculado en la *Tabla 3* teniendo en cuenta el sueldo bruto de cada uno de ellos, las pagas extra proporcionales a los 5 meses trabajados (de enero de 2023 a mayo de 2023) y el porcentaje correspondiente a la Seguridad Social, que es del 30% según ha sido establecido por el Ministerio de Inclusión, Seguridad Social y Migraciones en el Régimen General de la Seguridad Social de 2023. Se ha considerado una jornada laboral de 8 horas, lo que conlleva un total de 1760 horas trabajadas al año, descontando un mes de vacaciones, los fines de semana y los días no laborables.

TABLA 2. CUADRO DE MANO DE OBRA.

Nº	Código	Unidad	Denominación	Importe		
				Precio unitario (€)	Cantidad	Precio total (€)
1	MO.IBJ	Horas	Ingeniera Biomédica Junior	12,00	395,50	4746,00
2	MO.IP	Horas	Cotutora investigadora predoctoral	15,00	335,50	5032,50
3	MO.T1	Horas	Cotutora responsable del proyecto	36,00	43,00	1548,00
4	MO.T2	Horas	Tutora responsable del proyecto	36,00	37,00	1332,00
Total mano de obra (€):						12.659

TABLA 3. CÁLCULO DEL COSTE CADA MANO DE OBRA

Código	Salario bruto (€)/mes	Pagos extra/mes	Seguridad Social mensual (€)	Horas trabajadas/año	Coste (€)/hora
MO.IBJ	1200	200	360	1760	12
MO.IP	1500	250	450	1760	15
MO.T1	3600	600	1080	1760	36
MO.T2	3600	600	1080	1760	36

3. CUADRO DE PRECIOS DE MATERIALES

En la *Tabla 4* se han computado los costes asociados a los materiales y los equipos de protección individual utilizados en el proyecto.

TABLA 4. CUADRO DE MATERIALES

Nº	Código	Unidad	Denominación	Importe		
				Precio unitario (€)/unidad	Cantidad	Precio total (€)
1	EPI.G	ud	Caja de guantes de nitrilo (100 unidades)	6,45	8,00	51,60
2	EPI.B	ud	Bata de laboratorio	20,00	2,00	40,00
3	MAT.AD	L	Agua destilada	0,97	0,04	0,04
4	MAT.HEP	Vial	Células HepG2 (ATCC HB-8065)	595,00	1,00	595,00
5	MAT.THP	Vial	Células THP-1 (ATCC TIB-202)	595,00	1,00	595,00
6	MAT.F12	L	Medio de cultivo F12 (Gibco)	88,08	0,58	51,32

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

7	MAT.L15	L	Medio de cultivo L15 (Gibco)	74,70	0,58	43,53
8	MAT.RPM	L	Medio de cultivo RPMI Glutamax (Gibco)	67,52	1,05	71,14
9	MAT.DMEM	L	Medio DMEM sin rojo fenol (Gibco)	34,78	0,024	0,83
10	MAT.GLUT	mL	L-Glutamina	0,21	3,00	0,63
11	MAT.GLUC	mL	Glucosa	0,04	3,00	0,12
12	MAT.SBF	mL	Suero Bovino Fetal (LINU- 8460)	1,20	11,77	14,13
13	MAT.BSA	mL	Albúmina de Suero Bovino (Sigma)	0,13	10,00	1,25
14	MAT.BC	mL	Bicarbonato comercial (Grifols)	0,13	5,00	0,63
15	MAT.PS	mL	Antibiótico Pen-Strep Penicillin y Streptomycin (Gibco)	0,15	83,00	12,62
16	MAT.TRI	mL	Tripsina	0,07	120,00	8,64
17	MAT.PBS	L	Tampón fosfato salino 1X	18,70	1,74	32,54
18	MAT.PMA	mg	Forbol-12-miristato-13- acetato (Sigma, 1 MG)	126,00	1,00	126,00
19	MAT.LPS	mL	Lipopolisacárido (Sigma, 2ML)	293,00	2,00	586,00
20	MAT.IFN	mg	Interferón (PeproTech)	1890,00	1,00	1890,00
21	MAT.PFA	mL	Paraformaldehído	18,00	10,00	180,00
22	MAT.TRIT	mL	Reactivo Triton X100	6,82	2,00	13,64
23	MAT.Hoe	mL	Hoechst (Thermo Scientific)	25,00	0,05	1,25
24	MAT.TW	mL	Tween (Sigma)	0,64	2,00	1,27
25	MAT.MTT	g	Reactivo MTT (1G)	102,00	1,50	153,00
26	MAT.DMSO	L	Dimetilsulfóxido	91,80	0,30	27,32
27	MAT.TVX	mg	Trovafoxacino (Sigma, 5MG)	23,00	5,00	115,00
28	MAT.LVX	mg	Levofloxacino (Sigma, 5MG)	1,91	5,00	9,55
29	MAT.TGZ	mg	Troglitazona (Sigma, 100 MG)	53,20	5,00	266,00
30	MAT.RGZ	mg	Rosiglitazona (Sigma, 10 MG)	0,62	5,00	3,12
31	MAT.UREA	ud	QuantiChrom™ Urea Assay Kit (Byoassays Systems)	177,00	1,00	177,00
32	MAT.ALB	ud	Human Albumin ELISA kit (Bethyl)	590,81	1,00	590,81
33	MAT.RNA	ud	Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen)	423,70	1,00	423,70
34	MAT.RT	ud	Kit Reactivo M-MLV, RNease Out, DTT y Buffer 5X	361,00	1,00	361,00
35	MAT.NTP	μL	dNTP's	0,75	685,00	513,75
36	MAT.dT14	μg	Primer oligo dT14	4,80	150,00	720,00

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

37	MAT.SYBR	mL	Reactivo SYBR Green Master	91,25	0,60	54,75
38	MAT.QY	mL	Colorante QY amarillo	0,75	0,70	0,52
39	MAT.TE	mL	Buffer TE (trisacetato EDTA)	1,20	0,60	0,72
40	MAT.XC	g	Colorante XC azul	2,47	0,006	0,01
41	MAT.ET	L	Etanol 100%	25,43	0,042	1,07
42	MAT.AALB	µg	Goat anti-Human Albumin (Bethyl)	0,25	38,00	9,50
43	MAT.AALBg	µg	Alexa fluor 488 donkey anti-Goat (Invitrogen)	0,50	38,00	19,00
44	MAT.CD68	µg	Recombinant anti-CD68 mouse antibody (ABCAM)	0,60	38,00	22,80
45	MAT.CD68r	µg	Alexa fluor 594 donkey anti-mouse (Invitrogen)	0,32	38,00	12,16
46	MAT.CD163	µg	Recombinant Alexa anti-CD163 rabbit antibody (ABCAM)	0,27	38,00	10,26
47	MAT.CD163g	µg	Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen)	0,21	38,00	7,98
48	MAT.P96W	ud	Placa de cultivo de 96 pocillos transparente	3,60	30,00	108,00
49	MAT.P12W	ud	Placa de cultivo de 12 pocillos transparente	2,64	27,00	71,28
50	MAT.PRIM	ud	Primers específicos	6,00	26,00	156,00
51	MAT.FT75	ud	Frasco T75	3,80	20,00	76,00
52	MAT.PP	ud	Pipeta Pasteur	0,30	96,00	28,80
53	MAT.EP01	ud	Tubos de Eppendorf de 2 mL	0,09	167,00	15,03
54	MAT.EP02	ud	Tubos de Eppendorf de 1,5 mL	0,08	246,00	19,68
55	MAT.EP03	ud	Tubos de Eppendorf de 0,5 mL	0,07	132,00	9,24
56	MAT.P384	ud	Placa de 384 pocillos	3,86	6,00	23,16
57	MAT.PIP01	ud	Pipeta multicanal 20-200 µL	852,00	1,00	852,00
58	MAT.PIP02	ud	Pipeta electrónica de 20 µL	402,00	1,00	402,00
59	MAT.PIPET	ud	Pipeta "Fastpette" electrónica	280,00	1,00	280,00
60	MAT.PIP03	ud	Micropipeta 100-1000 µL (Thermo)	195,00	1,00	195,00
61	MAT.PIP04	ud	Micropipeta 20-200 µL (Thermo)	189,00	1,00	189,00
62	MAT.PIP05	ud	Micropipeta 1-10 µL (Thermo)	207,00	1,00	207,00
63	MAT.BV	ud	Botella de vidrio 500 mL	5,50	1,00	5,50
64	MAT.P01	ud	Caja puntas micropipeta 1000 µL	66,10	20,00	1322,00
65	MAT.P02	ud	Caja puntas micropipeta 200 µL	37,50	18,00	675,00

66	MAT.P03	ud	Caja puntas micropipeta 10 µL	57,00	2,00	114,00
67	MAT.ESP	ud	Espátula metálica	3,75	1,00	3,75
68	MAT.F01	ud	Tubo Falcon 50 mL	0,15	35,00	5,25
69	MAT.F03	ud	Tubo Falcon 15 mL	0,10	52,00	5,20
70	MAT.TC	ud	Tubo centrífuga	0,10	25,00	2,50
71	MAT.VP	ud	Vaso de precipitados de 3L plástico	2,00	4,00	8,00
72	MAT.GRAD01	ud	Gradilla para tubos Falcon	5,00	1,00	5,00
73	MAT.GRAD02	ud	Gradilla para tubos Eppendorf	4,80	1,00	4,80
74	MAT.FILT	ud	Filtro (Corning® 250 mL Vacuum Filter 431096)	115,00	1,00	115,00
75	MAT.ALU	m	Papel de aluminio	0,16	1,00	0,16
Total materiales (€):						12.714,55

4. CUADRO DE PRECIOS DE MAQUINARIA

En la *Tabla 5* se ha estimado el coste asociado a cada equipo empleado en el proyecto. Para ello, se ha calculado el factor de amortización asociado a cada uno, como el precio de compra (C) dividido entre el producto del número aproximado de horas de uso al año (T_{uso}) por el periodo de amortización o años de vida útil (P_a), que es de 10 años para este tipo de equipos, tal y como dicta la Agencia Tributaria para equipos electrónicos (*Ecuación 1*). Posteriormente, el cálculo del coste total de la máquina se obtiene multiplicando por el número de horas que se ha utilizado para el presente trabajo.

$$\text{Factor de amortización} = A = \frac{C}{T_{uso} * P_a}$$

ECUACIÓN 1. FACTOR DE AMORTIZACIÓN

TABLA 5. CUADRO DE MAQUINARIA

Nº	Código	Unidad	Denominación	Importe		
				Precio unitario (€/hora)	Cantidad	Precio total (€)
1	MAQ.CFL	Horas	Cabina de flujo laminar (Faster TWO30)	0,17	241,50	40,25
2	MAQ.INC	Horas	Incubador de CO2	0,39	3720,00	1463,20
3	MAQ.CF01	Horas	Centrífuga Biocen 22 R. OrtoArlesa	0,31	1,30	0,41
4	MAQ.CF02	Horas	Centrífuga Thermo Scientific Megafuge 402	0,53	5,00	2,63
5	MAQ.CF03	Horas	Centrifuga para placas de 384 pocillos	0,43	0,20	0,09
6	MAQ.NEU	Horas	Cámara de Neubauer	0,01	2,50	0,03
7	MAQ.CONG	Horas	Ultracongelador vertical	0,50	744,00	372,00

8	MAQ.HMR	Horas	Microscopio Leica HMR del fabricante Leica Microsystems	0,11	3,00	0,34
9	MAQ.LAB	Horas	Lector de absorbancia Synergy H1 de BioTek	0,29	19,50	5,72
10	MAQ.CEG	Horas	Campana de extracción de gases	0,23	9,60	2,24
11	MAQ.ENT	Horas	Espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 de Thermo Scientific	0,30	3,00	0,90
12	MAQ.MO	Horas	Microscopio Óptico	0,10	2,50	0,25
13	MAQ.BP	Horas	Balanza de precisión Mettler Toledo (XS105 dualrange)	0,07	1,50	0,11
14	MAQ.AGIT	Horas	Agitador de balanceo (DRS-12)	0,06	144,00	8,16
15	MAQ.NEV	Horas	Nevera (Liebherr)	0,05	144,00	7,60
16	MAQ.TERM	Horas	Termociclador LigthCycler 480 Real-Time PCR Applied Biosystems™	0,64	9,00	5,76
17	MAQ.TRT	Horas	Veriti™ Thermal Cycler, 96-Well	0,33	7,50	2,50
18	MAQ.BAN	Horas	Baño de agua 5 Litros	0,05	241,50	12,75
Total maquinaria (€):						1.924,93

5. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS

Los precios descompuestos dividen el proyecto en capítulos y subcapítulos, de forma que dan a conocer el coste de cada uno de los procedimientos realizados en el presente trabajo (Tabla 6). Los capítulos han sido elaborados en función de los procedimientos explicados en el apartado de “Métodos” del Documento I.

TABLA 6. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS

Nº Código	Descripción				
Capítulo 1. Cultivos celulares					
1.1	Cultivos THP-1. Siembra de las placas solo con THP-1 y mantenimiento de las mismas (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.THP	Células THP-1	0,08	Vial	595,00	49,58
MAT.RPM	Medio de cultivo RPMI Glutamax	0,11	L	67,52	7,14
MAT.SBF	Suero Bovino Fetal	3,52	mL	1,20	4,23
MAT.PS	Antibiótico P/S	2,81	mL	0,15	0,43
MAQ.INC	Incubador de CO2	354,29	Horas	0,39	139,35
MAQ.CF02	Centrífuga Megafuge 402	0,48	Horas	0,53	0,25
MAQ.NEU	Cámara de Neubauer	0,24	Horas	0,01	0,0027

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

MAQ.MO	Microscopio Óptico	0,24	Horas	0,10	0,02
MAQ.BAN	Baño de agua 5 Litros	23,00	Horas	0,05	1,21
MAQ.CFL	Cabina de flujo laminar	23,00	Horas	0,17	3,83
MAT.P12W	Placa de cultivo de 12 pocillos	2,00	ud	2,64	5,28
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	23,00	Horas	12,00	276,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	23,00	Horas	15,00	345,00
	Costes indirectos	3,00	%	832,33	24,97
	Recursos auxiliares	3,00	%	857,30	25,72
Total del capítulo 1.1 (€)					883,02

1.2	Cultivos y co-cultivos de HepG2 y THP-1 (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.HEP	Células HepG2	0,33	Vial	595,00	198,33
MAT.THP	Células THP-1	0,25	Vial	595,00	148,75
MAT.F12	Medio comercial F12	0,17	L	88,08	14,68
MAT.L15	Medio comercial L15	0,17	L	74,70	12,45
MAT.GLUT	L-Glutamina	0,83	mL	0,21	0,18
MAT.GLUC	Glucosa	0,83	mL	0,04	0,03
MAT.SBF	Suero Bovino Fetal	0,40	mL	1,20	0,48
MAT.BSA	Albúmina de Suero Bovino	1,33	mL	0,13	0,17
MAT.BC	Bicarbonato	1,50	mL	0,13	0,19
MAT.PS	Antibiótico P/S	23,86	mL	0,15	3,63
MAT.TRI	Tripsina	40,00	mL	0,07	2,88
MAT.PBS	PBS 1X	0,06	L	18,70	1,06
MAT.P12W	Placa de cultivo de 12 pocillos	7,00	ud	2,64	18,48
MAT.P96W	Placa de cultivo de 96 pocillos	10,00	ud	3,60	36,00
MAT.RPM	Medio de cultivo RPMI Glutamax	0,19	L	67,52	12,49
MAQ.INC	Incubador de CO2	354,29	Horas	0,39	139,35
MAQ.CF02	Centrífuga Megafuge 402	1,19	Horas	0,53	0,63
MAQ.NEU	Cámara de Neubauer	0,60	Horas	0,01	0,01
MAQ.MO	Microscopio Óptico	0,60	Horas	0,10	0,06
MAQ.BAN	Baño de agua 5 Litros	23,00	Horas	0,05	1,21
MAQ.CFL	Cabina de flujo laminar	23,00	Horas	0,17	3,83
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	23,00	Horas	12,00	276,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	23,00	Horas	15,00	345,00
	Costes indirectos	3,00	%	1215,88	36,48
	Recursos auxiliares	3,00	%	1252,36	37,57
Total del capítulo 1.2 (€)					1.289,93

1.3	Diferenciación THP-1. Diferenciación de las células THP-1 a macrófagos proinflamatorios (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.PMA	PMA	0,33	mg	126,00	42,00
MAT.LPS	Lipopolisacárido	0,67	mL	293,00	195,33
MAT.IFN	Interferón	0,33	mg	1890,00	630,00
MAQ.BAN	Baño de agua 5 Litros	11,50	Horas	0,05	0,61

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

MAQ.CFL	Cabina de flujo laminar	11,50	Horas	0,17	1,92
MAQ.INC	Incubador de CO2	177,14	Horas	0,39	69,68
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	11,50	Horas	12,00	138,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	11,50	Horas	15,00	172,50
	Costes indirectos	3,00	%	1250,03	37,50
	Recursos auxiliares	3,00	%	1287,53	38,63
Total del capítulo 1.3 (€)					1.326,16

Capítulo 2. Pruebas de viabilidad celular e incubaciones con fármacos

2.1	Incubaciones de los cultivos con los fármacos TVX, LVX, TGZ y RGZ (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.TVX	Trovafloxacino	1,67	mg	23,00	38,33
MAT.LVX	Levofloxacino	1,67	mg	1,91	3,18
MAT.TGZ	Troglitazona	1,67	mg	53,20	88,67
MAT.RGZ	Rosiglitazona	1,67	mg	0,62	1,04
MAT.DMSO	Dimetilsulfóxido (DMSO)	8	0,000 L	91,80	0,07
MAT. RPM	Medio de cultivo RPMI Glutamax	0,01	L	67,52	0,72
MAT.F12	Medio comercial F12	0,003	L	88,08	0,23
MAT.L15	Medio comercial L15	0,003	L	74,70	0,20
MAT.GLUT	L-Glutamina	0,08	mL	0,21	0,02
MAT.GLUC	Glucosa	0,08	mL	0,04	0,0033
MAT.SBF	Suero Bovino Fetal	0,0005	mL	1,20	0,0006
MAT.BSA	Albúmina de Suero Bovino	0,17	mL	0,13	0,02
MAT.BC	Bicarbonato	0,08	mL	0,13	0,01
MAT.PS	Antibiótico P/S	0,50	mL	0,15	0,08
MAQ.BAN	Baño de agua 5 Litros	11,50	Horas	0,05	0,61
MAQ.CFL	Cabina de flujo laminar	11,50	Horas	0,17	1,92
MAQ.INC	Incubador de CO2	177,14	Horas	0,39	69,68
MAQ.BP	Balanza de precisión Mettler Toledo	0,50	Horas	0,07	0,04
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	11,50	Horas	12,00	138,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	11,50	Horas	15,00	172,50
	Costes indirectos	3,00	%	515,32	15,46
	Recursos auxiliares	3,00	%	530,77	15,92
Total del capítulo 2.1 (€)					546,70

2.2	Ensayo de viabilidad MTT (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.DMSO	Dimetilsulfóxido (DMSO)	0,10	L	91,80	9,03
MAT. RPM	Medio de cultivo RPMI Glutamax	0,05	L	67,52	3,36
MAT.F12	Medio comercial F12	0,02	L	88,08	2,19
MAT.L15	Medio comercial L15	0,02	L	74,70	1,86
MAT.GLUT	L-Glutamina	0,08	mL	0,21	0,02
MAT.GLUC	Glucosa	0,08	mL	0,04	0,0033

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

MAT.SBF	Suero Bovino Fetal	0,0028	mL	1,20	0,0034
MAT.BSA	Albúmina de Suero Bovino	0,17	mL	0,13	0,02
MAT.BC	Bicarbonato	0,08	mL	0,13	0,01
MAT.PS	Antibiótico P/S	0,50	mL	0,15	0,08
MAT.PBS	PBS 1X	0,10	L	18,70	1,84
MAT.MTT	Reactivo MTT (1G)	0,50	g	102,00	51,00
MAT.ALU	Papel de aluminio	0,07	m	0,16	0,01
MAQ.BAN	Baño de agua 5 Litros	11,50	Horas	0,05	0,61
MAQ.CFL	Cabina de flujo laminar	11,50	Horas	0,17	1,92
MAQ.LAB	Lector de absorbancia	5,50	Horas	0,29	1,61
MAQ.INC	Incubador de CO2	177,14	Horas	0,39	69,68
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	11,50	Horas	12,00	138,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	11,50	Horas	15,00	172,50
	Costes indirectos	3,00	%	453,74	13,61
	Recursos auxiliares	3,00	%	467,36	14,02
Total del capítulo 2.2 (€)					481,38

Capítulo 3. Estudios morfológicos

3.1	Inmunofluorescencia (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.AALB	Goat anti-Human Albumin Antibody	6,33	µg	0,25	1,58
MAT.AALBg	Alexa fluor 488 donkey anti-Goat	6,33	µg	0,50	3,17
MAT.CD68	Anti-CD68 mouse antibody	6,33	µg	0,60	3,80
MAT.CD68r	Alexa fluor 594 donkey anti-mouse	6,33	µg	0,32	2,03
MAT.CD163	Alexa anti-CD163 rabbit antibody	6,33	µg	0,27	1,71
MAT.CD163 g	Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit	6,33	µg	0,21	1,33
MAT.PBS	Tampón fosfato salino 1X	0,21	L	18,70	3,97
MAT.PFA	Paraformaldehído	1,67	mL	18,00	30,00
MAT.TRIT	Reactivo Triton X100	0,33	mL	6,82	2,27
MAT.Hoe	Hoechst (Thermo Scientific)	0,01	mL	25,00	0,21
MAT.TW	Tween (Sigma)	0,33	mL	0,64	0,21
MAT.BSA	Albúmina de Suero Bovino (Sigma)	0,83	mL	0,13	0,10
MAT.PP	Pipeta Pasteur	16,00	ud	0,30	4,80
MAT.ALU	Papel de aluminio	0,10	m	0,16	0,02
MAQ.CEG	Campana de extracción de gases	0,10	Horas	0,23	0,0233
MAQ.HMR	Microscopio Leica HMR	0,50	Horas	0,11	0,06
MAQ.AGIT	Agitador de balanceo (DRS-12)	24,00	Horas	0,06	1,36
MAQ.NEV	Nevera (Liebherr)	24,00	Horas	0,05	1,27
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	2,00	Horas	12,00	24,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	2,00	Horas	15,00	30,00
	Costes indirectos	3,00	%	111,91	3,36
	Recursos auxiliares	3,00	%	115,27	3,46
Total del capítulo 3.1 (€)					118,73

Capítulo 4. Estudios de expresión génica					
4.1	Extracción de RNA (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.RNA	Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen)	0,17	ud	423,70	70,62
MAT.ET	Etanol 100%	0,01	L	25,43	0,18
MAQ.ENT	Espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 de Thermo Scientific	0,50	Horas	0,30	0,15
MAQ.CF01	Centrífuga OrtoArlesa	0,17	Horas	0,31	0,05
MAT.AD	Agua destilada	0,0067	L	0,97	0,0065
MAQ.CEG	Campana de extracción de gases	1,50	Horas	0,23	0,35
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	1,50	Horas	12,00	18,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	1,50	Horas	15,00	22,50
	Costes indirectos	3,00	%	111,85	3,36
	Recursos auxiliares	3,00	%	115,21	3,46
Total del capítulo 4.1 (€)					118,67
4.2	Retrotranscripción RNA (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.AD	Agua destilada	0,0002	L	0,97	0,0002
MAT.RT	Kit Reactivo M-MLV, RNease Out, DTT y Buffer 5X	0,17	ud	361,00	60,17
MAT.NTP	dNTP's	114,17	µL	0,75	85,63
MAT.dT14	Primer oligo dT14	25,00	µg	4,80	120,00
MAQ.TRT	Applied Biosystems™ Veriti™ Thermal Cycler, 96-Well	1,25	Horas	0,64	0,80
MAQ.CONG	Ultracongelador vertical	124,00	Horas	0,50	62,00
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	1,00	Horas	12,00	12,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	1,00	Horas	15,00	15,00
	Costes indirectos	3,00	%	355,59	10,67
	Recursos auxiliares	3,00	%	366,26	10,99
Total del capítulo 4.2 (€)					377,25
4.3	qPCR (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.SYBR	Reactivo SYBR Green Master	0,10	mL	91,25	9,13
MAT.QY	Colorante QY amarillo	0,12	mL	0,75	0,09
MAT.TE	Buffer TE (trisacetato EDTA)	0,10	mL	1,20	0,12
MAT.XC	Colorante XC azul	0,0010	g	2,47	0,002
MAT.PRIM	Primers específicos	4,33	ud	6,00	26,00
MAT.AD	Agua destilada	0,0004	L	0,97	0,0004
MAT.P384	Placa de 384 pocillos	1,00	ud	3,86	3,86
MAQ.CF03	Centrífuga placas 384 pocillos	0,0333	Horas	0,43	0,01
MAQ.TPCR	Termociclador LigthCycler	1,50	Horas	0,64	0,96
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	2,00	Horas	12,00	24,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	2,00	Horas	15,00	30,00

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

Costes indirectos	3,00	%	94,17	2,83
Recursos auxiliares	3,00	%	96,99	2,91
Total del capítulo 4.3 (€)				99,90

Capítulo 5. Pruebas de funcionalidad

5.1	Cuantificación de la albúmina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.ALB	Human Albumin ELISA kit (Bethyl)	0,33	ud	590,81	196,94
MAT.DMEM	Medio DMEM sin rojo fenol (Gibco)	0,008	L	34,78	0,28
MAQ.CF01	Centrífuga OrtoArlesa	0,05	Horas	0,31	0,02
MAQ.LAB	Lector de absorbancia	0,50	Horas	0,29	0,15
MAT.ALU	Papel de aluminio	0,03	m	0,16	0,01
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	2,00	Horas	12,00	24,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	2,00	Horas	15,00	30,00
	Costes indirectos	3,00	%	251,38	7,54
	Recursos auxiliares	3,00	%	258,92	7,77
Total del capítulo 5.1 (€)					266,69

5.2	Ureogénesis (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MAT.UREA	QuantiChrom™ Urea Assay Kit	0,33	ud	177,00	59,00
MAT.AD	Agua destilada	0,0001	L	0,97	0,0001
MAT.ALU	Papel de aluminio	0,03	m	0,16	0,01
MAQ.CF01	Centrífuga OrtoArlesa	0,05	Horas	0,31	0,02
MAQ.LAB	Lector de absorbancia	0,50	Horas	0,29	0,15
MO.IBJ	Ingeniera biomédica	2,00	Horas	12,00	24,00
MO.IP	Investigadora predoctoral	2,00	Horas	15,00	30,00
	Costes indirectos	3,00	%	113,17	3,40
	Recursos auxiliares	3,00	%	116,56	3,50
Total del capítulo 5.2 (€)					120,06

Capítulo 6. Equipos de protección individual y seguridad

6.1	Materiales de protección individual (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
EPI.G	Caja de guantes de nitrilo	4,00	ud	6,45	25,80
EPI.B	Bata de laboratorio	1,00	ud	20,00	20,00
	Costes indirectos	3	%	45,8	1,374
Total del capítulo 6.1 (€)					47,17

Capítulo 7. Material inventariable/fungible

7.1	Material inventariable/fungible (ud)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
------------	---	----------	--------	----------------------	--------------------

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

MAT.EP01	Tubos de Eppendorf de 2 mL	167,00	ud	0,09	15,03
MAT.EP02	Tubos de Eppendorf de 1,5 mL	246,00	ud	0,08	19,68
MAT.EP03	Tubos de Eppendorf de 0,5 mL	132,00	ud	0,07	9,24
MAT.PIP01	Pipeta multicanal 20-200 µL	1,00	ud	852,00	852,00
MAT.PIP02	Pipeta electrónica de 20 µL	1,00	ud	402,00	402,00
MAT.PIPET	Pipeta "Fastpette" electrónica	1,00	ud	280,00	280,00
MAT.PIP03	Micropipeta 100-1000 µL (Thermo)	1,00	ud	195,00	195,00
MAT.PIP04	Micropipeta 20-200 µL (Thermo)	1,00	ud	189,00	189,00
MAT.PIP05	Micropipeta 1-10 µL (Thermo)	1,00	ud	207,00	207,00
MAT.BV	Botella de vidrio 500 mL	1,00	ud	5,50	5,50
MAT.P01	Caja puntas micropipeta 1000 µL	20,00	ud	66,10	1322,0
MAT.P02	Caja puntas micropipeta 200 µL	18,00	ud	37,50	675,00
MAT.P03	Caja puntas micropipeta 10 µL	2,00	ud	57,00	114,00
MAT.ESP	Espátula metálica	1,00	ud	3,75	3,75
MAT.F01	Tubo Falcon 50 mL	35,00	ud	0,15	5,25
MAT.F03	Tubo Falcon 15 mL	52,00	ud	0,10	5,20
MAT.TC	Tubo centrífuga	25,00	ud	0,10	2,50
MAT.VP	Vaso de precipitados de 3L plástico	4,00	ud	2,00	8,00
MAT.GRADO 1	Gradilla para tubos Falcon	1,00	ud	5,00	5,00
MAT.GRADO 2	Gradilla para tubos Eppendorf	1,00	ud	4,80	4,80
MAT.FT75	Frasco T75	20,00	ud	3,80	76,00
MAT.FILT	Filtro (Corning®)	1,00	ud	115,00	115,00
	Costes indirectos	3,00	%	4510,95	135,33
Total del capítulo 7.1 (€)					4.646,28

Capítulo 8. Reuniones y elaboración del documento

8.1	Planificación (h)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MO.IBJ	Ingeniera Biomédica <i>Junior</i>	10,00	Horas	12,00	120,00
MO.IP	Cotutora investigadora predoctoral	20,00	Horas	15,00	300,00
MO.T1	Cotutora responsable del proyecto	20,00	Horas	36,00	720,00
MO.T2	Tutora responsable del proyecto	20,00	Horas	36,00	720,00
	Costes indirectos	3,00	%	1860,00	55,80
	Recursos auxiliares	3,00	%	1915,80	57,47
Total del capítulo 8.1 (€)					1.973,27
8.2	Resultados (h)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MO.IBJ	Ingeniera Biomédica <i>Junior</i>	8,00	Horas	12,00	96,00
MO.IP	Cotutora investigadora predoctoral	15,00	Horas	15,00	225,00
MO.T1	Cotutora responsable del proyecto	15,00	Horas	36,00	540,00

Nuevos modelos multicelulares para la predicción de la hepatotoxicidad idiosincrática

MO.T2	Tutora responsable del proyecto	15,00	Horas	36,00	540,00
	Costes indirectos	3,00	%	1401,00	42,03
	Recursos auxiliares	3,00	%	1443,03	43,29
Total del capítulo 8.2 (€)					1.486,32
8.3	Redacción y corrección (h)	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (€/ud)	Precio parcial (€)
MO.IBJ	Ingeniera Biomédica <i>Junior</i>	85,00	Horas	12,00	1020,00
MO.IP	Cotutora investigadora predoctoral	8,00	Horas	15,00	120,00
MO.T1	Cotutora responsable del proyecto	8,00	Horas	36,00	288,00
MO.T2	Tutora responsable del proyecto	2,00	Horas	36,00	72,00
	Costes indirectos	3,00	%	1500,00	45,00
	Recursos auxiliares	3,00	%	1545,00	46,35
Total del capítulo 8.3 (€)					1.591,35

6. CUADRO DE PRESUPUESTOS PARCIALES

En la *Tabla 7* se muestra el presupuesto parcial, calculado a partir del presupuesto parcial de cada subcapítulo, y la cantidad de veces que se ha realizado cada uno de ellos.

TABLA 7. CUADRO DE PRESUPUESTOS PARCIALES

Capítulo 1. Cultivos celulares					
Código	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Total (€)
1.1	Cultivos THP-1	ud	3	883,02 €	2.649,07
1.2	Cultivos y co-cultivos de HepG2 y THP-1	ud	3	1.289,93 €	3.869,79
1.2	Diferenciación THP-1	ud	3	1326,160153	3.978,48
Presupuesto parcial del Capítulo 1					10.497,34 €
Capítulo 2. Pruebas de viabilidad celular e incubaciones con fármacos					
Código	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Total (€)
2.1	Incubaciones de los cultivos con los fármacos	ud	3	546,6977717	1.640,09
2.2	Ensayos de viabilidad MTT	ud	3	481,3769983	1.444,13
Presupuesto parcial del Capítulo 2					3.084,22 €
Capítulo 3. Estudios morfológicos					

Código	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Total (€)
3.1	Inmunofluorescencia	ud	6	118,7259732	712,36
Presupuesto parcial del Capítulo 3					712,36 €

Capítulo 4. Estudios de expresión génica

Código	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Total (€)
4.1	Extracción de RNA	ud	6	118,6652458	711,99
4.2	Retrotranscripción RNA	ud	6	377,2474063	2.263,48
4.3	qPCR	ud	6	99,9043721	599,43
Presupuesto parcial del Capítulo 4					3.574,90 €

Capítulo 5. Pruebas de funcionalidad

Código	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Total (€)
5.1	Cuantificación de la albúmina	ud	3	266,69 €	800,07
5.2	Ureogénesis	ud	3	120,0595744	360,18
Presupuesto parcial del Capítulo 5					1.160,25 €

Capítulo 6. Equipos de protección individual y seguridad

Código	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Total (€)
6.1	Materiales de protección individual	ud	2	47,174	94,35
Presupuesto parcial del Capítulo 6					94,35 €

Capítulo 7. Material inventariable/fungible

Código	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Total (€)
7.1	Material inventariable/fungible	ud	1	4646,2785	4.646,28
Presupuesto parcial del Capítulo 7					4.646,28 €

Capítulo 8. Reuniones y elaboración del documento

Código	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Total (€)
8.1	Planificación	ud	1	1973,274	1.973,27
8.2	Resultados	ud	1	1486,3209	1.486,32
8.3	Redacción y corrección	ud	1	1591,35	1.591,35
Presupuesto parcial del Capítulo 8					5.050,94 €

7. PRESUPUESTO DE BASE DE LICITACIÓN

Presupuesto de ejecución material, por contrata y base de licitación

Código	Descripción	Importe
Capítulo 1	Cultivos celulares	10.497,34 €
Capítulo 2	Pruebas de viabilidad celular e incubaciones con fármacos	3.084,22 €
Capítulo 3	Estudios morfológicos	712,36 €
Capítulo 4	Estudios de expresión génica	3.574,90 €
Capítulo 5	Pruebas de funcionalidad	1.160,25 €
Capítulo 6	Equipos de protección individual y seguridad	94,35 €
Capítulo 7	Material inventariable/fungible	4.646,28 €
Capítulo 8	Reuniones y elaboración del documento	5.050,94 €
Presupuesto de ejecución material:		28.820,65 €
	Gastos generales (15%)	4.323,10 €
	Beneficio industrial (0%)	- €
Presupuesto de ejecución por contrata:		33.143,75 €
	IVA (21%)	6.960,19 €
Presupuesto base de licitación		40.103,93 €

El presupuesto de base de licitación asciende a la cantidad de **CUARENTA MIL CIENTO TRES EUROS CON NOVENTA Y TRES CÉNTIMOS**