



Modelos in vitro utilizados para predecir hepatotoxicidad de medicamentos en la fase pre-clínica

In vitro models used to predict drug hepatotoxicity in the pre-clinical phase

KENNEDY, MARIA LUISA¹ *
GALEANO, ANTONIA K.¹

CAMPUZANO-BUBLITZ, MIGUEL A.¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 13 JULIO 2021

FECHA DE ACEPTACIÓN: 20 OCTUBRE 2021

Resumen

El hígado es el órgano principal del cuerpo encargado de mantener la homeostasis interna, además cumple un rol fundamental en el metabolismo de medicamentos (xenobióticos) por lo tanto es vulnerable a lesiones fisiológicas o anatómicas. La lesión hepática inducida por fármacos (DILI) es la causa más común del fracaso del desarrollo pre-clínico y clínico de nuevos medicamentos, y de las advertencias de recuadro negro y el retiro de un medicamento del mercado. Por lo tanto, representa un problema grave para las industrias farmacéuticas, así también para el paciente, profesionales de la salud y las entidades reguladoras. Cabe mencionar que existen dos tipos de lesión hepática inducida por fármacos: farmacológicas o intrínsecas

Abstract

The liver is the main organ of the body whose function is to maintain internal homeostasis, it also plays a fundamental role in the metabolism of drugs (xenobiotics), therefore it is vulnerable to physiological or anatomical injuries. Drug-induced liver injury (DILI) is the most common cause of pre-clinical and clinical development failure of new drugs, black box warnings, and drug recall. Therefore, it represents a serious problem for the pharmaceutical industries, as well as for the patient, health professionals and regulatory entities. It should be mentioned that there are two types of drug-induced liver injury: pharmacological or intrinsic and idiosyncratic. During the pre-clinical stage of the drug development process, candidate drugs are screened using in vitro

¹ DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS. UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCION. PARAGUAY
* AUTOR PARA CORRESPONDENCIA: LUKENROL@QUI.UNA.PY
¹ [HTTPS://ORCID.ORG/0000-0002-6837-8531](https://orcid.org/0000-0002-6837-8531)
² [HTTPS://ORCID.ORG/0000-0002-9360-2793](https://orcid.org/0000-0002-9360-2793)
³ [HTTPS://ORCID.ORG/0000-0003-0592-6171](https://orcid.org/0000-0003-0592-6171)

y la idiosincrásica. Durante la etapa pre-clínica del proceso de desarrollo de un medicamento se realiza un panel de cribado a los medicamentos candidatos empleando modelos celulares in vitro que incluyen sistemas de cultivos en 2D, 3D y líneas celulares de hepatoma humano, aunque también existen otros enfoques en el cual utilizan al pez cebra (reemplazo a los modelos animales) o modelos celulares basados en cribado de alto contenido. Posteriormente se emplean animales que, aunque presenten diferencias específicas respecto al humano a nivel hepatocelular igualmente se utiliza, para realizar predicciones cuantitativas y cualitativas de las principales propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas y toxicológicas del medicamento candidato. Actualmente existe un mayor esfuerzo para ir mejorando algunos modelos in vitro ya existentes, acoplado alguna herramienta o modificándolo genéticamente hacia el producto de interés proporcionando nuevos enfoques útiles para la predicción potencial tóxico a nivel hepático de los medicamentos candidatos.

PALABRAS CLAVE

Hepatotoxicidad, Pre-Clínico, *In Vitro*, Líneas Celulares.

cell models that include 2D, 3D culture systems and human hepatoma cell lines, although other approaches use zebrafish (replacement for animal models), or cell models based on high content screening. Subsequently, animals are used, which despite having specific differences with respect to humans at the hepatocellular level are also used to make quantitative and qualitative predictions of the main pharmacodynamic, pharmacokinetic and toxicological properties of the candidate drug. Currently, there is a major effort to improve some existing in vitro models, coupling a tool or genetically modifying it towards the product of interest, providing new useful approaches for the potential prediction of liver toxicity, of the candidate drugs.

KEYWORDS

Hepatotoxicity, Pre-Clinical, In Vitro, Cell Lines.

INTRODUCCIÓN

El hígado es el órgano principal del cuerpo encargado de mantener la homeostasis interna, además participa en la mayoría de las vías bioquímicas implicadas en crecimiento, reproducción, provisión de nutrientes, y defensa frente a enfermedades (Cómo Funciona el Hígado, 2018; Lee, 2003). Además, es el principal sitio del organismo encargado del metabolismo de medicamentos (xenobióticos), que ocurre en el retículo endoplasmático de los hepatocitos, por lo tanto, es vulnerable a lesiones ya sea funcional o anatómica, lo cual representa un gran problema de salud pública (Cascales et al., 2017).

La lesión hepática inducida por fármacos (DILI de sus siglas en inglés, Drug-induced liver injury) es la causa más común del fracaso del desarrollo pre-clínico, clínico de nuevos medicamentos, advertencias de recuadro negro y el retiro de un medicamento del mercado, por lo tanto, representa un problema grave para las industrias farmacéuticas, así también para el paciente, profesionales de la salud y las entidades reguladoras. La DILI es la



causa más común de muerte por daño hepático agudo y representa cerca del 10% de casos de daño hepático agudo a nivel mundial. Existen dos tipos de lesión hepática inducida por fármacos; farmacológicas o intrínsecas y la idiosincrásica, la primera es dependiente de la dosis y predecible, es decir que a mayor concentración mayor será el daño hepático y su hepatotoxicidad es reproducible en animales, en tanto que, la segunda no es estrictamente dependiente de la dosis y causa hepatotoxicidad inesperada en un número reducido de pacientes susceptibles, que conduce a la elevación asintomática de los niveles séricos de las enzimas hepáticas. La DILI puede presentarse como una insuficiencia hepática aguda o insuficiencia hepática crónica, por lo que dificulta diferenciarlo de otras enfermedades hepáticas, además es frecuente tanto en hombres como en mujeres (Cascales et al., 2017; Fung et al., 2001; Bell & Chalasani, 2009; Marino et al., 2001; Shehu et al., 2017; Tejada, 2010).

Durante la etapa pre-clínica del proceso de desarrollo de un medicamento, se realiza un panel de cribado con modelos in vitro seguidos por estudios en animales para predecir cualitativa y cuantitativamente las principales propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas y toxicológicas del medicamento candidato. Los modelos in vitro se emplean para evaluar metabolismo y captación de fármaco, inducción de enzimas, interacción farmacológica que afecten al metabolismo y la hepatotoxicidad, pero estos modelos que incluyen fracciones hepáticas purificadas y líneas celulares inmortalizadas, carecen del amplio espectro de metabolismo y expresión génica de las células in vivo. En tanto que los experimentos con animales presentan diferencias específicas de especie en cuanto a la función hepatocelular humana, por lo tanto, la predicción de hepatotoxicidad es limitada (Brandon et al., 2003; Davila et al., 1998; Sivaraman et al., 2005; Borchardt et al., 1996; Cross & Bayliss, 2000; E. LeCluyse et al., 1994; Kostadinova et al., 2013).

Es necesario emplear técnicas y métodos más eficaces para lograr predecir, si un nuevo medicamento posee potencial tóxico a nivel hepático en etapas más tempranas de su desarrollo. Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica de modelos in vitro empleados en la fase pre-clínica del desarrollo de medicamentos a fin de detectar hepatotoxicidad.

MODELOS CELULARES HEPÁTICOS IN VITRO

Cultivo en monocapa 2D

Los modelos in vitro de hígado que emplean hepatocitos primarios en diferentes configuraciones se utiliza como cribado para evaluar metabolismo, toxicidad de los medicamentos o las nuevas entidades químicas, transporte, eficacia, proliferación de hepatocitos, sistema de apoyo bioartificial y la

investigación de la regulación de los procesos involucrados. En los cultivos de monocapa de hepatocitos, éstos se siembran sobre un soporte rígido, generalmente plástico, con proteínas de la matriz extracelular (MEC) (colágeno tipo I/IV, fibronectina o biomatrices también conocidos como Matrigel) recubierto de una sola capa, sobre el que adquieren una morfología aplanada. Los hepatocitos humanos cultivados en monocapa muestran funciones hepáticas clave: metabolismo de carbohidratos (síntesis, degradación y acumulación de glucógeno, gluconeogénesis, glicólisis), ureogénesis, síntesis y secreción de proteínas plasmáticas, metabolismo lipídico, síntesis de ácidos biliares y biotransformación de medicamentos (CYP y enzimas de conjugación). Es muy limitado el acceso al tejido hepático de origen humano, y existe una alta variabilidad funcional observada entre los hepatocitos humanos de diferentes donantes, pero es la representación más cercana a la fisiología humana. En cuanto al cultivo primario que emplea hepatocitos de rata, hay una pérdida rápida de la expresión del ARNm de Ntcp (Polipéptido co-transportador de Na⁺-taurocholate, proveniente del ácido taurólico, un ácido biliar involucrado en la emulsificación de grasas) y la capacidad de captación de taurocolato en placas recubiertas de colágeno. Además, los hepatocitos aislados presentan limitaciones tales como la pérdida de las funciones del hígado, en cuestiones de horas cuando se mantienen bajo condiciones estándar de cultivo (Sivaraman et al., 2005; Godoy et al., 2013; Lake et al., 2009; Swift et al., 2010; Guguen-Guillouzo & Guillouzo, 2010; Gómez-Lechón et al., 2014; Liang et al., 1993).

Cultivo 2D en configuración de sándwich

Las células hepáticas son un tipo de célula epitelial polarizada con dominio apical (canalicular) y basolateral (sinusoidal), que están divididos por uniones estrechas. El dominio basolateral interactúa con los componentes de la matriz extracelular (MEC), favoreciendo la conservación de la polaridad y funcionalidad de las células hepáticas. Este modelo fue desarrollado con el fin de prolongar la función de los hepatocitos, mantenimiento de la polaridad, transportadores y enzimas metabólicas (CYP), evitando así cambios del citoesqueleto, reducción del debilitamiento celular y en consecuencia la estabilización de la interacción célula-célula. En este sistema la monocapa de células hepáticas entre capas contiene mayormente colágeno tipo I (derivados de proteoglicanos, colágeno blando o matrigel que conduce a la formación de una red canalicular extensa). Dentro de este contexto los hepatocitos mantienen durante aproximadamente dos semanas las funciones hepáticas in vivo clave tales como la síntesis y secreción de albúmina, capacidad para el metabolismo y transporte de fármacos, secreción de urea, morfología poligonal, para luego finalmente volverse necrótica según evaluaciones genómicas y proteómicas. El cultivo en sándwich permite determinar el índice de excreción de sales biliares mediante la medición de la



secreción canalicular de sustancias, por lo cual es útil para estudios de transporte hepatobiliar y lesión hepática colestática (Cascales et al., 2017; Godoy et al., 2013; Lauschke et al., 2016; Kienhuis et al., 2007; LeCluyse et al., 1994).

Cultivo de hepatocitos en 3D

Las células hepáticas in vivo tienen una organización y morfología 3D compleja. Se sabe que los hepatocitos presentan una forma poligonal y son multipolares presentando al menos dos superficies basolaterales y dos apicales, por lo tanto mantener la función parenquimatosa del hígado ex vivo es fundamental para obtener hepatocitos completamente funcionales para generar modelos que permitan una evaluación más realista del metabolismo de medicamentos y las reacciones adversas, expandir hepatocitos primarios para generar trasplantes en pacientes y construir dispositivos bioartificiales, sin embargo en el cultivo de células hepáticas en 2D existe una reducción de las funciones hepáticas principales que incluyen a las enzimas metabólicas y la producción de albúmina. Por lo tanto, existe una necesidad de tecnologías que permitan modelos 3D más predictivos, debido a que éstos presentan mayor supervivencia, capacidad metabólica y funcional, lo cual hace posible evaluar tratamientos prolongados con dosis única o repetida de medicamentos lo cual permite una mejor predicción in vitro del metabolismo y la hepatotoxicidad. Para ello existen tres técnicas para el montaje de cultivos en 3D que se mencionan a continuación.

Sistemas esféricos 3D

Los esféricos se pueden obtener por un lado mediante la incorporación de hepatocitos en hidrogeles no adhesivos (sin andamios), que incluyen alginato, matrigel, colágeno y péptidos de autoensamblaje, que conducen a la polimerización de los hepatocitos y el cultivo dentro del hidrogel donde se encuentran encapsulados. Cabe mencionar que el MatrigelTM está basado en MEC proveniente de sarcoma de ratón, ExtracelTM basado en colágeno útil para prolongar la actividad de enzimas metabólicas (CYP) en condiciones in vitro, AlgimatrixTM basado en esponja de alginato, sin embargo, no es representativo de la MEC de mamíferos, pero se ha demostrado que su empleo para el cultivo de hepatocitos primarios de rata conduce a una mayor síntesis de albúmina, PuramatrixTM basado en péptidos lo cual induce a la diferenciación de células progenitoras de hígado de rata en células hepáticas con características de regulación para obtener una mayor producción de albúmina y actividad de enzimas metabólicas (CYP). Por otro lado, también se pueden emplear matrices sólidas 3D (andamios) ya sea de origen natural derivado del hígado de rata o sintético como el alginato y poliestireno. Las ventajas ofrecidas por la de origen natural son biocompatibilidad, imitación de las interacciones célula-célula, biodegradabilidad y compatibilidad con

la función hepática a largo plazo; en cambio los sintéticos ofrecen reproducibilidad y estabilidad. Cabe mencionar, la importancia crítica del tamaño de los esferoides (200-300 μ m) para lograr una distribución celular uniforme, migración celular y supervivencia celular que es fundamental para la difusión adecuada de nutrientes, oxígeno y eliminación de desechos metabólicos (secreción acumulada de bilis), los cuales se ven afectados cuando el tamaño es mayor, que conduce a la generación de células necróticas/hipóxicas en el centro del esferoide. De acuerdo a una evaluación reciente en el cual emplean esferoides de co-cultivo de hepatocitos con células no parenquimatosas (NCP) que representa un sistema útil para evaluar patologías hepáticas como la colestasis, esteatosis, hepatitis vírica y hepatotoxicidad inducida por fármacos, también se reportó que adaptando este sistema se pueden obtener cultivos de alto rendimiento (Cascales et al., 2017; Sivaraman et al., 2005; Bissell et al., 1987; Tateno & Yoshizato, 1996; Koebe et al., 1994; Glicklis et al., 2000; Bell et al., 2016).

Sistema microfluídico

La incorporación de canales microfluídicos biocompatibles sintéticos o naturales a los sistemas de cultivo 3D, representa un paso decisivo y necesario para controlar la pobre difusión de oxígeno y nutrientes a través de los esferoides, agregados célula-célula y MEC, para así obtener un modelo de cultivo hepático enteramente funcional, que logre imitar la arquitectura del lóbulo hepático in vivo que es utilizado en investigación toxicológica a través de la evaluación de la tasa de eliminación in vivo y farmacológica, para lo cual se ha demostrado que este sistema proporciona datos más correlacionados con los datos in vivo, lo cual se debe a que se puede diseñar y ajustar la velocidad del flujo dentro de los canales, así como la concentración de fármacos (Cascales et al., 2017; Godoy et al., 2013; Gómez-Lechón et al., 2014; Novik et al., 2010; Marion et al., 2012).

Plataforma de hígado en un chip (liver-on-a-chip) o HepaTox Chip

Es una tecnología que puede recrear a microescala las funciones hepáticas en condiciones in vitro. Consiste en una plataforma de colágeno sobre la cual se encuentran inmovilizadas las células hepáticas y canales microfluídicos por medio del cual circula el medio de cultivo que fluye a los hepatocitos. El soporte puede ser biodegradable lo que implica que con el tiempo puede ser sustituida gradualmente por las células hepáticas hasta que desaparezca una vez que cumpla su función. Cabe resaltar, que esta tecnología de hígado en un chip microfluídico que tiene como objetivo reemplazar las pruebas de toxicidad en animales, pero hasta el momento ha demostrado pocas ventajas sobre los métodos tradicionales (Cascales et al., 2017; Bavli et al., 2016).



MODELOS CELULARES ALTERNATIVOS A LAS DE ORIGEN HUMANO

Líneas celulares de hepatoma humano

Estas líneas celulares se originan a partir de tumores con capacidad de proliferación indefinida, ampliamente utilizadas como modelos in vitro para estudiar funciones hepatocelulares y toxicidad de medicamentos, ya que presentan varias ventajas respecto a los cultivos de hepatocitos humanos primarios, como son la vida media útil bastante prolongada, fenotipo estable, disponibilidad, fácil manejo, aunque la mayoría de las líneas celulares de hepatoma presentan bajos niveles de expresión de enzimas metabólicas de la Fase I y II por sobre todo CYP respecto a los hepatocitos debido a la marcada diferencia en los niveles de expresión de los factores claves de transcripción hepática y receptores nucleares, sin embargo se han desarrollado varias estrategias para subsanar dicho inconveniente. Entre las líneas celulares de origen tumoral más ampliamente utilizados se encuentran los siguientes (Cascales et al., 2017; Godoy et al., 2013).

Células HepG2

Es una línea celular de carcinoma humano bastante utilizada porque presenta múltiples funciones del hígado ya que expresan enzimas conjuntivas y posee un elevado nivel de expresión de CYP1A1 y CYP3A7, pero baja expresión de las demás enzimas involucradas en el metabolismo tanto de Fase I y II, sin embargo, presenta niveles medibles de Glutathion-S-transferasa, Sulfotransferasa y UDP-Glucuroniltransferasa, por lo cual aún se utiliza bastante en estudios de toxicidad. También existen otros mecanismos por el cual se puede evaluar toxicidad empleando a las HepG2 tales como, medición de la formación de especies reactivas de oxígeno, agotamiento de glutatión, integridad de la membrana, viabilidad, proliferación celular, nivel de ATP, potencial de membrana mitocondrial, los cuales corresponden a puntos finales de evaluación de daño celular. Además, cabe mencionar que empleando en conjunto otras herramientas como la transcriptómica o en combinación con una prueba de mutagenicidad, se puede estudiar hepatotoxicidad de medicamentos en etapas más tempranas o se puede predecir el riesgo genotóxico de compuestos, respectivamente (Gomez-Lechon et al., 2008; Donato et al., 2013; Mills et al., 2004).

Células HepaRG

Esta línea celular deriva de un carcinoma hepatocelular humano cuyo patrón de expresión asemeja en gran medida a los hepatocitos en cultivo, por lo cual es útil para estudios de hepatotoxicidad in vitro. Son células que en estado proliferativo se diferencian hacia un fenotipo de hepatocito después

de dos semanas de cultivo y tratamiento con DMSO, por lo cual expresan niveles más altos de actividad de metabolización de fármacos que otras células de hepatoma como el HepG2. Sin embargo, respecto a los hepatocitos humanos, la expresión de CYP en las células HepaRG es en general más baja, excepto CYP3A4. En estudios anteriores se ha demostrado que posee la propiedad de ser susceptible a la infección por virus de hepatitis B, que podría representar una herramienta para estudiarla (Rodríguez-Antona et al., 2002; Aninat et al., 2005; Gripon et al., 2002).

OTROS ENFOQUES

Conteo de imágenes celulares en larvas de pez cebra (Modelo ex vivo)

El pez cebra constituye un modelo animal de pequeños vertebrados, lo cual representa una alternativa al uso de animales como los ratones o ratas, y cuenta con una elevada similitud respecto a los mamíferos en cuanto al metabolismo de los hepatocitos, funcionamiento del hígado y, respuesta similar a hepatotóxicos, asimismo es completamente funcional a partir de las 72 horas post-fertilización lo que permite monitorizarlo desde una etapa temprana.

El estudio consiste en realizar el recuento de las imágenes celulares de hepatocitos marcados con DsRed (una proteína tetrámera que posee intrínsecamente la capacidad de emitir fluorescencia), donde las imágenes corresponden a los hepatocitos marcados con DsRed recuperados tras la digestión con la proteasa del pez cebra (*Danio rerio*) transgénico, para medir el efecto de compuestos hepatotóxicos conocidos sobre los hepatocitos, donde la reducción del número de hepatocitos después de la exposición al compuesto tóxico es un indicador de hepatotoxicidad, permite realizar pruebas de citotoxicidad multiparamétrica. En un estudio reciente de comparación entre el análisis visual de la morfología hepática mediante microscopía de fluorescencia y el análisis de tamaño de imágenes hepáticas 2D fluorescentes, que es el método más actual para evaluar hepatotoxicidad, sugieren combinar ambas metodologías mencionadas, para obtener una evaluación más exitosa de la hepatotoxicidad (Nguyen et al., 2017; Wikipedia, 2021; Driessen et al., 2013; McGrath & Li, 2008; Chu & Sadler, 2009; Amicone et al., 2012).
Modelo de células basado en cribado de alto contenido

Este modelo está basado en el empleo de células de HepG2 para evaluar el potencial de medicamentos que inducen hepatotoxicidad humana en combinación de una tecnología de "análisis de alto contenido" (HCS) que permite analizar el fenotipo de células, lo que representa una combinación de características críticas, tales como el uso de hepatocitos humanos con capacidad de metabolismo de medicamentos, pre-incubación de células



durante tres días con medicamentos dentro de un rango de concentración de al menos 30 veces la concentración efectiva o 100 μM , medición de parámetros morfológicos y bioquímicos indicativos de efectos citotóxicos preliminares, evaluación de diferentes mecanismos de toxicidad a nivel de una célula, y la posibilidad de rendimiento rápido. La HCS se basa en la utilización de un microscopio de epifluorescencia automatizada, análisis de imágenes de células en formato de placa de microtitulación y aplicación de tecnología de microsonda multi-fluorescente en tiempo real de marcadores biológicos implicados en diversos mecanismos de hepatotoxicidad que incluyen, alteración de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, inhibición de la función mitocondrial, activación de apoptosis y estrés oxidativo, para lo cual emplea los siguientes fluorocromos; (Fluo-4 AM) calcio, (TMRM) potencial de membrana mitocondrial, (Hoechst 33342) contenido de ADN para determinar el área nuclear y el número de células y (TOTO-3) permeabilidad de la membrana plasmática, respectivamente. En un estudio reciente compararon este modelo con siete ensayos convencionales de citotoxicidad in vitro que incluyen la evaluación de síntesis de ADN, síntesis de proteínas, agotamiento de glutatión, secreción de superóxidos, actividad de caspasa-3, integridad de membrana y la viabilidad celular; y para lo cual emplearon medicamentos con mecanismo hepatotóxico conocido. Los resultados mostraron que el modelo basado en células concuerda con los resultados obtenidos con los métodos convencionales (O'Brien et al., 2006; Abraham et al., 2004; Giuliano et al., 2003; Haskins et al., 2001; Plymale et al., 1999; Tolosa et al., 2012).

CONCLUSIÓN

Existe una gran oferta de modelos in vitro que se pueden utilizar para predecir hepatotoxicidad de medicamentos en etapa temprana de su desarrollo, sin embargo, cada modelo cuenta con características particulares que deben tomarse en cuenta al estudiar dicho modelo, lo que permite una evaluación completa y similar a lo que ocurre en el hígado humano. Hoy en día, se realizan mayores esfuerzos por mejorar algunos modelos existentes, acoplando alguna herramienta o modificándolo genéticamente hacia el producto de interés, lo que proporciona enfoques nuevos útiles, que podrían prevenir, los altos costos que representa que un medicamento produzca una reacción adversa como la hepatotoxicidad. Es importante destacar que a pesar de existir estudios y avances sobre dichos modelos, es necesario poder integrar las reacciones que ocurren en el hígado y su interacción posterior con otros sistemas u órganos del organismo como un todo.

REFERENCIAS

- Abraham, V., Lansing, D., & Haskins, J. (2004). High content screening applied to large-scale cell biology. *Trends in Biotechnology*, 22(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.012>
- Amicone, L., Citarella, F., Tripodi, M., & Cicchini, C. (2012). Hepatocytes and Progenitor Stem Cells in Regeneration and Therapy. *Liver Regeneration*. Published. <https://doi.org/10.5772/45602>
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langou t, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A. (2005). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG CELLS. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(1), 75–83. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.006759>
- Bavli, D., Prill, S., Ezra, E., Levy, G., Cohen, M., Vinken, M., Vanfleteren, J., Jaeger, M., & Nahmias, Y. (2016). Real-time monitoring of metabolic function in liver-on-chip microdevices tracks the dynamics of mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(16), E2231-E2240. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522556113>
- Bell, C., Hendriks, D., Moro, S., Ellis, E., Walsh, J., Renblom, A., Fredriksson, L., Dankers, A., Jacobs, F., Snoeys, F., Sison-Young, R., Jenkins, R., Nordling, A., Mkrtchian, S., Park, K., Kitteringham, N., Goldring, C., Lauschke, V., Ingelman-Sundberg, M. (2016). Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep25187>
- Bell, L., & Chalasani, N. (2009). Epidemiology of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Seminars in Liver Disease*, 29(04), 337–347. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240002>
- Bissell, D., Aronson, D., Maher, J., & Roll, F. (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *Journal of Clinical Investigation*, 79(3), 801–812. <https://doi.org/10.1172/jci112887>
- Borchardt, R. T., Smith, P. L., & Wilson, G. (1996). *Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism*. Springer Publishing.
- Brandon, E. F., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. (2003). An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 189(3), 233–246. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00128-5](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00128-5)
- Cascales, M., Gómez-Lechón, M. J., Donato, T., & Jover, R. (2017). Recientes avances en la hepatotoxicidad de fármacos. *Scientific News*, 83(2), 255–293.
- Chu, J., & Sadler, K. (2009). New school in liver development: Lessons from zebrafish. *Hepatology*, 50(5), 1656–1663. <https://doi.org/10.1002/hep.23157>
- Cómo Funciona el Hígado. (2018). Health Library. <https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=c-mofuncionaelhgado-90-P05112>
- Cross, D. M., & Bayliss, M. K. (2000). A commentary on the use of hepatocytes in drug metabolism studies during drug discovery and development. *Drug Metabolism Reviews*, 32(2), 219–240. <https://doi.org/10.1081/dmr-100100574>
- Davila, J. C., Rodriguez, R. J., Melchert, R. B., & Acosta, D. (1998). Predictive value of in vitro model systems in toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38(1), 63–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.63>
- Donato, M., Jover, R., & Gómez-Lechón, M. (2013). Hepatic Cell Lines for Drug Hepatotoxicity Testing: Limitations and Strategies to Upgrade their Metabolic Competence by Gene Engineering. *Current Drug Metabolism*, 14(9), 946–968. <https://doi.org/10.2174/1389200211314090002>
- Driessen, M., Kienhuis, A., Pennings, J., Pronk, T., van de Brandhof, E., Roodbergen, M., Spaink, H., van de Water, B., van der Ven, L. (2013). Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling. *Archives of Toxicology*, 87(5), 807–823. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1039-z>
- Fung, M., Thornton, A., Mybeck, K., Wu, J., Hornbuckle, K., & Muniz, E. (2001). Evaluation of the Characteristics of Safety Withdrawal of Prescription Drugs from Worldwide Pharmaceutical Markets-1960 to 1999. *Drug Information Journal*, 35(1), 293–317. <https://doi.org/10.1177/009286150103500134>
- Giuliano, K., Haskins, J., & Taylor, D. (2003). Advances in High Content Screening for Drug Discovery. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 1(4), 565–577. <https://doi.org/10.1089/154065803322302826>
- Glicklis, R., Shapiro, L., Agbaria, R., Merchuk, J., & Cohen, S. (2000). Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(3), 344–353. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10620265/>



- Godoy, P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S. (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(8), 1315–1530. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>
- Gomez-Lechon, M., Donato, M., Lahoz, A., & Castell, J. (2008). Cell Lines: A Tool for In Vitro Drug Metabolism Studies. *Current Drug Metabolism*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.2174/138920008783331086>
- Gómez-Lechón, M., Tolosa, L., Conde, I., & Donato, M. (2014). Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10(11), 1553–1568. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.967680>
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24), 15655–15660. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>
- Guguen-Guillouzo, C., & Guillouzo, A. (2010). General Review on In Vitro Hepatocyte Models and Their Applications. *Methods in Molecular Biology*, 640, 1–40. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_1
- Haskins, J., Rowse, P., Rahbari, R., & de la Iglesia, F. (2001). Thiazolidinedione toxicity to isolated hepatocytes revealed by coherent multiprobe fluorescence microscopy and correlated with multiparameter flow cytometry of peripheral leukocytes. *Archives of Toxicology*, 75(7), 425–438. <https://doi.org/10.1007/s002040100251>
- Kienhuis, A., Wortelboer, H., Maas, W., van Herwijnen, M., Kleinjans, J., van Delft, J., & Stierum, R. (2007). A sandwich-cultured rat hepatocyte system with increased metabolic competence evaluated by gene expression profiling. *Toxicology in Vitro*, 21(5), 892–901. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.01.010>
- Koebe, H., Pahernik, S., Eyer, P., & Schildberg, F. (1994). Collagen gel immobilization: A useful cell culture technique for long-term metabolic studies on human hepatocytes. *Xenobiotica*, 24(2), 95–107. <https://doi.org/10.3109/00498259409043224>
- Kostadinova, R., Boess, F., Applegate, D., Suter, L., Weiser, T., Singer, T., Naughton, B., & 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>
- Lake, B., Price, R., Giddings, A., & Walters, D. (2009). In Vitro Assays for Induction of Drug Metabolism. *Methods in Molecular Biology*, 47–58. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-201-4_5
- Lauschke, V., Hendriks, D., Bell, C., Andersson, T., & Ingelman-Sundberg, M. (2016). Novel 3D Culture Systems for Studies of Human Liver Function and Assessments of the Hepatotoxicity of Drugs and Drug Candidates. *Chemical Research in Toxicology*, 29(12), 1936–1955. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00150>
- LeCluyse, E., Audus, K., & Hochman, J. (1994). Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 266(6), C1764–C1774. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.6.c1764>
- LeCluyse, E. (2001). Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 343–368. [https://doi.org/10.1016/s0928-0987\(01\)00135-x](https://doi.org/10.1016/s0928-0987(01)00135-x)
- Lee, W. (2003). Drug-Induced Hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine*, 349(5), 474–485. <https://doi.org/10.1056/nejmra021844>
- Liang, D., Hagenbuch, B., Stieger, B., & Meier, P. (1993). Parallel decrease of Na⁺-taurocholate cotransport and its encoding mRNA in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology*, 18(5), 1162–1166. <https://doi.org/10.1002/hep.1840180523>
- Marino, G., Zimmerman, H., & Lewis, J. (2001). Management of drug-induced liver disease. *Current Gastroenterology Reports*, 3, 38–48. DOI: 10.1007/s11894-001-0039-y
- Marion, T., Perry, C., St. Claire, R., & Brouwer, K. (2012). Endogenous bile acid disposition in rat and human sandwich-cultured hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.02.002>
- McGrath, P., & Li, C. (2008). Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today*, 13(9–10), 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.03.002>
- Mills, J., Rose, K., Sadagopan, N., Sahi, J., & de Morais, S. (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>



- Nguyen, X., Kislyuk, S., Pham, D., Kecskés, A., Maes, J., Cabooter, D., Annaert, P., De Witte, P., Ny, A. (2017). Cell Imaging Counting as a Novel Ex Vivo Approach for Investigating Drug-Induced Hepatotoxicity in Zebrafish Larvae. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 356. <https://doi.org/10.3390/ijms18020356>
- Novik, E., Maguire, T., Chao, P., Cheng, K., & Yarmush, M. (2010). A microfluidic hepatic coculture platform for cell-based drug metabolism studies. *Biochemical Pharmacology*, 79(7), 1036–1044. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.11.010>
- O'Brien, P., Irwin, W., Diaz, D., Howard-Cofield, E., Krejsa, C., Slaughter, M., Gao, M., Kaludercic, N., Angeline, A., Bernardi, P., Brain, P., Hougham, C., (2006). High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of Toxicology*, 80(9), 580–604. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0091-3>
- Plymale, D., Haskins, J., & Iglesia, F. (1999). Monitoring simultaneous subcellular events in vitro by means of coherent multiprobe fluorescence. *Nature Medicine*, 5(3), 351–355. <https://doi.org/10.1038/6574>
- Red fluorescent protein. (2021, 14 febrero). Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Red_fluorescent_protein
- Rodríguez-Antona, C., Donato, M., Boobis, A., Edwards, R., Watts, P., Castell, V., Gomez-Lechon, M. (2002). Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica*, 32(6), 505–520. <https://doi.org/10.1080/00498250210128675>
- Shehu, A., Ma, X., & Venkataramanan, R. (2017). Mechanisms of Drug-Induced Hepatotoxicity. *Clinics in Liver Disease*, 21(1), 35–54. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.002>
- Sivaraman, A., et al. (2005). A Microscale In Vitro Physiological Model of the Liver: Predictive Screens for Drug Metabolism and Enzyme Induction. *Current Drug Metabolism*, 6(6), 569–591. <https://doi.org/10.2174/138920005774832632>
- Swift, B., Pfeifer, N., & Brouwer, K. (2010). Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 42(3), 446–471. <https://doi.org/10.3109/03602530903491881>
- Tateno, C., & Yoshizato, K. (1996). Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *Am J Pathol.*, 148(2), 383–392. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1861672/>
- Tejada, F. (2010). Hepatotoxicidad por Fármacos. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 3(3), 177–191. <https://doi.org/10.4321/s1699-695x2010000300006>
- Tolosa, L., Pinto, S., Donato, M., Lahoz, A., Castell, J., O'Connor, J., Gómez-Lechón, M. (2012). Development of a multiparametric cell-based protocol to screen and classify the hepatotoxicity potential of drugs. *Toxicol Sci*, 127(1), 187–198. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs083>