

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LIANA MONTEIRO DA FONSECA CARDOSO

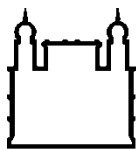
PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO DE HEPATÓCITOS DE RATO PARA TERAPIA celular

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves

RIO DE JANEIRO

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LIANA MONTEIRO DA FONSECA CARDOSO

PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO DE HEPATÓCITOS DE RATO PARA TERAPIA CELULAR

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto - Presidente

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado

Prof. Dr. Lucio Filgueiras Pacheco Moreira

Prof. Dra. Andrea Henriques Pons

Prof. Dra. Helene Santos Barbosa

RIO DE JANEIRO

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C268 Cardoso, Liana Monteiro da Fonseca

Padronização das condições de criopreservação de hepatócitos de rato para terapia celular / Liana Monteiro da Fonseca Cardoso. – Rio de Janeiro, 2015.

xiv,84 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 77-84

1. Fígado. 2. Insuficiência hepática aguda. 3. Hepatócitos. 4. Criopreservação. 5. Transplante de hepatócitos. I. Título.

CDD 616.362

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe, Nádia, minha irmã, Letícia e principalmente a minha filha, Ana Beatriz; por serem o meu porto seguro e iluminarem a minha vida todos os dias.

Aqui termino mais essa etapa da minha vida, e nesses dois anos de caminhada científica gostaria muito de agradecer a algumas pessoas que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Portanto, quero deixar aqui registrado o quanto cada um de vocês direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que sempre foi o meu amparo e a minha luz. Agradeço por ter sido a minha força quando eu mais precisei, quando inúmeras vezes deixei de acreditar que era possível, por ter colocado em minha vida as pessoas certas e até as erradas pois foram com elas que eu mais aprendi. Obrigada pelo apoio, pela força espiritual e mental pois sempre tive a certeza que nunca estive sozinha.

Agradeço à minha família... Ah!!!! O que seria de mim sem vocês??? Ao meu pai que mesmo tão distante da vida terrena é minha inspiração de todos os dias. Foi com você que me tornei o que sou hoje, um guerreiro que me proporcionou um exemplo de vida, força, determinação, amor e principalmente por ter me ensinado a não desistir tão fácil ou melhor me ensinou a nunca desistir. Sinto a sua falta e morro de saudades todos os dias, dedico todas as minhas vitórias a você. À Minha mãe pois hoje tudo se torna possível unicamente pelo seu apoio de todos os dias. Agradeço pelos inúmeros sacrifícios que fazes para ver meus sonhos realizados, mesmo com tantas dificuldades que já enfrentamos você nunca nos deixou cair. Te amo por isso e por muito mais que seria impossível decifrar. Agradeço à minha irmã, nossa o que dizer de você? Que também é uma filha pra mim, que te peguei em meu colo quando ainda era um bebezinho e hoje é o meu maior orgulho. Inteligente, linda e acima de tudo com um caráter admirável sei o quanto você torce por mim e que daqui a pouco quem estará fazendo todos esses agradecimentos será você. Bom, quero agradecer a alguém que ainda não faz a mínima noção do que está acontecendo agora mas um dia será capaz de entender e sentir a dimensão do meu amor e gratidão pela sua existência. É por ela que eu vivo a cada dia, é por ela que cada palavra dessa dissertação foi escrita, é por ela que me esforço todos os dias para me tornar uma pessoa melhor, para ser um exemplo de vida afinal quero que se orgulhe muito de mim. Tu estás presente no ar que respiro, és dona dos meus passos e por quem morreria se preciso fosse. Então saiba é você minha filha, Ana Beatriz (hoje com 5 aninhos) o meu presente de Deus, que move a minha vida.

Agradeço à minha prima e amiga Gabriela, pela torcida e pensamentos positivos sempre. À minha tia Cristina pelas orações silenciosas e preocupação. Agradeço a oportunidade de estarmos juntas com a benção de Deus.

Agradeço aos meus amigos, Juliana Soares, Clarisse Silva, Vinícius Matos que me acham uma cientista louca. Obrigada pela paciência e compreensão pela minha ausência em diversos momentos.

Agradeço ao meu orientador, Luiz Anastacio, por acreditar e confiar em mim. Saiba que admiro muito a sua inteligência e o seu conhecimento. Agradeço pelo seu empenho de desenvolver em cada aluno um indivíduo crítico e pensante, por se preocupar com o nosso futuro científico e não medir esforços para isso. Obrigada pelo tempo dedicado ao meu aprendizado e pelas horas de incentivo. Ao aplicar a sua filosofia do “Pensamento crítico e habilidade de aprender aprender” me tornei uma aluna “nerd”, obrigada confesso que já aceitei e estou adorando essa nova fase.

Agradeço à Dr^a. Cristina, ou melhor a minha amiga Cris. É difícil explicar e ainda mais complicado para que entendam, mas acho que uma expressão define todo o meu carinho por você... um encontro divino, é isso. Se não fosse você eu não estaria aqui hoje no LCC e defendendo a minha tese de mestrado. Você foi o meu primeiro passo e ao longo desses dois anos você continuou caminhando comigo. Obrigada por ser essa luz de todos os dias, pelos conselhos, pelo carinho, pelo respeito e dedicação para que tudo dê certo. A você meus eternos agradecimentos.

Agradeço a uma pessoa muito especial, com quem aprendi e aprendo todos os dias um pouco do conhecimento científico... no início um pai científico, que dedicava seu tempo para me ensinar grande parte do que sei hoje e aos poucos uma amizade de tamanho indefinível conquistamos, com você divido a bancada e como grandes amigos divido a minha vida. Me orgulho de ter ao meu lado uma pessoa de tamanho conhecimento e que com muita humildade sustenta isso, me orgulho da sua honestidade e capacidade de ser o que você é sem passar por cima de ninguém. Na vida toda criança tem um super herói ou uma princesa encantada, na vida científica eu tenho você... o “Super Anael” e na vida pessoal eu tenho o meu “Amigãozão”. Obrigada Anael, por tudo, pelas horas sérias de trabalho e pelas horas de muitos risos nos momentos de descontração.

Agradeço aos amigos Carla Santos e Renato Mattos. A vocês agradeço todo auxílio, apoio e luta do dia-dia no LCC. Carla obrigada por todo apoio e ajuda durante esses dois anos de mestrado, nas apresentações em power point, nas dúvidas frequentes, nos textos e em tudo aquilo que sempre pude contar com você. Aos dois agradeço acima de tudo a amizade sincera, as ótimas conversas e momentos “*relax outside the lab*” sem mais detalhes acredito que tenham entendido.

Agradeço aos meus companheiros de jornada, Luíza Pereira, que sempre me ajudou com os experimentos de padronização e esteve ali sempre que necessário. Ao Leonardo Braga pelo apoio e idéias sempre bem-vindas; A Natasha Rocha pela amizade, carinho e desabafos; ao Dinarte Ferreira, Alejandra Carreño, pelo companherismo e apoio de todos os dias.

A aluna de Doutorado Kátia Quaresma, com quem iniciei todo esse projeto e me permitiu desenvolver parte de sua linha de pesquisa. Obrigada por dividir comigo seu conhecimento e experiência principalmente no isolamento de hepatócitos.

Agradeço ao Dr. Marcelo Pinto quem sempre esteve disposto a contribuir com seu conhecimento e experiência em hepatite fulminante. Obrigada por estar presente nesse trabalho e ao longo da minha caminhada científica, contribuindo de forma engrandecedora desde os meus treinos para a seleção do mestrado até a minha seleção para o doutorado.

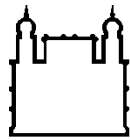
Agradeço a Dra. Andrea Henriques que sempre com muita atenção e carinho abriu as portas do seu laboratório para me socorrer nas horas de aperto. Seu conhecimento contribui de forma inesplicável para esse trabalho, hoje sou feliz por conseguir células não marcadas com o corante azul de tripan justamente pela sua ajuda. Não fazes idéia da dimensão da minha felicidade e tranquilidade é claro. Obrigada ainda pela revisão na dissertação.

Agradeço aos pesquisadores do LCC Dr. Robson Faria e Dr. Pedro Celso pelo auxílio e contribuição durante esses dois anos.

SUMÁRIO

| | Páginas |
|---|---------|
| AGRADECIMENTOS | iv |
| LISTA DE FIGURAS E QUADROS | xi |
| LISTA DE TABELAS | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xiv |
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | x |
| 1. CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. O Fígado Humano | 1 |
| 1.2. Insuficiência Hepática | 3 |
| 1.3. Transplante Hepático | 8 |
| 1.3.1. Transplante Inter-vivos | 11 |
| 1.3.2. Transplante Auxiliar | 13 |
| 1.3.3. Transplante <i>Split</i> | 14 |
| 1.4. Terapias de suporte ao transplante hepático | 14 |
| 1.5. Terapia Celular e Transplante Hepatocitário | 16 |
| 1.6. Criopreservação | 20 |
| 1.6.1. Agentes Crioprotetores | 24 |
| 1.6.2. Criopreservação de hepatócitos | 25 |
| 1.6.3. Animais tolerantes ao congelamento | 27 |
| 2. CAPÍTULO II. JUSTIFICATIVA & OBJETIVOS | 29 |
| 2.1. Justificativa | 29 |
| 2.2. Objetivos | 29 |
| 2.2.1. Objetivo Geral | 29 |
| 2.2.2. Objetivos específicos | 29 |

| | |
|--|----|
| 3. CAPÍTULO III. MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 3.1. Animais | 31 |
| 3.2. Isolamento de hepatócitos de rato com colagenase tipo IV | 31 |
| 3.3. Isolamento de hepatócitos de rato com Tryple Express 1X | 34 |
| 3.4. Criopreservação- Congelamento e descongelamento de hepatócitos | 35 |
| 3.5. Viabilidade celular | 36 |
| 3.6. Avaliação da viabilidade por marcação celular com calceína ácida, calceína-AM e Iodeto de propídio | 36 |
| 3.7. Ensaio de LDH | 37 |
| 3.8. Avaliação da produção de albumina | 38 |
| 3.9. Análise estatística | 38 |
| 4. CAPÍTULO IV RESULTADOS | 39 |
| 5. CAPÍTULO V DISCUSSÃO | 63 |
| 6. CAPÍTULO VI CONCLUSÕES | 74 |
| 7. CAPÍTULO VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 75 |



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

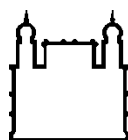
PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO DE HEPATÓCITOS DE RATO PARA TERAPIA CELULAR

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Liana Monteiro da Fonseca Cardoso

A insuficiência hepática aguda (IHA) é uma síndrome clínica grave e complexa, que se destaca pela súbita perda funcional dos hepatócitos. O transplante hepático ainda é a única opção terapêutica definitiva para a substituição da função hepática. Infelizmente, há grande limitação de doadores, o que contribui para uma alta mortalidade de pacientes. Novas estratégias de suporte ao transplante precisam ser desenvolvidas a fim de minimizar a mortalidade de pacientes em filas de espera. Logo, a proposta do transplante hepatocitário pode melhorar a qualidade de vida até o dia do transplante ou mesmo levar à recuperação do paciente. Contudo, o maior desafio para o uso clínico é a disponibilidade de hepatócitos em boas condições para o transplante e a criopreservação é um fator essencial a esta demanda, uma vez que torna possível o armazenamento de hepatócitos em grande escala. No entanto, hepatócitos são altamente suscetíveis ao processo de congelamento. Dessa forma, este estudo tem como objetivo desenvolver um protocolo de criopreservação de hepatócitos, utilizando substâncias naturais que possam minimizar as criolesões. Hepatócitos de ratos foram isolados por dois métodos de dissociação enzimática. A viabilidade celular foi analisada por exclusão do azul de tripan, calceína-AM, iodeto de propídio e pelo método de MTT antes e após a criopreservação. Hepatócitos recém isolados utilizando a enzima colagenase não nos permitiu medir a viabilidade pela técnica de exclusão do azul de tripan. Entretanto, tais células apresentaram atividade metabólica, confirmada pelo ensaio de MTT. O isolamento de hepatócitos de rato com o reagente de digestão Tryple Express mostrou ser eficaz no processo de isolamento das células hepáticas e nos permitiu avaliar a viabilidade em todos os métodos propostos. Além disso, demonstramos que hepatócitos podem ser criopreservados em DMSO a 5%, metade da concentração sugerida pela literatura. Células criopreservadas com 0,2 M de trealose, na ausência de DMSO, apresentaram maior viabilidade quando comparadas àquelas submetidas a apenas 5% de DMSO, demonstrando que a trealose é um potencial agente crioprotetor.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STANDARDIZATION OF CONDITIONS RAT HEPATOCYTES CRYOPRESERVATION FOR CELL THERAPY

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION

Liana Monteiro da Fonseca Cardoso

Acute liver failure (ALF) is a severe and complex clinical syndrome and stands out for sudden functional loss of hepatocytes. Liver transplantation remains the only definitive treatment option for liver function recovery. Unfortunately, there is a great limitation of donors, which contributes to the high mortality rate of patients. Alternative strategies for transplantation must be developed in order to minimize patients mortality while on waiting lists. Therefore, the proposal of hepatocyte transplantation may improve life quality until the transplantation or even lead to patient recovery. Nevertheless, the biggest challenge for clinical use is the availability of highly viable hepatocytes for transplantation and cellular cryopreservation is an essential factor to this application, since it makes possible to store hepatocytes on a large scale. However, hepatocytes are highly susceptible to freezing process. Thereby, this study aim is to develop an hepatocyte cryopreservation protocol, using natural substances that could minimize the cryo-injuries. Rat hepatocytes were isolated by two different enzymatic dissociation methods. Cell viability before and after cryopreservation was analyzed by trypan blue exclusion, Calcein-AM, propidium iodide and by the MTT method. Hepatocytes freshly isolated using collagenase did not allow us to measure cell viability by the trypan blue exclusion. However, those cells had metabolic activity, confirmed MTT. The isolation of fresh rat hepatocytes with Tryple Express reagent proved to be effective in liver cells isolation and enabled us to assess cell viability using all proposed methods. Furthermore, we demonstrated that hepatocytes can be cryopreserved using 5% DMSO, half concentration suggested by the literature. Cryopreserved cells with 0.2 M trehalose, in the absence of DMSO, showed higher viability when compared to those submitted to only 5% DMSO, demonstrating that trehalose is a potential cryoprotectant agent.

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 Estrutura do fígado..... | 2 |
| Figura 1.2. Características clínicas da IHA em diversos órgãos..... | 4 |
| Figura 1.3. Causas da IHA..... | 7 |
| Figura 1.4. Necessidade estimada e número de transplantes de fígado realizados no Brasil em 2013..... | 11 |
| Figura 1.5. Alternativas terapêuticas ao transplante hepático..... | 17 |
| Figura 3.1. Princípio do ensaio de viabilidade pelo MTT..... | 36 |
| Figura 4.1. Microscopia dos hepatócitos frescos após isolamento com colagenase tipo IV..... | 40 |
| Figura 4.2. Avaliação da viabilidade celular por exclusão do azul de tripan após isolamento com colagenase tipo IV..... | 41 |
| Figura 4.3. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após isolamento com colagenase tipo IV..... | 41 |
| Figura 4.4. Ensaio de LDH em hepatócitos isolados e incubados a 37°C..... | 42 |
| Figura 4.5. Ensaio de LDH em hepatócitos isolados e incubados a 4°C..... | 42 |
| Figura 4.6. Hepatócitos marcados com calceína-AM, calceína ácida e iodeto de propídio..... | 43 |
| Figura 4.7. Hepatócitos de rato isolados com enzima de dissociação Tryple Express 1X..... | 45 |
| Figura 4.8. Avaliação da viabilidade celular por exclusão do azul de tripan após isolamento com Tryple express 1x..... | 46 |
| Figura 4.9. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após isolamento com tryple express 1X..... | 46 |
| Figura 4.10. Ensaio de LDH em hepatócitos isolados e incubados a 37°C | 47 |
| Figura 4.11. Ensaio de LDH em hepatócitos isolados e incubados a 4°C..... | 48 |
| Figura 4.12. Microscopia de fluorescência com calceína-AM e Pi..... | 48 |
| Figura 4.13. Ensaio funcional para a produção de albumina em hepatócitos de rato após o isolamento e criopreservação..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.14. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan em células HepG2 após a criopreservação com DMSO..... | 51 |
| Figura 4.15. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT em células HepG2 após a criopreservação com DMSO..... | 51 |
| Figura 4.16. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan de hepatócitos isolados após a criopreservação com DMSO..... | 52 |
| Figura 4.17. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT em Hepatócitos de rato após a criopreservação com DMSO..... | 52 |
| Figura 4.18. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan e MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com DMSO e Sacarose durante 7, 15 ou 30 dias..... | 54 |
| Figura 4.19. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan e MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com DMSO e Glicose durante 7, 15 ou 30 dias..... | 55 |
| Figura 4.20. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan e MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com DMSO e Trealose durante 7, 15 ou 30 dias..... | 56 |
| Figura 4.21. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e Sacarose..... | 58 |
| Figura 4.22. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e Sacarose..... | 58 |
| Figura 4.23. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e glicose..... | 59 |
| Figura 4.24. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e glicose..... | 60 |
| Figura 4.25. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e trealose..... | 60 |
| Figura 4.26. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e trealose..... | 61 |
| Figura 4.27. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e glicerol..... | 62 |
| Figura 4.28. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO ou glicerol..... | 62 |
| Figura 5.1. Resultados gerais de isolamento e criopreservação de hepatócitos de rato..... | 73 |

LISTA DE TABELAS E QUADROS

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1. Classificação de Insuficiência Hepática Aguda Segundo O'Grady | 4 |
| Tabela 1.2. Estágios da Encefalopatia Hepática - Critérios de West Haven | 5 |
| Tabela 1.3. Transplante de Hepatócitos Humanos: Estudos clínicos em pacientes com doenças metabólicas do fígado..... | 17 |
| Tabela 1.4. Transplante de Hepatócitos Humanos para pacientes com IHA..... | 18 |
| Tabela 1.5. Trabalhos da literatura com criopreservação de hepatócitos em DMSO..... | 26 |
| Tabela 1.6. Estratégia de tolerância ao congelamento desenvolvida por algumas espécies de animais..... | 28 |
| Tabela 3.1 Composição de salina tamponada com HEPES, com e sem EDTA, na presença ou na ausência de cálcio utilizado no isolamento de hepatócitos de rato para perfusão com colagenase..... | 32 |
| Tabela 3.2. Composição do HBSS sem cálcio e sem magnésio utilizado no isolamento de hepatócitos de rato para perfusão com colagenase. (pH= 7,4) | 32 |
| Tabela 3.3. Composição do HBSS com cálcio e com magnésio utilizado no isolamento de hepatócitos de rato para perfusão com colagenase (pH= 7,4) | 33 |
| Tabela 3.4. Composição do reagente <i>TrypLE™ Express 1X</i> | 34 |
| Tabela 3.5. Osmolaridade das soluções adicionadas ao meio de criopreservação..... | 35 |
| Tabela 5.1. Contribuição desse trabalho para a criopreservação de hepatócitos de rato..... | 72 |
| Quadro 1.1. Alguns medicamentos que podem causar lesões hepáticas idiossincráticas e induzir a IHA..... | 7 |
| Quadro 1. 2. Atuais e Principais indicações para o transplante de fígado..... | 9 |
| Quadro 1.3. Critério de <i>Clichy</i> para indicação de transplante hepático na IHA..... | 10 |
| Quadro 1.4. Critério de <i>King's College</i> para indicação de transplante hepático na IHA..... | 10 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

- (IHA) – Insuficiência Hepática Aguda
- (EH) – Encefalopatia Hepática
- (FHF) – Falência Hepática Fulminate
- (TF) – Transplante de Fígado
- (FV) – Fator V (Cinco)
- (HBsAg) – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
- (TP) – Tempo de Protrombina
- (RNI) – *International normalized ratio*
- (TFDV) – Transplante de Fígado de Doador Vivo
- (APHLT) – *Auxiliary Partial Heterotopic Liver Transplantation*
- (TFD) – Transplante de Fígado Dominó
- (PAF) - Polineuropatia Amiloidótica Familiar
- (HCC) – Hepatocelular
- (TFS) - Transplante de Fígado *Split*
- (ACP) - Agente Crioprotetor
- (DMSO) - Dimetilsulfoxido
- (Pi) – *Propidium iodide* (iodeto de propídio)
- (LDH) – Lactato desidrogenase
- (MTT) – 3-(4,5 – dimetiltiazolyl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
- (HBSS) - *Hank's buffered salt solution*

1.1. O FÍGADO HUMANO

O fígado é o maior órgão interno do corpo humano, correspondendo de 2 a 5% do peso corporal e desempenha diversas funções de suma importância para a manutenção da homeostase, tais como: metabolismo de aminoácidos, carboidratos, lipídios, vitaminas; desintoxicação; síntese de proteínas plasmáticas (albumina, fatores de coagulação); produção e secreção da bile; secreção de resíduos endógenos e xenobióticos (1, 2). É um órgão glandular e está envolvido por uma cápsula, a cápsula de Gilson. Está localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal abaixo do diafragma e está protegido pela caixa torácica (3, 4). Esse órgão apresenta dois lobos principais, o lobo lateral direito e o lobo lateral esquerdo, e dois lobos acessórios, o lobo quadrado e o lobo caudado (4). É um órgão muito vascularizado e em repouso recebe até 30% do do sangue por minuto, mais do que qualquer outro órgão (4). Apresenta um duplo aporte sanguíneo, dividido exclusivamente entre a artéria hepática e a veia porta. A maior parte, de 75% a 80%, do suporte sanguíneo deriva da veia porta, transportando sangue pouco oxigenado e rico em nutrientes. A artéria hepática recebe de 20% a 25% do suprimento de sangue, fornecendo sangue rico em oxigênio (3, 4).

Histologicamente, o fígado está dividido em lóbulos. Os lóbulos hepáticos são as unidades funcionais do fígado e apresentam uma arquitetura hexagonal multicelular, formada pelos hepatócitos e pelos sinusóides em torno de uma veia central (1, 5). Lóbulos vizinhos estão rodeados por tríades portais, compostas por ramos do ducto biliar, da veia porta, e da artéria hepática. A partir do hilo, em uma área de espessamento da cápsula de Gilson, há uma ramificação contínua da artéria hepática e da veia porta formando uma rede de capilares chamados sinusóides (5). Citologicamente, os lóbulos hepáticos são constituídos em sua grande maioria por células parenquimatosas ou hepatócitos. Tais células estão organizadas em cordões e são as principais células encontradas no fígado, correspondendo correspondendo a aproximadamente 70% das células totais. As demais células, isto é, células endoteliais sinusoidais, células de Kupffer (macrófagos residentes), células esteladas ou células Ito e células pit (células *natural killer*), constituem aproximadamente 33% do número de células residentes do fígado (5). A estrutura do fígado e as células que o compõem estão representadas na figura 1.1.

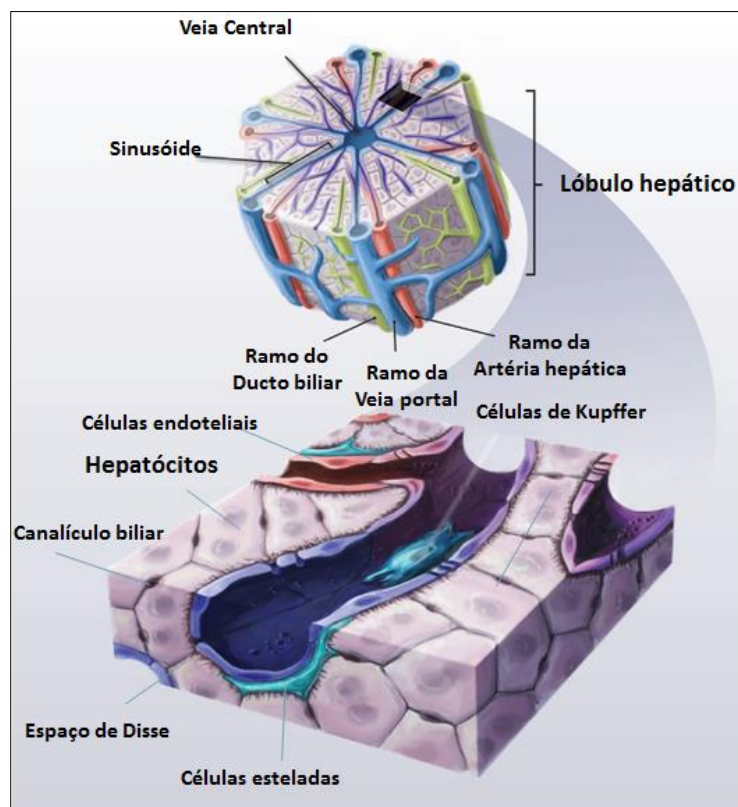


Figura 1.1 Estrutura do fígado. O lóbulo hepático, é a unidade funcional do fígado e apresenta uma arquitetura hexagonal multicelular formado pelos hepatócitos e sinusóides em torno de uma veia central. Os hepatócitos são células polarizadas que interagem com outros tipos de células não-parenquimatosas ao longo das extensões sinusoidais do lóbulo do hepático. Coletivamente, todos esses componentes celulares e a estrutura hepática contribuem para a diversidade de papéis funcionais do fígado. Modificado de Bhatia *et al*, 2014.

Uma das principais características do fígado é a sua notável capacidade de regeneração após a remoção de parte do seu parênquima ou lesão de até 70% da sua massa total (4). Embora comumente utilizado, o termo regeneração é biologicamente incorreto, uma vez que a resposta induzida pela perda de tecido hepático não é verdadeiramente regenerativa. Esse processo é mais corretamente definido como um processo de hiperplasia compensatória, visto que o tecido hepático remanescente se expande para atender as necessidades metabólicas do organismo. Contrariamente ao verdadeiro processo de regeneração, no caso de hepatectomia parcial e algumas lesões hepáticas induzidas quimicamente, a reposição da massa hepática ocorre pela replicação dos hepatócitos existentes sem ativação das células progenitoras (6).

Devido à sua posição anatômica singular e complexidade funcional, o fígado é suscetível a uma grande variedade de lesões metabólicas, tóxicas, microbianas, circulatórias e neoplásicas (2). Tais lesões podem levar a modificações morfológicas e

funcionais, descaracterizando o tecido hepático e promovendo perda funcional crônica ou aguda (1).

1.2. INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

Dentre as doenças hepáticas que acometem o fígado, a insuficiência hepática aguda (IHA) destaca-se pela rápida deteriorização da função hepática, com um alto índice de mortalidade, chegando a 80% em diversas séries (7-11). É também uma síndrome clínica complexa resultante da perda funcional súbita dos hepatócitos, em pacientes sem doença hepática pré-existente. Essa rápida perda funcional é resultado da necrose maciça dos hepatócitos e está associada com encefalopatia hepática (EH), coagulopatia e icterícia (12). Além disso, a IHA é uma síndrome na qual, além do fígado, outros órgãos podem ser acometidos, como o cérebro, os rins, os pulmões, a medula, o sistema circulatório e o sistema imunológico (figura 1.2) (13). Os sinais e sintomas são geralmente inespecíficos, tais como: fadiga, anorexia, náusea, dor abdominal, febre e icterícia. Estes progridem até o desenvolvimento de encefalopatia hepática (14, 15).

A IHA é por vezes referida como Falência Hepática Fulminante (FHF), um termo usado pela primeira vez em 1970 por Trey e Davidson (Bernal and Wendon 2014). Os autores descrevem a IHA como uma doença potencialmente reversível resultante de uma lesão hepática grave, com um início de encefalopatia dentro de 8 semanas do aparecimento dos sintomas, na ausência de doença hepática crônica. Embora, as características principais dessa definição continuem relevantes até hoje, O'Grady *et al*, propôs em 1993 uma nova classificação para adultos com IHA. Nessa classificação, os autores apresentaram três grupos com base no tempo entre o início da icterícia e o desenvolvimento de encefalopatia, como demonstrado na tabela 1.1. Essa classificação já ganhou ampla aceitação nos estudos clínicos e de pesquisa e reconhece que as complicações e o prognóstico da IHA dependem da taxa de evolução dessas alterações (12, 13, 16).

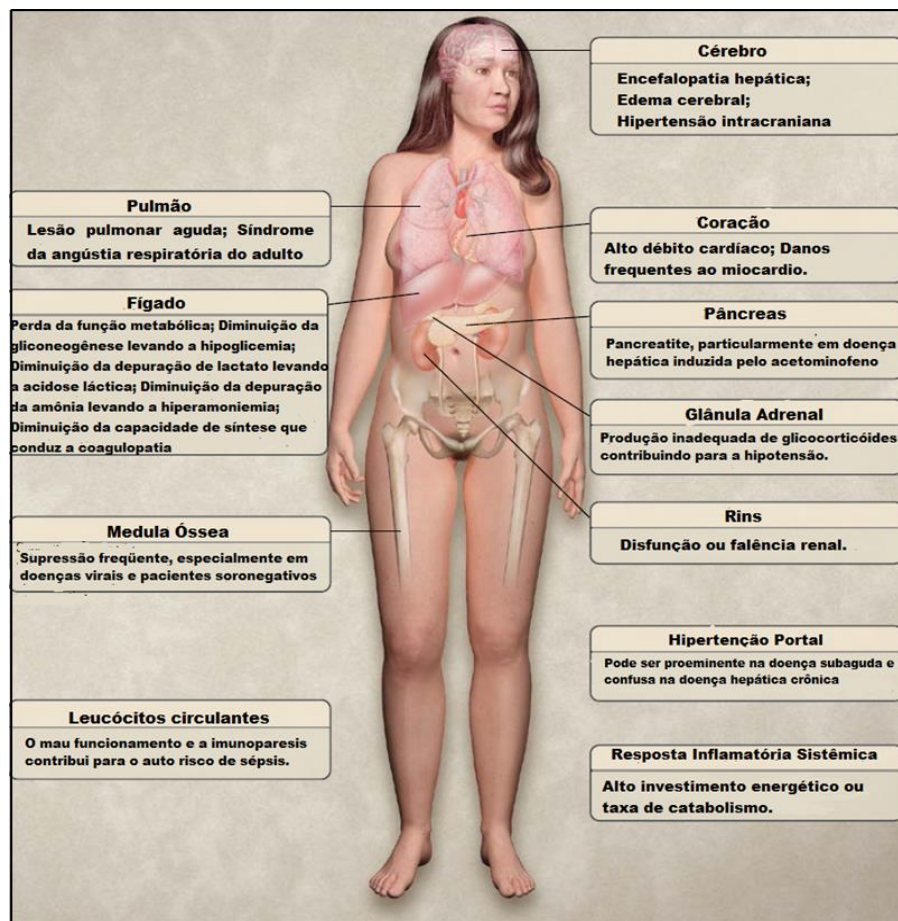


Figura 1.2 Características clínicas da IHA em diversos órgãos. Adaptado de Bernal *et al*, 2014.

Tabela 1.1. Classificação de Insuficiência Hepática Aguda Segundo O’Grady

| Referência | Classificação | Intervalo de tempo entre desenvolvimento de icterícia e aparecimento de encefalopatia |
|-----------------------------|-----------------------------------|---|
| O’Grady <i>et al</i> , 1993 | Insuficiência hepática hiperaguda | 0-1 semanas |
| | Insuficiência hepática aguda | 1-4 semanas |
| | Insuficiência hepática subaguda | 4-12 semanas |

Em crianças, a encefalopatia clínica pode ser ausente ou tardia no curso da doença, assim, a classificação não depende desse sintoma, sendo caracterizada apenas pela presença de coagulopatia devido à lesão hepática. A designação aceita da IHA para estudos clínicos e de pesquisa é que trata-se de um distúrbio multisistêmico, em que o grave comprometimento da função hepática, com ou sem encefalopatia, ocorre devido à necrose hepatocelular em pacientes sem doença hepática pré-existente (13, 16).

A hipertensão intracraniana, maior causa de mortalidade nesses pacientes, é secundária ao edema cerebral, que é o centro do processo responsável pela EH (17-19). A manifestação clínica da EH evolui rapidamente, podendo variar desde alterações mentais sutis até o coma (tabela 1.2), mantendo relação direta com a intensidade do edema cerebral e com a evolução da gravidade da insuficiência hepática (20-22).

Tabela 1.2: Estágios da Encefalopatia Hepática - Critérios de West Haven

| Estágio | Consciência | Intelecto e Comportamento | Achados Neurológicos |
|---------|--------------------------|--|--|
| 0 | normal | normal | exame normal; testes psicomotores prejudicados |
| 1 | leve perda de atenção | redução na atenção; redução e subtração prejudicadas | tremor ou flapping leve |
| 2 | letárgico | desorientado; comportamento inadequado | flapping evidente; fala arrastada |
| 3 | sonolento mas responsivo | desorientação severa; comportamento bizarro | rigidez muscular e clonus; hiperreflexia |
| 4 | coma | coma | postura de descerebração |

O fígado tem um papel importante na síntese de quase todos os fatores da coagulação e de alguns inibidores da coagulação. As principais alterações na IHA, incluem disfunção plaquetária (quantitativa e qualitativa), bem como redução dos níveis circulantes de fibrinogênio e dos fatores de coagulação II, V, VII, IX e X. Isso leva ao prolongamento no tempo de protrombina, o qual é amplamente usado como um indicador da gravidade da lesão hepática (14, 15, 23).

A infecção, principalmente dos tratos respiratório e urinário, desenvolve-se em 80% dos casos de IHA e a bacteremia em 20% a 25% dos casos. Os pacientes têm um risco substancial de sepse, causada principalmente pela disfunção do sistema monocítico-fagocitário e pela diminuição da opsonização. Os patógenos mais comumente encontrados são estafilococos, estreptococos e bacilos gram-negativos. Já as infecções fúngicas ocorrem em um terço dos casos, principalmente por *Candida albicans*, em pacientes com insuficiência renal e em antibioticoterapia prolongada (15, 23).

As complicações cardiovasculares, hemodinâmicas e respiratórias são frequentes nesses pacientes, caracterizando-se por vasodilatação sistêmica, baixa resistência vascular sistêmica, hipotensão e aumento compensatório do débito cardíaco (13). As anormalidades metabólicas incluem insuficiência renal aguda, hipoglicemia, anormalidades eletrolíticas e

pancreatite. A insuficiência renal aguda ocorre em 50% dos casos, determinando um mau prognóstico (15, 23).

Diversas são as etiologias envolvidas na IHA (figura 1.3), incluindo hepatites virais (A, B e E), hepatites medicamentosas, intoxicação exógena, vasculares (isquêmica ou Budd-Chiari), infiltração neoplásica (ex. linfoma), septicemia fulminante, doenças hepáticas auto-imunes e genéticas, choque hepático isquêmico e cerca de 20% dos casos permanece sem causa definida (14, 15, 23). Os principais agentes causadores de lesões hepáticas que levam à indução da IHA apresentam grandes variações geográficas, porém, a maioria dos casos está relacionado a infecções virais, fármacos ou toxinas. Nos países em desenvolvimento, como por exemplo o Brasil, as causas virais são predominantes, sendo as hepatites do tipo A, B e E responsáveis pela maioria dos casos (13). Ao contrário do que ocorre nesses países, nos Estados Unidos e em boa parte da Europa Ocidental a indução da lesão hepática ocorre predominantemente pela utilização de drogas (13, 15). A intoxicação por acetaminofeno (paracetamol) é a principal causa de IHA nos Estados Unidos e no Reino Unido, representando cerca de 40% das causas de insuficiência hepática (13). A ingestão de doses excedentes a 10 g/dia de acetaminofeno apresenta uma relação direta com a indução de IHA. Entretanto, doses terapêuticas de 3-4 g/dia têm sido relacionadas com hepatotoxicidade e são capazes de induzir lesões hepáticas graves. Esse quadro pode dar origem a aumentos assintomáticos nas concentrações das transaminases hepáticas no sangue depois de mais de 4 dias de consumo (13, 15). Os casos de intoxicação por acetaminofeno podem ser intencionais ou não, em alguns casos, a overdose pode ocorrer pela administração simultânea de muitos produtos contendo paracetamol para fins analgésicos (13, 23, 24). Além disso, pacientes com alto risco de hepatotoxicidade associado ao uso crônico de álcool podem desenvolver hepatotoxicidade com a ingestão de doses terapêuticas da droga (13).

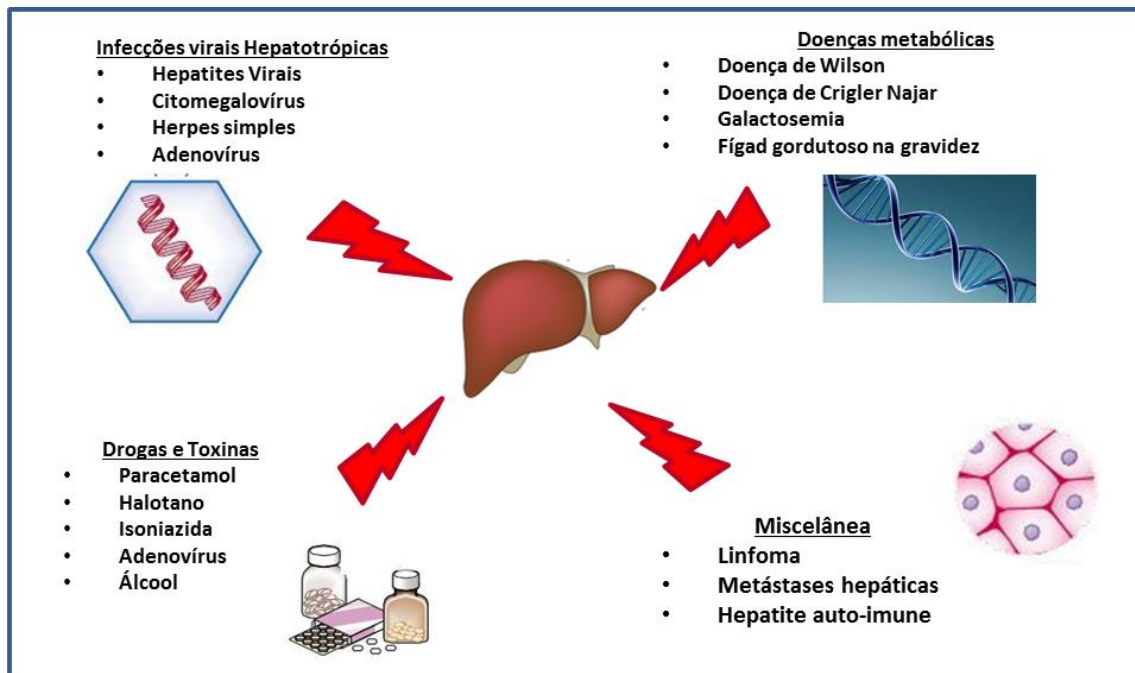


Figura 1.3. Causas da IHA. Diversas são as etiologias envolvidas, incluindo hepatites virais (A, B e E), hepatites medicamentosas, intoxicação exógena, vasculares (isquêmica, ou Budd-Chiari), infiltração neoplásica (ex. linfoma), septicemia fulminante, doenças hepáticas auto-imunes e genéticas, choque hepático isquêmico e cerca de 20% das causas permanecem sem etiologia definida

Uma variedade de medicamentos (quadro 1.1) têm sido associados à lesão hepática aguda. A maioria dos exemplos de drogas idiossincráticas que induzem a hepatotoxicidade ocorrem nos primeiros 6 meses após o início da administração da droga. As classes de drogas comumente implicadas são: antibióticos, agentes anti-inflamatórios não-esteróides, anti-convulsivos e anti-epiléticos (13, 15).

Quadro 1.1 Alguns medicamentos que podem causar lesões hepáticas idiossincráticas e induzir a IHA

| | |
|--|--|
| <p>Anti-epiléticos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fenitoína • Valproato • Carbamazepina | <p>Estatinas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Atorvastatina • Cerivastatina • Sinvastatina |
| <p>Anti-inflamatórios não esteróides</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diclofenaco • Bronfenac • Ibuprofeno | <p>Outras Drogas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Propiltiouracil • Halotano • Herbal • Amitriptilina • Nefazodona • Metrotexano • Troglitazona • Mercaptopurina ou azatioprina • Metildopa |
| <p>Antibióticos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nitrofurantoína • Cetoconazol • Amoxicilina e clavulanato • Trimetoprima sulfametoxazol • Minociclina | |

A investigação criteriosa de todos os possíveis agentes etiológicos é bastante importante, embora alguns pacientes sejam classificados como de etiologia indeterminada. Cabe ressaltar que a identificação da causa influencia o prognóstico e o manejo da doença (15).

1.3. O TRANSPLANTE HEPÁTICO

Embora existam terapias modernas de suporte à vida disponíveis nos centros de terapia intensiva, pacientes que desenvolvem IHA permanecem sem um tratamento terapêutico eficaz, sendo o transplante do órgão a terapia usual em estágios não reversíveis da doença (15, 25, 26).

O primeiro transplante de fígado (TF) foi realizado por Thomas Starzl em 1963 e desde então continua sendo o único mecanismo realizado com sucesso em casos de perda da função hepática. Desde a sua realização até os dias atuais, muitas estratégias de transplantes evoluíram em todo o mundo no que diz respeito às técnicas cirúrgicas, a imunossupressão, alocação de órgãos, seleção dos doadores, indicação e contra-indicação para o TF, a profilaxia de infecções e a prevenção de doenças recorrentes. A capacitação técnica das equipes cirúrgicas e procedimentos bem estabelecidos, salvou inúmeras vidas em todo o mundo (27). Como resultado, a sobrevivência após o TF é significativamente melhor nos últimos anos. Atualmente, a sobrevida média é cerca de 90% no primeiro ano pós-transplante e 60% aos 10 anos (28). Devido ao mau prognóstico, pacientes com IHA são indicados para o transplante hepático de emergência; entretanto, os riscos de um transplante hepático de emergência envolvendo a falência múltipla de órgãos devem ser contrabalançados com a possibilidade de sobrevida com os tratamentos de suporte. Devido à alta mortalidade de pacientes com IHA, é necessário identificar precocemente os casos irreversíveis para providenciar o órgão e evitar que complicações da doença excluam a possibilidade de transplante (15). Diferentes critérios de seleção para o transplante de emergência são utilizados em todo o mundo. Embora, existam variações para esses critérios, alguns aspectos comuns são levados em consideração como: a análise da sobrevida dos pacientes que irão receber o enxerto; presença de encefalopatia hepática grave; idade do paciente e a gravidade da disfunção hepática, de acordo com os níveis de coagulopatia e de icterícia (13)

No geral, o TF é indicado para IHA, cirrose devido à insuficiência hepática crônica, doenças metabólicas hereditárias, para o carcinoma hepatocelular e outros tipos de câncer hepáticos, incluindo o hepatoblastoma, hemangioendotelioma epitelióide hepático e

colangiocarcinoma hilar (27). As principais indicações para o TF estão apresentadas no quadro 1.2.

Quadro 1.2. Atuais e principais indicações para o transplante de fígado. Modificado de Song *et al*, 2014.

| Categoria | Doença |
|---------------------------------------|--|
| Insuficiência Hepática Aguda | <ul style="list-style-type: none"> • Hepatites agudas A e B • Hepatotoxicidades induzidas por toxinas e drogas |
| Cirrose de Doenças Hepáticas Crônicas | <ul style="list-style-type: none"> • Hepatite crônica pelo vírus C e B • Doença hepática alcoólica • Hepatite auto-imune • Doença hepática criptogênica • Cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária |
| Desordens Metabólicas | <ul style="list-style-type: none"> • Cirrose biliar secundária • Deficiência de alfa-1 antitripsina • Hemocromatose hereditária • Doença de Wilson • Doença de armazenamento de glicogênio tipo I • Hiperoxaluria primária tipo 1 • Hipercolesterolemia familiar homozigótica |
| Neoplasias Malignas | <ul style="list-style-type: none"> • Câncer hepático primário: carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma • Metastático: tumor carcinóide e tumores de ilhotas celulares |
| Miscelâneas | <ul style="list-style-type: none"> • Doença hepática policística • Síndrome de Budd-Chiari |

Alguns critérios para indicar o TF têm sido utilizados. Os critérios de *Clichy e King's College* são os dois principais scores utilizados para selecionar os pacientes em casos de IHA (27). Em 1986, Bernau e colaboradores avaliaram um coorte de 115 pacientes com hepatite viral B e IHA, sendo criado o critério de *Clichy*, que inclui: a dosagem do fator V (FV), a idade do paciente, a ausência de positividade do HbsAg, o nível de alfa fetoproteína. Sendo esses fatores preditivos independentes de sobrevida em análise multivariada (13, 29). Atualmente, o transplante hepático para IHA é indicado segundo os critérios modificados a partir dos estudos iniciais (quadro 1.3).

| Quadro 1.3. Critério de <i>Clichy</i> para indicação de transplante hepático na IHA |
|--|
| I. Encefalopatia com grau ≥ 3; dosagem de F V $< 20\%$ em pacientes com idade inferior a 30 anos |
| II. Encefalopatia com grau ≥ 3; dosagem de F V $< 30\%$ em pacientes com idade superior a 30 anos |

O'Grady *et al*, 1989 do Hospital *King's College* de Londres, propuseram um segundo critério de inclusão para esses pacientes e definiram as seguintes variáveis com significado prognóstico: causa da doença, idade do paciente, tempo de duração da icterícia, nível de bilirrubina, tempo de protrombina, pH arterial e creatinina (15, 23). As variáveis que constituem o critério de *King's College* estão listadas no quadro 1.4. Ambos os modelos alcançam alta especificidade (13, 15, 27).

| Quadro 1.4. Critério de <i>King's College</i> para indicação de transplante hepático na IHA |
|---|
| Paracetamol: |
| I- pH arterial $< 7,3$ (independente do grau de encefalopatia) ou três dos seguintes: |
| II- Grau 3 ou 4 de encefalopatia; TP > 100 segundos (RNI $> 6,5$) e Creatinina > 300 $\mu\text{mol} / \text{L}$ |
| Outras Etiologias: |
| I-TP > 100 segundos (RNI $> 6,5$) independente do grau de encefalopatia ou três dos seguintes: |
| II-idade < 10 ou > 40 |
| III- Etiologia:hepatite não-A; hepatite não-B; hepatite por halotano; droga idiossincrática |
| IV-Duração da icterícia antes da encefalopatia superior a sete dias |
| V-TP > 50 segundos (RNI $> 3,5$) |
| VI-Bilirrubina total > 300 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (17,5 mg/dL) |

TP – Tempo de Protrombina; RNI – *International normalized ratio*; Modificado de O'Grady *et al*, 1989

O grande problema para o TF é a escassez de órgãos disponíveis, o que limita a oferta para grande parte dos pacientes com a enfermidade aguda. Como consequência, um grande número de pacientes aguardam em listas de espera e não realizam o procedimento cirúrgico, contribuindo para a alta mortalidade (25). Segundo o registro da Associação Brasileira de Transplantes (base de dados 2013), cerca de 55% dos pacientes listados para receber o TF não realizam o procedimento cirúrgico, como ilustrado na figura 1.4.

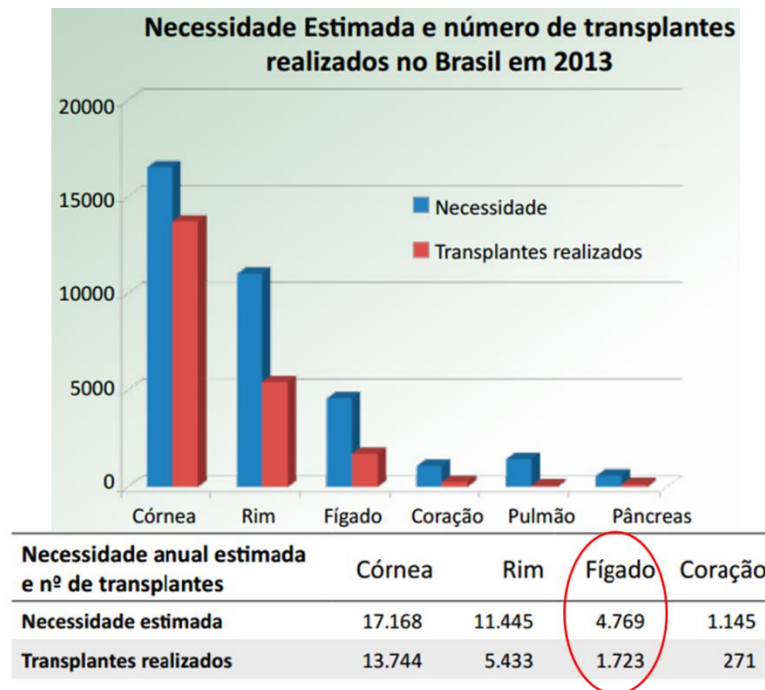


Figura 1.4. Necessidade estimada e número de transplantes de fígado realizados no Brasil em 2013. Fonte: Associação Brasileira de transplantes. Consulta pelo site [http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2013/rbt2013-parcial\(1\).pdf](http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2013/rbt2013-parcial(1).pdf) em 10/02/2015.

Com o objetivo de expandir o número de órgãos para o TF, e diminuir o número de pacientes nas filas de espera, diversos grupos no mundo vêm desenvolvendo estratégias para preencher a lacuna entre a disponibilidade e a demanda de órgãos (30, 31). Tais estratégias envolvem alguns tipos de transplantes, chamados de transplantes parciais tais como: (1) o transplante inter-vivos; (2) o transplante split e (3) o transplante auxiliar, como descrito a seguir (27, 31-34).

1.3.1. TRANSPLANTE INTERVIVOS

O transplante hepático inter-vivos ou transplante de fígado de doador vivo (TFDV) utilizando como enxertos fragmentos hepáticos de doadores vivos saudáveis, surgiu como uma opção de grande importância para muitos pacientes, em especial para pacientes pediátricos e pacientes adultos que são desfavorecidos pelo atual sistema de alocação de doadores falecidos (34, 35). Desde os primeiros transplantes de fígado de doadores vivos, no final da década de 1980, esta técnica de transplante vem sendo utilizada como uma ferramenta bem estabelecida dentro da medicina moderna de transplantes. Enxertos de fígado para beneficiários adultos são principalmente o lobo lateral direito e para receptores

pediátricos, é principalmente utilizado o lobo lateral esquerdo do fígado do doador (27, 34, 36).

A primeira tentativa do transplante inter-vivos foi realizada no Brasil, por Raia e colaboradores em 1989 (37). O transplante foi realizado em uma criança que não sobreviveu ao procedimento cirúrgico; entretanto, a tentativa de Raia estabeleceu a viabilidade técnica do procedimento (27, 35, 37). O primeiro transplante de fígado inter-vivos bem sucedido foi realizado em 1990, na Austrália, por Strong e colaboradores, utilizando como enxerto segmentos do lobo lateral esquerdo (34, 36).

Órgãos de doadores vivos oferecem muitas vantagens importantes sobre órgãos de doadores com morte cerebral. A principal vantagem é que ela otimiza o momento do transplante e os pacientes com doenças hepáticas graves saem das listas de espera. Além disso, o procedimento de transplante pode ser programado de forma eletiva, em tempo hábil, antes de o candidato desenvolver as complicações da fase final da doença hepática, que aumentam o risco de vida. O tempo de preservação externa do órgão é mínimo em transplantes de doadores vivos, com isso, o dano isquêmico ao fígado é significativamente menor. Além disso, o transplante de doador vivo aumenta a oferta de órgãos para transplantes, permitindo que mais pessoas sejam beneficiadas (27, 32, 34).

A grande desvantagem para a realização de um transplante com doadores vivos é o risco de mortalidade e a morbidade para estes doadores. Com isso, doadores voluntários perfeitamente saudáveis são expostos a possíveis danos relacionados ao procedimento cirúrgico. A morbidade desses procedimentos é significativa e correlaciona-se diretamente com a extensão da ressecção. Assim, tanto em termos de morbidade quanto de mortalidade, a lobectomia direita é mais arriscada do que lobectomia esquerda (34).

Cabe ressaltar que esse procedimento é consideravelmente mais caro e que as possibilidades de desenvolver complicações cirúrgicas são maiores do que para o transplante do órgão inteiro. São necessárias duas equipes altamente experientes de cirurgiões. Uma para executar o procedimento no doador e a outra para realizar o procedimento no paciente receptor (36, 38). Contudo, nos últimos anos, a maior parte dos problemas relacionados aos procedimentos técnicos, principalmente em adultos, vêm sendo elucidados. Como consequência, têm sido demonstrado uma diminuição da morbidade e da mortalidade associadas a erros técnicos durante os procedimentos para esse tipo de transplante (38).

1.3.2. TRANSPLANTE AUXILIAR

O Transplante de fígado auxiliar foi desenvolvido porque uma minoria significativa, cerca de 25%, dos pacientes com IHA que atendem aos critérios de transplante e podem ter uma recuperação morfológica e funcional completa do fígado (39, 40). Esse tipo de transplante consiste em implantar um enxerto de fígado saudável deixando todo ou uma parte do fígado nativo no paciente, tendo como princípio o potencial de regeneração compensatória do fígado nativo e conseqüentemente a retirada gradual da imunossupressão (41-43).

Teoricamente, há dois métodos para realizar o transplante de fígado auxiliar. Um deles é o transplante parcial heterotópico de fígado auxiliar (APHLT – *Auxiliary Partial Heterotopic Liver Transplantation*), em que o enxerto (geralmente parcial) é colocado abaixo do fígado nativo não ressecionado (44). O outro método é o transplante parcial ortotópico de fígado auxiliar (APOLT - *Auxiliary Partial Orthotopic Liver Transplantation*), em que o lobo lateral esquerdo ou parte do lobo lateral direito é ressecado e substituído por um enxerto de fígado parcial (41).

O transplante de fígado auxiliar iniciou originalmente nos países ocidentais, sob o método APHLT em pacientes com doença hepática em estágio final, com o primeiro relato clínico em 1965 (45). Entretanto, os resultados iniciais foram insatisfatórios, o que levou à modificações nos procedimentos técnicos e em 1988 foi realizado o primeiro APOLT (44).

APHLT é tecnicamente mais fácil porque hepatectomia nativa é evitada. Entretanto, algumas desvantagens são relacionadas a esse método uma vez que APHLT requer a implantação do enxerto sobre a veia cava infra- hepática, uma área de maior pressão da veia cava, induzindo um risco de obstrução do fluxo venoso. Além disso, essa técnica requer espaço suficiente no abdome, e há competição pelo fluxo venoso portal entre o enxerto e o fígado nativo (46, 47). A regeneração hepática após APHLT pode ser mais lenta do que após APOLT, provavelmente devido à presença total remanescente do fígado nativo necrótico, o que seria responsável pela liberação de citocinas (46).

Os principais resultados relacionados a esses tipos de transplantes são relatados para o APOLT visto as desvantagens já citadas do método anterior. APOLT é uma boa alternativa em casos de doenças metabólicas do fígado que causam complicações extra-hepáticas com risco de vida, tais como a doença de Wilson, síndrome de Crigler-Najjar tipo 1, deficiências enzimáticas-ciclo da uréia, e hiperoxalúria primária tipo 1 (48-50).

Atualmente, o processo convencional realizado para APHLT não pode evitar o problema de espaço, da competição funcional e variação hemodinâmica. Com isso, algumas

modificações cirúrgicas têm sido adotadas e estudadas por alguns grupos utilizando modelos experimentais e até mesmo em humanos, com o objetivo de minimizar tais efeitos aos pacientes após o procedimento cirúrgico (27, 51).

1.3.3. TRANSPLANTE *SPLIT*

O Transplante de Fígado *Split* (TFS) também foi desenvolvido como estratégia para aumentar a oferta de enxertos hepáticos, através da obtenção de dois enxertos a partir de um único doador falecido (52, 53). A bipartição de um fígado inteiro também apresenta extrema importância, principalmente para os pacientes pediátricos, mais uma vez diminuindo a incidência de mortalidade em listas de espera neste grupo (52).

As primeiras experiências do TFS não deram bons resultados, especialmente em receptores adultos e esta técnica quase foi abandonada nos anos 90 (27) . Posteriormente, com uma melhor compreensão da anatomia intra-hepática, o estabelecimento de critérios de seleção de doadores e receptores para TFS e a introdução da técnica de divisão do órgão *in situ*, a divisão de fígados entre os destinatários de crianças e adultos ganhou tornou-se possível. Tal fato, provavelmente ocorreu devido à redução dos tempos de isquemia e taxas de complicações biliares (52, 53). Geralmente, o fígado é dividido para um adulto e uma criança e a utilização de enxertos para a divisão entre dois pacientes adultos é incomum. O procedimento de divisão do órgão comumente ocorre da seguinte forma: o segmento do lobo lateral esquerdo é utilizado como enxerto para um paciente pediátrico e o lobo lateral direito para um receptor adulto (52).

Nesher *et al* em 2011 avaliaram 2.301 transplantes de fígado split realizados entre janeiro de 1995 a dezembro de 2008. As taxas de sobrevivência de pacientes em 1 e 5 anos após o TFS foram de 84% e 70%, respectivamente. Os pacientes pediátricos apresentaram os mesmos índices de sobrevivência; entretanto, para adultos, essa taxa de sobrevivência foi menor (75% e 66%). A mortalidade precoce ou tardia desse tipo de transplante para tais pacientes não estava relacionada com os problemas técnicos esperados devido à divisão do fígado, mas sim à sepse, ao edema cerebral na fase aguda e à rejeição crônica (53).

1.4. TERAPIAS DE SUPORTE AO TRANSPLANTE HEPÁTICO

Como descrito anteriormente, o único tratamento que tem mostrado eficácia real é o transplante de fígado, que notadamente aumenta a taxa de sobrevida em pacientes com IHA (54), bem como em indivíduos com doença hepática crônica em fase terminal,

principalmente cirrose (11, 55). Logo é essencial buscar métodos terapêuticos que sejam capazes, ainda que transitoriamente, de manter os pacientes vivos com doença hepática grave descompensada. Dessa forma, permitindo o prolongamento do tempo de espera pelos transplantes de fígado ou, até mesmo, uma possível recuperação da função hepática, evitando o transplante (Pares and Mas 2014).

Alternativas para o transplante hepático seriam terapias como a plasmáfereze e terapias de purificação do sangue, incluindo hemodiafiltração e fígado bioartificial (55, 56). Essas diferentes terapias de purificação consistem de componentes biológicos (hepatócitos frescos isolados de porco, hepatoblastoma humano ou linhagens celulares obtidas a partir de hepatócitos humanos de fígados de cadáveres não utilizados para o transplante de fígado) em um outro método sintético (57). Dentro desse contexto, xenotransplantes de fígado inteiro ou até mesmo de células isoladas a partir de outra espécie, como por exemplo porcos, são alternativas em estudo (58). Plasmáfereze é o tratamento no qual se retira o plasma do paciente com insuficiência hepática e o substitui por plasma fresco. Embora, possa ter benefícios clínicos, esse procedimento possui um alto custo devido às grandes quantidades de plasma fresco necessárias para a realização do tratamento e o risco associado à transfusão. Adicionalmente, o fígado possui diversas funções diferentes que são difíceis de serem substituídas por unidades funcionais artificiais. Isso estimulou a pesquisa do fígado bioartificial que utiliza tecido hepático vivo ou hepatócitos de porco para realizar a função de síntese e detoxificação do fígado. Estudos clínicos verificaram que os seres humanos podem desenvolver resposta imune às proteínas de porco, e que reações anafiláticas ocorrerem quando é feita perfusão extracorpórea usando fígado de animais (56, 59, 60). Além disso, o xenotransplante utilizando células, tecidos e órgãos de porcos pode estar associado com a transmissão de microorganismos suínos para o receptor humano. Alguns desses microrganismos podem induzir zoonoses, ou seja uma doença infecciosa induzida por microrganismos transmitidos a partir de uma outra espécie (61). Posteriormente, foram desenvolvidos biorreatores extracorpóreos com capilares artificiais contendo hepatócitos (62-64), os quais, no entanto, são muito complexos, impedindo seu uso disseminado na clínica. De forma alternativa, também se experimentou o uso de fígado inteiro com sistema de perfusão extra-corpórea, mas com coluna de hemoperfusão capaz de absorver leucócitos e imunoglobulina para evitar a reação hiperaguda contra o fígado xenogênico (64, 65). Porém, os riscos de influxo de proteína xenogênica no paciente e as conseqüentes reações imunes (com formação e deposição de imunocomplexos), além do potencial risco de transmissão de zoonoses persistiram. O método mais utilizado em estudos clínicos é a combinação de

hemodiafiltração com a plasmaferese ou a diálise por albumina humana. A diálise de albumina é necessária pelo fato de a maioria das toxinas retiradas pelo fígado serem não-hidrossolúveis e ligadas à albumina. Os métodos mais recentes dentro dessa linha são conhecidos por MARS (“Molecular Adsorbents Recirculating System”) e o “Prometheus” (66-68). Apesar de produzirem melhoras do perfil bioquímico dos pacientes, esses métodos devem ainda ser considerados experimentais, já que ainda não se comprovou que seu uso reduza a mortalidade na insuficiência hepática aguda (55, 66). Assim são necessários estudos randomizados em larga escala antes de se recomendar o uso rotineiro desses equipamentos na insuficiência hepática aguda.

Um outro fator importante é que esses procedimentos são muito caros e com muitas questões a serem respondidas antes da utilização na prática clínica (55).

1.5. TERAPIA CELULAR E TRANSPLANTE HEPATOCITÁRIO

Os recentes avanços na engenharia de tecidos, no transplante de células e nas tecnologias genéticas, tornam a célula viva uma importante ferramenta terapêutica no cuidado médico clínico (69). Se bem sucedida, a longo prazo, o armazenamento de células vivas pode ser um fator crucial para o sucesso dessas abordagens emergentes. Alguns estudos voltados para terapia celular em modelos animais de doenças hepáticas destacam a notável capacidade de regeneração dos hepatócitos *in vivo*. Logo, o transplante dessas células estaria desempenhando um papel importante como um mecanismo de inovação terapêutica, atuando diretamente na recuperação tecidual em casos de perda da função hepática. Dessa forma, o transplante de células do fígado seria uma alternativa associada ou, no mínimo, uma ponte para o transplante do órgão. Fato esse que prolongaria o período de espera desses pacientes, uma vez que gera células precursoras para o transplante e a disponibilidade destas pode gerar um grande avanço com novas perspectivas no tratamento de doenças do fígado (2, 70, 71). Assim, o transplante hepatocitário seria uma alternativa bastante útil, considerando a limitação dos métodos artificiais de suporte à função hepática descritos anteriormente. As alternativas terapêuticas de tratamento aos pacientes com disfunção hepática estão representadas na figura 1.5.

Dados da literatura relataram a aplicação bem sucedida do transplante alogênico de hepatócitos para doenças metabólicas herdadas, demonstrados na tabela 1.3, e IHA, representados na tabela 1.4 (72, 73). (2, 72).

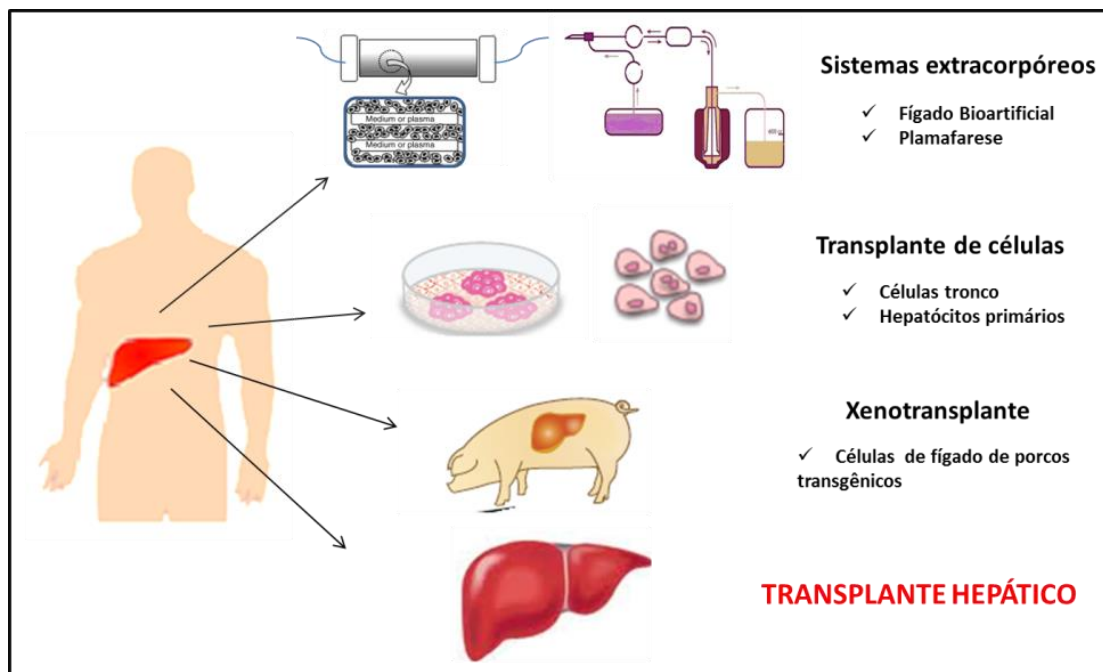


Figura 1.5. Alternativas terapêuticas para doenças do fígado. Algumas alternativas terapêuticas tem sido desenvolvidas e aplicadas na IHA, como as terapias de purificação do sangue, incluindo plasmaferese, hemodiafiltração e fígado bioartificial; bem como o transplante de células, utilizando células tronco ou hepatócitos primários adultos. Dentro desse contexto, xenotransplantes de fígado inteiro ou até mesmo de células isoladas a partir de outra espécie, como por exemplo porcos, são alternativas em estudo.

Tabela 1.3. Transplante de Hepatócitos Humanos: Estudos clínicos em pacientes com doenças metabólicas do fígado

| Doença | Idade do paciente | Nº de células viáveis transplantedas | Tipo de células transplantadas | Resultado | Estudo/Referências |
|--|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------|---|--------------------|
| Crigler-Najjar I | 10 anos | $7,5 \times 10^9$ | F | 50% diminuição da bilirrubina até 11 meses; TF após 4 anos | (74) |
| | 8 anos | $7,5 \times 10^9$ | F/C | 40% diminuição da bilirrubina até 6 meses; TF em 20 meses | (75) |
| | 9 anos | $7,5 \times 10^9$ | F | Diminuição de 32% da bilirrubina durante algumas semanas; TF após 5 meses | (76) |
| | 18 meses | $4,3 \times 10^9$ | C | Diminuição de 40% dos níveis de bilirrubina por 7 meses; TF aos 8 meses | (77) |
| | 8 anos | $1,4 \times 10^9$ | F | Diminuição de 30% da bilirrubina; TF após 11 meses | (78) |
| | 1 anos | $2,6 \times 10^9$ | F/C | Diminuição de 25% da bilirrubina em 4 meses; TF após 4 meses | (79) |
| | 9 anos | $6,1 \times 10^9$ | F/C | Diminuição de 35% da bilirrubina em 6 meses; fila de espera OLT | |
| Doença do depósito de glicogênio tipo I (GSD) | 18 anos | 6×10^9 | F/C | Melhoria no controle da glicose, níveis enzimáticos normais | (80) |
| | 47 anos | 2×10^9 | F | Melhor tempo de jejum, diminuição de triglicérides | (81) |

| | | | | | | |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|--|--|------|
| Hipercolesterolemia Familiar | | | | até 18 meses | | |
| | | | 1,1x10 ⁹ | | 20% de diminuição no colesterol, LDL, ApoB por 28 meses; | |
| | 5 pacientes | | 1,3x10 ⁹ | F | Nenhum efeito; | |
| | | | 1x10 ⁹ | | Diminuição de 6% no colesterol, LDL, ApoB por 19 meses; | (82) |
| | entre 7 e 41 anos | | 3,2x10 ⁹ | F | Pequeno efeito; | |
| | | 1,5x10 ⁹ | | Diminuição de 20% nos níveis de colesterol por 7 meses | | |

Defeitos do ciclo da uréia

| | | | | | |
|---------------------------------|----------------------|--|----------|--|------|
| OTD | 5 anos | 1x10 ⁹ | F | Diminuição da amônia inicialmente; morte após 42 dias | (83) |
| OTD | 10 horas | 9x10 ⁹ | F/C | Diminuição da amônia; TF em 6 meses | (84) |
| OTD | 2 dias | 1,9x10 ⁹ | F/C | Diminuição da amônia; TF em 6 meses | (85) |
| OTD | 14 meses | 2,4x10 ⁹ | C | Diminuição da amônia; aumento da ureia; melhoria fisicomotora; TF após 6 meses | (86) |
| OTD | 1 dia | 1,6x10 ⁹ | F/C | Diminuição da amônia; aumento da uréia com dieta normal; transplante ortotópico de fígado parcial (apolt) em 7 meses | (87) |
| OTD | 10 semanas 3 anos | 3,0x10 ⁹ | F | alguma estabilização | (88) |
| OTD | 6 horas 9 dias | 0,6x10 ^{9*} | C | Diminuição da amônia; aumento de urea; excreção normal do ácido orótico pela urina. Morte aos 4 meses | (89) |
| Citrulinemia | 36 meses | 1,5x10 ^{9*} | C | Amônia Normal; aumento de 40% de uréia | (89) |
| Deficiência do Fator VII | 3 meses 35 meses | 1,1x10 ⁹ 2,2x10 ⁹ | C F/C | Diminuição de 70% no fator VII recombinante por 6 meses; TF após 7 meses | (85) |

*Hepatocitos isolados do mesmo doador; TF, Transplante de fígado; F, Frescas; C, criopreservadas; ApoB, apolipoproteína B; OTD, (*ornithine transcarbamylase deficiency*)deficiência de ornitina transcarbamilase; LDL, baixa densidade de lipoproteína (*low density lipoprotein*)

Tabela 1.4. Transplante de Hepatócitos Humanos para pacientes com IHA

| Indicação | Idade do paciente | Nº de células viáveis transplnatadas | Resultado | Referência |
|--------------------------------|-------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------|
| IHA induzida por drogas | 27 anos | 2.8x10 ⁷ | TF após 10 dias da terapia celular | (90) |

| | | | | |
|-------------------------------|-----------|----------------------|--|------|
| | 26 anos | 2.8×10^7 | TF após 2 dias da terapia celular | (91) |
| | 32 anos | $1,3 \times 10^9$ | Morte no 14°. dia | (92) |
| | 35 anos | 1×10^{10} | Morte no 20°. dia | |
| | 55 anos | $3,9 \times 10^{10}$ | Morte após 6 horas | |
| | 27 anos | 3×10^7 | TF após 10 dias da terapia celular | (93) |
| | 26 anos | $1,2 \times 10^9$ | TF após 2 dias da terapia celular | |
| | 35 anos | $5,4 \times 10^9$ | Morte no 18°. dia | |
| | 35 anos | $3,7 \times 10^9$ | Completa recuperado e não recebeu o TF | |
| | 51 anos | $3,9 \times 10^9$ | TF após 3 dias da terapia celular | |
| IHA induzida por vírus | 28 anos | $1,9 \times 10^7$ | TF após 3 dias da terapia celular | (90) |
| | 28 anos | $1,7 \times 10^8$ | TF após 10 dias da terapia celular | (91) |
| | 37 anos | $1,2 \times 10^8$ | Morte após 5 dias | |
| | 43 anos | $7,3 \times 10^8$ | TF após 1 dias da terapia celular | |
| | 37 anos | $8,8 \times 10^8$ | Completa recuperado e não recebeu o TF | (94) |
| | 29 anos | 1×10^{10} | Morte em 18 horas | (92) |
| | 65 anos | 3×10^{10} | Morte no 52°. dia | |
| | 54 anos | $6,6 \times 10^9$ | Morte no 7°. dia | |
| IHA idiopática | 3.5 meses | $1,8 \times 10^{10}$ | TF após 1 dia da terapia celular | (93) |
| | 23 anos | $4,4 \times 10^{10}$ | TF no 5°. dia e Morte no 13°. dia | |
| | 48 anos | $4,5 \times 10^{10}$ | Morte no 1° dia | |

O transplante de células pode apresentar diversas vantagens, quando comparado ao processo cirúrgico. Por ser um procedimento menos invasivo, pode ser realizado em sessões repetidas e programadas. Não há necessidade de imunossupressão crônica, além de transplantes para mais de um destinatário a partir de um único doador. Contudo, o maior desafio para a ampla aplicação clínica desses métodos é a disponibilidade de grande quantidade, de hepatócitos com alta viabilidade (2, 30, 90). A obtenção dos hepatócitos primários ocorre geralmente pelo método de digestão enzimática, a partir de uma, duas ou três etapas de colagenase. No entanto, o seu uso é limitado devido à escassez de hepatócitos que podem ser isolados e cultivados (95).

Muitas fontes de células hepáticas têm sido propostas e investigadas como alternativas aos hepatócitos humanos, tais como linhagens de células tumorais humanas, de hepatócitos humanos imortalizados e de células de fígado de porco (69). Cada uma dessas fontes apresenta problemas e contra-indicações para uso clínico, como riscos de transmissão ou transformação neoplásica e biocompatibilidade de tecido animal. De maneira ideal, hepatócitos primários humanos isolados seriam a melhor fonte de tecido hepático para terapia celular, tendo em vista as limitações das fontes celulares citadas

acima (2). Atualmente, com o objetivo de expandir a fonte de hepatócitos primários viáveis para terapia celular, tem sido sugerida a utilização de células obtidas de órgãos rejeitados para o transplante ortotópico (30, 96). A cada ano um grande número de fígados de doadores falecidos é rejeitado para o transplante. Os motivos incluem esteatose de alto grau, cirrose não viral e morte com parada cardíaca, mas que não interferem no transplante hepatocitário (30, 31, 97). Contudo, é necessário o desenvolvimento de um método padronizado de isolamento de hepatócitos que possa garantir um bom rendimento, viabilidade e funcionalidade, assim como o processo de conservação e a estocagem destas células após o isolamento (30, 31, 98).

1.6. CRIOPRESERVAÇÃO

O sucesso da terapia celular está diretamente relacionado com o desenvolvimento de uma técnica eficiente de criopreservação, capaz de fornecer quantidade suficiente de células viáveis e metabolicamente funcionais, disponíveis em bancos de células para transplante hepatocitário de emergência ou programado (70, 99). A criopreservação é o uso de temperaturas muito baixas, para preservar e manter intacta a estrutura de células vivas de tecidos (100). Esse processo consiste na capacidade de preservação do metabolismo celular, uma vez que submetidas ao armazenamento em baixas temperaturas ocorre a indução da parada da atividade enzimática, do metabolismo e da respiração celular (Gordon et al. 1994).

A criopreservação tem sido realizada com sucesso em muitas espécies de mamíferos, incluindo camundongos, bovinos, suínos e humanos (101). Uma contribuição importante da criopreservação é possibilitar a conservação de materiais biológicos, permitindo a criação de bancos de células e de tecidos congelados, que possam ter ampla aplicação em estudos científicos, além de aplicações clínicas (70, 102). Na medicina reprodutiva, a criopreservação de oócitos surgiu como uma opção viável para manter a fertilidade feminina. A capacidade de preservar ovócitos por um longo período sob baixas temperaturas, permite manter a fertilidade para pacientes do sexo feminino que sofrem de condições patológicas como por exemplo: insuficiência prematura do ovário, cistos e tumores ou recebem terapia anti câncer, tais como quimioterapia, radioterapia ou outra terapia gonadotóxica (103, 104). Atualmente, na medicina regenerativa, a utilização de células-tronco humanas criopreservadas em terapias celulares é uma abordagem terapêutica promissora. Particularmente, células-tronco hematopoiéticas, mesenquimais,

embrionárias humanas e do cordão umbilical vêm sendo utilizadas no tratamento de várias doenças tais como: doenças cardiovasculares, diabetes, doenças imuno-moduladoras e câncer (103, 105, 106). Embora, diversos protocolos de criopreservação sejam utilizados clinicamente, crio-lesões ocorrem durante o processo de congelamento e descongelamento devido à formação de cristais de gelo, choque osmótico e toxicidade de agentes crioprotetores (ACP). Logo, tais lesões, levam à perda da viabilidade e da função celular (103).

Muitos trabalhos são publicados na área da criobiologia para diversos tipos de células e de tecidos, na tentativa de minimizar os danos celulares que ocorrem durante o processo de congelamento-descongelamento e garantir sua utilização na pesquisa e na clínica (107). A complexidade da área pode ser vista nas diversas revistas especializadas como: *Cryobiology* e *Cryoletters*.

O mecanismo preciso de lesão durante o congelamento vem sendo amplamente discutido e uma grande variedade de explicações reflete apenas o fato de que diferentes tipos de células respondem de diferentes maneiras a diferentes protocolos. Lovelock e colaboradores, em 1954, haviam especulado inicialmente que as lesões celulares eram resultantes da concentração de sais intracelulares. Meryman et al 1968, propuseram que o estresse produzido na membrana plasmática ocorria devido à redução de volume, decorrente da perda de água para a formação de gelo no meio extracelular (108-110). O fato é que muitos trabalhos têm apoiado a visão proposta pelos autores citados acima. Assim, as lesões que ocorrem durante a criopreservação de suspensões celulares lentamente congeladas, não é somente uma consequência direta da cristalização de gelo, mas também pela alta concentração de solutos que ocorre quando a água é removida do meio intracelular para formar o gelo (111). Esses estudos levaram à conclusão de que danos causados pelo congelamento é consequência tanto da redução da temperatura, por si só, como das mudanças na composição da solução ocasionadas pelo congelamento, ou ambos (111).

Até o presente momento, o que tem sido proposto é que as alterações nas membranas das células sob o estresse do congelamento podem depender do tipo de célula, da temperatura e da natureza do soluto extracelular. Dessa forma, um conhecimento prévio em criobiologia não pode ser negligenciado, a fim de desenvolver um protocolo eficaz para cada tipo de célula ou tecido a ser utilizado (112).

Durante o processo de criopreservação, a temperatura vai de 37°C a -196°C. A temperaturas inferiores a -0.6°C, a água biológica, sob condições isotônicas, torna-se termodinamicamente instável, favorecendo o estado cristalino. Devido à grande

concentração de água nos sistemas biológicos, cerca de 80%, a fase de transição água-gelo nos biomateriais é um fenômeno de importância crítica na criopreservação (100, 107). Durante o congelamento, as células podem perder até 95% de água e a concentração de eletrólitos dentro e fora da célula pode aumentar em muitas ordens de grandeza em relação às condições isotônicas (107).

Todas as células apresentam limites para a sua estabilidade em meios anisotônicos. A exposição excessiva a um meio hiperosmótico pode causar alterações na permeabilidade, na integridade e na função da membrana. Em alguns casos, pode resultar na extrusão de componentes da membrana. Provavelmente, a forma mais comum de danos hiperosmóticos resulta da difusão através da membrana celular de solutos conhecidos como não-penetrantes. Da mesma forma, cada tipo celular também apresenta um limite distinto de inchaço quando exposto a uma suspensão hiposmótica, seja por ruptura física, seja pela perda de solutos intracelulares. Além das características do meio, a temperatura da suspensão celular também é importante, podendo retardar ou acelerar a movimentação de água e eletrólitos entre a célula e o meio que a envolve (112).

A manutenção da viabilidade da célula submetida ao processo de criopreservação depende basicamente de sua capacidade de resistir alguns tipos de lesão: à desidratação, à alteração osmótica e ao dano mecânico decorrente da formação de cristais de gelo no seu interior (113). Durante o congelamento, a temperatura declina e a água do meio se cristaliza, o que leva ao aumento da concentração de solutos extracelulares. Assim, quando a velocidade de congelamento é lenta, a célula sofre desidratação. Porém, quando essa velocidade é rápida, a célula não perde água o suficiente, ocorrendo formação de gelo intracelular, que promove danos mecânicos, podendo determinar a morte celular (112, 114)

Alterações celulares referentes à formação de cristais de gelo foram primeiramente relatadas por Mazur em 1963, quando mostrou que a velocidade de saída da água intracelular está relacionada ao aumento da concentração do soluto extracelular, determinando o equilíbrio osmótico. Assim, a velocidade de congelamento determinará o grau de retração celular e a presença ou a ausência de cristais (113). A formação de cristais de gelo requer pelo menos um evento inicial de nucleação. Em seguida, há o aumento progressivo de tamanho por incorporação de moléculas de água livre e se expande por toda a solução ou suspensão celular na dependência da velocidade e da intensidade da queda de temperatura e da composição do soluto. O congelamento rápido resulta na formação de muitos pontos de nucleação, que surgem quase que simultaneamente, o que confere a cada cristal um tamanho relativamente menor do que aquele que surge com velocidades mais baixas de congelamento (112).

Quando se trata de suspensão celular, em geral a nucleação de gelo ocorre primeiramente no espaço extracelular, principalmente em baixas velocidades de congelamento. Os pontos iniciais de formação dos cristais de gelo recrutam moléculas de água e, de certa forma, “expulsam” o soluto para as porções ainda líquidas da solução, que, por sua vez, têm os seus pontos de congelamento progressivamente reduzidos, à medida que a concentração de soluto aumenta. A solução mais concentrada (e também com maior viscosidade) se localiza mais próxima das células, que, expostas ao meio hipertônico, sofrem processo de desidratação. Em determinado momento, a concentração de solutos torna-se tão alta que ocorre o fenômeno da vitrificação, quando então cessa todo movimento de água e, conseqüentemente cessa o aumento do tamanho dos cristais de gelo. Nos congelamentos realizados em alta velocidade pode ocorrer a formação de cristais de gelo concomitantemente nos espaços intracelular e extracelular. Dependendo do tamanho dos cristais, pode ocorrer lesão mecânica das organelas subcelulares e da membrana celular (107, 112).

Como resultado dos danos causados pelos efeitos da solução, as células de mamíferos, independente do grau de desidratação, não sobrevivem a resfriamentos abaixo de -20°C , a não ser que se utilize um agente crioprotetor (115). De acordo com Mazur et al 1970, ao adicionar um agente crioprotetor ao meio de congelamento, para temperaturas em torno de -5°C , tanto as células como o meio circundante permanecem descongelados. Esse efeito é causado pelo super-resfriamento decorrente do abaixamento do ponto de congelamento da solução provocado pela adição de substâncias crioprotetoras à suspensão celular (116). Os crioprotetores promovem o abaixamento do ponto de congelamento do meio, conferindo um período maior para remoção da água intracelular durante o resfriamento prévio ao congelamento da água, auxiliando no equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular. Essas substâncias apresentam ainda a capacidade de interagir com as membranas celulares, auxiliando contra o estresse provocado durante as mudanças físicas (114). Entretanto, além das criolesões que ocorrem durante o processo de congelamento, a citotoxicidade tempo-dependente do agente crioprotetor contribui para os danos celulares durante e após a criopreservação. Após o descongelamento, a remoção do crioprotetor do interior da célula deve ser realizada de forma lenta, através da diluição deste. Uma vez que a reentrada brusca de água no meio intracelular, também leva à lise das membranas (117).

1.6.1. AGENTES CRIOPROTETORES

Para as células sobreviverem ao processo de criopreservação é necessária a adição de agentes ACP durante o congelamento e o descongelamento. Em 1949, Polge e colaboradores reportaram, pela primeira vez, a utilização de um ACP, utilizando o glicerol para a preservação de espermatozóides de aves. Em seguida, Smith et al, demonstraram o sucesso desse mesmo agente em hemácias (114). O glicerol também se mostrou eficaz para a criopreservação de plaquetas, sendo este um desafio particular devido à sua limitada tolerância a estresses osmóticos. Essa substância não apresentar toxicidade para a maioria das células, e mesmo em concentrações muito elevadas, apresenta grande vantagem como ACP. Além disso, essa molécula diminui a desnaturação das proteínas expostas a baixas temperaturas. Contudo, a sua penetração nas células ocorre lentamente, o que constitui uma limitação em seu emprego para a criopreservação de diversos tipos celulares. Dessa forma, em alguns casos, pode ser impraticável como crioprotetor (112).

Dez anos após o relato das propriedades crioprotetoras do glicerol, Lovelock e Bishop demonstraram que a substância dimetilsulfóxido (DMSO) era eficaz na criopreservar esperma bovino e atualmente é o crioprotetor mais usado para a criopreservação de diversos tipos celulares (118-120). O DMSO é um composto higroscópico polar desenvolvido originalmente como solvente para produtos químicos. É uma substância de baixo peso molecular, composta por um grupo sulfóxido, que é hidrofílico, e dois grupos metila, que são hidrofóbicos. O DMSO é convertido em dimetilsulfona e dimetilsulfeto, eliminados por via renal e exalado pelos pulmões, respectivamente. Sua meia-vida é de aproximadamente 20 horas. A dimetilsulfona tem meia-vida de 72 horas e o dimetilsulfeto é expirado em aproximadamente 24 horas, o que confere odor característico ao hálito de pacientes após a infusão de células hematopoéticas progenitoras criopreservadas em DMSO (121). A função desse agente parece ser essencialmente coligativa, ou seja, de “captura” das moléculas de água livre, o que leva à redução da quantidade de gelo formada, à diminuição da temperatura do ponto de congelamento e ao aumento do ponto de vitrificação. Essa substância penetra em tecidos e células numa velocidade maior que a do glicerol à temperatura ambiente, o que constitui vantagem significativa. No entanto, o DMSO apresenta toxicidade considerável quando a essa temperatura (107, 112, 121). Classicamente, a concentração final é de 10 % DMSO e níveis mais altos são potencialmente tóxicos (70).

As características fundamentais para um ACP eficiente são baixo peso molecular, alta capacidade de atravessar a membrana celular e uma baixa toxicidade. Em geral,

agentes com rápida capacidade de penetração são mais favoráveis, porque o tempo de exposição ao crioprotetor antes do rápido resfriamento é curto, prevenindo assim, os danos osmóticos (Kasai 1996). Os crioprotetores são utilizados com o objetivo de aumentar a viscosidade da solução e a um maior equilíbrio osmótico entre solução e material biológico. O seu baixo peso molecular tem o objetivo de impedir os efeitos nocivos nas células referentes à formação de cristais de gelo intracelular que promovem danos mecânicos e podem determinar a morte celular (103). Os ACP são divididos em duas categorias: (A) intracelulares, que são solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento e o aquecimento. Essas correspondem a pequenas moléculas que penetram pela membrana celular, formam pontes de hidrogênio com moléculas de água intracelulares e diminuem a temperatura de congelamento, prevenindo a formação de cristais de gelo. Os mais utilizados são o etilenoglicol, o DMSO, o glicerol, o propilenoglicol, o metanol, o etanol, entre outros (103); (B) extracelulares, que são as macromoléculas e os açúcares cuja função é reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular. Os mais utilizados são a lactose, a glicose, a sacarose, a polivinilpirrolidona (PVP), o manitol, a trealose, entre outros (71, 114).

1.6.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE HEPATÓCITOS

Os hepatócitos são altamente sensíveis ao processo de congelamento, apresentando uma redução significativa na função e na viabilidade celular pós-descongelamento, o que reforça a grande necessidade de uma melhoria no processo (70, 122). Alguns trabalhos descrevem que após a criopreservação de hepatócitos, são observados danos às mitocôndrias, e é sabido que este tipo de dano está relacionado com o processo inicial de apoptose (123). Entretanto, tanto a apoptose quanto a necrose parecem ser eventos responsáveis pela diminuição da viabilidade e da funcionalidade de hepatócitos criopreservados (122, 124).

Em geral, a melhor estratégia para criopreservar hepatócitos é a utilização de um congelamento lento e com taxas de resfriamento controladas, geralmente $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (70, 122, 125, 126). O DMSO é o crioprotetor tipicamente utilizado com uma concentração final de 10% (70, 126-128). Embora geralmente se use DMSO 10%, existem exceções. Chesne et al 1993 e Rialland et al 2000 utilizam uma concentração de 12% de DMSO, enquanto que Coundouris et al 1993 sugerem 20,5% desse mesmo ACP (123, 129, 130). Protocolos mais específicos de caracterização da criopreservação de hepatócitos são

descritos na literatura por Diener et al 1993. Tais autores descrevem como metodologia de congelamento o resfriamento das células em escala gradativa, através de programas eletrônicos, em equipamentos controlados por computadores onde a temperatura pode ser monitorada (131). Porém, essa metodologia é de custo elevado, o que poderia inviabilizar seu uso corrente. Dois grupos avaliaram o processo de armazenamento de hepatócitos tanto em congelamento controlado eletronicamente quanto em congelamento tradicional, em que o resfriamento ocorre também de forma lenta e gradual utilizando freezers de armazenamento de -20°C e -80°C. Não foi encontrada diferença significativa entre os métodos (70, 99). Sendo assim, o desenvolvimento de uma estratégia de congelamento celular mais econômica seria de suma importância permitindo uma grande utilidade na clínica. Além disso, dados da literatura demonstram que a viabilidade dos hepatócitos, após a criopreservação com DMSO, apresenta uma queda em torno de 10-30%, quando comparados às células recém isoladas (tabela 1.5). Esses trabalhos reforçam a grande necessidade de estudos que possam melhorar essa percentagem, assim como, minimizar todos os danos relacionados à criopreservação de hepatócitos recém isolados.

Tabela 1.5. Trabalhos da literatura com criopreservação de hepatócitos em DMSO

| Espécie | Viabilidade-Método | % da viabilidade pós-isolamento | % da viabilidade pós-criopreservação | % de DMSO | Referência |
|----------------|---------------------------|--|---|------------------|-------------------------------|
| Humano | Azul de Tripan | 60-87% | 55% | 10% | (P.J.M Rijnteset et al. 1986) |
| Rato | Azul de Tripan | 89±5% | 70±5% | 20% | (J.N. Lawrence et al. 1991) |
| Rato | Azul de Tripan | 82±2% | 60±4% | 32% | (Fautrel, Alain et al. 1997) |
| Humano | Azul de tripan | 80% | 60% | 10% | (132) |
| Humano | Azul de tripan | 80±15% | 50% | 10-20% | (133) |
| Rato | Azul de Tripan | 87±10% | 50±8% | 10% | (134) |
| Humano | Azul de Tripan | 67±10% | 45±6% | 10% | (134) |
| | | | | 7,5% | |
| | | | 50±8% | 10% | |
| Rato | Azul de Tripan | >50% | 49±6% | 12,5% | (Clary Terry et al. 2010) |
| | | | 45±4% | 15% | |
| | | | | 20% | |
| Humano | Azul de Tripan | 87±8% | 63±8% | 10% | (96) |
| Rato | Azul de Tripan | >75% | 44±4% | 10% | (135) |

1.6.3. ANIMAIS TOLERANTES AO CONGELAMENTO

Embora, muitos tipos de células isoladas de mamíferos e de pequenos agregados de células possam ser congelados, seguindo protocolos já publicados e obtendo resultados reprodutíveis, este procedimento ainda é objeto de uma investigação aprofundada que tem como base nossa atual compreensão da química, física e toxicologia da criobiologia. Outra vertente de grande importância como estratégia de investigação estaria voltada para algumas adaptações naturais de tolerância ao congelamento que diversos organismos desenvolvem. Tais indivíduos, como alguns artrópodes, peixes, anfíbios, répteis e insetos apresentam mecanismos de sobrevivência em condições ambientais extremas como demonstrado na tabela 1.6 (136-139). A tolerância natural ao congelamento refere-se à presença de gelo apenas no líquido dos espaços extracelular. A formação de gelo intracelular é tão maciçamente destrutiva para a organização celular que é letal para todos os animais. Assim, a tolerância ao congelamento envolve a regulação da formação de gelo extracelular acoplado à mecanismos que protegem e estabilizam o ambiente intracelular contra o estresse da desidratação e da isquemia que acompanham o congelamento (140).

Rãs de madeira, por exemplo, podem suportar o congelamento por pelo menos 2 semanas sem respirar, sem batimentos cardíacos ou circulação de sangue, e com até 65% de sua água corporal total como o gelo (141). É sabido que a água é essencial á existência da vida. Entretanto, muitos desses organismos podem sobreviver numa atmosfera inerte, em estado dissecado por longos períodos com até 99% de perda de água, em um fenômeno conhecido como anidrobiose. Quando a água torna-se novamente disponível, eles rapidamente incham e retomam a vida ativa. Esse fenômeno é muito semelhante aos fenômenos que ocorrem durante a criopreservação (119, 142). Todavia, o descongelamento não é uniforme. Os órgãos centrais (com altos níveis crioprotectores) descongelam em primeiro lugar, facilitando a rápida retomada do batimento cardíaco e a circulação sanguínea (141). Os mecanismos moleculares naturais de tolerância ao congelamento em vertebrados inferiores incluem: 1) o controle sobre o crescimento dos cristais de gelo no plasma por proteínas de nucleação de gelo; 2) o acúmulo de crioprotectores com baixo peso molecular para minimizar a desidratação intracelular e estabilizar os componentes macromoleculares, e 3) boa tolerância a isquemias por todos os órgãos, que pode incluir mecanismos de privação metabólica para reduzir as necessidades energéticas do órgão enquanto congelado (141).

Como citado anteriormente, esses indivíduos dispõem de mecanismos para melhorar sua sobrevivência em tais condições, variando de espécie para espécie, como ilustrado na tabela 1.7. Tais adaptações podem incluir uma alta concentração de polióis (particularmente glicerol e glicose), de dissacarídeos (particularmente trealose) e de compostos anticongelantes (143, 144). Esses últimos incluem as proteínas anticongelantes (PAC) que também são encontradas em muitos organismos diferentes, tais como peixes, insetos e plantas que habitam ambientes abaixo de zero (145, 146). Essas proteínas protegem os organismos contra as criolesões e a sobrevivência abaixo de 0 °C através da inibição o crescimento do gelo (147). São estruturalmente diferentes e consistem de quatro subtipos diferentes, PAC I-IV e tipicamente apresentam grande parte da sua área de superfície para a ligação com gelo (146, 147). Tais moléculas atuam baixando o ponto de congelamento criando assim, uma histerese térmica em relação ao ponto de fusão (148).

As adaptações que preservam a vida a temperaturas abaixo de zero, para estes animais, ilustram os princípios da criopreservação de órgãos de vertebrados e podem ter aplicações importantes no desenvolvimento de tecnologia para o congelamento de células e de órgãos humanos transplantáveis. Dessa forma, cabe investigar a participação dos açúcares envolvidos no mecanismo de tolerância ao congelamento em animais no processo de criopreservação de hepatócitos, visto a sua sensibilidade ao congelamento.

Tabela 1.6: Estratégia de tolerância ao congelamento desenvolvida por algumas espécies de animais.

| Grupo de Animais | Estratégia Química | Referências |
|-------------------------|---|---|
| Artrópodes | Glicerol, Sorbitol, Trealose Glicose, Sacarose | Lee R.E 1991; Kelvin G. M et al 2011; John G. Duman 2001; David A. Wharton 2011 |
| Anfíbios | Glicose, Glicerol Glicerol+ glucose, Polietilenoglicol | John G. Duman 2001; Kelvin G. M et al 2011; Storey K.B et all 1986; |
| Peixes | Trealose e Glicose | David A. Wharton 2011; Lee R.E 2010 |
| Répteis | Sacarose e Glicose | Kenneth B. et al, 1992 |

2.1. Justificativa

Devido à carência de órgãos para o transplante de fígado, e sendo este o único procedimento terapêutico realizado com sucesso para a substituição da função hepática, é de suma importância o investimento em novas terapias que possam atuar paralelamente ou como uma ponte para o procedimento cirúrgico. Tais estratégias poderiam representar alternativas promissoras com o objetivo de diminuir a taxa de mortalidade dos pacientes que permanecem nas filas de transplantes de fígado. O transplante hepatocitário tem sido proposto como alternativa de grande importância na recuperação da função hepática. A otimização das técnicas que abordam esse procedimento é de suma importância para o estabelecimento e a realização desse procedimento. Com isso, estudos voltados para o isolamento e os mecanismos de preservação e estocagem de células hepáticas são alvos cruciais para a implementação dessa abordagem terapêutica.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo de criopreservação de hepatócitos de rato para terapia celular, utilizando substâncias que estão envolvidas no processo natural de anticongelamento de alguns animais como: trealose, glicose, sacarose e glicerol. Com isso tentar diminuir ou até mesmo remover a substância DMSO do meio de criopreservação.

2.2.2. Objetivos Específicos

- 1.** Realizar isolamento de hepatócitos de rato com índice de viabilidade acima de 80%;
- 2.** Avaliar o potencial crioprotetor e a toxicidade dose-dependente do DMSO durante a criopreservação de hepatócitos de rato e da linhagem celular HepG2;
- 3.** Verificar se é possível realizar a criopreservação de hepatócitos a partir de uma solução 5% de DMSO e não 10% como a maioria dos trabalhos da literatura sugere;
- 4.** Realizar criopreservação de hepatócitos de rato com diferentes soluções crioprotetoras incluindo soluções com trealose, sacarose, glicose e glicerol na

presença ou na ausência de DMSO e avaliar a viabilidade por azul de tripan e MTT após 7, 15 e 30 dias de congelamento;

5. Traçar o perfil funcional das células recém-isoladas e das células criopreservadas nas melhores condições.

3.1. ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados Ratos Wistar macho com peso entre 200 e 300 gramas procedentes do CECAL - FIOCRUZ. Os animais receberam água e comida à vontade. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais – CEUA/FIOCRUZ. Termo aditivo ao certificado da licença N° LW-43/11 (P-63/11) com validade até 21/11/2015, e estão de acordo com os critérios estabelecidos no “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicado pelo “US National Institutes of Health” (NIH Publication No. 85-23, 1996).

3.2. ISOLAMENTO DE HEPATÓCITOS DE RATO – DIGESTÃO ENZIMÁTICA COM COLAGENASE

Para a obtenção dos hepatócitos de rato foram utilizados dois métodos de isolamento celular. No primeiro método foi utilizado como enzima de dissociação Colagenase tipo IV (marca Worthington – USA). Hepatócitos de ratos foram isolados através de dissociação enzimática conforme método adaptado de Berry et al (1969), Seglen (1976) e Pichard et al 2006. Ratos wistar foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂, após confirmação do óbito, foi realizada uma incisão na linha média do animal para exposição do fígado. Em seguida, as vísceras foram movidas cuidadosamente para fora da região abdominal para expor a veia porta hepática, onde foi inserido um escalpe conectado à mangueira da bomba de perfusão. Uma vez feita a canulação, foi realizada perfusão no órgão com salina com tampão HEPES sem EDTA pH 7,4 a 10 mL/minuto a 37°C por 15 minutos ou em HBSS sem Ca²⁺. Após o órgão ficar esbranquiçado, uma incisão na veia cava inferior foi feita para permitir o efluxo do tampão de lavagem. Em seguida, foi realizado a perfusão de solução salina com HEPES-colagenase na presença de Ca²⁺ 14,53 unidades/mL a 37^o e velocidade de 10 mL/minuto por 10 minutos em 2 etapas. Nessa etapa, também foi testado o tampão HBSS-colagenase com Ca²⁺. Após a etapa de digestão, o órgão foi perfundido com salina tamponada com HEPES-EDTA a 10 mL/min por 10 minutos. Após a perfusão com esse tampão, o órgão foi imediatamente retirado e colocado em placa de petri com meio de cultura William's (Sigma, St. Louis, MO) a 37°C e a cápsula de Glisson foi removida. Os lóbulos hepáticos foram submetidos á digestão mecânica e os hepatócitos isolados foram recolhidos e filtrados em filtro de 100 µm. Os hepatócitos foram

submetidos a duas etapas de lavagem em meio William's enriquecido, em ciclos de centrifugação a 50 g por 5 minutos a 4°C. O pellet foi ressuspensionado em 5 mL de meio William's e a suspensão foi submetida a um gradiente de densidade por gravidade de Soro Fetal Bovino 100% (SFB) a 4°C por 30 minutos, visando aumentar a pureza e a viabilidade celular. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada. Cabe ressaltar que todas as soluções de perfusão estavam a 37°C.

Tabela 3.1. Composição de salina tamponada com HEPES, com e sem EDTA, na presença ou na ausência de cálcio utilizado no isolamento de hepatócitos de rato para perfusão com colagenase.

| Componentes | Peso Molecular | Concentração (mg/L) | mM |
|---|-----------------------|----------------------------|------------|
| <u>Sais inorgânicos</u> | | | |
| Hepes * | | 5.9 | 25.0 |
| EDTA* | | 146.0 | 0.5 |
| Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) (anidros) | 111.0 | 140.0 | 1.2612612 |
| Cloreto de Potássio (KCl) | 75.0 | 400.0 | 5.3333335 |
| Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄) | 136.0 | 60.0 | 0.44117647 |
| Cloreto de Sódio (NaCl) | 58.0 | 8000.0 | 137.93103 |
| Fosfato de Sódio Dibásico (Na ₂ HPO ₄) Anidros | 142.0 | 48.0 | 0.33802816 |
| <u>Outros componentes</u> | | | |
| D-Glicose | 180.0 | 1000.0 | 5.5555553 |

*Componentes acrescentados ou não à solução básica.

Tabela 3.2. Composição do HBSS sem cálcio e sem magnésio utilizado no isolamento de hepatócitos de rato para perfusão com colagenase. (pH= 7,4)

| Componentes | Peso Molecular | Concentração (mg/L) | mM |
|---|-----------------------|----------------------------|------------|
| <u>Sais inorgânicos</u> | | | |
| Cloreto de Potássio (KCl) | 75.0 | 400.0 | 5.3333335 |
| Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄) | 136.0 | 60.0 | 0.44117647 |

| | | | |
|---|-------|--------|------------|
| Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃) | 84.0 | 350.0 | 4.1666665 |
| Cloreto de Sódio (NaCl) | 58.0 | 8000.0 | 137.93103 |
| Fosfato de Sódio Dibásico (Na ₂ HPO ₄) Anidros | 142.0 | 48.0 | 0.33802816 |
| Outros componentes | | | |
| D-Glicose | 180.0 | 1000.0 | 5.5555553 |

Tabela 3.3. Composição do HBSS com cálcio e com magnésio utilizado no isolamento de hepatócitos de rato para perfusão com colagenase. (pH= 7,4)

| Componentes | Peso Molecular | Concentração (mg/L) | mM |
|---|-----------------------|----------------------------|------------|
| <u>Sais inorgânicos</u> | | | |
| Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) (anidros) | 111.0 | 140.0 | 1.2612612 |
| Cloreto de Magnésio (MgCl ₂ -6H ₂ O) | 203.0 | 100.0 | 0.49261084 |
| Sulfato de magnésio (MgSO ₄ -7H ₂ O) | 246.0 | 100.0 | 0.40650406 |
| Cloreto de Potássio (KCl) | 75.0 | 400.0 | 5.3333335 |
| Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄) | 136.0 | 60.0 | 0.44117647 |
| Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃) | 84.0 | 350.0 | 4.1666665 |
| Cloreto de Sódio (NaCl) | 58.0 | 8000.0 | 137.93103 |
| Fosfato de Sódio Dibásico (Na ₂ HPO ₄) Anidros | 142.0 | 48.0 | 0.33802816 |
| Outros componentes | | | |
| D-Glicose | 180.0 | 1000.0 | 5.5555553 |

3.3. ISOLAMENTO DE HEPATÓCITOS DE RATO – DIGESTÃO ENZIMÁTICA COM TRYPLE EXPRESS

Para esse segundo processo de isolamento de hepatócitos de rato, foi utilizado o reagente *TrypLE™ Express 1X*, (Gibco, Dinamarca) e, a formulação da solução *TrypLE™* está descrita na tabela 3.4. Ratos wistar foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂, e a primeira etapa de perfusão para a lavagem do órgão foi realizada seguindo o protocolo descrito no item 3.2, utilizando 250 mL de meio William's a 37°C pH 7,4 a 10 mL/minuto. Em seguida foi realizada a perfusão com 20 mL do reagente *Tryple Express 1X* a 37°C com seringa de 20 mL através da veia porta hepática. Após essa etapa, o órgão foi imediatamente retirado e colocado em placa de petri com 3 mL de *Tryple Express 1X*. Os lóbulos hepáticos foram submetidos à dissociação mecânica, sendo agitados levemente por aproximadamente 5 minutos. Em seguida foram adicionado 5 mL de meio William's. Os hepatócitos isolados foram recolhidos e filtrados em filtro de 100 µm e submetidos a duas etapas de lavagem em meio William's 10% SFB com ciclos de centrifugação a 50 g por 5 minutos a 4°C. O pellet foi ressuscitado em 5 mL de meio William's 10% SFB e esta suspensão submetida a um gradiente de densidade de SFB 100% por decantação a 4°C por 30 minutos. Com o objetivo de aumentar a pureza e a viabilidade celular. Após esse período a viabilidade celular foi avaliada.

Tabela 3.4. Composição do reagente *TrypLE™ Express 1X* - Gibco by Life technologies

| Componentes | Peso molecular | Concentração (mg/L) | mM |
|--|----------------|---------------------|------------|
| Sais inorgânicos | | | |
| Cloreto de Potássio (KCl) | 75,0 | 200,0 | 2.6666667 |
| Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄) | 136,0 | 200,0 | 1.4705882 |
| Cloreto de Sódio (NaCl) | 58,0 | 8000,0 | 137.93103 |
| Fosfato de Sódio Dibásico(Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O) | 268,0 | 2160,0 | 8,059702 |
| Outros componentes | | | |
| EDTA | 416,0 | 457,6 | 1,1 |
| rProtease | | Confidencial | n/a |

3.4. CRIOPRESERVAÇÃO – CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE HEPATÓCITOS

Os hepatócitos obtidos após o isolamento foram criopreservados em diferentes crioprotetores. A tabela 3.5. descreve a concentração, a osmolaridade e a temperatura de congelamento das soluções crioprotetoras utilizadas para o congelamento de hepatócitos. 1×10^6 células/mL foram resuspendidas nos meios de criopreservação com diferentes crioprotetores já listados na tabela 3.5 e SFB em criotubos (Corning Incorporated, México) com volume final de 1,0 mL. O congelamento dos hepatócitos foi realizado de forma lenta e gradativa segundo Tom D. R. et al (2004); porém, com algumas adaptações. Dessa forma, os criotubos foram colocados imediatamente no gelo (4°C) durante 5 minutos, depois mantidos a -20°C durante 3 horas. Em seguida, mantidos em gelo seco (-78°C) por 24 horas e por fim armazenados em nitrogênio líquido (-196°C). Após o período de congelamento estipulado (7, 15 ou 30 dias), os tubos de criopreservação contendo os hepatócitos criopreservados foram retirados do nitrogênio líquido (-196°C) e submetidos a um descongelamento rápido a 37°C. Para isso foi utilizado um banho maria aquecido para manter a temperatura constante de 37°C (70, 99, 149). Após o descongelamento das amostras, as células foram ressuspendidas em 5 mL de meio William's e centrifugadas a 50g a 4°C por 5 minutos. Essa etapa foi realizada duas vezes para a remoção do crioprotetor.

Tabela 3.5. Osmolaridade das soluções adicionadas ao meio de criopreservação.

| Solução | DMSO (%v/v) | Sacarose (Mol/L) | Glicose (Mol/L) | Trealose (Mol/L) | Osmolaridade | Temperatura |
|---------|-------------|------------------|-----------------|------------------|--------------|-------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0310 mOsm/Kg | 0575 m °C |
| 2 | 5 | 0 | 0 | 0 | 1246 mOsm/Kg | 2315 m °C |
| 3 | 10 | 0 | 0 | 0 | 2362 mOsm/Kg | 4386m °C |
| 4 | 0 | 0,2 | 0 | 0 | 0512 mOsm/Kg | 951 m °C |
| 5 | 0 | 0,3 | 0 | 0 | 0621 mOsm/Kg | 1153 m °C |
| 6 | 0 | 0,4 | 0 | 0 | 0753 mOsm/Kg | 1399 m °C |
| 7 | 0 | 0 | 0,2 | 0 | 0513 mOsm/Kg | 953 m °C |
| 8 | 0 | 0 | 0,3 | 0 | 0646 mOsm/Kg | 1200m °C |
| 9 | 0 | 0 | 0,4 | 0 | 0725 mOsm/Kg | 1347 m °C |

| | | | | | | |
|----|---|---|---|-----|--------------|-----------|
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | 0504 mOsm/Kg | 936 m °C |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0,3 | 0621 mOsm/Kg | 1269 m °C |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0,4 | 0753 mOsm/Kg | 1532 m °C |

*A osmolaridade foi verificada em nosso laboratório de acordo com o ponto de congelamento das soluções de sacarose, glicose e de trealose que adicionamos à solução de criopreservação (SFB na ausência ou presença de 5% DMSO).

3.5. VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a viabilidade das células recém isoladas e criopreservadas, foi utilizada a técnica por exclusão do azul de tripan (0,2%) (Sigma, St. Louis, MO) e contagem em câmara de Neubauer. Além disso, utilizamos a técnica do MTT (Sigma, St. Louis, MO). A metodologia do MTT se baseia na formação do formazan, um corante produzido a partir de um sal de tetrazólio (MTT) pela ação de enzimas desidrogenases, existentes no meio intracelular figura 3.1. No experimento proposto, as células inviáveis perdem a capacidade de gerar o formazan em função da perda da atividade metabólica. Para isso, foram plaqueadas 1×10^5 células para cada poço e adicionado 25 μ L de solução de MTT a 5 mg/mL diluído com PBS. Após um período de 3 horas de incubação a 37°C, a placa foi centrifugada a 50g por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. Os cristais de formazan foram solubilizados em 100 μ L de DMSO (Sigma, St. Louis, MO). A leitura foi realizada em leitor de placas EzRead 400 (Biochrom, Cambridge, UK) com comprimento de onda de 570 nm.

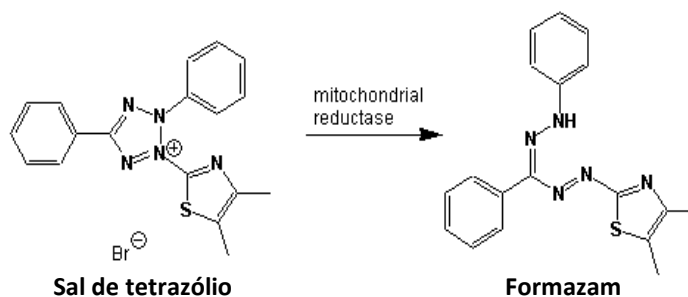


Figura 3.1. Princípio do ensaio de viabilidade celular. O MTT é reduzido por desidrogenases celulares a Formazan (roxo), o que permite a análise absorvância.

3.6. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE POR MARCAÇÃO CELULAR COM CALCEÍNA ÁCIDA, CALCEÍNA-AM E IODETO DE PROPÍDIO

Para avaliar a viabilidade celular, utilizamos marcadores celulares de fluorescência. A calceína-AM é um composto de éster acetoximetílico (AM) permeável à membrana

plasmática. Uma vez hidrolisado por esterases intracelulares inespecíficas, esse composto torna-se fluorescente e confinado no ambiente intracelular. Dessa forma, células com altos níveis de viabilidade adquirem um forte brilho verde-fluorescente após a hidrólise da calceína-AM, enquanto células apresentando baixa ou média viabilidade possuem menor fluorescência. As células mortas são incapazes de realizar essa tarefa e não se tornam fluorescentes. Para esse ensaio, os hepatócitos foram incubados com 5 μM de calceína-AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon – USA) a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas em duas etapas com meio de cultura a 50g a 4°C por 5 minutos e posterior análise em microscópio de fluorescência.

O fator mais importante para a avaliação da viabilidade celular foi verificar a integridade da membrana plasmática. Para esse fim, utilizamos dois diferentes compostos fluorescentes impermeáveis à membrana plasmática: o iodeto de propídio (Pi) e a calceína ácida. O primeiro é uma molécula intercalante de bases de ácidos nucleicos pareados de 668.39 Da e alcança o ambiente intracelular após um dano membranar, capaz de alterar a permeabilidade seletiva da membrana plasmática. Assim, os hepatócitos foram incubados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de Pi (Sigma, St. Louis, MO) por 5 minutos e lavadas em duas etapas com meio de cultura a 50g 4°C por 5 minutos para posterior análise em microscópio de fluorescência. Por sua vez, a calceína ácida é um composto aniônico de 622.55 Da que, semelhante ao Pi, somente atravessa a membrana plasmática após a perda da permeabilidade seletiva. Desse modo, os hepatócitos foram incubados com 1 μM de calceína (Sigma, St. Louis, MO) por 5 minutos a 37°C. Em seguida foram realizadas três lavagens com meio William's 50g a 4°C por 5 minutos e posterior análise em microscópio de fluorescência.

3.7. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR LIBERAÇÃO DE LDH

A lactato desidrogenase (LDH) catalisa a conversão do lactato em piruvato pela oxidação de NADH a NAD⁺. O ensaio de LDH é baseado na detecção da enzima citosólica, lactato desidrogenase, que é liberada para o meio extracelular em caso de perda da integridade da membrana em decorrência de um processo de morte celular (150). Nesse experimento foi utilizado um kit comercial de ensaio de LDH (Doles - Goiânia, Brasil). Os experimentos foram realizados seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante com as seguintes modificações: 1×10^5 células foram incubadas em placa de 96 poços em 200 μL de meio William's durante 1 hora. Após esse tempo, a placa foi centrifugada a 50g por 5 minutos a 4°C e 10 μL de sobrenadante foi recolhido para o ensaio de LDH. A leitura da

reação foi feita em leitor de placas EzRead 400 (Biochrom, Cambridge, UK) utilizando o comprimento de onda de 492 nm.

3.8. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ALBUMINA

Para avaliar a função hepática dos hepatócitos recém isolados e criopreservados, foi realizado teste bioquímico utilizando Kit da marca Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil) para a produção de albumina. O protocolo desse teste foi padronizado em nosso laboratório para hepatócitos de rato. Para esses experimentos 5×10^5 células/poço foram colocadas em placa de 96 poços e o sobrenadante recolhido após uma incubação de 1 hora em meio William's a 37°C. A leitura da reação foi feita em leitor de placas SpectraMax[®] M5 (Molecular devices, USA).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Pré-teste D'agostino e Pearson foi utilizado para verificar a normalidade da nossa amostra seguido de análise de variância com pós teste Tukey para comparações múltiplas, em caso de distribuição normal. Para as distribuições não-paramétricas utilizamos o teste Kruskal-Wallis seguido de pós teste Dunns. Os Valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4.1. ISOLAMENTO DE HEPATÓCITOS DE RATO – MÉTODO COM COLAGENASE TIPO IV.

Com o intuito de padronizar o isolamento de hepatócitos humanos, foi utilizado nesta dissertação um modelo animal. Inicialmente, para isolar os hepatócitos de rato foi utilizado como agente de dissociação enzimática a enzima colagenase tipo IV. Esse procedimento é bem descrito na literatura, porém controverso com relação às etapas de colagenase utilizadas.

Foram utilizadas como controle das reações a linhagem celular HepG2, que foi isolada de carcinoma hepatocelular humano, que apresenta um perfil metabólico semelhante aos hepatócitos isolados do fígado e é rotineiramente utilizada em ensaios *in vitro* (4).

Hepatócitos de rato foram isolados e a viabilidade tanto após o isolamento quanto após o gradiente de SFB a 100% , foi avaliada utilizando as metodologias de exclusão do azul de tripan e ensaio de MTT. De acordo com os resultados obtidos, a maioria das células isoladas por digestão enzimática com colagenase apresentam uma marcação positiva para o corante azul de tripan, após uma ou duas etapas de perfusão. Para tentar elucidar essa questão utilizamos diferentes tampões já descritos anteriormente e concentrações da enzima, assim como diferentes velocidades de perfusão (2,5 mL/minuto; 5 mL/minuto; 10 mL/minuto e 15 mL/min). Entretanto, em nenhuma dessas condições foi possível diminuir ou abolir a captação do corante azul de tripan pelas células. Contudo, observamos uma diferença na intensidade de captação pelo corante azul de tripan. Algumas células apresentam uma marcação total (bem azulada) pelo corante, após observação em microscopia. Tais células foram classificadas como mortas, uma vez que não foi possível distinguir o núcleo do citoplasma. Porém, a maioria dos hepatócitos isolados apresentou uma fraca marcação pelo corante azul de tripan, o que nos permitiu distinguir núcleo do citoplasma. Para essa fraca marcação consideramos os hepatócitos como viáveis como ilustrado na figura 4.1. Dessa forma, os gráficos apresentados para os ensaios de exclusão do azul de tripan para hepatócitos isolados por digestão enzimática com colagenase, são classificadas como viáveis as células fracamente marcadas pelo corante, figura 4.2. Tal procedimento foi adotado devido ao fato de que tais células mesmo com uma fraca marcação positiva para o corante apresentaram atividade metabólica, observada pelo

ensaio de MTT como observado na figura 4.3. Os resultados obtidos indicam que pela técnica de exclusão do azul de tripan não é possível mensurar a viabilidade de hepatócitos obtidos pela digestão com colagenase. Após a submissão por 30 min em gradiente de SFB, a viabilidade celular pelo ensaio de MTT foi superior às obtidas logo após o isolamento celular, $81 \pm 1,1\%$ vs. $72 \pm 3,3\%$, respectivamente. O resultado indica que o gradiente de SFB 100% utilizado na técnica é capaz de enriquecer a amostra em células viáveis em aproximadamente 10%, visto que as células mortas não sedimentaram. Além disso, foi avaliado por ensaio de LDH que não houve grande perda da integridade da membrana celular após o isolamento dos hepatócitos como ilustrado na figura 4.4. Entretanto, quando mantidas em cultura a 37°C houve um aumento significativo da liberação de LDH no meio, de forma tempo-dependente. Esses valores foram superiores às células mantidas a 4°C , como ilustrado nas figura 4.5. Assim, as células mantidas a 4°C mantêm a viabilidade e a integridade de membrana por aproximadamente 6 horas após o isolamento. Dessa forma, seria fundamental realizar a terapia celular em modelos animais com células frescas nesse intervalo de tempo, se mantidas a essa temperatura. Caso contrário, a criopreservação é a única metodologia a ser aplicada para a manutenção da integridade celular por um tempo prolongado.

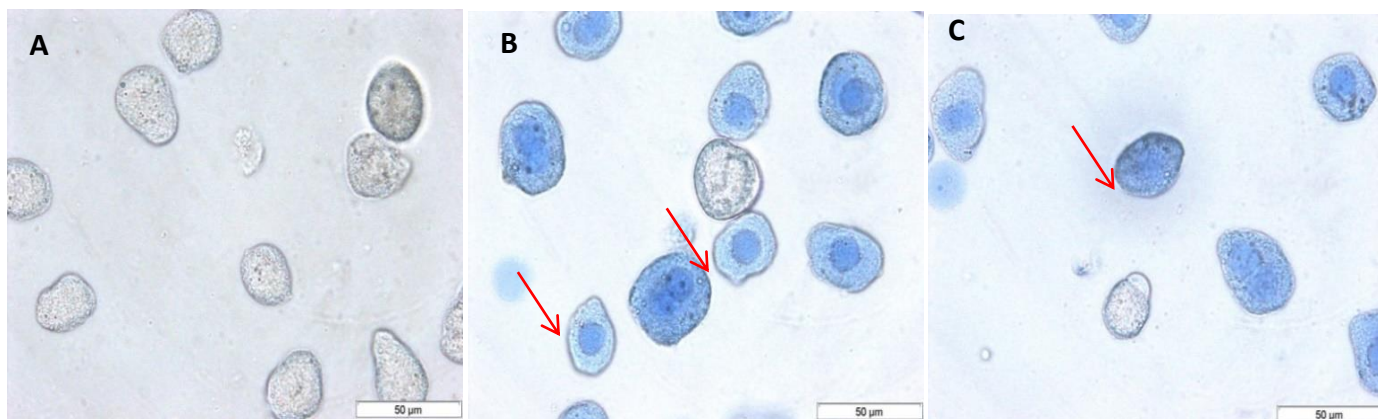


Figura 4.1. Microscopia dos hepatócitos frescos. A) Células sem azul de tripan. B) hepatócitos marcados fracamente com corante azul de tripan. C) Células mortas positivas para o azul de tripan. As setas indicam a diferença na marcação com o corante, demonstrando um padrão diferenciado de marcação positiva para o azul de tripan. Imagem representativa de 4 experimentos realizados independentes. Barra 50 μM .

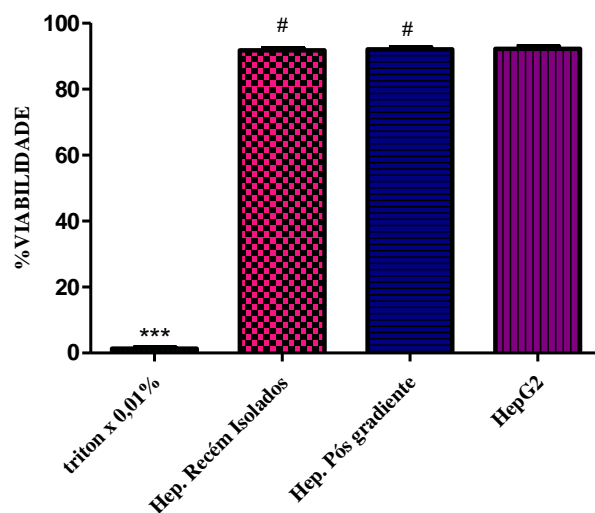


Figura 4.2. Avaliação da viabilidade celular por exclusão do azul de tripan após isolamento com collagenase tipo IV. A viabilidade está representada pela porcentagem de células marcadas ou não pelo corante de azul de tripan. Os dados foram comparados ao grupo controle (células HepG2) mantidas em cultura. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores * $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas e # $p > 0,05$ não apresentam diferença significativa, *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey)

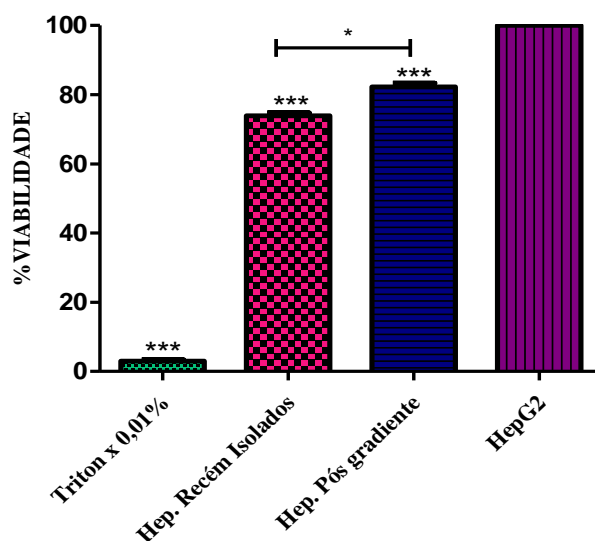


Figura 4.3. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após isolamento com collagenase tipo IV. Após o isolamento pelo método de digestão enzimática com collagenase, hepatócitos (1×10^5 células/poço) foram plaqueados e a viabilidade foi avaliada pela técnica de MTT. Os dados foram normalizados e comparados em função do grupo controle, células HepG2 mantidas em cultura, e os dados expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. * $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

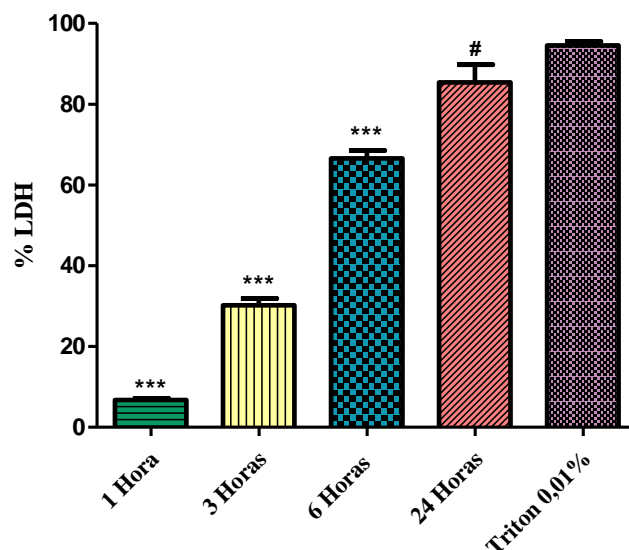


Figura 4.4. Ensaio de LDH em hepatócitos isolados e incubados a 37°C. Após o isolamento pelo método de collagenase, hepatócitos (1×10^5 células/poço) foram colocados em placa de 96 poços e incubados a 37°C por 1, 3, 6 e 24 horas e o sobrenadante recolhido nestes intervalos de tempo para o ensaio de detecção de LDH no meio extracelular. Os dados foram comparados em função do controle positivo, Triton 0,01%, percentual máximo de morte. Gráfico representativo de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores * $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. # $> p > 0,05$ não apresenta diferença significativa *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns)

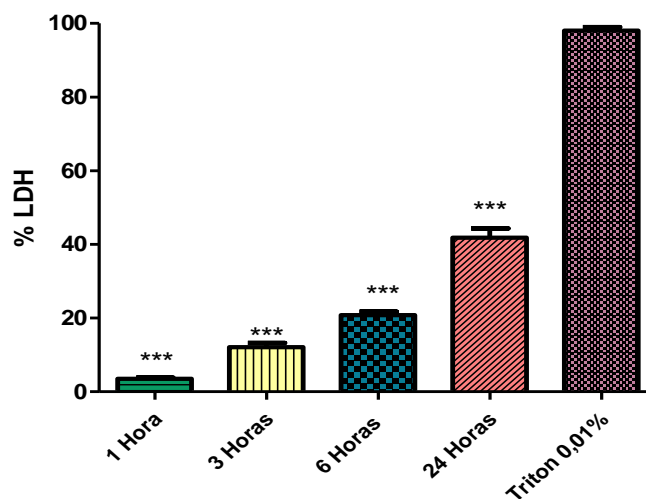


Figura 4.5. Ensaio de LDH em hepatócitos isolados e incubados a 4°C. Após o isolamento pelo com collagenase, hepatócitos (1×10^5 células/poço) foram colocados em placa de 96 poços e incubados a 4°C por 1, 3, 6 e 24 horas e o sobrenadante recolhido para o ensaio de detecção de LDH. Os dados foram comparados em função do controle positivo, Triton 0,01%, percentual máximo de morte. Gráfico representativo de 6 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

Embora os hepatócitos tenham apresentado uma marcação positiva para o corante azul de tripan, estas células apresentaram a capacidade metabólica de converter o MTT em formazan e integridade de membrana visto pela baixa liberação de LDH no meio extracelular. Adicionalmente, fomos investigar possíveis danos à membrana plasmática utilizando corantes fluorescentes vitais. Para esse experimento utilizamos corantes com diferentes pesos moleculares e com propriedades distintas de captação pela célula de acordo com a sua integridade. A figura 4.6 B, hepatócitos marcados em verde após incubação com o corante calceína-AM e em C e E não apresenta nenhuma marcação para os corantes pi e calceína ácida, respectivamente. Vale ressaltar que esses últimos apenas são capazes de atravessar a membrana plasmática e fluorescer caso haja uma perda da permeabilidade de membrana. Após os ensaios de marcação com os corantes citados, podemos sugerir que as células isoladas por digestão enzimática com colagenase tipo IV apresentam integridade de membrana e que essa marcação fraca para o corante azul de tripan parece ser inespecífica. Uma vez que, utilizamos corantes com diferentes pesos moleculares e nenhum deles indicaram danos irreversíveis à membrana celular. Ficou claro que hepatócitos isolados com colagenase tipo IV apresentam uma marcação positiva para o corante azul de tripan porém, isso não inviabiliza a sua utilização para fins experimentais. Essa afirmação está baseada nos resultados de MTT, LDH e marcação com diferentes corantes vitais vistos neste trabalho.

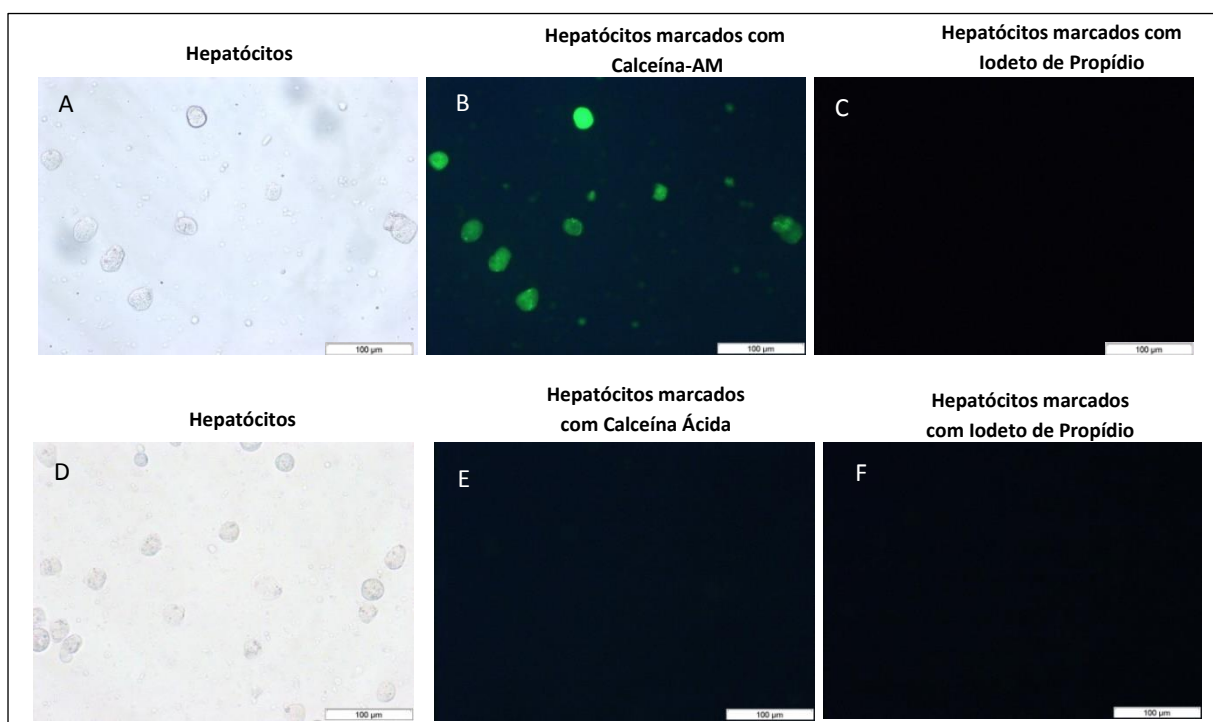


Figura 4.6. Avaliação da viabilidade por marcação com calceína-AM, calceína ácida e iodeto de propídio. Em A e D hepatócitos no campo claro. Após o isolamento de hepatócitos com colagenase, as células foram incubadas com calceína-AM (A), ou com de calceína ácida (E) ou

com iodeto de propídio (C e F) em seguida as células foram lavadas em 3 etapas de centrifugação a 50g, 4°C por 5 minutos. As amostras foram observadas em microscópio de fluorescência. Imagens representativas de 4 experimentos realizados independentes. Barra 100 µm.

4.2. ISOLAMENTO DE HEPATÓCITOS DE RATO – MÉTODO COM REAGENTE *TRYPLE EXPRESS 1X*

Ao isolar hepatócitos de rato com a enzima colagenase verificamos uma marcação para o corante azul de tripan. Entretanto, não sabemos até o momento o motivo para que esse artefato ocorra. Dessa forma, realizamos a perfusão com outro agente capaz de realizar a dissociação enzimática, o reagente *Tryple Express 1X*, visando diminuir ou abolir tal efeito. O reagente *Tryple express 1X* é uma enzima recombinante derivada de fermentação microbiana e é utilizado para a dissociação de linhagens celulares aderentes ao substrato. Atua de forma semelhante à tripsina de porco, entretanto esse reagente não é de origem animal. Diferente das células isoladas com colagenase, hepatócitos isolados pelo método com o reagente *Tryple Express* não apresentaram nenhuma marcação para o corante azul de tripan, exceto para as células aparentemente mortas (totalmente marcadas com o corante) como ilustrado na figura 4.7. Além disso, foram observadas diversas células refringentes à luz do microscópio, o que não foi possível demonstrar pela técnica anterior. As células dissociadas do fígado e a viabilidade celular foi quantificada através da técnica de exclusão de azul de tripan e MTT, e comprovou-se que esse método para dissociação de células a partir do tecido hepático, é uma excelente alternativa metodológica para isolar células viáveis.

A figura 4.8 ilustra os dados de viabilidade celular avaliados pela técnica de azul de tripan. Podemos observar que células isoladas com o *Tryple express* após o gradiente SFB não apresentaram diferenças significativas na viabilidade quando comparadas às células de linhagem HepG2, $88,2 \pm 1,78$ vs. $91,4 \pm 1,72$, respectivamente. Os hepatócitos obtidos logo após o isolamento celular apresentaram uma viabilidade de $76,6 \pm 4,8$. Isto sugere mais uma vez que o gradiente de densidade de SFB é capaz de concentrar um número maior de hepatócitos viáveis em aproximadamente 11%.

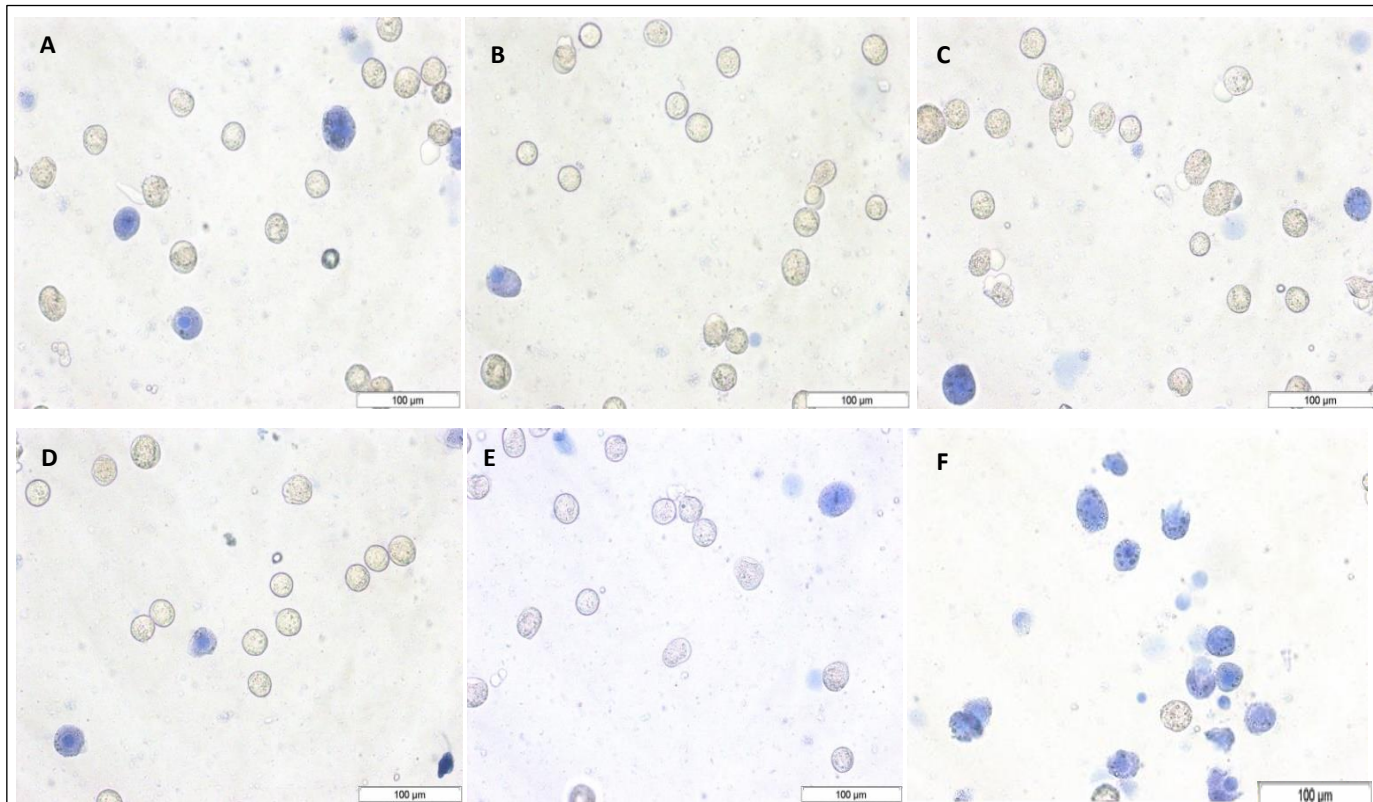


Figura 4.7. Hepatócitos de rato isolados com enzima de dissociação Tryple Express 1X. Em A), B), C), D) e E) são mostradas células após o isolamento e viabilidade por exclusão do azul de tripan. F) Hepatócitos incubados por 3 minutos com 0,01% de triton, como controle total de morte. As fotos representam 5 experimentos independentes. Imagens representativas de 6 experimentos realizados independentes. Barra 100 µM.

Como a grande maioria das células isoladas por colagenase apresentaram marcação positiva para o corante azul de tripan, não foi possível comparar a viabilidade por esse método entre os dois tipos de isolamentos realizados. Podemos apenas sugerir que o isolamento com Tryple express apresentaram dados favoráveis e superiores ao método anterior avaliados pelas demais técnicas utilizadas. Nos ensaios de MTT, figura 4.9, foi observado um aumento no metabolismo celular dos hepatócitos primários recém isolados quando comparados à linhagem controle. Embora a viabilidade por exclusão do azul de tripan para células HepG2 seja alta, o metabolismo destas células pode ser inferior às recém isoladas. Levando em consideração que uma linhagem celular com um número indefinido de passagens e submetidas à dissociação enzimática com tripsina por ser célula e aderente ao substrato, pode diminuir a capacidade metabólica dessas células e conseqüentemente a sua eficácia no metabolismo do MTT em formazan.

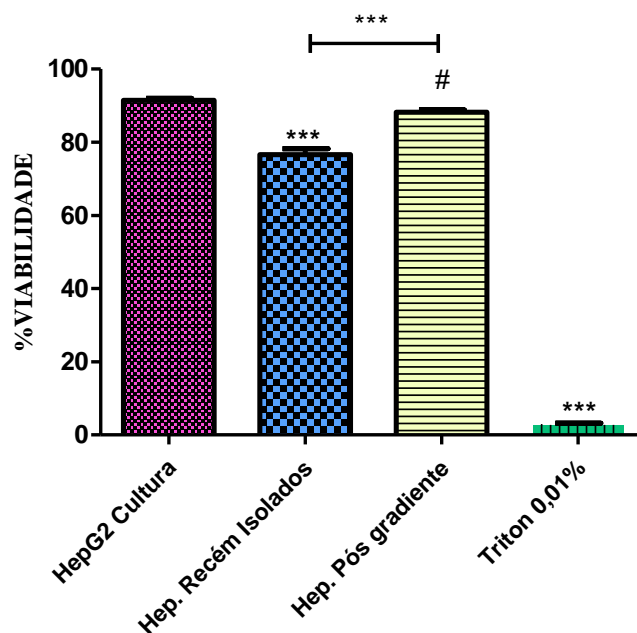


Figura 4.8. Avaliação da viabilidade celular por exclusão do azul de tripan após isolamento com Tryple express 1x. A viabilidade de hepatócitos recém isolados e após o gradiente de SFB a 100%, pelo método de digestão enzimática com tryple express 1X, foi avaliada por exclusão do azul de tripan. A viabilidade está representada pela porcentagem de células marcadas ou não pelo corante de azul de tripan. Os dados foram comparados ao grupo controle (células HepG2) mantidas em cultura. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores ** $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas e # $p > 0,05$ não apresentam diferença significativa, *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey)

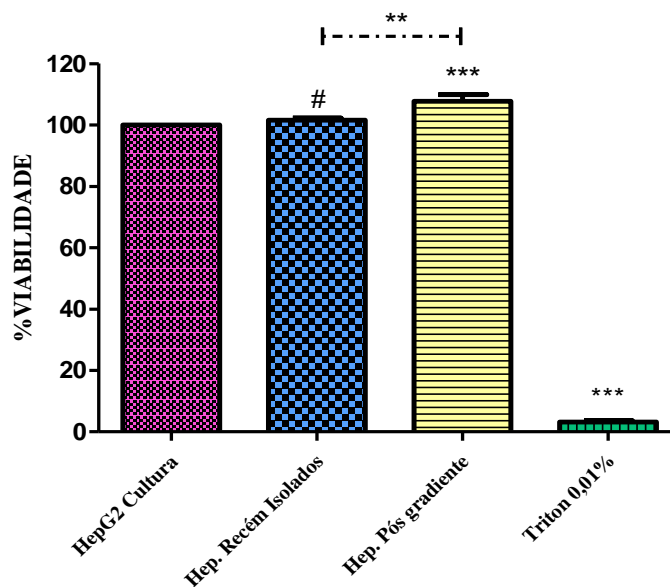


Figura 4.9. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT após isolamento com tryple express 1X. Após o isolamento pelo método de digestão enzimática com tryple express 1X, hepatócitos (10^5 células/poço) foram colocados em placa de 96 poços e incubadas a 37°C por 3 horas com reagente MTT e absorbância verificada a 570 nm. Os dados foram normalizados e comparados em função do grupo controle (células HepG2) e os dados expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas

(média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. *** $p < 0,0001$. ** $p < 0,001$ (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

Os ensaios de LDH para os hepatócitos isolados por dissociação com Tryple Express, ilustrados nas figuras 4.10 e 4.11, demonstraram que as taxas de liberação da molécula LDH para o meio extracelular é inferior àquelas isoladas pelo protocolo anterior. Tal efeito foi observado tanto para as células mantidas em cultura a 37°C, quanto para as células a 4°C. Hepatócitos isolados por colagenase apresentaram um aumento significativo na detecção de LDH a partir de 3 horas a 37°C, enquanto a 4°C foi necessário um intervalo maior, 6 horas. Hepatócitos dissociados por Tryple Express apresentaram dados satisfatórios para a detecção da molécula de LDH quando comparados ao protocolo anterior. A 37°C a porcentagem de LDH no meio extracelular começa a aumentar significativamente a partir de 6 horas e somente a partir de 24 horas a 4°C.

Após verificar que o isolamento de hepatócitos com Tryple Express nos fornecia células íntegras e sem marcação para o corante azul de tripan, repetimos os ensaios de viabilidade com os corantes vitais também realizados anteriormente para o outro método de isolamento. Como ilustrado na figura 4.12, também comprovamos a integridade de membrana pela fluorescência do corante calceína-AM e ausência de fluorescência para os corantes Pi e calceína ácida.

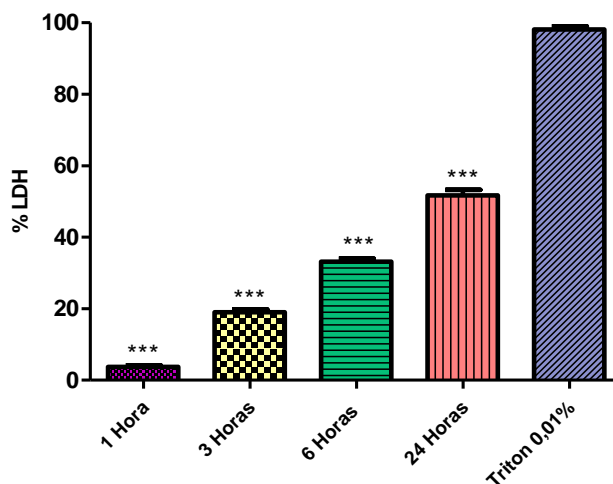


Figura 4.10. Ensaio de LDH em hepatócitos isolados e incubados a 37°C. Após o isolamento pelo método com tryple express1X, hepatócitos (1×10^5 células/poço) foram plaqueados para análise de LDH no sobrenadante em diferentes intervalos de tempo a 37°C como indicado no eixo X. Os dados foram comparados em função do controle positivo, ou seja, percentual máximo de morte células incubadas por 3 minutos com triton 0,01%. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam

diferenças significativas *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

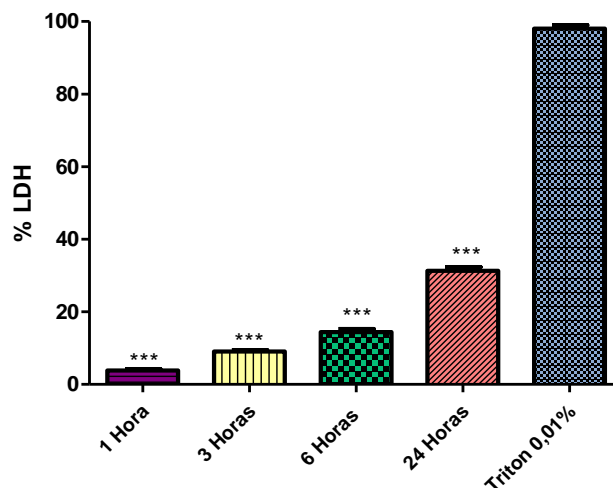


Figura 4.11. Ensaio de LDH em hepatócitos isolados e incubados a 4°C. Após o isolamento pelo método com tryple express1X, hepatócitos (1×10^5 células/poço) foram plaqueados para análise de LDH no sobrenadante em diferentes intervalos de tempo a 4°C. Os dados foram comparados em função do controle positivo, ou seja, percentual máximo de morte células incubadas por 3 minutos com triton 0,01%. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

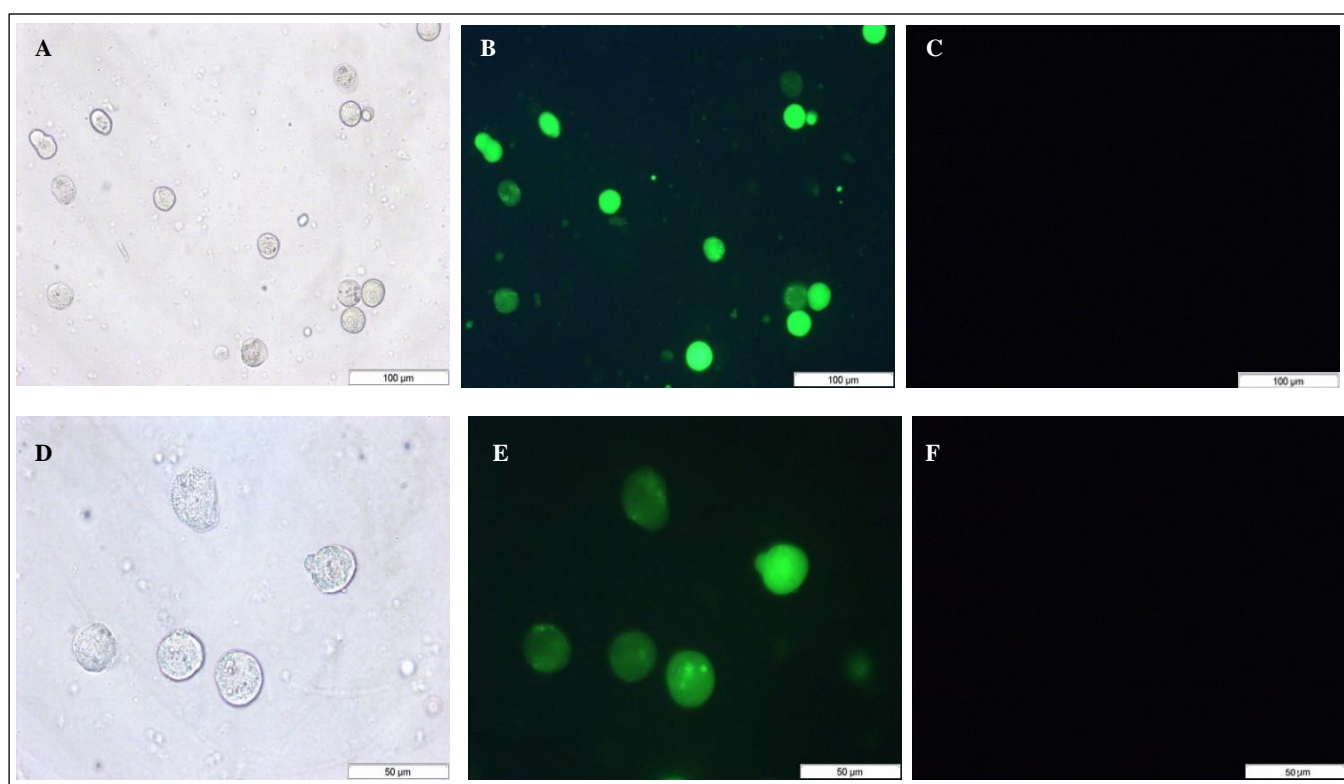


Figura 4.12. Microscopia de fluorescência com calceína-AM e com Pi das células isoladas com tryple express. A) e D) células no campo claro. B) e E) células com marcação para o corante calceína-AM, demonstrando a viabilidade dos hepatócitos isolados. C) e F) ausência de marcação para o corante Pi. Imagens representativas de 6 experimentos realizados independentes. Barra 50 µm e 100 µm.

Para a análise funcional das células, foi realizado ensaio de produção de albumina ilustrado na figura 4.13. A produção padrão de albumina é de $3,75 \pm 0,09$ g/dL e os hepatócitos isolados apresentaram uma produção normal de albumina com $3,12 \pm 0,06$ g/dL. Hepatócitos criopreservados apresentaram uma queda na produção de albumina, $1,96 \pm 0,15$ g/dL e $2,19 \pm 0,05$ para células criopreservadas com 5% DMSO e 0,2M de Trealose na ausência do DMSO, respectivamente. De acordo com esse resultado, hepatócitos criopreservados em trealose na ausência de DMSO apresentaram capacidade funcional superior às células criopreservadas com 5% de DMSO.

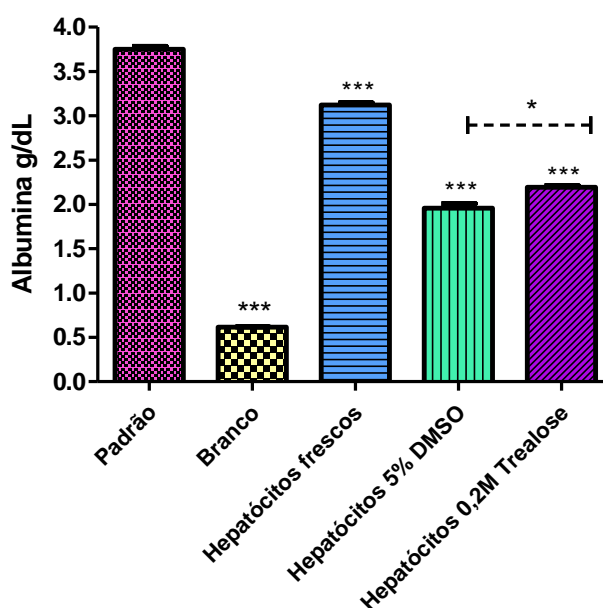


Figura 4.13. Ensaio funcional para a produção de albumina em hepatócitos de rato após o isolamento com tryple express e criopreservação. 5×10^5 células/poço foram incubadas a 37°C durante 1 hora. Após esse período foi recolhido o sobrenadante para análise da produção de albumina. Também foram analisados sobrenadantes de hepatócitos criopreservados durante 7 dias em nitrogênio líquido em solução de SFB com 5% DMSO e células criopreservadas em uma solução de SFB com 0,2M de trealose na ausência de DMSO. Os dados foram comparados em relação ao padrão de produção do Kit. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. * $p < 0,01$ *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

4.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CRIOPROTETOR E TOXICIDADE DOSE-DEPENDENTE DO DMSO DURANTE A CRIOPRESERVAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR HEPG2 E DE HEPATÓCITOS DE RATO ISOLADOS COM COLAGENASE.

O objetivo principal desta dissertação é desenvolver um protocolo de criopreservação para hepatócitos de rato que possa garantir melhores condições às células, sendo capaz de minimizar os danos aos quais estas são submetidas durante o congelamento. Visto que em ambos os mecanismos de isolamento os hepatócitos de rato obtidos parecem viáveis e com membrana plasmática íntegra, fomos testar condições de criopreservação. Inicialmente, avaliamos a capacidade crioprotetora do DMSO em células de linhagem HepG2 e em hepatócitos isolados com colagenase. O DMSO é o crioprotetor mais utilizado atualmente nos protocolos de congelamento de diversos tipos celulares, porém, é sabido que esse ACP é tóxico para as células a temperatura ambiente e há uma relação dose-dependente desse efeito. A concentração sugerida para a criopreservação de hepatócitos de diferentes espécies é preferencialmente de 10% e com o objetivo de diminuir esse efeito, buscamos uma concentração menor de DMSO do que àquela sugerida na literatura, capaz de promover um potencial crioprotetor satisfatório.

Nossos resultados indicaram que a solução de 5% DMSO, confere um papel crioprotetor superior à concentração de 10% de DMSO, $83 \pm 2\%$ e $77 \pm 1,8\%$, respectivamente por exclusão do azul de tripan e $85 \pm 3,5\%$ vs. $77 \pm 3,6\%$, respectivamente pela da técnica de MTT em células da linhagem HepG2. Dados ilustrados nas figuras 4.14 e 4.15.

O potencial crioprotetor do DMSO em hepatócitos de rato foi avaliado pela técnica de exclusão do azul de tripan porém, pelo artefato conferido por essa técnica após o isolamento com colagenase, não foi possível utilizar o azul de tripan como referência para a viabilidade (figura 4.16). Entretanto, pela técnica de MTT ficou clara a diferença entre as concentrações de DMSO e seu potencial crioprotetor para hepatócitos de rato após a criopreservação. A figura 4.17, sugere pela da técnica de MTT que a concentração de 5% DMSO ($79,73 \pm 2,2\%$ de viabilidade), apresenta um potencial crioprotetor superior às células criopreservadas em 10% DMSO, ($71 \pm 2,8\%$ de células viáveis). De forma semelhante à linhagem HepG2, hepatócitos primários podem ser criopreservados a uma concentração menor àquela sugerida pela literatura. A utilização da linhagem celular HepG2, nos permitiu demonstrar e validar a técnica de exclusão do azul de tripan e o ensaio de MTT como metodologias para avaliar a viabilidade celular. Embora não tenha

vido possível validar ambas as técnicas para hepatócitos primários isolados com colagenase, demonstramos que os valores são correspondentes para todos os grupos analisados por azul de tripan e MTT em linhagem HepG2.

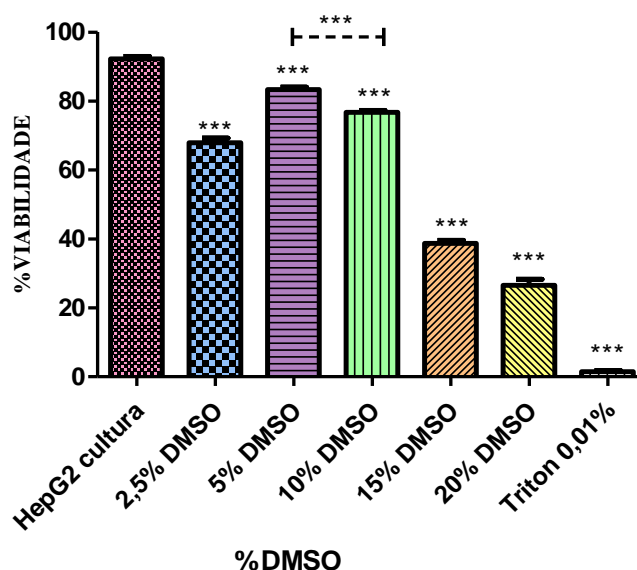


Figura 4.14. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan em células HepG2 após a criopreservação com DMSO. 1×10^6 células foram criopreservadas durante 7 dias em nitrogênio líquido em diferentes concentrações de DMSO para análise do potencial crioprotetor e toxicidade do DMSO em células HepG2 por azul de tripan. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes e um pool de 3 amostras realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores de $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas $***p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey)

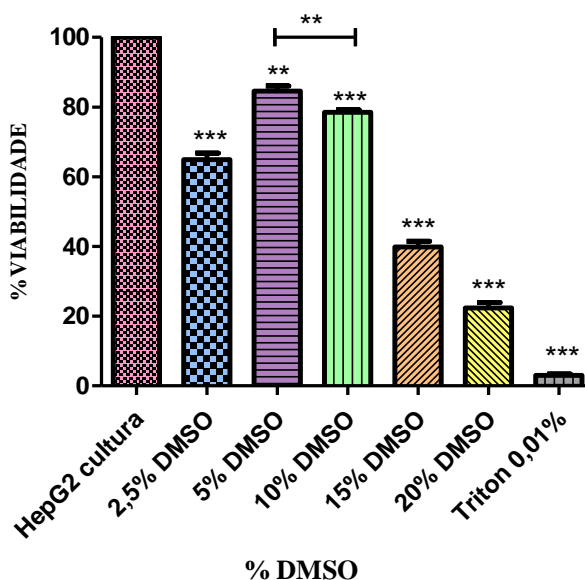


Figura 4.15. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT em células HepG2 após a criopreservação com DMSO. 1×10^6 células foram criopreservadas durante 7 dias em nitrogênio líquido em diferentes concentrações de DMSO para análise do potencial crioprotetor e toxicidade do DMSO em células HepG2. A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados foram normalizados e comparados em função do grupo controle, células HepG2 mantidas em cultura e os

dados expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes e um pool de 3 amostras realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

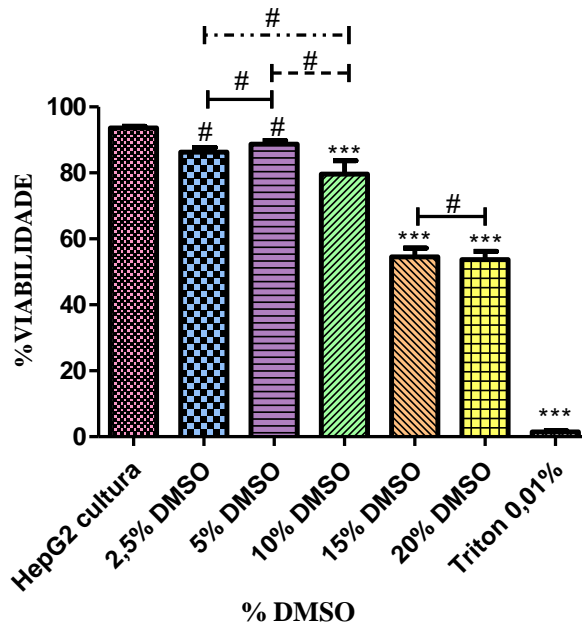


Figura 4.16. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan de hepatócitos isolados com colagenase após a criopreservação com DMSO. 1×10^6 células foram criopreservadas durante 7 dias em nitrogênio líquido em diferentes concentrações de DMSO para análise do potencial crioprotetor e toxicidade do DMSO em hepatócitos de rato. Os dados foram comparados em função do controle, células HepG2 mantidas em cultura. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes e um pool de 3 amostras realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores de # $p > 0,05$ não apresentam diferença significativa. $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas *** $p < 0,0001$. Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

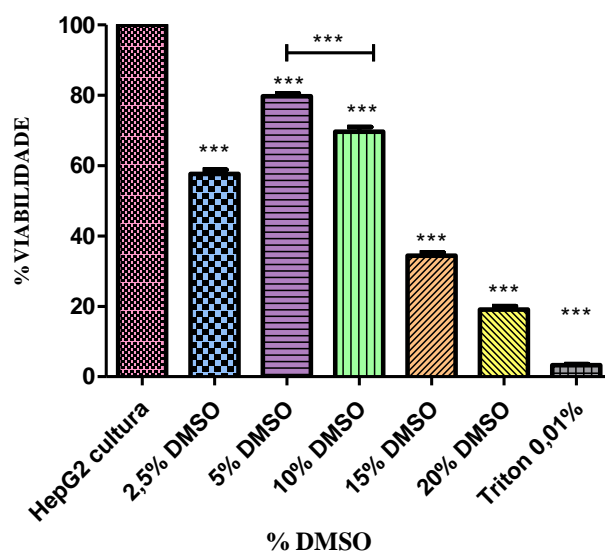


Figura 4.17. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT em hepatócitos de rato isolados com colagenase após a criopreservação com DMSO. 1×10^6 células foram criopreservadas durante 7

dias em nitrogênio líquido em diferentes concentrações de DMSO para análise do potencial crioprotetor e toxicidade do DMSO. A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados foram normalizados e comparados em função ao grupo controle, células HepG2 mantidas em cultura e os dados expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes e um pool de 3 amostras realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. $***p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

4.4. Avaliação do processo de criopreservação de hepatócitos de rato durante 7, 15 e 30 dias com diferentes crioprotetores na presença ou ausência de DMSO – Isolamento com colagenase tipo IV

O fato dos hepatócitos captarem o azul de tripan após o isolamento com colagenase tipo IV não nos impediu de prosseguir com os experimentos de congelamento, uma vez que os dados apresentados nos ensaios de MTT, liberação de LDH e marcação celular com corantes vitais mostraram que as células isoladas apresentam atividade metabólica e integridade de membrana aceitáveis. Além disso, o nosso objetivo foi observar se essa marcação característica do processo de isolamento poderia afetar de forma significativa a viabilidade dos hepatócitos após o descongelamento.

Após o isolamento, hepatócitos de rato foram criopreservados de acordo com o protocolo descrito anteriormente. Para isso, 1×10^6 células/mL foram criopreservadas em diferentes concentrações de crioprotetores classificados como naturais. Esses crioprotetores (sacarose, glicose, trealose e glicerol) são encontrados em animais que desenvolveram tolerância ao congelamento quando submetidos a temperaturas abaixo de zero (tabela 1.7). Hepatócitos são altamente sensíveis ao processo de congelamento e por esta razão optamos por selecionar tais compostos, para de minimizar as criolesões e possíveis efeitos tóxicos. Para a solução de criopreservação foram utilizadas soluções com 0,2 M; 0,3 M ou 0,4 M de sacarose (figura 4.18), de glicose (figura 4.19) ou de trealose (figura 4.20), na ausência ou na presença do DMSO.

Em todos os experimentos foi visto que o método por exclusão do azul de tripan para células isoladas com colagenase não é a melhor técnica para avaliar a viabilidade de hepatócitos de primários de rato como observado anteriormente. A marcação pelo corante mantém o mesmo perfil das células obtidas após o isolamento, ou seja, uma fraca marcação pelo corante por todo o citoplasma e uma coloração mais azulada no núcleo. Mais uma vez ficou claro que os hepatócitos marcados apresentam atividade metabólica observada nos ensaios de MTT, o que nos permitiu verificar diferenças significativas entre os grupos de

criopreservação analisados. De acordo com os resultados de sacarose e glicose, não foi possível atingir um potencial crioprotetor superior à concentração de 5% de DMSO. Entretanto, células criopreservadas com 0,2 M de trealose na ausência de DMSO apresentaram viabilidade superior quando comparadas aos diferentes grupos avaliados. Foram avaliados diferentes tempos de congelamento, 7, 15 e 30 dias e não houve diferença significativa entre os tempos de criopreservação.

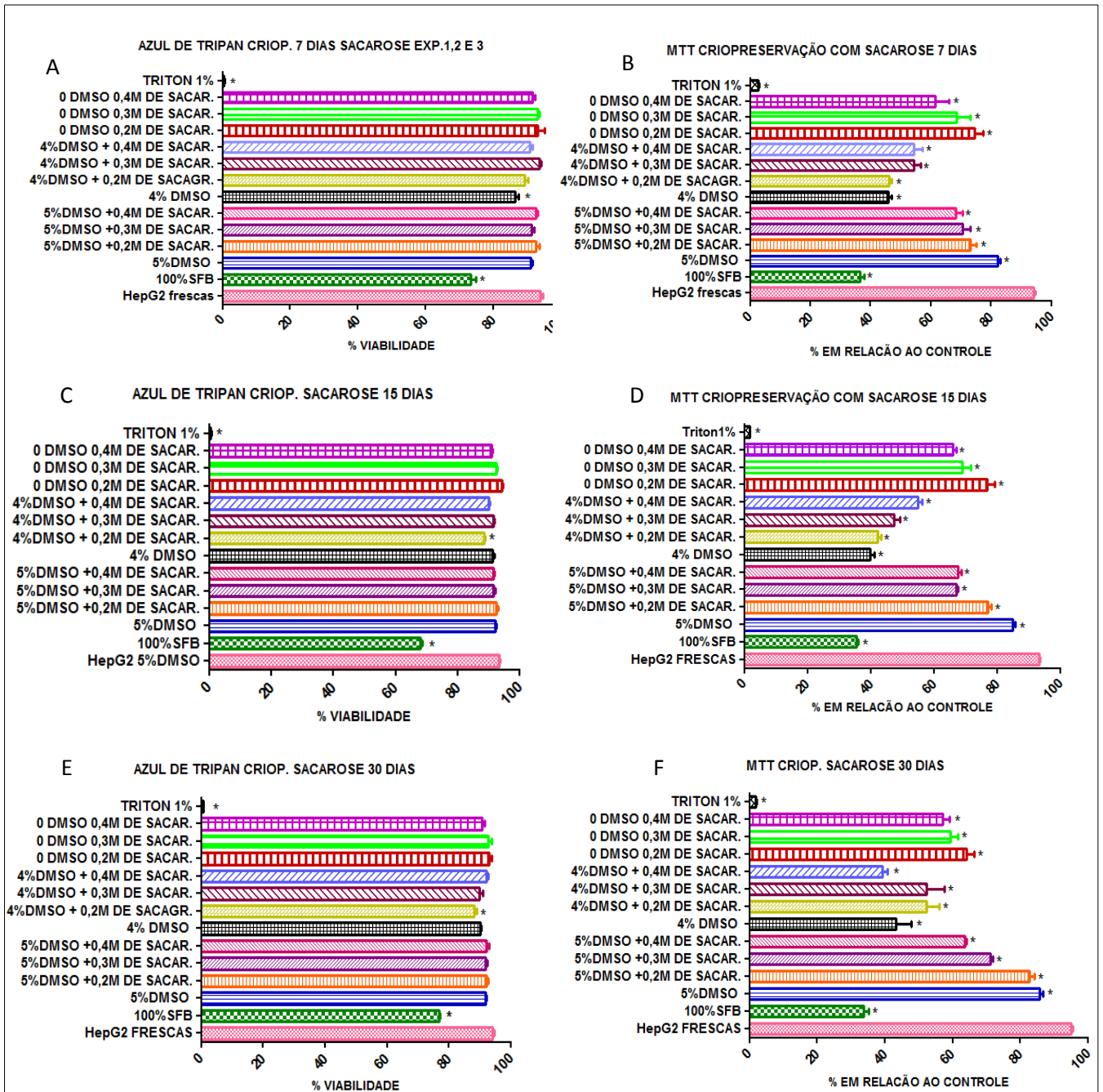


Figura 4.18. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan e MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com DMSO e Sacarose durante 7, 15 ou 30 dias. Após o isolamento com colagenase, 1×10^6 células/mL foram criopreservadas em diferentes concentrações de sacarose na presença ou ausência de DMSO. Após 7, 15 ou 30 dias de congelamento os criotubos foram descongelados a 37°C e a viabilidade foi analisada por exclusão do azul de tripan (A, C e E). Os dados foram comparados com o grupo controle, hepatócitos recém isolados (células frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. As figuras B, D e E

representam os ensaios de MTT. Os dados foram comparados em função do grupo controle, linhagem HepG2 (células frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. Para os ensaios, o gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. $*p < 0,01$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

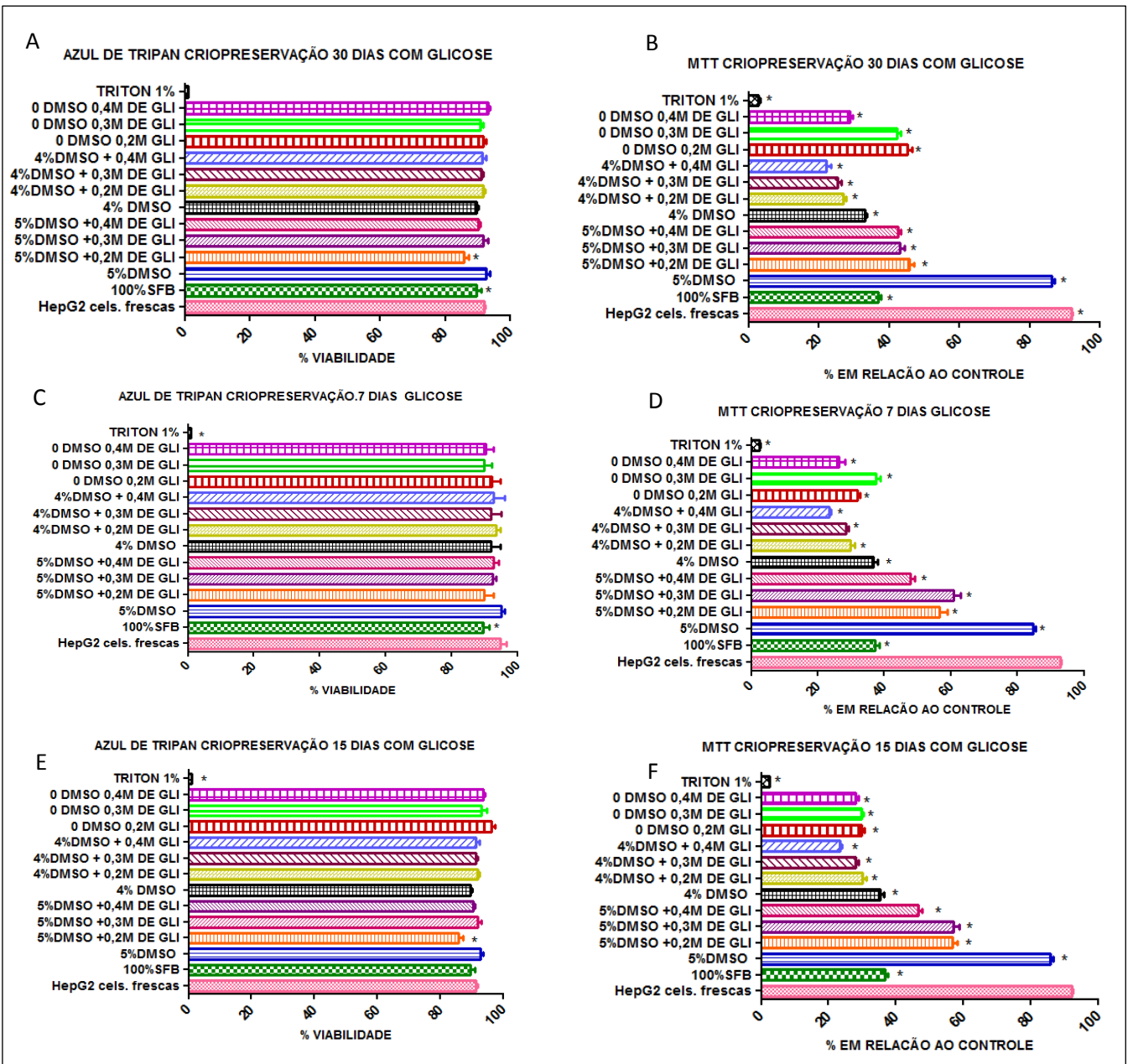


Figura 4.19. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan e MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com DMSO e Glicose durante 7, 15 ou 30 dias. Após o isolamento com colagenase, 1×10^6 células/mL foram criopreservadas em diferentes concentrações de glicose na presença ou ausência de DMSO. Após 7, 15 ou 30 dias de congelamento os criotubos foram descongelados a 37°C e a viabilidade foi analisada por exclusão do azul de tripan (A, C e E). Os dados foram comparados com o grupo controle, hepatócitos recém isolados (células frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. As figuras B, D e E representam os ensaios de MTT. Os dados foram comparados em função do grupo controle, linhagem HepG2 (células frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. Para os ensaios, o gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. $*p < 0,01$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

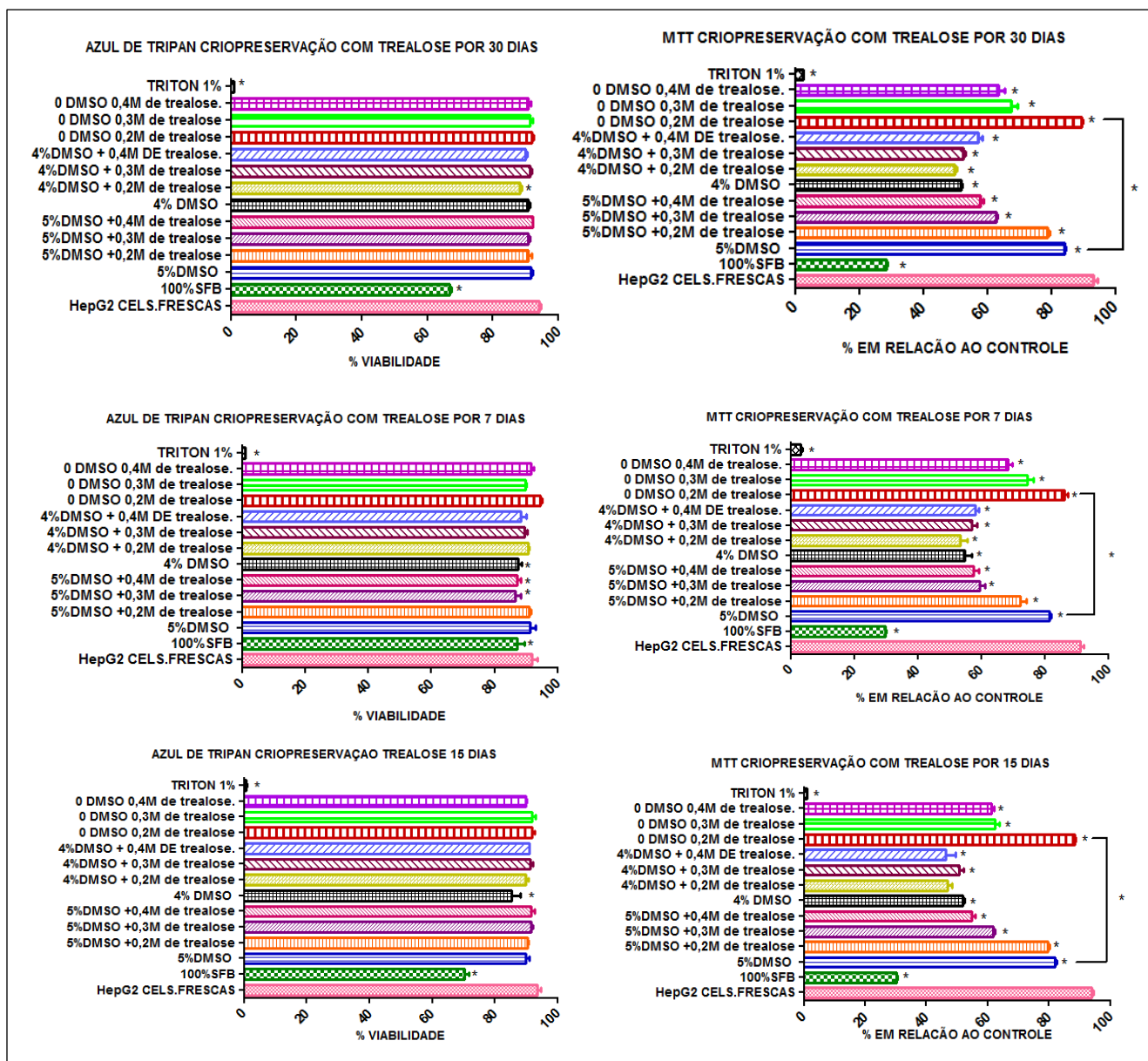


Figura 4.20. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan e MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com DMSO e Trealose durante 7, 15 ou 30 dias. Após o isolamento com colagenase, 1×10^6 células/mL foram criopreservadas em diferentes concentrações de trealose na presença ou ausência de DMSO. Após 7, 15 ou 30 dias de congelamento os criotubos foram descongelados a 37°C e a viabilidade foi analisada por exclusão do azul de tripan (A, C e E). Os dados foram comparados com o grupo controle, hepatócitos recém isolados (células frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. As figuras B, D e E representam os ensaios de MTT. Os dados foram comparados em função do grupo controle, linhagem HepG2 (células frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. Para os ensaios, o gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. $*p < 0,01$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

4.6. AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE HEPATÓCITOS DE RATO DURANTE 7 DIAS COM DIFERENTES CRIOPROTETORES NA PRESENÇA OU NA AUSÊNCIA DE DMSO – ISOLAMENTO COM *TRYPLE EXPRESS 1X*.

Foi avaliada a viabilidade de hepatócitos isolados por tryple express 1x por exclusão do azul de tripan e pelo método de MTT e para o grupo com potencial crioprotetor superior à 5% DMSO avaliamos a liberação de LDH no meio extracelular. O efeito do processo de criopreservação sobre as células hepáticas foi avaliado por um período de congelamento de 7 dias. Esse intervalo de tempo foi escolhido porque os experimentos anteriores com hepatócitos isolados com colagenase não apresentaram diferenças significativas entre os intervalos de tempo determinados. Para a solução de criopreservação, foram utilizadas soluções com 0,2 M; 0,3 M ou 0,4 M de sacarose, de glicose ou de trealose, na ausência ou na presença de 5% de DMSO. Além disso, avaliamos o potencial crioprotetor do glicerol. Entretanto, esse composto não apresenta toxicidade para as células e poderá ser uma opção de possíveis combinações entre as demais substâncias citadas. As figuras 4.21. a 4.26, correspondem aos resultados obtidos na criopreservação com com sacarose, com glicose e com trealose. Os resultados correspondem a 3 experimentos independentes em triplicata e para cada grupo foi feito um pool com 3 todos de células criopreservadas. Os dados de criopreservação demonstraram que hepatócitos de rato criopreservados com 0,2 M de trealose na ausência de DMSO, utilizando uma velocidade lenta e gradativa de congelamento, apresentaram um potencial crioprotetor superior a qualquer outra solução avaliada. Assim como observado nos hepatócitos isolados por colagenase. As amostras foram comparadas ao controle, hepatócitos recém isolados (células frescas). O glicerol não apresentou propriedades crioprotetoras superiores ao DMSO para hepatócitos de rato.

- Criopreservação com 0,2 M; 0,3 M e 0,4 M de Sacarose

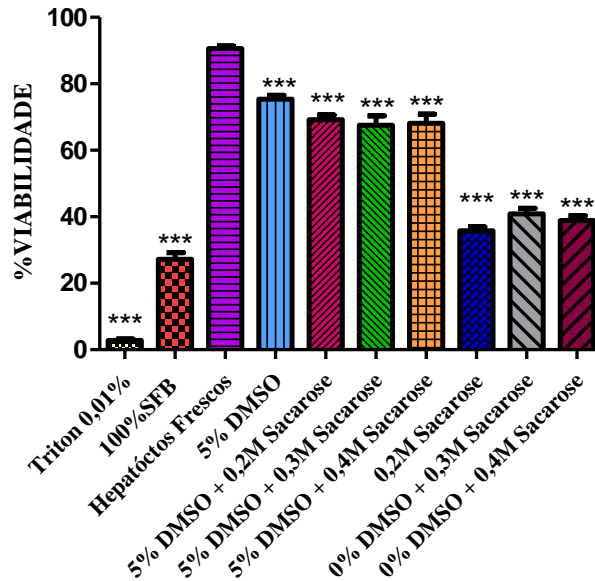


Figura 4.21. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e com Sacarose. Após o isolamento, 1×10^6 células/mL foram criopreservadas durante 7 dias em nitrogênio líquido em diferentes concentrações de sacarose na presença ou ausência de 5% de DMSO. Após o descongelamento, a viabilidade celular foi avaliada por exclusão do azul de tripan. Os dados foram comparados em função do grupo controle, hepatócitos recém isolados (células frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. $***p < 0,0001$ (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

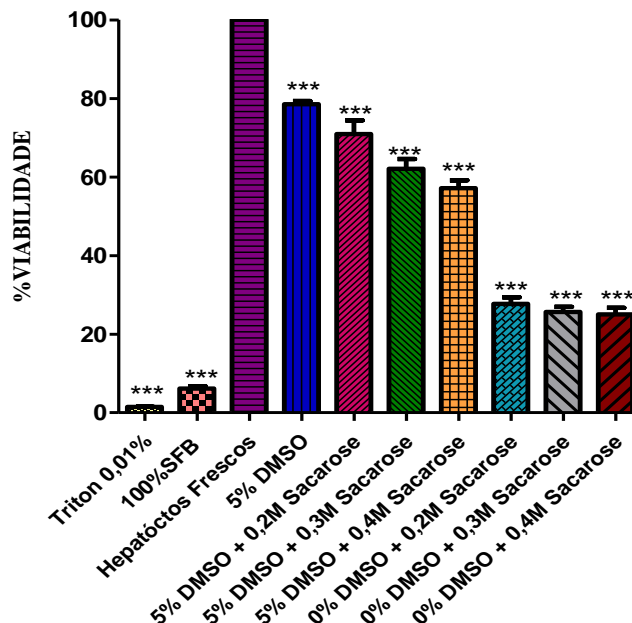


Figura 4.22. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e com Sacarose. Após o isolamento, 1×10^6 células/mL foram criopreservadas em diferentes concentrações de sacarose na presença ou ausência de 5% de DMSO. Após o descongelamento, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT. Os dados foram comparados normalizados e comparados como grupo controle, hepatócitos recém isolados (células

frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. $*p < 0,01$. $***p < 0,0001$. # $p > 0,05$ (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

Criopreservação com 0,2 M; 0,3 M e 0,4 M de Glicose

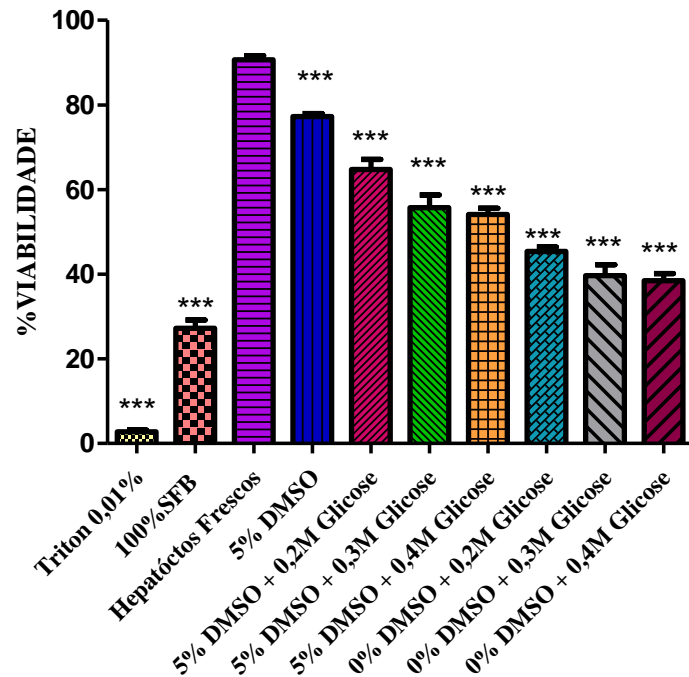


Figura 4.23. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan de hepatócitos de rato criopreservados com 5% DMSO e com glicose. Após o isolamento, 1×10^6 células/mL foram criopreservadas durante 7 dias em nitrogênio líquido em diferentes concentrações de glicose na presença ou ausência de 5% de DMSO. Após o descongelamento, a viabilidade celular foi avaliada por exclusão do azul de tripan. Os dados foram comparados em função do grupo controle, hepatócitos recém isolados (células frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. $***p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

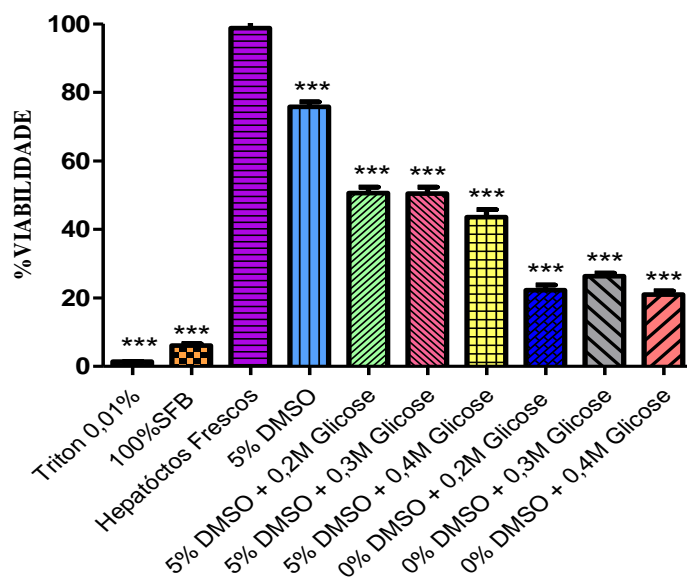


Figura 4.24. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT de Hepatóctos de rato criopreservados com 5%DMSO e com glicose. Após o isolamento, 1×10^6 células/mL foram criopreservadas em diferentes concentrações de glicose na presença ou ausência de 5% de DMSO. Após o descongelamento, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT. Os dados foram comparados normalizados e comparados como grupo controle, hepatócitos recém isolados (células frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

- **Criopreservação com 0,2 M; 0,3 M e 0,4 M de Trealose**

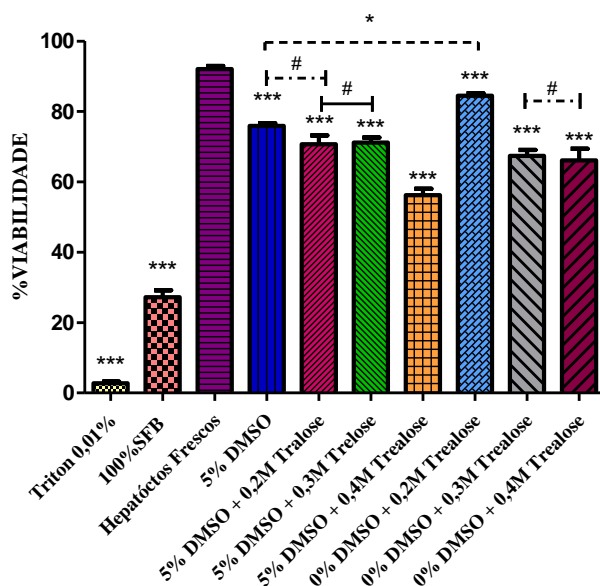


Figura 4.25. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan de Hepatóctos de rato criopreservados com 5%DMSO e trealose. Após 7 dias de congelamento os criotubos foram descongelados a 37°C e a viabilidade foi analisada por exclusão do azul de tripan. Os dados foram

comparados em função do grupo controle, hepatócitos recém isolados (células frescas) e expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. $*p < 0,01$. $***p < 0,0001$. Para os valores de # $p > 0,05$ não apresentam diferenças significativas (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

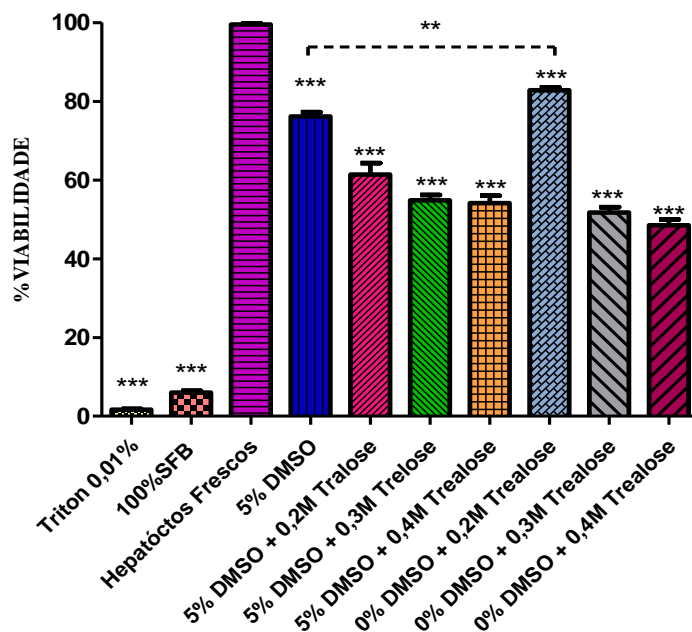


Figura 4.26. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e trealose. Após 7 dias de congelamento os criotubos foram descongelados a 37°C e a viabilidade analisada pelo ensaio de MTT. Os dados foram normalizados e comparados em relação ao grupo controle hepatócitos recém isolados (células frescas), e expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. $***p < 0,0001$. $**p < 0,001$ (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

• Criopreservação com Glicerol

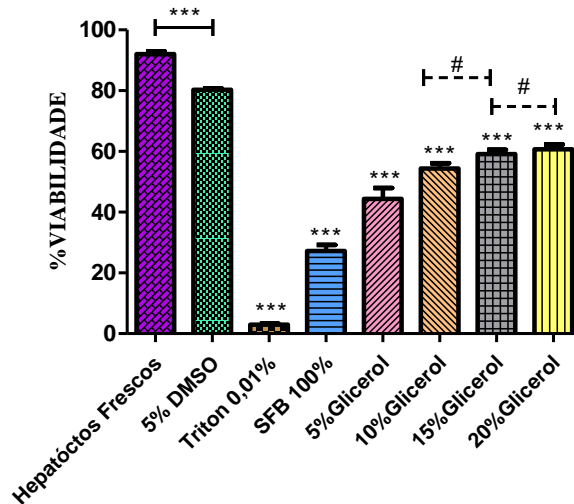


Figura 4.27. Análise da viabilidade por exclusão do azul de tripan de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO e glicerol. Após o isolamento, 1×10^6 células/mL foram criopreservadas em diferentes concentrações de glicerol. Após 7 dias de congelamento os criotubos foram descongelados a 37°C e a viabilidade foi analisada por exclusão do azul de tripan. Os dados foram comparados com grupo 5%DMSO, e expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. # $p > 0,05$ não apresentam diferenças significativas. *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

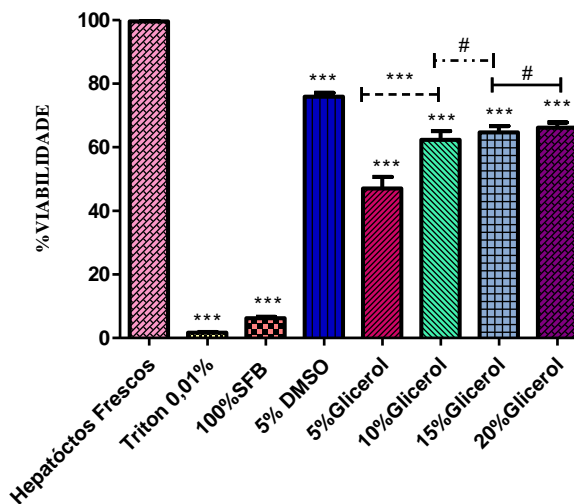


Figura 4.28. Análise da viabilidade pelo ensaio de MTT de Hepatócitos de rato criopreservados com 5%DMSO ou glicerol. Após o isolamento, 1×10^6 células/mL foram criopreservadas em diferentes concentrações de glicerol. Após 7 dias de congelamento os criotubos foram descongelados a 37°C e a viabilidade analisada pelo ensaio de MTT. Os dados foram normalizados e comparados em relação ao grupo controle hepatócitos recém isolados (células frescas), e expressos como porcentagem de viabilidade. Gráfico representativo de um pool de 3 criotubos de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas (média e desvio padrão). Valores $p < 0,05$ apresentam diferenças significativas. # $p > 0,05$ não apresentam diferenças significativas. *** $p < 0,0001$. (Estatística realizada pelo método One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

A IHA é uma síndrome clínica grave, complexa e com alta mortalidade. Essa mortalidade se mantém elevada principalmente devido à escassez de órgãos para o transplante ortotópico, a única medida terapêutica realizada com sucesso em casos de perda da função hepática (7, 16, 28). Dessa forma, é de suma importância investir no conhecimento e no aprimoramento de novas fontes alternativas ao tratamento de pacientes com doenças terminais do fígado, a fim de minimizar o número de pacientes que morrem nas listas de espera. O transplante hepatocitário pode ser uma alternativa substancial importância como tratamento a esses pacientes. Podendo atuar paralelamente ao transplante do órgão ou até mesmo levar a recuperação espontânea da lesão hepática (70). Entretanto, ainda há uma dificuldade no isolamento e estocagem de quantidade com qualidade dos hepatócitos obtidos de tecidos hepáticos. Sendo assim, a combinação da otimização de protocolos de isolamento e congelamento de células são etapas cruciais para o desenvolvimento dessa terapia em larga escala. A criação de bancos de células hepáticas permitirá a disponibilização de hepatócitos para o transplante celular de emergência ou programado. Contudo, essa prática dependerá principalmente do aprimoramentos dessas técnicas (72, 122).

Visando futuramente isolar hepatócitos humanos de fígados rejeitados para o transplante e conseqüentemente a criopreservação destas células para terapia celular em para modelos de IHA, este trabalho teve como objetivo principal a otimização do protocolo de isolamento de hepatócitos de ratos e do processo de criopreservação. Durante o isolamento de hepatócitos humanos, o estresse oxidativo e a morte celular iniciam logo após a ressecção hepática (151, 152). A condição clínica dos doadores, o grau de esteatose, os tempos de isquemia fria e quente afetam diretamente a qualidade dos hepatócitos (125, 135). Uma vez que os hepatócitos já apresentam uma queda na qualidade antes mesmo do isolamento celular, é de grande importância a caracterização prévia dos protocolos de isolamento e congelamento de células do fígado que possam garantir o mínimo de perda na viabilidade e na capacidade funcional destas células durante estes processos.

A técnica de isolamento de hepatócitos, que foi originalmente desenvolvida para isolar células de rato, começou em meados dos anos de 1960, quando Howard *et al.* 1967

isolaram hepatócitos de rato, utilizando uma combinação de técnica mecânica com digestão enzimática. Subsequentemente modificada por Berry e colaboradores em 1969 e Seglen *et al.* 1976 ficou estabelecida a técnica de perfusão com colagenase em duas etapas e que atualmente é amplamente utilizada com algumas modificações por diversos laboratórios do mundo. Esse procedimento foi modificado por vários laboratórios para o isolamento de hepatócitos a partir de várias espécies de animais, incluindo o ser humano. Alguns autores utilizam até três etapas com colagenase como mecanismo de dissociação enzimática (153-155). Contudo, a enzima colagenase, de origem bacteriana, atua como protease para dissociar o parênquima hepático em células individuais. Algumas dessas proteases podem causar uma reação enzimática indesejável afetando diretamente a qualidade e quantidade de células viáveis ou até mesmo serem citotóxicas (153, 156). Associado a isso, após a desagregação das células do parênquima hepático, os hepatócitos são obtidos por dissociação mecânica, nas filtrações e nas etapas de baixa centrifugação. Dessa forma, o estresse realizado durante o processo de isolamento poderia gerar uma perda transitória na integridade da membrana plasmática e diminuir a qualidade das células após o isolamento.

Este trabalho forneceu evidências que o isolamento de hepatócitos de rato com a enzima colagenase do tipo IV permitiu a captação do corante azul de tripan pelas células após o isolamento, dessa forma não foi possível mensurar a viabilidade celular por essa técnica. É sabido que os testes de viabilidade utilizando azul de tripan confiam na sua capacidade de serem excluídos a partir de células vivas, em um processo dependente de energia com gasto de ATP. As células mortas ou células necróticas que têm a integridade da membrana plasmática comprometida permitem a entrada do corante no citoplasma, adquirindo a cor azulada. A quantidade de células mortas ou células em processo de morte podem, então, ser contada manualmente, usando câmara de Neubauer e microscopia de imagem (157). De forma alternativa, o azul tripan pode ser solubilizado e a absorbância medida entre 580 e 610 nm (150).

Nossas imagens de microscopia apresentaram dois perfis de coloração para o corante azul de tripan em hepatócitos isolados com colagenase tipo IV: (1) células totalmente marcadas pelo corante, tanto o núcleo quanto o citoplasma, em que ambos captaram o corante na mesma intensidade de coloração azul o que nos impedindo de diferenciar os dois componentes celulares e (2) células com o núcleo e o citoplasma apresentando diferentes intensidades de coloração azul. Nesses casos, o núcleo apresentou uma forte marcação para o corante enquanto o citoplasma permaneceu fracamente marcado de azul. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que o azul de tripan é um ácido fraco e com

isso, apresenta afinidade aumentada por proteínas básicas. Dessa forma, a absorção pelo núcleo das células é geralmente maior, devido à presença de histonas, produzindo uma marcação azul de maior intensidade nesta organela, enquanto o citoplasma permanece levemente marcado (150, 157).

De acordo com o que foi descrito, poderíamos classificar hepatócitos isolados pelo método com colagenase tipo IV, como células mortas ou em processo de morte celular, uma vez que há captação do corante azul tripan e perda da capacidade de bombeá-lo para o meio externo. Entretanto, para comprovar se essas células estavam de fato inviáveis, utilizamos outras técnicas para verificar a viabilidade celular. Foram realizadas marcações com corantes vitais e ensaios adicionais de viabilidade como MTT e de liberação de LDH. A técnica de MTT é uma reação do tipo redox, em que células metabolicamente viáveis reduzem o sal tetrazólio em derivados de formazan. Parte dessa reação é realizada por enzimas desidrogenases da cadeia respiratória mitocondrial e a maior parte da redução do MTT ocorre em sítios extramitocondriais, envolvendo mecanismos dependentes de nucleotídeos de piridina NADH e NADPH (157, 158). Os ensaios de MTT apresentados indicaram que células marcadas com o azul de tripan apresentam capacidade de reduzir o sal tetrazólio em formazan. Embora, essa capacidade seja inferior àquela detectada em linhagem celular HepG2, os resultados normalizados e convertidos em porcentagem de viabilidade indicaram que essas células apresentam uma viabilidade de cerca de 80%. A técnica de MTT realizada para hepatócitos de rato isolados pode ser validada pelos experimentos realizados para linhagem celular HepG2 criopreservadas com diferentes concentrações de DMSO, ilustrados nas figuras 15 e 16. Os dados obtidos pelo ensaio de MTT corroboram àqueles encontrados para a técnica de exclusão do azul de tripan, o que nos permite sugerir e validar ambos ensaios para avaliar a viabilidade celular. Além disso, diversos trabalhos na literatura utilizam essa técnica como forma de avaliar a citotoxicidade, a proliferação e a viabilidade celular (157, 159, 160)

O ensaio de LDH é baseado na liberação da Lactato Desidrogenase, uma enzima citosólica, de células que tiveram sua membrana plasmática rompida após um dano celular. Os hepatócitos isolados pelo método com colagenase tipo IV, que apresentaram marcação positiva heterogênea para o corante azul de tripan, foram submetidos ao ensaio de LDH para verificar possíveis danos à membrana plasmática. Os resultados apresentados para este ensaio apresentaram uma liberação significativa de LDH apenas após 6 horas de incubação a 37°C e após 24 horas de incubação a 4°C, aproximadamente 66% e 43%, respectivamente. O método de exclusão do azul de tripan foi comparado com o ensaio de LDH, produzindo estimativas de sobrevivência semelhantes segundo trabalho publicado

por Uliasz e colaboradores (150). No trabalho citado, os autores determinaram a morte celular neuronal por exclusão do azul de tripan através da absorbância do corante por espectrofotometria a 590 nm. Quando comparado com o ensaio de lactato desidrogenase não apresentou diferenças estatísticas nos níveis de morte celular pela liberação de LDH em relação à marcação com o corante (150). De forma semelhante, a captação do corante azul de tripan e o ensaio de liberação de LDH foram avaliados em hepatócitos primários em suspensão e em monocamadas de cultura primária. Esses dados sugerem que o processo de contagem de células utilizando o corante azul de tripan foi menos sensível quando comparado ao ensaio de liberação de LDH. As células em suspensão não apresentaram valores correspondentes para os métodos aplicados. Porém, quando avaliados em células mantidas em cultura, esses valores foram semelhantes, indicando que o ensaio de LDH é uma alternativa menos subjetiva com relação ao procedimento de contagem de células e pode ser aplicável para células em suspensão ou aderentes (161).

Além disso, os hepatócitos foram marcados com corantes fluorescentes que nos permitiram afirmar que esta marcação positiva para o corante azul de tripan é inespecífica. Os hepatócitos isolados a partir da dissociação com colagenase foram submetidos à marcação com os corantes fluorescentes: (1) calceína-AM, que confere uma fluorescência verde às células viáveis; (2) calceína ácida que confere uma fluorescência verde às células que perderam a integridade de membrana e (3) iodeto de propídio, permeável apenas após a perda da integridade de membrana e confere ao núcleo das células uma fluorescência vermelha. Ao analisar as marcações desses hepatócitos, observamos que para todos os testes com os corantes fluorescentes as células estão viáveis e com integridade de membrana, visto que fluorescem na presença da calceína-AM. Entretanto, não são capazes de permitir a entrada dos demais corantes.

Alguns trabalhos abordam a vantagem ou a desvantagem no uso da técnica de azul de tripan quando comparada com outras técnicas vitais. P. Gain *et al* (2014) ao comparar a técnica de exclusão por azul de tripan com a técnica de túnel, demonstrou que a exclusão do azul de tripan é um método inviável para analisar viabilidade/morte de células de córnea humanas para enxerto. Em oposição a isso, Sandra Sanfilippo *et al* (2011) sugere que tanto a técnica por exclusão do azul de tripan quanto calceína/AM são metodologias aplicáveis na avaliação da viabilidade de folículos ovarianos humanos para transplante.

As desvantagens relacionadas ao método de contagem por exclusão do azul de tripan incluem as características subjetivas de todos os procedimentos de contagem visual de células como a necessidade do controle e padronização da concentração do corante, a manutenção do pH, a duração do tempo de coloração e erro amostral (150, 161). Além

disso, a possibilidade de falso positivo não pode ser descartada, pois proteínas extracelulares podem influenciar a leitura do ensaio. Jingru Hu *et al.*, 1994 avaliou a citotoxicidade de peptídeos β -amilóides em neurônios comparando os ensaios de LDH, de captação de fluoresceína e de azul de tripan. Nesse caso, foi observada uma mortalidade celular falsamente maior pelo ensaio de azul de tripan, interpretado como consequência do acúmulo de peptídeos β -amilóides nas membranas celulares o que facilitaria a retenção de azul de tripan (162). Contudo, ao que diz respeito à vantagem desse método podemos destacar a rapidez e praticidade, assim como pode ser usado em um laboratório simples e em hospitais com baixo custo.

Células isoladas com colagenase permitem a captação do azul de tripan no interior da célula e que por algum motivo, estas células perderam a capacidade de bombear o corante para o meio extracelular. Inicialmente levantamos a hipótese de que as condições de estresse às quais os hepatócitos são submetidos, poderiam estar induzindo a abertura de canais iônicos de alta condutância e aumentando a permeabilidade da membrana celular. É sabido que os canais iônicos P2XRs são modulados por diversos fatores e moléculas, como mudanças de pH, de temperatura, espécies de oxigênio reativo, monóxido de carbono, álcool, além das proteínas kinases, entre outros (163-165). Com isso, as condições a que essas células são submetidas durante as etapas de isolamento poderiam estar induzindo a abertura de um canal iônico específico e permitindo a passagem desse corante. O receptor P2X7, por exemplo, um membro da família P2X, seria um possível candidato a permitir a entrada do corante azul de tripan. Esse receptor, quando exposto a altas concentrações de ATP, abre um poro que permite a passagem de cátions e de ânions de alto peso molecular. Esses poros permitem que moléculas de até 900 Da passem pela membrana da célula, como os corantes fluorescentes Brometo de Etídio e *Lucifer Yellow* (166, 167). Porém, se o receptor P2X7 estivesse envolvido no processo de entrada do azul de tripan, deveríamos observar concomitantemente a entrada do corante Pi nas células, o que não foi observado nos experimentos de fluorescência.

A família de transportadores ABC representa a maior família de proteínas transmembranares e compreende 49 transportadores que estão subdivididos em sete subfamílias (168, 169). Os membros da família ABC apresentam um cassete de ligação ao ATP sendo chamadas de *ATP binding-cassete*, e geralmente usam a energia da hidrólise do ATP para o transporte de vários substratos, tais como aminoácidos, esteróides, proteínas, fosfolipídios e diferentes íons e ânions (170). Alguns desses transportadores também estão envolvidos no fenômeno de resistência a múltiplas drogas em células tumorais, por extrusão de drogas anticâncer, para fora da célula e resistência celular ao

estresse oxidativo (168-170). Transportadores ABC atuam tanto para transportar diferentes solutos para dentro da célula, como para transportar outros produtos para fora. Dessa forma, poderiam estar envolvidos no transporte do corante azul de tripan para dentro da célula ou no processo de exclusão do mesmo para o meio extracelular. Hossein Ardehali e colaboradores demonstraram que a diminuição da expressão de mRNA do transportador mABC1, um membro da família ABC envolvido da resistência ao estresse oxidativo, promove um aumento do número de células coradas pelo azul de tripan. Indicando que o baixo funcionamento do transportador resulta no aumento significativo de células marcadas com azul de tripan, em comparação às células com expressão normal para o transportador (170). Poderíamos então levantar a hipótese que hepatócitos de rato isolados com colagenase apresentam uma captação basal do corante azul de tripan e por alguma modificação na expressão ou na sequência dessas proteínas transportadoras estaria perdendo a capacidade de bombear o corante para fora da célula. Assim, apesar das células estarem positivas para o corante azul de tripan, elas permanecem viáveis, com capacidade metabólica e com integridade de membrana. Contudo, é preciso realizar experimentos que possam dar base para essa hipótese.

Com o objetivo de minimizar os possíveis danos às células durante o processo de isolamento de hepatócitos com colagenase, optamos por testar um outro reagente de dissociação enzimática. O reagente TrypLE™ Express 1X é uma enzima recombinante, utilizada para dissociar vários tipos de células aderentes de mamíferos (171, 172). É uma enzima alternativa à tripsina de origem animal, que promove a clivagem de ligações peptídicas na região C-terminal da lisina e da arginina, mas com uma maior especificidade do que preparações de tripsina de origem animal. Uma das razões para a substituição da tripsina de origem animal pela tripsina recombinante em aplicações farmacêuticas e na medicina alternativa por exemplo, é o fato de que proteínas derivadas de animais podem ser uma fonte de vírus de mamíferos (171, 173). Mesmo que haja uma etapa de inativação viral, para a maioria dos processos de purificação de biofármacos, alguns vírus de origem bovina ou suína podem ser resistentes ao protocolo de purificação. Além disso, algumas vacinas de vírus vivos não podem ser submetidas a um passo de inativação viral. A contaminação de duas vacinas pediátricas aprovadas contra o rotavírus, com sequências de DNA viral suíno, foi posteriormente atribuída à utilização de tripsina nos bancos de células usadas para a fabricação das vacinas. Uma vez que esse vírus suíno não é conhecido por ser infeccioso para os seres humanos, as vacinas permanecem no mercado (174).

As enzimas alternativas à tripsina de origem animal da linha TrypLE™ são produtos da Life Technologies. Esses produtos são baseados em um tipo de tripsina utilizando

enzima de *Fusarium oxysporum*, originalmente chamado rProtease (Gibco). Os fabricantes afirmam que as enzimas da linha TrypLE™ apresentam vantagens sobre a tripsina suína, como a estabilidade à temperatura ambiente e o fato de não ser necessário utilizar um inibidor de protease para extinguir a atividade do TrypLE, após dissociar a célula do substrato (Howard, 2014).

Essa outra metodologia de isolamento de hepatócitos de rato, utilizando o TrypLE™ Express 1X, nos permitiu isolar células do fígado com alta viabilidade, refringentes ao microscópio e negativas para o corante azul de tripan como demonstrado na figura 4.14. A marcação com corantes fluorescentes confirmou a integridade da membrana. Além disso, demonstramos valores de D.O para o ensaio de MTT superiores para as células isoladas com TrypLE™ Express 1X. Com base nos dados apresentados neste trabalho, sugerimos o reagente TrypLE™ Express 1X como enzima de dissociação para a obtenção de células viáveis em protocolos de isolamento de hepatócitos de rato.

Trabalhos sugerem a utilização de outra enzima recombinante substituinte da tripsina, a TrypZean™, fabricado pela empresa Sigma-Aldrich no processo de isolamento de células epiteliais multipotentes de membrana amniótica placentária e de células-tronco derivadas do estroma da medula óssea humana (175, 176). Carvalho *et al.*, 2011 recomendam adotar as enzimas TrypZean™ or TrypLE Express™ na obtenção de linhagens de células-tronco derivadas do estroma do tecido adiposo (173).

Além da otimização do processo de isolamento celular, a criopreservação é uma etapa crucial para o desenvolvimento de terapias com células vivas, uma vez que permite a preservação celular por tempo indeterminado e a disponibilidade de células suficientes para o transplante. Além disso, o desenvolvimento de técnicas eficazes de criopreservação para a criação de bancos de células hepáticas é fundamental para a aplicação e expansão desse procedimento terapêutico. Tendo em vista que o processo de congelamento leva à diminuição da viabilidade e da função celular é preciso melhorar os protocolos de criopreservação para que possam minimizar tais efeitos.

Vários protocolos de criopreservação de hepatócitos são atualmente descritos na literatura. Entretanto, ainda não há um consenso de um protocolo bem estabelecido (125, 126, 135, 177). Hepatócitos são muito sensíveis às lesões do processo de congelamento e descongelamento, suas função normalmente são prejudicadas ou perdidas durante a criopreservação (156).

Açúcares como sacarose e trealose têm sido utilizados como estratégias de criopreservação para diversos tipos celulares, como leveduras e células vegetais, visto que são capazes de interagir com a membrana plasmática minimizando os danos osmóticos e

físicos gerados durante o congelamento. Outro fator bastante importância no uso desses compostos associados à solução de criopreservação é o fato de estarem presentes em grandes concentrações em animais submetidos a temperaturas extremamente baixas, um fenômeno que ocorre de forma natural como estratégia de sobrevivência. Curiosamente, alguns indivíduos chegam a perder cerca de 99% de água e sobrevivem a longos períodos em estado de dissecação devido a sua capacidade de acumular osmolitos, principalmente trealose (142, 178). De forma semelhante às funções propostas da trealose no processo de anidrobiose em animais, a presença do açúcar durante o congelamento pode auxiliar na proteção das membranas e das proteínas, atuando na estabilidade das estruturas celulares ou até mesmo auxiliando no processo de vitrificação (179). Associado a isso, ao adicionar crioprotetores não-tóxicos, como os compostos descritos na tabela 1.7 ao meio de criopreservação, é possível reduzir a concentração de compostos tóxicos como o DMSO, que podem contribuir para a perda da viabilidade após o descongelamento (180).

Diversos mecanismos são responsáveis pelos danos a hepatócitos durante o processo de congelamento e de descongelamento, como o stress oxidativo, a lesão mecânica pela formação de cristais de gelo, a lesão osmótica e a ativação da caspase-3 com apoptose (181, 182). Para minimizar tais problemas, diversas alternativas têm sido propostas e estudadas. Tais estratégias envolvem a adição de dissacarídeos, de inibidores de caspases e de antioxidantes ao meio de criopreservação, visando diminuir os efeitos das crio-lesões (120, 135, 183, 184). Além disso, a adição e remoção destes ACP são processos complexos associados com o choque osmótico prejudicial para as células. Por isso a grande importância de desenvolver meios livres de ACP ou na presença CPAs não tóxicos para a criopreservação e armazenamento de vários tipo de células (180).

De forma semelhante ao que ocorre em hepatócitos, a principal causa para a perda da viabilidade com células-tronco embrionárias humanas após o congelamento lento é a apoptose induzida pelo processo de congelação-descongelação (185). Os autores descrevem que a apoptose é induzida por ativação tanto de caspase-8, através a via extrínseca, e caspase-9, através da via intrínseca, durante a criopreservação (185). Dados pré-clínicos também sugerem que a ativação de caspases durante os processos de congelamento e descongelamento podem induzir a apoptose e, conseqüentemente, contribuir para criolesão em enxertos para transplante (186). Portanto, o uso de inibidores de caspases em combinação com outros agentes crioprotetores não tóxicos, como a trealose podem atuar de forma protetora às células durante o armazenamento a longo prazo de células vivas, o que é crítico para o sucesso das estratégias de engenharia de tecidos (180, 186). A adição do dissacarídeo, trealose associado ao antioxidante (catalase) e inibidor de

caspace (ZVAD-fmk) em soluções de criopreservação de células tronco derivadas do fluido amniótico, reduzem a concentração padrão de 10% (v/v) de DMSO para 5% (v/v) ou 2,5% (v/v) (180).

Rodrigues *et al* (2008) sugere que a adição de dissacarídeos, como trealose à solução de criopreservação, possibilita a diminuição da concentração de DMSO para um volume final de 2,5% e de 5% com sacarose em células hematopoéticas. Hepatócitos humanos criopreservados em solução com 10% de DMSO associado à 0,2 M de trealose apresentaram um aumento na viabilidade em torno de 15% quando comparadas ao grupo controle sem trealose ($62,9 \pm 13$ vs $46,9 \pm 11\%$), respectivamente (187). Além disso, a trealose parece ter um efeito não somente protetor quando adicionado à solução de criopreservação, como também um efeito preventivo às criolesões. Stokich *et al.* demonstraram que células HepG2 quando submetidas a uma pré-incubação de 24 horas com 100 mM de trealose antes do congelamento em 10% de DMSO, apresenta um aumento de 400% na viabilidade celular após o descongelamento. Dessa forma, a trealose parece estar diretamente relacionada com a proteção de células submetidas ao congelamento em baixas temperaturas, auxiliando na manutenção da viabilidade e até mesmo na funcionalidade celular após o descongelamento. Assim como a trealose, outros açúcares parecem estar envolvidos nesse processo de proteção às lesões durante a criopreservação. Aghdai *et al.*, 2013 apresentou dados favoráveis quanto à utilização da frutose no meio de criopreservação de hepatócitos de rato e em linhagem HepG2. A justificativa para isso segundo o grupo, é que a frutose pode proteger as células contra a apoptose através da formação de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADPH) para reestabelecer os níveis de glutathione (GSH). Esse evento reduz a geração de espécies reativas de oxigênio refletindo diretamente na viabilidade das células (135). A incubação de hepatócitos de rato com glicose (100-300 mM), frutose (100-300 mM) ou ácido α -lipóico antes do congelamento melhora a viabilidade, a eficiência de fixação das células em cultura e a redução de LDH pós-descongelamento (188). A frutose também tem sido sugerida como possível aditivo à solução de digestão enzimática no processo de isolamento de hepatócitos como mecanismo preventivo às lesões geradas durante a obtenção das células. A adição desse substrato possibilitaria a recuperação de energia dos hepatócitos após o estresse por isquemia e reperfusão durante o isolamento das células a partir de amostras de tecidos (30, 188).

Esse trabalho avaliou o potencial crioprotetor de açúcares envolvidos no processo de anidrobiose em animais, como a sacarose, a glicose, a trealose e o glicerol. Entretanto, dentre as soluções de açúcares avaliadas, apenas a solução de trealose 0,2 M na ausência

de DMSO apresentou um potencial crioprotetor superior à solução de DMSO a 5%. Esse resultado merece destaque, visto que estudos com infusão de células tronco hematopoéticas criopreservadas em DMSO descrevem diversos efeitos associados a este crioprotetor, em pacientes submetidos ao transplante. Tais efeitos envolvem sedação, vômito, hipertensão, bradicardia, hemólise intravascular, choque anafilático e hiperosmolalidade. Descrevem ainda, que esses efeitos são mais evidentes em crianças, devido ao baixo peso corporal associado ao potencial tóxico dose dependente (119, 189). Com isso, a solução de 0,2 M de trealose na ausência do DMSO é um dado importante para a terapia celular com células hepáticas, frente aos efeitos colaterais já apresentados e a toxicidade do DMSO. Embora o tempo de criopreservação tenha sido curto (7 dias) demonstramos que esse feito se repete até 1 mês de criopreservação. Porém, pretendemos analisar tempos maiores de congelamento como, por exemplo, de 6 meses a 1 ano, visto que as amostras estão criopreservadas em nosso laboratório. As contribuições desse trabalho para a criopreservação de hepatócitos de rato podem ser observadas na tabela 5.1 e na figura 5.1.

Durante toda a apresentação deste trabalho ficou claro a grande necessidade de caracterizar e de desenvolver com qualidade todos os procedimentos envolvidos desde a obtenção de hepatócitos, sejam de rato, ou humanos, até o descongelamento das células. A criação de bancos de células bem estruturados está relacionada diretamente com o avanço de tecnologias e terapias utilizando células e tecidos. A disponibilização desses materiais em centrais de distribuição permitirá o desenvolvimento e o tratamento para diversas doenças que sejam relacionadas à perda da função hepática ou doenças degenerativas. Para que a aplicação dessas abordagens emergentes se torne possível na clínica é fundamental a manutenção da qualidade com quantidade desses materiais, para que possam atender a um número ilimitado de pacientes.

Tabela 5.1. Contribuição deste trabalho para a criopreservação de hepatócitos de rato.

| Hepatócitos | % Viabilidade Azul de tripan | MTT |
|--|---|-----------------|
| Recém isolados (Frescos) | 90,6±2,7% | 100% |
| Criopreservados em 5%DMSO | 75,9±2,% | 76,2±3 |
| Criopreservados com 0% de DMSO + 0,2M de Trealose | 84,5±1,9% | 82,8±2,1 |

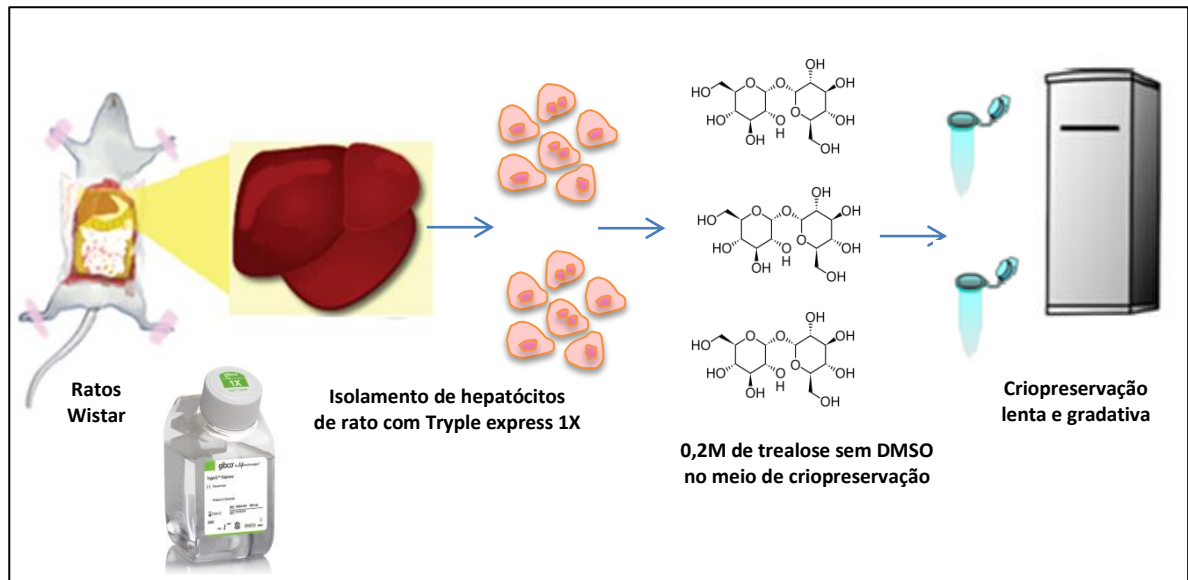


Figura 5.1. Resultados gerais de isolamento e criopreservação de hepatócitos de rato. Neste trabalho sugerimos a utilização de uma enzima alternativa à tripsina como agente de dissociação das células do parênquima hepático. O reagente Tryple Express 1X permitiu a obtenção de hepatócitos não marcados para o corante azul de tripan e apresentou dados favoráveis quanto à viabilidade analisada por outras técnicas. Após esse processo, ficou claro que a criopreservação celular com 0,2M de trealose atingiu um potencial crioprotetor superior às células criopreservadas na presença do ACP DMSO. Assim, sugerimos um novo protocolo de isolamento e de criopreservação de hepatócitos de rato para terapia celular.

Esse trabalho apresentou resultados positivos quanto ao processo de isolamento de hepatócitos de rato com uma enzima alternativa à colagenase, classicamente utilizada na dissociação do parênquima hepático. Ficou claro que a enzima colagenase promove um artefato durante o processo de isolamento que não nos permitiu avaliar a viabilidade por exclusão do azul de tripan. A explicação para tal evento ainda permanece em aberto. Para que possamos sugerir uma possível explicação, será necessário investigarmos experimentalmente algumas hipóteses. Entretanto, esse artefato que ocorreu com o azul de tripan não inviabiliza as células quanto ao metabolismo celular avaliado pelo ensaio de MTT e a integridade de membrana demonstrada pela detecção de LDH no meio extracelular. Neste trabalho sugerimos a utilização de uma enzima alternativa à tripsina como agente de dissociação das células do parênquima hepático. O reagente Tryple Express 1X permitiu a obtenção de hepatócitos não marcados para o corante azul de tripan e apresentou dados favoráveis quanto à viabilidade analisada por outras técnicas. Após esse processo, demonstramos que a presença de 0,2 M de tralose e a ausência do DMSO na solução de congelamento foi capaz de aumentar a viabilidade celular em aproximadamente 8%, quando comparada às células criopreservadas em 5% de DMSO. O resultado obtido é de grande importância para terapia celular, pois demonstramos que foi possível criopreservar hepatócitos de rato na ausência do DMSO, que pode ser tóxico. Embora, os dados tenham sido obtidos em células de rato, podemos analisar e testar futuramente esse protocolo para células humanas ou células de porcos transgênicos. A ausência do DMSO no meio de criopreservação é de grande importância em tratamentos com transplantes de células, permitindo a infusão de hepatócitos em pacientes com doenças do fígado sem expor tais indivíduos ao potencial tóxico e aos efeitos colaterais dessa substância. Assim, sugerimos um novo protocolo de isolamento e de criopreservação de hepatócitos de rato para estudos de terapia celular de doenças hepáticas, metabolismo de drogas e xenotransplantes.

Com isso, futuramente iremos realizar os protocolos de isolamento e criopreservação padronizados neste trabalho para amostras de tecidos humanos, visando avanços futuros na terapia celular para pacientes com doenças hepáticas.

1. Bhatia SN, Underhill GH, Zaret KS, Fox IJ. Cell and tissue engineering for liver disease. *Science translational medicine*. 2014;6(245):245sr2. Epub 2014/07/18.
2. Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, et al. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *Journal of hepatology*. 2006;45(1):144-59. Epub 2006/05/30.
3. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *The Surgical clinics of North America*. 2010;90(4):643-53. Epub 2010/07/20.
4. Treyer A, Musch A. Hepatocyte polarity. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(1):243-87. Epub 2013/05/31.
5. Jacobs F, Wisse E, De Geest B. The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer. *The American journal of pathology*. 2010;176(1):14-21. Epub 2009/12/02.
6. Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. Liver regeneration. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2014;163(4):352-62. Epub 2014/02/06.
7. Aleem Khan A, Parveen N, Habeeb MA, Habibullah CM. Journey from hepatocyte transplantation to hepatic stem cells: a novel treatment strategy for liver diseases. *The Indian journal of medical research*. 2006;123(5):601-14. Epub 2006/07/29.
8. Lee WM. Acute liver failure. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2012;33(1):36-45. Epub 2012/03/27.
9. Gill RQ, Sterling RK. Acute liver failure. *Journal of clinical gastroenterology*. 2001;33(3):191-8. Epub 2001/08/14.
10. Panackel C, Thomas R, Sebastian B, Mathai SK. Recent advances in management of acute liver failure. *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*. 2015;19(1):27-33. Epub 2015/01/28.
11. Keefe EB. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology*. 2001;120(3):749-62. Epub 2001/02/17.
12. Scott TR, Kronsten VT, Hughes RD, Shawcross DL. Pathophysiology of cerebral oedema in acute liver failure. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(48):9240-55. Epub 2014/01/11.
13. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet*. 2010;376(9736):190-201. Epub 2010/07/20.
14. Schiodt FV, Lee WM. Fulminant liver disease. *Clinics in liver disease*. 2003;7(2):331-49, vi. Epub 2003/07/26.
15. Polson J, Lee WM. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology*. 2005;41(5):1179-97. Epub 2005/04/21.
16. Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *The New England journal of medicine*. 2014;370(12):1170-1. Epub 2014/03/22.
17. Donovan JP, Schafer DF, Shaw BW, Jr., Sorrell MF. Cerebral oedema and increased intracranial pressure in chronic liver disease. *Lancet*. 1998;351(9104):719-21. Epub 1998/03/21.
18. Vaquero J, Chung C, Cahill ME, Blei AT. Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Seminars in liver disease*. 2003;23(3):259-69. Epub 2003/10/03.
19. Haussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *Journal of hepatology*. 2000;32(6):1035-8. Epub 2000/07/18.
20. Jalan R. Intracranial hypertension in acute liver failure: pathophysiological basis of rational management. *Seminars in liver disease*. 2003;23(3):271-82. Epub 2003/10/03.
21. Jalan R, Davies NA, Olde Damink SW. Hypothermia for the management of intracranial hypertension in acute liver failure. *Metabolic brain disease*. 2002;17(4):437-44. Epub 2003/02/27.

22. Detry O, Arkadopoulos N, Ting P, Kahaku E, Margulies J, Arnaout W, et al. Intracranial pressure during liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Transplantation*. 1999;67(5):767-70. Epub 1999/03/30.
23. Sass DA, Shakil AO. Fulminant hepatic failure. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2005;11(6):594-605. Epub 2005/05/26.
24. Lee WM. Etiologies of acute liver failure. *Seminars in liver disease*. 2008;28(2):142-52. Epub 2008/05/03.
25. Lopez PM, Martin P. Update on liver transplantation: indications, organ allocation, and long-term care. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. 2006;73(8):1056-66. Epub 2007/02/08.
26. Rai R. Liver transplantatation- an overview. *The Indian journal of surgery*. 2013;75(3):185-91. Epub 2014/01/16.
27. Dou K, Wang D, Tao K, Yue S, Ti Z, Song Z, et al. A modified heterotopic auxiliary living donor liver transplantation: report of a case. *Annals of hepatology*. 2014;13(3):399-403. Epub 2014/04/24.
28. Rubin A, Sanchez-Montes C, Aguilera V, Juan FS, Ferrer I, Moya A, et al. Long-term outcome of 'long-term liver transplant survivors'. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2013;26(7):740-50. Epub 2013/05/30.
29. Bernuau J, Goudeau A, Poynard T, Dubois F, Lesage G, Yvonnet B, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in fulminant hepatitis B. *Hepatology*. 1986;6(4):648-51. Epub 1986/07/01.
30. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz-Barriga M, Adani GL, Zambito AM, et al. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2003;9(5):506-12. Epub 2003/05/13.
31. Gramignoli R, Tahan V, Dorko K, Skvorak KJ, Hansel MC, Zhao W, et al. New potential cell source for hepatocyte transplantation: discarded livers from metabolic disease liver transplants. *Stem cell research*. 2013;11(1):563-73. Epub 2013/05/07.
32. Emre S. Living donor liver transplantation: a critical review. *Transplantation Proceedings*. 2001;33(7-8):3456-7.
33. Antonini TM, Lozeron P, Lacroix C, Mincheva Z, Durrbach A, Slama M, et al. Reversibility of acquired amyloid polyneuropathy after liver retransplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(10):2734-8. Epub 2013/08/07.
34. Florman S, Miller CM. Live donor liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(4):499-510. Epub 2006/03/24.
35. Rauchfuss F, Bauschke A, Barthel E, Scheuerlein H, Schule S, Malessa C, et al. [Living Donor Liver Transplantation - Past and Present.]. *Zentralblatt fur Chirurgie*. 2013. Epub 2013/07/05. *Lebertransplantation mit Lebendspende - Historie und Gegenwart*.
36. Brown RS, Jr. Live donors in liver transplantation. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1802-13. Epub 2008/05/13.
37. Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet*. 1989;2(8661):497. Epub 1989/08/26.
38. Lee SG. A Complete Treatment of Adult Living Donor Liver Transplantation: A Review of Surgical Technique and Current Challenges to Expand Indication of Patients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014. Epub 2014/11/02.
39. Belghiti J, Sommacale D, Dondero F, Zinzindohoue F, Sauvanet A, Durand F. Auxiliary liver transplantation for acute liver failure. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2004;6(2):83-7. Epub 2008/03/12.

40. O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*. 1989;97(2):439-45. Epub 1989/08/01.
41. Gubernatis G, Pichlmayr R, Kemnitz J, Gratz K. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation (APOLT) for fulminant hepatic failure: first successful case report. *World journal of surgery*. 1991;15(5):660-5; discussion 5-6. Epub 1991/09/01.
42. Moritz MJ, Jarrell BE, Armenti V, Radomski J, Carabasi RA, Zeitoun G, et al. Heterotopic liver transplantation for fulminant hepatic failure--a bridge to recovery. *Transplantation*. 1990;50(3):524-6. Epub 1990/09/01.
43. Boudjema K, Jaeck D, Simeoni U, Bientz J, Chenard MP, Brunot P. Temporary auxiliary liver transplantation for subacute liver failure in a child. *Lancet*. 1993;342(8874):778-9. Epub 1993/09/25.
44. Terpstra OT, Schalm SW, Weimar W, Willemse PJ, Baumgartner D, Groenland TH, et al. Auxiliary partial liver transplantation for end-stage chronic liver disease. *The New England journal of medicine*. 1988;319(23):1507-11. Epub 1988/12/08.
45. Absolon KB, Hagihara PF, Griffen WO, Jr., Lillehei RC. Experimental and clinical heterotopic liver homotransplantation. *Revue internationale d'hepatologie*. 1965;15(8):1481-90. Epub 1965/01/01.
46. van Hoek B, de Boer J, Boudjema K, Williams R, Corsmit O, Terpstra OT. Auxiliary versus orthotopic liver transplantation for acute liver failure. EURALT Study Group. European Auxiliary Liver Transplant Registry. *Journal of hepatology*. 1999;30(4):699-705. Epub 1999/04/20.
47. Jaeck D, Pessaux P, Wolf P. Which types of graft to use in patients with acute liver failure? (A) Auxiliary liver transplant (B) Living donor liver transplantation (C) The whole liver. (A) I prefer auxiliary liver transplant. *Journal of hepatology*. 2007;46(4):570-3. Epub 2007/02/23.
48. Rela M, Muiesan P, Vilca-Melendez H, Dhawan A, Baker A, Mieli-Vergani G, et al. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I. *Annals of surgery*. 1999;229(4):565-9. Epub 1999/04/15.
49. Onaca N, Sanchez EQ, Melton LB, Netto GJ, Glastad KA, Martin PA, et al. Cadaveric orthotopic auxiliary split liver transplantation and kidney transplantation: an alternative for type 1 primary hyperoxaluria. *Transplantation*. 2005;80(3):421-4. Epub 2005/08/06.
50. Morioka D, Kasahara M, Takada Y, Shirouzu Y, Taira K, Sakamoto S, et al. Current role of liver transplantation for the treatment of urea cycle disorders: a review of the worldwide English literature and 13 cases at Kyoto University. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2005;11(11):1332-42. Epub 2005/10/21.
51. Qiao J, Han C, Zhang J, Wang Z, Meng X. A new rat model of auxiliary partial heterotopic liver transplantation with liver dual arterial blood supply. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015;9(2):367-71. Epub 2015/01/13.
52. Emre S, Umman V. Split liver transplantation: an overview. *Transplantation proceedings*. 2011;43(3):884-7. Epub 2011/04/14.
53. Neshar E, Island E, Tryphonopoulos P, Moon J, Nishida S, Selvaggi G, et al. Split liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2011;43(5):1736-41. Epub 2011/06/23.
54. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Annals of internal medicine*. 2002;137(12):947-54. Epub 2002/12/18.
55. Pares A, Mas A. Extracorporeal liver support in severe alcoholic hepatitis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(25):8011-7. Epub 2014/07/11.
56. Yu Y, Fisher JE, Lillegard JB, Rodysill B, Amiot B, Nyberg SL. Cell therapies for liver diseases. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2012;18(1):9-21. Epub 2011/12/06.
57. Ichai P, Samuel D. Treatment of patients with hepatic failure: the difficult place of liver support systems. *Journal of hepatology*. 2004;41(4):694-5. Epub 2004/10/07.

58. Bonavita AG, Quaresma K, Cotta-de-Almeida V, Pinto MA, Saraiva RM, Alves LA. Hepatocyte xenotransplantation for treating liver disease. *Xenotransplantation*. 2010;17(3):181-7. Epub 2010/07/20.
59. Abouna GM, Boehmig HG, Serrou B, Amemiya H, Martineau G. Long-term hepatic support by intermittent multi-species liver perfusions. *Lancet*. 1970;2(7669):391-6. Epub 1970/08/22.
60. Baquerizo A, Mhoyan A, Kearns-Jonker M, Arnaout WS, Shackleton C, Busuttil RW, et al. Characterization of human xenoreactive antibodies in liver failure patients exposed to pig hepatocytes after bioartificial liver treatment: an ex vivo model of pig to human xenotransplantation. *Transplantation*. 1999;67(1):5-18. Epub 1999/01/28.
61. Denner J. Xenotransplantation and Hepatitis E virus. *Xenotransplantation*. 2015. Epub 2015/02/14.
62. Gerlach JC, Encke J, Hole O, Muller C, Ryan CJ, Neuhaus P. Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion. *Transplantation*. 1994;58(9):984-8. Epub 1994/11/15.
63. Uchino J, Tsuburaya T, Kumagai F, Hase T, Hamada T, Komai T, et al. A hybrid bioartificial liver composed of multiplated hepatocyte monolayers. *ASAIO transactions / American Society for Artificial Internal Organs*. 1988;34(4):972-7. Epub 1988/10/01.
64. Naruse K. Artificial liver support: future aspects. *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs*. 2005;8(2):71-6. Epub 2005/08/12.
65. Naruse K, Sakai Y, Guo L, Natori T, Shindoh J, Karasawa Y, et al. Development of a new extracorporeal whole-liver perfusion system. *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs*. 2003;6(3):211-7. Epub 2003/11/05.
66. Krisper P, Stauber RE. Technology insight: artificial extracorporeal liver support--how does Prometheus compare with MARS? *Nature clinical practice Nephrology*. 2007;3(5):267-76. Epub 2007/04/26.
67. Stange J, Mitzner SR, Klammt S, Freytag J, Peszynski P, Loock J, et al. Liver support by extracorporeal blood purification: a clinical observation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2000;6(5):603-13. Epub 2000/09/09.
68. Di Campli C, Zileri Dal Verme L, Andrisani MC, Armuzzi A, Candelli M, Gaspari R, et al. Advances in extracorporeal detoxification by MARS dialysis in patients with liver failure. *Current medicinal chemistry*. 2003;10(4):341-8. Epub 2003/02/07.
69. Vacanti JP, Kulig KM. Liver cell therapy and tissue engineering for transplantation. *Seminars in pediatric surgery*. 2014;23(3):150-5. Epub 2014/07/06.
70. Stephenne X, Najimi M, Sokal EM. Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? *World journal of gastroenterology*. 2010;16(1):1-14. Epub 2009/12/30.
71. Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, Fowler A, Cheley S, Bayley H, et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature biotechnology*. 2000;18(2):163-7. Epub 2000/02/05.
72. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2010;7(5):288-98. Epub 2010/04/07.
73. Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *Journal of internal medicine*. 2009;266(4):339-57. Epub 2009/09/22.
74. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *The New England journal of medicine*. 1998;338(20):1422-6. Epub 1998/05/15.
75. Darwish AA, Sokal E, Stephenne X, Najimi M, de Goyet Jde V, Reding R. Permanent access to the portal system for cellular transplantation using an implantable port device. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2004;10(9):1213-5. Epub 2004/09/07.
76. Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, Guariso G, Franchin E, Miotto D, et al. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell transplantation*. 2005;14(2-3):151-7. Epub 2005/05/11.

77. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *Journal of inherited metabolic disease*. 2006;29(2-3):431-5. Epub 2006/06/10.
78. Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W. Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2008;14(5):688-94. Epub 2008/04/25.
79. Lysy PA, Najimi M, Stephenne X, Bourgois A, Smets F, Sokal EM. Liver cell transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I: update and perspectives. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(22):3464-70. Epub 2008/06/21.
80. Lee KW, Lee JH, Shin SW, Kim SJ, Joh JW, Lee DH, et al. Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. *Cell transplantation*. 2007;16(6):629-37. Epub 2007/10/05.
81. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet*. 2002;359(9303):317-8. Epub 2002/02/07.
82. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ, 3rd, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nature medicine*. 1995;1(11):1148-54. Epub 1995/11/01.
83. Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS, Barranger JA, Towbin RB, Charron M, et al. Transplantation of human hepatocytes. *Transplantation proceedings*. 1997;29(4):2103-6. Epub 1997/06/01.
84. Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, et al. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics*. 2003;111(6 Pt 1):1262-7. Epub 2003/06/05.
85. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation*. 2004;78(12):1812-4. Epub 2004/12/23.
86. Stephenne X, Najimi M, Smets F, Reding R, de Ville de Goyet J, Sokal EM. Cryopreserved liver cell transplantation controls ornithine transcarbamylase deficient patient while awaiting liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(8):2058-61. Epub 2005/07/06.
87. Puppi J, Tan N, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Mieli-Vergani G, et al. Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation--a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(2):452-7. Epub 2008/01/24.
88. Meyburg J, Hoerster F, Weitz J, Hoffmann GF, Schmidt J. Use of the middle colic vein for liver cell transplantation in infants and small children. *Transplantation proceedings*. 2008;40(4):936-7. Epub 2008/06/17.
89. Meyburg J, Das AM, Hoerster F, Lindner M, Kriegbaum H, Engelmann G, et al. One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. *Transplantation*. 2009;87(5):636-41. Epub 2009/03/20.
90. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*. 1997;63(4):559-69. Epub 1997/02/27.
91. Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Seminars in liver disease*. 1999;19(1):39-48. Epub 1999/06/01.
92. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2000;6(1):32-40. Epub 2000/01/29.
93. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation*. 2006;82(4):441-9. Epub 2006/08/24.

94. Fisher RA, Bu D, Thompson M, Tisnado J, Prasad U, Sterling R, et al. Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion. *Transplantation*. 2000;69(2):303-7. Epub 2000/02/12.
95. Li YS, Harn HJ, Hsieh DK, Wen TC, Subeq YM, Sun LY, et al. Cells and materials for liver tissue engineering. *Cell transplantation*. 2013;22(4):685-700. Epub 2012/11/07.
96. Bonora-Centelles A, Donato MT, Lahoz A, Pareja E, Mir J, Castell JV, et al. Functional characterization of hepatocytes for cell transplantation: customized cell preparation for each receptor. *Cell transplantation*. 2010;19(1):21-8. Epub 2009/10/03.
97. Pietrosi G, Vizzini GB, Gruttadauria S, Gridelli B. Clinical applications of hepatocyte transplantation. *World journal of gastroenterology*. 2009;15(17):2074-7. Epub 2009/05/07.
98. Jorns C, Gramignoli R, Saliem M, Zemack H, Mork LM, Isaksson B, et al. Strategies for short-term storage of hepatocytes for repeated clinical infusions. *Cell transplantation*. 2014;23(8):1009-18. Epub 2014/09/10.
99. Lloyd TD, Orr S, Berry DP, Dennison AR. Development of a protocol for cryopreservation of hepatocytes for use in bioartificial liver systems. *Ann Clin Lab Sci*. 2004;34(2):165-74. Epub 2004/07/02.
100. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2015;1257:3-19. Epub 2014/11/28.
101. Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology*. 2004;48(2):157-78. Epub 2004/04/20.
102. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 2004;48(2):146-56. Epub 2004/04/20.
103. Asghar W, El Assal R, Shafiee H, Anchan RM, Demirci U. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnology journal*. 2014;9(7):895-903. Epub 2014/07/06.
104. Tao T, Del Valle A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2008;25(7):287-96. Epub 2008/08/02.
105. Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2010;3(4):248-69. Epub 2010/11/13.
106. Heng BC, Kuleshova LL, Bested SM, Liu H, Cao T. The cryopreservation of human embryonic stem cells. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2005;41(Pt 2):97-104. Epub 2004/12/14.
107. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996;17(3):243-56. Epub 1996/02/01.
108. Lovelock JE. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *The Biochemical journal*. 1954;56(2):265-70. Epub 1954/02/01.
109. Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology*. 1971;8(5):489-500. Epub 1971/10/01.
110. Meryman HT. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature*. 1968;218(5139):333-6. Epub 1968/04/27.
111. Pegg DE. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*. 2010;60(3 Suppl):S36-44. Epub 2010/02/18.
112. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*. 2007;47(5):935-45. Epub 2007/05/01.
113. Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *The Journal of general physiology*. 1963;47:347-69. Epub 1963/11/01.
114. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006;65(1):236-44. Epub 2005/11/18.
115. Szell A, Shelton JN. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *Journal of reproduction and fertility*. 1986;78(2):699-703. Epub 1986/11/01.

116. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*. 1970;168(3934):939-49. Epub 1970/05/22.
117. Vincent C, Johnson MH. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxford reviews of reproductive biology*. 1992;14:73-100. Epub 1992/01/01.
118. Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. *Nature*. 1959;183(4672):1394-5. Epub 1959/05/16.
119. Motta JP, Gomes BE, Bouzas LF, Paraguassu-Braga FH, Porto LC. Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology*. 2010;60(3):301-7. Epub 2010/02/16.
120. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009;5(3):90-6. Epub 2010/01/05.
121. Sauer-Heilborn A, Kadidlo D, McCullough J. Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. *Transfusion*. 2004;44(6):907-16. Epub 2004/05/26.
122. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology*. 2006;53(2):149-59. Epub 2006/06/24.
123. Chesne C, Guyomard C, Fautrel A, Poullain MG, Fremond B, De Jong H, et al. Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology*. 1993;18(2):406-14. Epub 1993/08/01.
124. Matsushita T, Yagi T, Hardin JA, Cragun JD, Crow FW, Bergen HR, 3rd, et al. Apoptotic cell death and function of cryopreserved porcine hepatocytes in a bioartificial liver. *Cell transplantation*. 2003;12(2):109-21. Epub 2003/06/12.
125. Adams RM, Wang M, Crane AM, Brown B, Darlington GJ, Ledley FD. Effective cryopreservation and long-term storage of primary human hepatocytes with recovery of viability, differentiation, and replicative potential. *Cell transplantation*. 1995;4(6):579-86. Epub 1995/11/01.
126. Alexandre E, Viollon-Abadie C, David P, Gandillet A, Coassolo P, Heyd B, et al. Cryopreservation of adult human hepatocytes obtained from resected liver biopsies. *Cryobiology*. 2002;44(2):103-13. Epub 2002/08/02.
127. Diener B, Traiser M, Arand M, Leissner J, Witsch U, Hohenfellner R, et al. Xenobiotic metabolizing enzyme activities in isolated and cryopreserved human liver parenchymal cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 1994;8(6):1161-6. Epub 1994/12/01.
128. Naik S, Santangini HA, Trenkler DM, Mullon CJ, Solomon BA, Pan J, et al. Functional recovery of porcine hepatocytes after hypothermic or cryogenic preservation for liver support systems. *Cell transplantation*. 1997;6(5):447-54. Epub 1997/10/23.
129. Rialland L, Guyomard C, Scotte M, Chesne C, Guillouzo A. Viability and drug metabolism capacity of alginate-entrapped hepatocytes after cryopreservation. *Cell biology and toxicology*. 2000;16(2):105-16. Epub 2000/08/05.
130. Coundouris JA, Grant MH, Engeset J, Petrie JC, Hawksworth GM. Cryopreservation of human adult hepatocytes for use in drug metabolism and toxicity studies. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 1993;23(12):1399-409. Epub 1993/12/01.
131. Diener B, Utesch D, Beer N, Durk H, Oesch F. A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics. *Cryobiology*. 1993;30(2):116-27. Epub 1993/04/01.
132. Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M, et al. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug metabolism reviews*. 2000;32(1):81-118. Epub 2000/03/11.
133. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz M, Adani GL, Lorenzin D, et al. Cryopreserved human hepatocytes from cell bank: in vitro function and clinical application. *Transplantation proceedings*. 2005;37(1):256-9. Epub 2005/04/06.
134. Terry C, Mitry RR, Lehec SC, Muiesan P, Rela M, Heaton ND, et al. The effects of cryopreservation on human hepatocytes obtained from different sources of liver tissue. *Cell transplantation*. 2005;14(8):585-94. Epub 2005/12/17.

135. Aghdai MH, Jamshidzadeh A, Nematizadeh M, Behzadiannia M, Niknahad H, Amirghofran Z, et al. Evaluating the Effects of Dithiothreitol and Fructose on Cell Viability and Function of Cryopreserved Primary Rat Hepatocytes and HepG2 Cell Line. *Hepatitis monthly*. 2013;13(1):e7824. Epub 2013/04/16.
136. Brockbank KG, Campbell LH, Greene ED, Brockbank MC, Duman JG. Lessons from nature for preservation of mammalian cells, tissues, and organs. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2011;47(3):210-7. Epub 2010/12/31.
137. Sullivan KJ, Storey KB. Environmental stress responsive expression of the gene *li16* in *Rana sylvatica*, the freeze tolerant wood frog. *Cryobiology*. 2012;64(3):192-200. Epub 2012/02/04.
138. Kristiansen E, Zachariassen KE. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiology*. 2005;51(3):262-80. Epub 2005/09/06.
139. Sinclair BJ, Renault D. Intracellular ice formation in insects: unresolved after 50 years? *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology*. 2010;155(1):14-8. Epub 2009/11/03.
140. Storey KB, Storey JM. Natural freeze tolerance in ectothermic vertebrates. *Annual review of physiology*. 1992;54:619-37. Epub 1992/01/01.
141. Storey KB, Mosser DD, Douglas DN, Grundy JE, Storey JM. Biochemistry below 0 degrees C: nature's frozen vertebrates. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1996;29(3):283-307. Epub 1996/03/01.
142. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. Anhydrobiosis. *Annual review of physiology*. 1992;54:579-99. Epub 1992/01/01.
143. Duman JG. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual review of physiology*. 2001;63:327-57. Epub 2001/02/22.
144. Duman JG, Serianni AS. The role of endogenous antifreeze protein enhancers in the hemolymph thermal hysteresis activity of the beetle *Dendroides canadensis*. *Journal of insect physiology*. 2002;48(1):103-11. Epub 2003/05/29.
145. DeVries AL. Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. *Science*. 1971;172(3988):1152-5. Epub 1971/06/11.
146. Garner J, Harding MM. Design and synthesis of antifreeze glycoproteins and mimics. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2010;11(18):2489-98. Epub 2010/11/26.
147. Jia Z, Davies PL. Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction. *Trends in biochemical sciences*. 2002;27(2):101-6. Epub 2002/02/20.
148. Capicciotti CJ, Poisson JS, Boddy CN, Ben RN. Modulation of antifreeze activity and the effect upon post-thaw HepG2 cell viability after cryopreservation. *Cryobiology*. 2015. Epub 2015/01/18.
149. Stephenne X, Najimi M, Ngoc DK, Smets F, Hue L, Guigas B, et al. Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex 1. *Cell transplantation*. 2007;16(4):409-19. Epub 2007/07/31.
150. Uliasz TF, Hewett SJ. A microtiter trypan blue absorbance assay for the quantitative determination of excitotoxic neuronal injury in cell culture. *Journal of neuroscience methods*. 2000;100(1-2):157-63. Epub 2000/10/21.
151. Fu T, Guo D, Huang X, O'Gorman MR, Huang L, Crawford SE, et al. Apoptosis occurs in isolated and banked primary mouse hepatocytes. *Cell transplantation*. 2001;10(1):59-66. Epub 2001/04/11.
152. Garcea G, Gescher A, Steward W, Dennison A, Berry D. Oxidative stress in humans following the Pringle manoeuvre. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2006;5(2):210-4. Epub 2006/05/16.
153. Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A. Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Seminars in cell & developmental biology*. 2002;13(6):463-7. Epub 2002/12/07.
154. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in cell biology*. 1976;13:29-83. Epub 1976/01/01.

155. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *The Journal of cell biology*. 1969;43(3):506-20. Epub 1969/12/01.
156. Li AP. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chemico-biological interactions*. 2007;168(1):16-29. Epub 2007/02/03.
157. Bunel V, Ouedraogo M, Nguyen AT, Stevigny C, Duez P. Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths, and limits. *Planta medica*. 2014;80(14):1210-26. Epub 2014/01/17.
158. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1993;303(2):474-82. Epub 1993/06/01.
159. Abe K, Saito H. Amyloid beta protein inhibits cellular MTT reduction not by suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase but by acceleration of MTT formazan exocytosis in cultured rat cortical astrocytes. *Neuroscience research*. 1998;31(4):295-305. Epub 1998/11/11.
160. Takahashi S, Abe T, Gotoh J, Fukuuchi Y. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochemistry international*. 2002;40(5):441-8. Epub 2002/02/01.
161. Jauregui HO, Hayner NT, Driscoll JL, Williams-Holland R, Lipsky MH, Galletti PM. Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes--freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In vitro*. 1981;17(12):1100-10. Epub 1981/12/01.
162. Hu J, el-Fakahany EE. An artifact associated with using trypan blue exclusion to measure effects of amyloid beta on neuron viability. *Life sciences*. 1994;55(13):1009-16. Epub 1994/01/01.
163. Coddou C, Codocedo JF, Li S, Lillo JG, Acuna-Castillo C, Bull P, et al. Reactive oxygen species potentiate the P2X2 receptor activity through intracellular Cys430. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(39):12284-91. Epub 2009/10/02.
164. Crews FT, Morrow AL, Criswell H, Breese G. Effects of ethanol on ion channels. *International review of neurobiology*. 1996;39:283-367. Epub 1996/01/01.
165. Light AR, Huguen RW, Zhang J, Rainier J, Liu Z, Lee J. Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, ATP, and lactate mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *Journal of neurophysiology*. 2008;100(3):1184-201. Epub 2008/05/30.
166. Faria RX, Defarias FP, Alves LA. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *American journal of physiology Cell physiology*. 2005;288(2):C260-71. Epub 2004/10/08.
167. Coutinho-Silva R, Persechini PM. P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *The American journal of physiology*. 1997;273(6 Pt 1):C1793-800. Epub 1998/01/22.
168. Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen ZS. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese journal of cancer*. 2012;31(2):58-72. Epub 2011/11/22.
169. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome research*. 2001;11(7):1156-66. Epub 2001/07/04.
170. Ardehali H, O'Rourke B, Marban E. Cardioprotective role of the mitochondrial ATP-binding cassette protein 1. *Circulation research*. 2005;97(8):740-2. Epub 2005/09/17.
171. Manira M, Khairul Anuar K, Seet WT, Ahmad Irfan AW, Ng MH, Chua KH, et al. Comparison of the effects between animal-derived trypsin and recombinant trypsin on human skin cells proliferation, gene and protein expression. *Cell and tissue banking*. 2014;15(1):41-9. Epub 2013/03/05.
172. Merten OW. Virus contaminations of cell cultures - A biotechnological view. *Cytotechnology*. 2002;39(2):91-116. Epub 2008/11/13.

173. Carvalho PP, Wu X, Yu G, Dietrich M, Dias IR, Gomes ME, et al. Use of animal protein-free products for passaging adherent human adipose-derived stromal/stem cells. *Cytotherapy*. 2011;13(5):594-7. Epub 2011/01/05.
174. McClenahan SD, Krause PR, Uhlenhaut C. Molecular and infectivity studies of porcine circovirus in vaccines. *Vaccine*. 2011;29(29-30):4745-53. Epub 2011/05/17.
175. Murphy S, Rosli S, Acharya R, Mathias L, Lim R, Wallace E, et al. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Current protocols in stem cell biology*. 2010;Chapter 1:Unit 1E 6. Epub 2010/04/08.
176. Fekete N, Gadelorge M, Furst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy*. 2012;14(5):540-54. Epub 2012/02/03.
177. Loretz LJ, Li AP, Flye MW, Wilson AG. Optimization of cryopreservation procedures for rat and human hepatocytes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 1989;19(5):489-98. Epub 1989/05/01.
178. Crowe LM, Crowe JH. Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Adv Space Res*. 1992;12(4):239-47. Epub 1992/01/01.
179. Stokich B, Osgood Q, Grimm D, Moorthy S, Chakraborty N, Menze MA. Cryopreservation of hepatocyte (HepG2) cell monolayers: impact of trehalose. *Cryobiology*. 2014;69(2):281-90. Epub 2014/08/17.
180. Seo JM, Sohn MY, Suh JS, Atala A, Yoo JJ, Shon YH. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology*. 2011;62(3):167-73. Epub 2011/02/22.
181. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *Journal of hepatology*. 2000;32(3):508-15. Epub 2000/03/29.
182. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(1):155-68. Epub 1999/01/05.
183. Fujita R, Hui T, Chelly M, Demetriou AA. The effect of antioxidants and a caspase inhibitor on cryopreserved rat hepatocytes. *Cell transplantation*. 2005;14(6):391-6. Epub 2005/09/27.
184. Baust JM, Van B, Baust JG. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2000;36(4):262-70. Epub 2000/06/14.
185. Yagi T, Hardin JA, Valenzuela YM, Miyoshi H, Gores GJ, Nyberg SL. Caspase inhibition reduces apoptotic death of cryopreserved porcine hepatocytes. *Hepatology*. 2001;33(6):1432-40. Epub 2001/06/08.
186. Wyns C, Van Langendonck A, Wese FX, Donnez J, Curaba M. Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue. *Hum Reprod*. 2008;23(11):2402-14. Epub 2008/07/31.
187. Katenz E, Vondran FW, Schwartlander R, Pless G, Gong X, Cheng X, et al. Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2007;13(1):38-45. Epub 2006/12/13.
188. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Lehec SC, Hughes RD. Preincubation of rat and human hepatocytes with cytoprotectants prior to cryopreservation can improve viability and function upon thawing. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(1):165-77. Epub 2005/12/31.

189. Rodrigues JP, Paraguassu-Braga FH, Carvalho L, Abdelhay E, Bouzas LF, Porto LC. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology*. 2008;56(2):144-51. Epub 2008/03/04.