

## Caracterización de modelos hepáticos 2D y 3D.

Susana Calvo Alfonso<sup>1,2\*</sup>, Carolina Rodenas-Valverde<sup>2</sup> y Jesús de la Fuente-Carralero<sup>2</sup>.

**1** Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** GlaxoSmithKline (GSK) Tres Cantos. Madrid, España.

### Resumen

A pesar de que la inversión de la industria farmacéutica en investigación y desarrollo durante las pasadas décadas se ha incrementado exponencialmente, el número de nuevos fármacos que alcanzan el mercado ha ido decreciendo anualmente, debido, esencialmente, a la alta tasa de fallo en las fases clínicas del descubrimiento de fármacos, como consecuencia, principalmente, de hepatotoxicidad de fármacos. Esta situación hace que se planteen nuevas estrategias para la detección temprana de toxicidad de fármacos en las fases tempranas del descubrimiento. Por ello, se han incorporado modelos *in vitro*, más complejos que los modelos 2D convencionales, que permiten reproducir las funciones hepáticas que tienen lugar *in vivo*. Así, los hepatocitos de origen primario se cultivan *in vitro* generalmente en monocapa, utilizando superficies pre-tratadas con proteínas de la matriz extracelular (MEC) como colágeno o con biomatrices (como Matrigel), pero estas células son incapaces de reproducir y de mantener la funcionalidad hepática. Por ello, se desarrolla el cultivo 2D+, donde las células, que se sitúan entre capas de colágeno, mantienen un nivel de funcionalidad durante un corto periodo de tiempo. Sin embargo, el modelo 3D, de alto rendimiento y sensibilidad, provee a los hepatocitos de un microambiente adecuado para la expresión a largo plazo de las funciones hepáticas específicas, por lo que es una buena estrategia para evaluar múltiples fármacos y sus metabolitos, especialmente en High Throughput Screening (HTS) de toxicidad de fármacos. En este trabajo, el modelo 3D utilizado consiste en un scaffold denominado Alvetex<sup>®</sup>, el cual mantiene la viabilidad (medida por la producción de ATP y la reducción de resazurina) y la funcionalidad celular (determinada por la producción de urea) a largo plazo, respecto a los modelos 2D y 2D+.

**Palabras clave:** descubrimiento de fármacos; predictibilidad; hepatotoxicidad; cultivo celular; modelo 3D.

**Cita:** Susana Calvo, Carolina Rodenas-Valverde, Jesús de la Fuente-Carralero (2014) Caracterización de modelos hepáticos 2D y 3D. *Dianas* 3(1): e20140911. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140911 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Editores:** María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

**Recibido:** 27 de junio de 2014

**Copyright:** © 2014 Susana Calvo Alfonso et al.

Este es un artículo open-access distribuido bajo licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

**\*E-mail:** susana14\_82@hotmail.com



### Introducción

Bajo rendimiento de los procesos actuales en la industria farmacéutica para el descubrimiento de fármacos.

El número de nuevos fármacos que alcanzan el mercado ha ido decreciendo anualmente [1, 2], a pesar del incremento exponencial durante las pasadas décadas de la inversión de la industria farmacéutica en investigación y desarrollo. El proceso de descubrimiento de fármacos se divide en varias etapas: búsqueda y desarrollo de fármacos (validación de la diana, generación de hits y optimización de uno a varios cabezas de serie), estudios preclínicos en animales, ensayos clínicos en humanos (fase I, II y III) y aprobación del fármaco por la FDA (Food and Drug Administration) [2]. Todos los estudios indican que este proceso de desarrollo de fármacos es un proceso ineficaz y que el principal objetivo es mejorar y anticipar la identificación de problemas en las fases de descubrimiento se deben incorporar ensayos *in vitro* más predictivos que permitan seleccionar las moléculas con menor riesgo de toxicidad en humanos. Así, solo el 4% de los compuestos que entran en las fases preclínicas se registran con éxito, teniendo la fase III de ensayos clínicos un 43% de fallo [2, 3]. Esta situación nos fuerza a definir nuevas estrategias para la detección temprana de las principales causas de fallo que se encuentran en las fases clínicas [3, 4], entre las que destaca la hepatotoxicidad, la causa principal por la que los nuevos fármacos lanzados son retirados del mercado (el 50% de los casos se deben a fallo hepático agudo) [5].

## Estrategias para detectar toxicidad de fármacos en la fase temprana de descubrimiento.

La línea celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2 ha sido ampliamente utilizada para ensayos de hepatotoxicidad en las fases tempranas. Aunque posee buena estabilidad fenotípica y tiene fácil manejo en cultivo, presenta una limitada expresión de las enzimas metabolizadoras de fármacos, por lo que no es metabólicamente competente en cultivos 2D convencionales y los resultados obtenidos de su cultivo no son ampliamente extrapolables a humanos [6, 7]. Por ello, surge la necesidad de desarrollar modelos con células primarias que mantengan la funcionalidad, con los cuales se obtengan datos más predictivos.

Los hepatocitos, como células dominantes en el hígado, metabolizan todos los fármacos y, por tanto, están altamente expuestas a metabolitos de drogas [6, 8]. Estas células de origen primario son ampliamente consideradas como la mejor opción para el screening *in vitro*, ya que presentan gran funcionalidad y su citoarquitectura es similar a la que presentan *in vivo* [9]. Se cultivan *in vitro* generalmente en monocapa, utilizando superficies pre-tratadas con proteínas de la matriz extracelular (MEC) como colágeno, biomatrices (como Matrigel), derivados de proteoglicanos, etc. [6, 10] (modelo 2D optimizado). Sin embargo, estas células primarias son difíciles de mantener en cultivo en las condiciones convencionales óptimas y en ellas son incapaces de replicar completamente y de mantener la funcionalidad hepática [6, 10]. Al respecto, los esfuerzos se están centrando en mejorar la reproducibilidad, estandarización y rendimiento de los cultivos hepáticos primarios mediante los cultivos de hepatocitos en modelos 2D+ y 3D, especialmente para el screening rutinario de toxicidad de fármacos [6, 11], ya que un riguroso método *in vitro* que reproduzca las funciones hepáticas que tienen lugar *in vivo* podría mejorar significativamente la eficiencia del desarrollo de nuevos fármacos.

La tecnología comúnmente utilizada es el cultivo “sandwich” 2D+, donde los hepatocitos se sitúan entre capas de componentes artificiales de la MEC (generalmente colágeno), con el fin de mantener *ex vivo* la correcta función del parénquima hepático, lo cual es esencial para generar sistemas estables de screenings toxicológicos (estudio metabólico de fármacos, farmacocinética y farmacodinamia) [6, 12]. Los resultados previos demuestran que el cultivo “sandwich” con proteínas de la MEC puede aumentar la actividad de CYP (principal familia de enzimas metabolizadoras de la fase I de biotransformación de fármacos), la polarización celular y la red de canalículos biliares, pero mantienen un nivel de funcionalidad durante un corto periodo de tiempo [6, 10, 11, 13].

Por su parte, los modelos 3D favorecen las interacciones célula-célula e interacciones de las células con la MEC, requeridas para el desarrollo funcional normal [6, 11], ya que los cultivos 3D proveen a los hepatocitos de un microambiente adecuado para la expresión a largo plazo de las funciones hepáticas específicas [4, 6, 11]. A diferencia de los cultivos convencionales en monocapa, algunos modelos de cultivo 3D mantienen la funcionalidad parenquimal, polaridad y morfología (forma poligonal) de las células del tejido hepático [4, 6, 10, 14] y facilitan el aporte adecuado de nutrientes y factores paracrinicos que permiten el desarrollo de la amplia variedad de funciones celulares *in vivo* (reacciones de biotransformación de fase I y II, biosíntesis de ácidos biliares, etc.) [11]. Estas uniones con la MEC no solo acentúan la reorganización de los componentes del citoesqueleto celular para el anclaje, generan rutas inter e intracelulares específicas de segundos mensajeros y regulan la expresión génica [6] a largo plazo.

Un buen ejemplo de modelo 3D es Alvetex<sup>®</sup>, un scaffold de poliestireno de 200 micras altamente poroso (lagunas de 40 micras) diseñado para reproducir con exactitud y sensibilidad la función celular fisiológica *in vivo* como parte de un sistema *in vitro* [6, 15]. El grosor de los discos de poliestireno asegura la suficiente difusión de gases, nutrientes y productos de desecho. Aporta buena estabilidad, es compatible con los compuestos químicos usados en cultivo celular y fácilmente adaptable a los formatos comunes de cultivo celular. Así, Alvetex<sup>®</sup> permite mantener la morfología original de las células y la organización tisular, imitando las dimensiones y el microambiente del tejido en humanos [6, 15].

El principio de las 3R surgió en la década de los años 60 como propuesta de principios rectores del uso de animales en la investigación científica [4, 16]. Las tres erres hacen referencia a reemplazar, reducir y refinar, las cuales aluden a métodos que eviten o sustituyan el uso de animales, cualquier estrategia que tenga como resultado el uso de un menor número de animales y el bienestar animal, respectivamente. Así, los modelos de cultivo 3D que demuestren su predictibilidad reducirán y podrán reemplazar el uso animal y aumentar el rendimiento para evaluar múltiples fármacos y sus metabolitos.

## Mecanismos de hepatotoxicidad.

El hígado es particularmente susceptible al daño inducido por drogas debido a su papel en el aclaramiento, biotransformación y excreción de fármacos [16]. Los fármacos y/o los metabolitos derivados del metabolismo hepático (de las fases I y II de biotransformación) pueden desencadenar estrés celular a través de diversos mecanismos [5, 17]: depleción de glutatión (GSH), unión a diversas estructuras celulares (ácidos nucleicos, enzimas, lisosomas...), inhibición de funciones hepatocelulares como el transporte canalicular de sales biliares (BSEP), con la consecuente acumulación intracelular de

sales biliares; respuestas inmunes específicas y disfunción mitocondrial (desacoplamiento o inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial originando depleción de ATP e incremento de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros mecanismos).

En todos los casos, la célula puede entrar en un proceso de muerte (por apoptosis o necrosis) como consecuencia del daño mitocondrial y la disminución de la producción de energía [17].

## Objetivo

Desarrollo de modelos *in vitro* de alta predictibilidad para determinar hepatotoxicidad en las fases tempranas del proceso de descubrimiento de fármacos.

## Materiales y Métodos

Aislamiento celular y cultivo.

Los hepatocitos se aíslan de una rata macho cepa Sprague-Dawley mediante perfusión retrógrada two-step con collagenasa, según el procedimiento ampliamente descrito en la bibliografía [6, 18]. El conteo y determinación de la viabilidad se realiza en cámara de Neubauer con tinción de exclusión con Trypan Blue. Sólo se utilizan las células que presenten una viabilidad superior al 70% después del proceso de perfusión.

### Cultivo 2D y 2D+ (2D recubierto de gel de colágeno I y 2D recubierto de Matrigel).

Los hepatocitos primarios de rata (PRH en este trabajo) se siembran en placas de 96 pocillos Biocoat Collagen I coated en medio de cultivo a corto plazo previamente descrito en la literatura [19] a 37500 células por pocillo (día 0). A las 24 horas (día 1), las células se recubren con un gel de colágeno I (colágeno I a 1.87 mg/ml neutralizado que se mantiene 90 minutos a 37°C para su gelificación) o con Matrigel (0.25 mg/ml) o se dejan sin recubrimiento (denominado cultivo 2D en este trabajo). Tras el proceso de recubrimiento, las células se exponen a dosis de los compuestos que se describen en el siguiente apartado en un medio de cultivo para mantenimiento de hepatocitos a largo plazo previamente descrito en la literatura [20, 21]. Cada 24 horas se preparan las dosis de los compuestos en el medio de cultivo de largo plazo y con ellas se hace un cambio de medio. Los cultivos se observan diariamente para detectar cambios morfológicos por microscopía de contraste de fases.

### Cultivo 2D versus 3D (Alvetex).

Para determinar las condiciones óptimas de siembra en el sistema 3D de Alvetex<sup>®</sup>, los hepatocitos de rata se siembran en placas Alvetex<sup>®</sup> recubiertas con colágeno I, en placas 2D recubiertas de colágeno I con el mismo tratamiento realizado en el Alvetex<sup>®</sup> y en placas Biocoat Collagen I coated (control del recubrimiento). El scaffold de Alvetex<sup>®</sup> se acondiciona con etanol al 70% siguiendo el protocolo descrito por el fabricante y a continuación se realiza el recubrimiento con colágeno I a 0.05mg/ml y se incuban durante una hora a temperatura ambiente. Las células resuspendidas en el medio de cultivo a corto plazo se siembran a 12500, 25000, 37500 y 50000 células/pocillo (día 0). A las 1-2 horas se hace un cambio de medio y a partir de día 1 diariamente. Se realizan ensayos de viabilidad a diferentes tiempos del cultivo.

### Preparación de los compuestos.

Todos los compuestos son inicialmente disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), a las concentraciones que se indican en la Tabla 1. Las dosis de estos compuestos se realizan en DMSO y posteriormente se diluyen 1:200 en medio de cultivo a largo plazo (0.5% DMSO final, que es la concentración de DMSO que se ensaya de los pocillos controles).

Compuesto	Referencia	[stock] (mM)	[en células] (µM)
Pioglitazone	Sigma E6910	60	300, 100, 33.3, 11.11, 3.7
Amiodarone	Sigma A8423	60	300, 100, 33.3, 11.11, 3.7
Bosentan	Cayman 11731	60	300, 100, 33.3, 11.11, 3.7
Dicloferac	Sigma D6899	200	1000, 333.33, 111.11, 37.03, 12.34
Paracetamol (APAP)	Sigma A5000	6000	300000, 100000, 33333, 11111, 3700

Tabla 1.- Concentraciones de los compuestos seleccionados, en 0.5% de DMSO final.

### Ensayo de citotoxicidad

A las 24h, 72h, 7 días y 14 días de incubación con las dosis de compuestos (excepto en Matrigel que se ensaya hasta 7 días) se recogen los sobrenadantes de los cultivos, que se congelan a -20°C para posterior cuantificación de urea, y sobre los cultivos se realizan los ensayos para determinar viabilidad celular (resazurina y ATP), los cuales se describen a continuación:

Resazurina: para determinar el poder redox de los hepatocitos (reducción de resazurina a resorufina), tras retirar el medio se añade el medio de ensayo (450  $\mu$ M de resazurina en medio Williams). Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se lee la resorufina producida por fluorescencia en SpectraMax (ex530 em580).

ATP: después de realizar el ensayo de resazurina, los cultivos se lavan exhaustivamente con PBS. A continuación, se añade la solución de ensayo (CellTiter-glo) a las células y se agitan las placas en Orbital shaker unos 10 minutos para su completa lisis celular. Posteriormente se añade medio Williams y se vuelve a agitar y se permite la estabilización de la señal antes de su lectura (unos 30 minutos desde la primera adición). Se lee luminiscencia en Viewlux (ultraHTS Multilabel Reader).

Urea: para determinar la producción de urea en los sobrenadantes se cuantifica la urea en los mismos en un ensayo colorimétrico con el kit comercial correspondiente (Urea Biochain). Se lee absorbancia en el SpectraMax.

## Análisis de datos

Se estima el porcentaje de viabilidad de cada concentración de fármaco con respecto a su vehículo control y para la determinación de las IC50 se analizan los datos usando el software GraphPad PRISM con la ecuación "log(inhibitor) vs response -- Variable slope".

## Resultados y Discusión

Para validar la predictibilidad de hepatotoxicidad de los modelos 2D y 2D+ se han seleccionado una serie de compuestos con diferente mecanismo hepatotóxico:

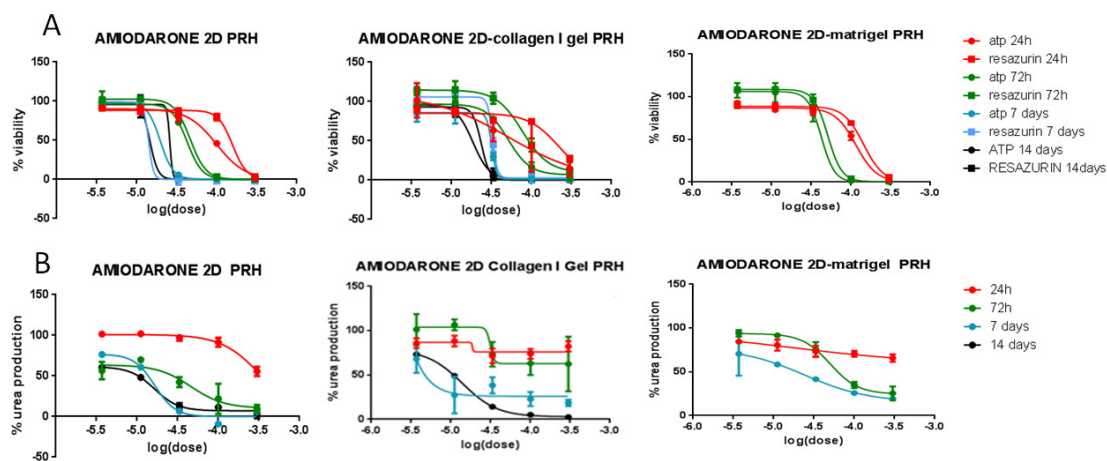


Figura 1.- A. Citotoxicidad hepática de la Amiodarone. B. Efecto de la Amiodarone en la producción de urea de las células.

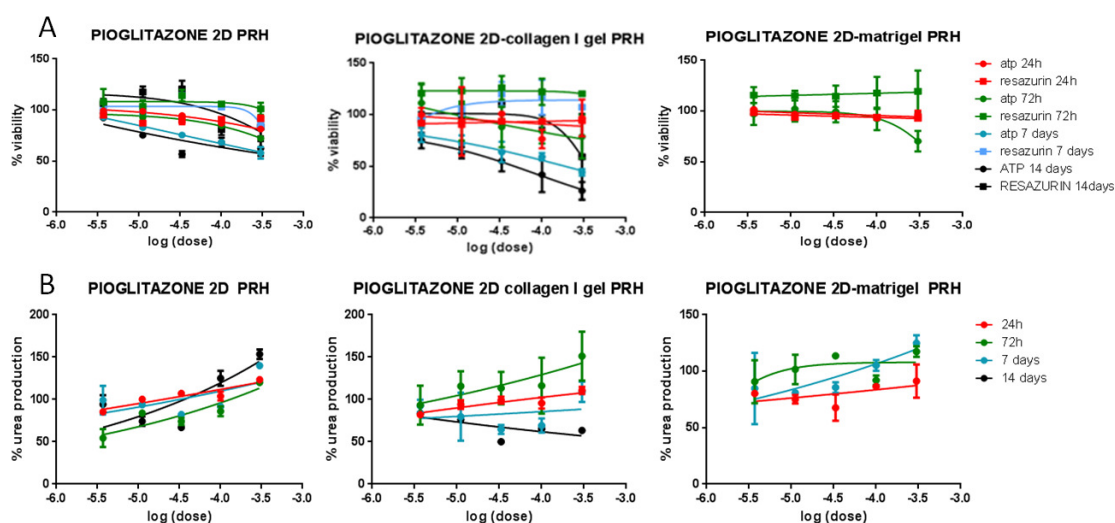


Figura 2.- A. Hepatotoxicidad de la Pioglitazone. B. Evaluación de la producción de urea de las células tratadas con Pioglitazone.

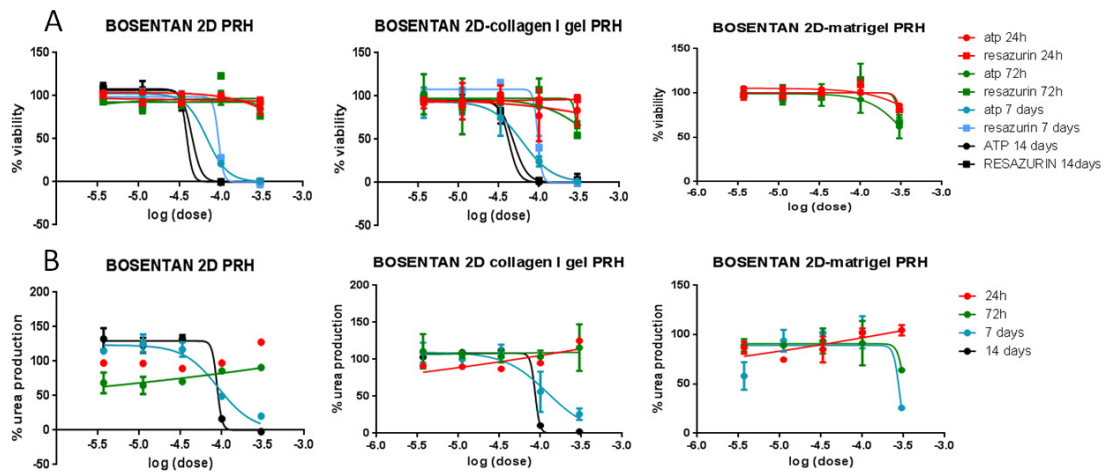


Figura 3.- A. Evaluación de la toxicidad del Bosentan en hepatocitos primarios de rata. B. Efecto del Bosentan sobre la producción de urea de las células.

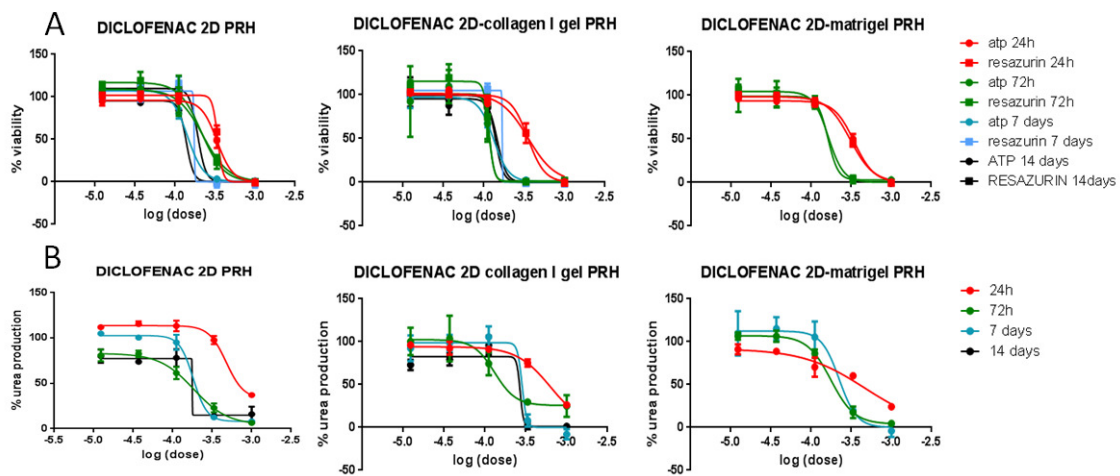


Figura 4.- A. Citotoxicidad hepática del Diclofenac. B. Evaluación de la producción de urea de las células tratadas con Diclofenac.

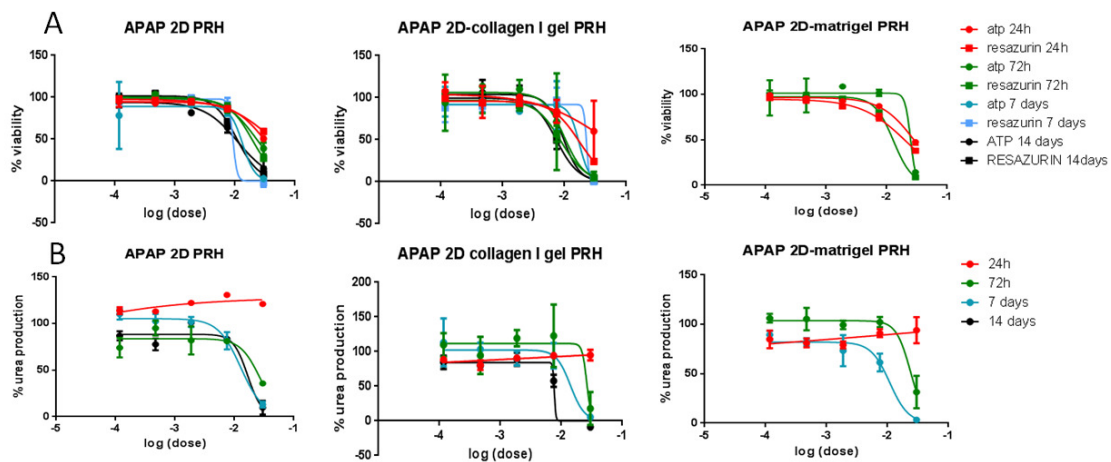


Figura 5.- A. Efecto del Paracetamol en la viabilidad de los hepatocitos primarios. B. Producción de urea de los hepatocitos en cultivo tratados con Paracetamol.

**Amiodarone.**

Control positivo de toxicidad hepática en los modelos actuales (HepG2 y hepatocitos primarios en 2D), que desencadena fosfolipidosis y altera la función mitocondrial [16, 22]. En los tres modelos se detecta como compuesto tóxico ( $IC_{50} < 200 \mu M$ ) desde las primeras 24 horas de exposición y el efecto tóxico se incrementa a lo largo del tiempo de exposición con valores de  $IC_{50}$  cada vez menores (Figura 1 y Tabla 2). La caída en la producción de urea correlaciona con los datos de viabilidad aunque se muestra como un ensayo menos sensible en los primeros tiempos de exposición.

	IC50 (µM)	ATP 24h	Resazurina 24h	ATP 72h	Resazurina 72h	ATP 7 días	Resazurina 7 días	ATP 14 días	Resazurina 14 días
<b>2D</b>	Amiodarone	99.28	157.4	42.6	46.62	19.69	14.03	14.57	25.87
	Pioglitazone	inactivo	inactivo	inactivo	inactivo	27.99	inactivo	inactivo	inactivo
	Diclofenac	334.9	340.7	223.1	213	142.5	173.2	137.5	191.7
	Bosentan	inactivo	inactivo	inactivo	inactivo	67.09	93.49	44.18	38.35
	APAP	32660	44240	22910	19470	13400	9263	11130	10670
<b>2D-collagen</b>	Amiodarone	52.08	221.3	51.02	76.87	31.78	32.48	23.53	18.48
	Pioglitazone	inactivo	inactivo	inactivo	inactivo	254.5	inactivo	84.3	inactivo
	Diclofenac	352.5	352.8	116.9	116	132.3	169.3	147.1	139.2
	Bosentan	inactivo	inactivo	inactivo	inactivo	62.64	96.81	42.13	48.26
	APAP	43740	17310	9971	8759	17320	22770	9560	7407
<b>2D-matrigel</b>	Amiodarone	115.5	143.8	42.23	50.97				
	Pioglitazone	inactivo	inactivo	inactivo	inactivo				
	Diclofenac	344	307.1	161.5	163.5				
	Bosentan	inactivo	inactivo	inactivo	inactivo				
	APAP	29540	21710	24840	12990				

Tabla 2.- IC50 (µM) de los compuestos seleccionados en los tres modelos utilizados.

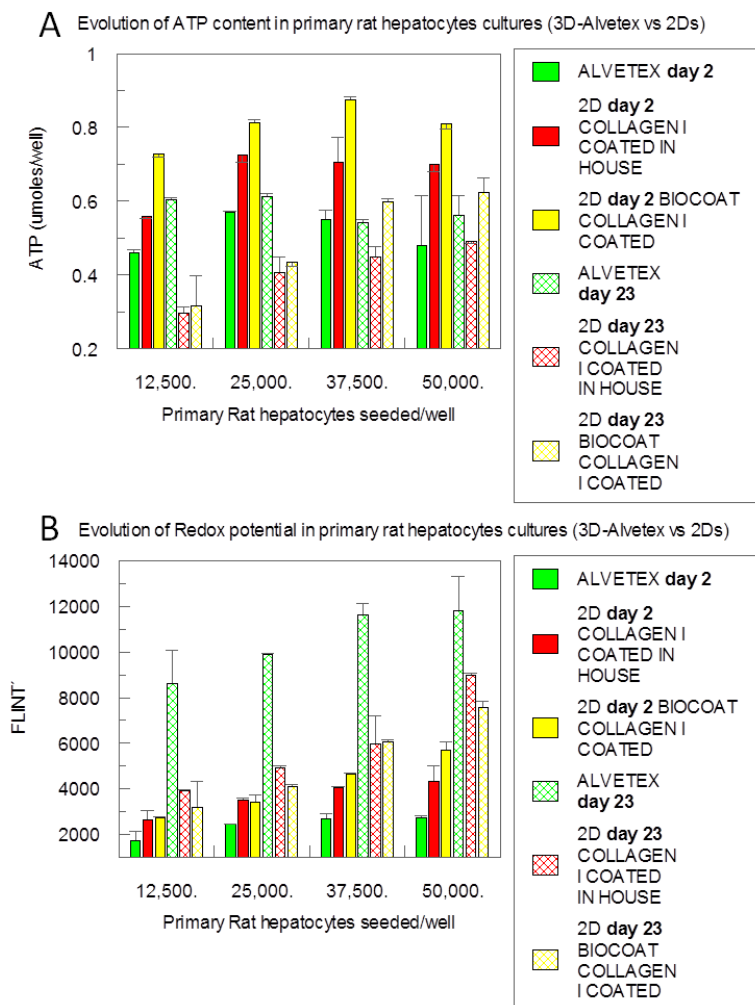


Figura 6.- Determinación de las condiciones óptimas de siembra en el modelo 3D de Alvetex®.

### Pioglitazone.

Control negativo [23] de los modelos de cultivo actuales. En los tres modelos, en los dos ensayos en las primeras 72 horas es inactivo. Sin embargo, a partir de 7 días de tratamiento en el ensayo de ATP se produce una disminución de viabilidad, que no se observa con el ensayo de resazurina ni con la producción de urea. Esto puede ser debido a la acumulación de los cristales que forma el compuesto en las tres primeras concentraciones, que interfieren con el ensayo de ATP (Figura 2 y Tabla 2).

Compuestos hepatotóxicos que son difícilmente detectables en los modelos de cultivo 2D y 2D+ actuales (falsos negativos).

El Bosentan [14, 16], que inhibe la bomba de transporte hepatocanalicular de las sales biliares (BSEP), solo a partir del séptimo día de tratamiento se muestra tóxico ( $IC_{50} < 200 \mu M$ ), siendo su efecto tóxico mayor con el tiempo de tratamiento ( $IC_{50}$  todavía menor). La caída en la producción de urea correlaciona con los datos de viabilidad celular (Figura 3 y Tabla 2). Estos datos demuestran que este compuesto necesita ser ensayado a largo plazo para detectar su toxicidad.

El Diclofenac [16, 24] inhibe BSEP, origina disfunción mitocondrial y su metabolismo mediado por CYP2C9 produce metabolitos reactivos que producen depleción de NADPH. Se muestra tóxico ( $IC_{50} < 200 \mu M$ ), desde las primeras 24 horas de tratamiento, siendo su efecto tóxico mayor a partir de 72 horas. La caída en la producción de urea correlaciona con los datos de viabilidad celular (Figura 4 y Tabla 2), aunque es como un ensayo menos sensible en los primeros tiempos de exposición.

El Paracetamol (APAP) [5, 16, 25], cuyo metabolismo mediado por CYP2E1, entre otros, origina metabolitos tóxicos (principalmente NAPQI) que producen depleción de GSH, generación de ROS y uniones covalentes con proteínas celulares. En los tres modelos es tóxico en la concentración más alta a las 24 horas y a partir de 72 horas de tratamiento no se observa un incremento del efecto tóxico con el tratamiento. La producción de urea correlaciona con la viabilidad aunque el ensayo se muestra menos sensible en los primeros tiempos de exposición (Figura 5 y Tabla 2). Con ninguno de los modelos utilizados se consigue el nivel de toxicidad observado *in vivo*, lo que sugiere que los complejos enzimáticos involucrados en su metabolismo no presentan la misma actividad que *in vivo*.

Con los modelos 2D/2D+ no se consiguen detectar todos los compuestos positivos, por lo que se decide estudiar un modelo 3D (Alvetex<sup>®</sup>). El modelo 3D de Alvetex<sup>®</sup> puede utilizarse con la tecnología de HTS para detectar toxicidad de un elevado número de compuestos en las fases tempranas del proceso de descubrimiento de fármacos. Determinar las condiciones óptimas de siembra en el sistema es el primer paso. Los resultados indican que la concentración óptima de células es 37500 células/pocillo, ya que a concentraciones mayores el número de células adheridas no aumenta ni a corto ni a largo plazo. La viabilidad en este sistema en todas las concentraciones a largo plazo es mayor que en cultivo 2D+ (Fig 6).

El siguiente paso en nuestro estudio es ensayar el set de compuestos en este modelo de cultivo 3D para comprobar su predictibilidad de toxicidad.

## Conclusión

El cultivo a largo plazo de hepatocitos primarios de rata en los modelos 2D y 2D+ ensayados permite detectar alguno de los compuestos hepatotóxicos que son falsos negativos en los modelos actuales (Bosentan y Diclofenac). Sin embargo, no se consiguen detectar todos los falsos negativos ensayados (APAP) por lo que surge la necesidad de desarrollar otros modelos de cultivo más predictivos.

## Bibliografía

- Owens, J. 2007. 2006 drug approvals: finding the niche. *Nat Rev Drug Discov*, 6(2):99-101.
- Bunnage, M.E. 2011. Getting pharmaceutical R&D back on target. *Nat Chem Biol*, 7(6):335-9.
- Kola, I. 2008. The state of innovation in drug development. *Clin Pharmacol Ther*, 83(2):227-30.
- Meng, Q. 2010. Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6(6):733-46.
- Lee, W.M. 2003. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med*, 349(5):474-85.
- Godoy, P. et al. 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. *Arch Toxicol*, 87(8):1315-530.
- Ramaiahgari, S.C. et al. 2014. A 3D *in vitro* model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch Toxicol*, 88(5):1083-95.
- Hussaini, S.H. and E.A. Farrington. 2014. Idiosyncratic drug-induced liver injury: an update on the 2007 overview. *Expert Opin Drug Saf*, 13(1):67-81.
- Ukairo, O. et al. 2013. Long-term stability of primary rat hepatocytes in micropatterned cocultures. *J Biochem Mol Toxicol*, 27(3):204-12.
- Gunness, P. et al. 2013. 3D organotypic cultures of human HepaRG cells: a tool for *in vitro* toxicity studies. *Toxicol Sci*, 133(1):67-78.
- Trask, O.J., A. Moore and E.L. LeCluyse. 2014. A micropatterned hepatocyte coculture model for assessment of liver toxicity using high-content imaging analysis. *Assay Drug Dev Technol*, 12(1):16-27.
- Choi, K. et al. 2014. Development of 3D Dynamic Flow Model of Human Liver and Its Application to Prediction of Metabolic Clearance of 7-Ethoxycoumarin. *Tissue Eng Part C Methods*, [Epub ahead of print].

13. Schutte, M. et al. 2011. Rat primary hepatocytes show enhanced performance and sensitivity to acetaminophen during three-dimensional culture on a polystyrene scaffold designed for routine use. *Assay Drug Dev Technol*, 9(5):475-86.
14. Marion, T.L., E.M. Leslie and K.L. Brouwer. 2007. Use of sandwich-cultured hepatocytes to evaluate impaired bile acid transport as a mechanism of drug-induced hepatotoxicity. *Mol Pharm*, 4(6):911-8.
15. Knight, E. et al. 2011. Alvetex<sup>(R)</sup>: polystyrene scaffold technology for routine three dimensional cell culture. *Methods Mol Biol*, 695:323-40.
16. Giri, S., K. Nieber and A. Bader. 2010. Hepatotoxicity and hepatic metabolism of available drugs: current problems and possible solutions in preclinical stages. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6(8):895-917.
17. Russmann, S., G.A. Kullak-Ublick and I. Grattagliano. 2009. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Curr Med Chem*, 16(23):3041-53.
18. Gomez-Lechon, M.J., P. Lopez and J.V. Castell. 1984. Biochemical functionality and recovery of hepatocytes after deep freezing storage. *In Vitro*, 20(11):826-32.
19. Donato, M.T., M.J. Gomez-Lechon and J.V. Castell. 1993. A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*, 213(1):29-33.
20. Puppi, J. et al. 2011. Use of a clinically approved iron oxide MRI contrast agent to label human hepatocytes. *Cell Transplant*, 20(6):963-75.
21. Pichard, L. et al. 2006. Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol*, 320:283-93.
22. Bhandari, N. et al. 2008. Phospholipidosis assay in HepG2 cells and rat or rhesus hepatocytes using phospholipid probe NBD-PE. *Assay Drug Dev Technol*, 6(3):407-19.
23. Gupta, G. et al. 2014. Protective effect of pioglitazone, a PPARgamma agonist against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem*, 393(1-2):223-8.
24. Bort, R. et al. 1999. Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity. *J Pharmacol Exp Ther*, 288(1):65-72.
25. Howell, B.A., S.Q. Siler and P.B. Watkins. 2014. Use of a systems model of drug-induced liver injury (DILIsym<sup>(R)</sup>) to elucidate the mechanistic differences between acetaminophen and its less-toxic isomer, AMAP, in mice. *Toxicol Lett*, 226(2):163-72.