

FRANCISCO FILIPAK NETO

**Cultivo primário de células hepáticas de traíra -
Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) - empregando
método não enzimático de isolamento.**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio II em Biologia Celular, do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para alcançar o grau de bacharel.

Orientadores: Prof^o. Ms. Marco A. F. Randi e Prof^o. Dr. Ciro A. de O. Ribeiro.

Curitiba
2003

AGRADECIMENTOS

Aos seguintes professores-pesquisadores, que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, sejam pela atenção e tempo ou materiais gentilmente cedidos, sejam pelas idéias e sugestões ou ensinamentos compartilhados, ofereço meu sincero agradecimento.

Prof^a. Dr^a. Célia Regina C. Franco

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (orientador)

Prof^a. Dr^a. Dorly de Freitas Buchi

Prof^o. Ms. Marco Antônio Ferreira Randi (orientador)

Prof^o. Rogério Gargioni

Prof^o. Dr. Sílvio Sanches Veiga

Prof^o. Dr. Sílvio Marques Zanata

Agradeço também às sugestões da prof^a. Dr^a. Célia Regina C. Franco e do prof^o. Dr. Sílvio Marques Zanata, pesquisadores que prontamente aceitaram fazer parte da banca avaliadora desta monografia. Acredito sinceramente que seus ensinamentos contribuirão muito para o meu crescimento crítico-profissional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 O órgão hepático.....	01
1.2 Isolamento de hepatócitos de peixe.....	03
1.3 Cultivo primário de hepatócitos de teleósteos em monocamada.....	09
1.4 Cultivo primário de hepatócitos: a influência do meio e do microambiente celular.....	13
1.4.1 Fatores do meio de cultivo.....	13
1.4.2 Componentes da matriz extracelular.....	15
1.4.3 Interações célula-célula.....	16
1.5 Uso de cultivo de hepatócitos para pesquisa fármaco-toxicológica e fisiológico-bioquímica: um vasto campo de investigação científica.....	18
1.5.1 Estudos fisiológicos e bioquímicos.....	20
1.5.2 Estudos de toxicidade e de biotransformação de xenobiontes.....	22
1.5.3 Estudos de genotoxicidade.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Coleta dos exemplares de traíra utilizados.....	28
4.2 Preparo do meio de cultivo e soluções para perfusão.....	28
4.3 Isolamento das células.....	30
4.4 Manutenção das células.....	31
4.5 Adesão das células em substrato.....	32
4.6 Teste de viabilidade celular e morfologia das células (por microscopia de luz).....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1 Perfusão do fígado.....	34
5.2 Teste de viabilidade celular.....	34
5.3 Variação do pH do meio durante o período de cultivo.....	34
5.4 pH das soluções utilizadas nos experimentos após esterilização e armazenamento.....	35
5.5 Adesão dos hepatócitos.....	35
5.6 Morfologia das células.....	36
FIGURA 1 e 2.....	38
FIGURA 3.....	39
FIGURA 4.....	40
6. DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

RESUMO

Nos últimos anos vêm crescendo o número de trabalhos científicos que discutem a importância de ensaios *in vitro* para o estudo de vários processos metabólicos da célula e dos mecanismos de toxicidade envolvendo a presença de contaminantes. Destes, são vários os resultados que apontam o uso de cultivo primário de células altamente funcionais, como os hepatócitos, como uma ferramenta promissora na identificação e caracterização do efeito de agentes tóxicos. Para mamíferos, e mais especificamente, seres humanos, técnicas de isolamento e cultivo já estão bem estabelecidas, assim como já existem linhagens celulares de hepatócitos. Contudo, para peixes, especialmente de ecossistemas tropicais brasileiros, não existem dados relacionados com o estabelecimento de linhagens ou do uso de cultivo primário de células de espécies nativas para a investigação dos processos supracitados, fazendo com que a iniciativa deste trabalho ganhe relevância e ineditismo. No presente estudo, hepatócitos de traíra (*Hoplias malabaricus*), uma espécie nativa, foram isolados por perfusão não enzimática e cultivados pelo período de seis dias. Testaram-se diferentes metodologias para o isolamento dessas células e optou-se pelas que se mostraram mais apropriadas, por questões logísticas, e para a espécie “traíra”. Estimou-se, após o isolamento, o número de hepatócitos pelo método hemocitométrico e a viabilidade celular dos mesmos pelo método de exclusão de azul de tripan. As células foram cultivadas em meio DMEM (pH 7,85 e 291 mOsm) em duas temperaturas distintas, 25°C e 37°C, somente sobre lamínulas, lamínulas cobertas com poli-L-lisina ou sobre *coat* de proteínas da matriz extracelular. O cultivo foi acompanhado com o uso de microscópio de contraste de fase, e em intervalos de 24h, as células foram fixadas em Bouin e coradas com Giemsa para avaliar aspectos morfológicos. Cerca de $3,0 \times 10^7 - 10^8$ células/100g de massa de peixe foram obtidas, com viabilidade média de 73%. Os hepatócitos de traíra apresentaram relativa dificuldade para aderir quando na ausência das proteínas de matriz. As análises morfológicas realizadas evidenciaram que as células não sofreram alterações visíveis no decorrer do período de cultivo e mantiveram a capacidade de organização tecidual. Porém, análises para determinação das alterações metabólicas e do conteúdo enzimático não foram realizadas, devido às dificuldades para padronização da cultura primária dos hepatócitos. Este trabalho é o início de um projeto mais amplo, que na sua continuidade, deverá investigar a possibilidade de manter estas células vivas, funcionais e diferenciadas por um período de tempo maior e seu emprego para estudos de efeitos e de mecanismos de toxicidade relativa a contaminantes de origem antrópica.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O órgão hepático

O fígado é um órgão de fundamental importância na manutenção da homeostase¹ interna dos vertebrados, sendo o sítio bem como o alvo de processos complementares que mantêm as funções hepáticas em harmonia com os requerimentos metabólicos de todo o organismo (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Este órgão participa na adaptação² do organismo às alterações de condições ambientais pelo contínuo reajuste das funções hepatocelulares, como a captação de nutrientes e seu subsequente metabolismo, estoque e distribuição para o sangue, produção de bile, bem como transformação de compostos exógenos e endógenos (GUILLOUZO *et al.*, 1990). O metabolismo de nutrientes; estoque de energia em macromoléculas (glicogênio, lipídeos); síntese e secreção de proteínas (por ex. albumina, vitelogenina, lipoproteínas); manutenção dos níveis plasmáticos de glucose; eliminação de componentes nitrogenados (uréia, amônia); metabolismo de hormônios; metabolismo de xenobióticos; e formação da bile são também funções desse órgão (SEGNER, 1998). A maioria dessas funções é realizada pelos hepatócitos, que representam, em mamíferos, cerca de 65% da população total de células no fígado (GUILLOUZO *et al.*, 1990). A natureza dinâmica e sua regulação em muitos processos metabólicos e fisiológicos fazem desse órgão um modelo valioso para o estudo de mecanismos e processos de aclimação³ ambiental (SEGNER, 1998). O dano hepático é comum na toxicidade causada por drogas e na maioria dos problemas de saúde (GUILLOUZO *et al.*, 1997). Sendo assim, as abordagens *in vitro* utilizando tais células podem auxiliar grandemente na compreensão das propriedades básicas e respostas “adaptativas” ambientais (MOON *et al.*, 1965; BAKSI e FRAZIER, 1990; BERRY *et al.*, 1991; MONMSEN *et al.*, 1994; SKETT, 1994; PESONEN e ANDERSSON, 1997). A utilização de hepatócitos isolados nos estudos de toxicidade fornece todos os benefícios de uma célula intacta (organelas funcionais,

¹ Atualmente o termo mais adequado para uma situação fisiológica que varia dentro de certo intervalo, o qual pode ser considerado normal ou neutro é reostase. Devido ao fato de homeostase representar uma linha e não um intervalo, pode-se dizer que características como temperatura corporal, pH, etc. não são controladas homeostaticamente e sim reostaticamente.

² Segundo FONTAINE (1993) adaptação ocorre em escala de tempo evolutivo e apresenta caráter hereditário, estando envolvida no ajuste do organismo ao meio, logo ajuste, acomodação ou adequação seriam os termos mais apropriados na citação acima.

³ Processos de acomodação a novas condições ambientais (por ex. temperatura), em geral, são denominados aclimação (ajuste que o organismo sofre em laboratório) e aclimatização (ajuste da fisiologia do organismo que ocorre no ambiente de vida desse organismo, por ex. durante a mudança de estações do ano).

interações enzimáticas, cofatores fisiológicos e concentrações de metabólitos, etc) sem a complexidade das possíveis interferências encontradas em um animal intacto (SEGNER, 1998). Nesse sistema *in vitro*, condições experimentais definidas podem ser prontamente estabelecidas e mantidas, possibilitando estudos bioquímicos sofisticados nos quais fatores exógenos podem ser analisados individualmente ou em associação, e tipos múltiplos de condições experimentais podem ser iniciadas com populações de células obtidas de um único animal (SEGNER, 1998). Desconsiderando as razões científicas e técnicas em favor dos sistemas *in vitro*, há também considerações éticas e econômicas que defendem o uso de células isoladas ao invés de animais (GUILLOUZO *et al.*, 1997 e SEGNER, 1998).

Métodos para isolar células intactas e funcionais do fígado de mamíferos surgiram no final dos anos 60. Os primeiros procedimentos utilizavam combinações de hialuronidase e colagenase para a digestão enzimática do tecido hepático (BERRY e FRIEND, 1969), porém essa técnica passou subseqüentemente por refinamentos (SEGLEN, 1972 e BERRY *et al.*, 1991). Uma vez isoladas, as células do fígado podem ser usadas, em suspensão para estudos de curta duração (2 a 4 horas) ou em cultivo primário para estudos mais longos. Comparados com células recém isoladas, cultivos celulares têm várias vantagens, dentre as quais podemos citar: investigações de maior duração e de processos tempo-dependentes; estudos de estruturas e funções que requerem contato e organização intercelular; permitem a recuperação de eventuais danos causados às células durante o processo de isolamento (SEGNER, 1998).

Durante os anos 80, a aplicação de hepatócitos recém isolados aumentou bastante (BAKSI e FRAZIER, 1990). Primeiramente, poucos estudos exploravam o uso de cultivos primários ao invés de células recém isoladas, um fato que poderia estar relacionado com os problemas técnicos na manutenção *in vitro* de hepatócitos de peixe (BLAIR *et al.*, 1990). Apenas recentemente o uso de cultivo primário dessas células passou a ser mais difundido, tendo sido usado para o estudo de vários aspectos da estrutura e funções hepáticas (SEGNER, 1998). Requerimentos para um sistema de cultivo primário de hepatócitos incluem um protocolo otimizado de isolamento e provisão de condições ótimas de cultivo (meio e microambiente celular) para a sobrevivência e funcionamento adequados das células (SEGNER, 1998).

Os modelos *in vitro* incluem células isoladas a partir da perfusão de órgãos, fatias de tecido, linhagens celulares, frações subcelulares, microsomas e células geneticamente

produzidas por técnicas de engenharia. Todas apresentam vantagens e desvantagens (GUILLOUZO *et al.*, 1990 e 1997).

Os hepatócitos estão ricamente associados com enzimas do metabolismo de drogas, que são convencionalmente divididas em dois grupos. As reações da fase I são geralmente processos oxidativos, redutivos e hidrolíticos; elas provêm o grupo funcional necessário para as reações da fase II, que são geralmente conjugadas (GUILLOUZO *et al.*, 1990). As enzimas mais importantes formam o sistema de monooxigenases mistas do Citocromo P450 (CYP1A), que está localizado no retículo endoplasmático liso de células parenquimais (GUILLOUZO *et al.*, 1990). As enzimas metabolizantes de drogas não estão uniformemente distribuídas nos lobos hepáticos, sendo mais abundantes ou mais exclusivamente expressas nas zonas centrais (GUMUCIO, 1989). Se o efeito resultante das enzimas do metabolismo de drogas é a conversão de xenobiontes em formas mais solúveis em água, que possam ser prontamente eliminadas pelo sistema renal, parece que cerca de 600 drogas são possivelmente hepatotóxicas (STRICKER e SPOELSTRA, 1985). A droga por si só, um metabólito estável ou reativo, pode ser responsável pelos efeitos tóxicos. Muitos dos agentes tóxicos induzem dano hepático de uma maneira previsível e podem ser considerados realmente hepatotoxinas (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Entretanto, uns poucos compostos produzem danos hepáticos incomuns em humanos susceptíveis e têm sido denominados dependentes de idiosincrasia (ZIMMERMAN, 1982). As respostas do fígado, que podem resultar de diferentes mecanismos, são descritas como necrose, colestase, inflamação e fibrose e podem ser analisadas em níveis moleculares, celulares e tissulares (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Todavia, a função hepática está sob influência de vários outros fatores endógenos e exógenos e tais interações fisiológicas com outros órgãos são complexas, dificultando a distinção dos efeitos primários de manipulação experimental particular, daqueles induzidos secundariamente. Esta é a principal vantagem em se substituir, em muitas investigações, o uso do sistema *in vivo* pelos sistemas *in vitro* (GUILLOUZO *et al.*, 1990).

1.2 Isolamento de hepatócitos de peixe

O primeiro fator a ser controlado, antes de tudo, é o anestésico a ser utilizado. Embora haja muitos anestésicos disponíveis para peixes, o anestésico de escolha mais comum é o triclanometanosulfonato (MS-222) (RANDALL e HOAR, 1971). Outros

anestésicos usados são o uretano, clorabutanol e fenoxietanol. Métodos físicos como decapitação ou um golpe na cabeça são comumente utilizados para peixes pequenos, cujos fígados são imediatamente extirpados (BAKSI e FRAZIER, 1990).

Hepatócitos recém isolados “memorizam” sinais para os quais eles respondiam antes da dissociação do fígado. Com respeito aos hepatócitos humanos, um número considerável de fatores pode ser responsável por variações conspícuas individuais nas funções celulares. Adicionalmente ao sexo, idade, doenças hepáticas e polimorfismos genéticos, pré-medicação e estado nutricional do doador, bem como a duração e condições de preservação do fígado antes da separação das células, influenciam grandemente as atividades metabólicas dos hepatócitos recém isolados (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Eles podem ser usados imediatamente após o isolamento ou estocados por 1 a 3 dias por hipotermia, ou por meses e até anos, caso sejam congelados, exibindo perda de 10 a 20% de viabilidade e 50% da capacidade de adesão em plástico após criopreservação (GUILLOUZO *et al.*, 1997).

Hepatócitos têm sido isolados de várias espécies de peixes. Alguns exemplos incluem peixes de água doce, como truta arco-íris, carpa, peixe-lua verde, e peixes marinhos, como peixe-sapo ou diabo-marinho, linguado e peixe-escorpião gigante. A seleção das espécies para preparações de hepatócitos tem sido baseada em vários critérios (BAKSI e FRAZIER, 1990); um deles é a facilidade em se obter e manter o peixe. O peixe-dourado é comprado de aviários e mantido em aquários (BIRNBAUM *et al.*, 1976), enquanto outros peixes, como peixe-gato e truta arco-íris, podem ser comprados de criadouros (CAMPBELL *et al.*, 1983 e KLAUNIG *et al.*, 1985). Outra consideração deve ser uma função metabólica específica e característica de uma espécie particular de peixe ou a existência de informação biológica relevante. Peixes de espécies e tamanhos variáveis são usados para obter hepatócitos. Truta arco-íris de 100g a 5kg (BAILEY *et al.*, 1982), assim como peixes pequenos de 4-10g (MOERLAND e SIDELL, 1981), têm sido usados experimentalmente. No entanto, o tamanho do peixe pode afetar na técnica cirúrgica e de perfusão usadas para isolar os hepatócitos, o que pode dificultar a obtenção das células (BIRNBAUM *et al.*, 1976 e MOERLAND e SIDELL, 1981).

As técnicas de perfusão usualmente apresentam dois passos. Seguindo a perfusão, há um rompimento mecânico do órgão, como foi inicialmente desenvolvido para o isolamento de hepatócitos de mamíferos (BERRY e FRIEND, 1969), tendo ganhado grande aceitabilidade para o isolamento de células do fígado de teleosteos (MOON *et al.*, 1982;

BAKSI e FRAZIER, 1990; MONMSEN *et al.*, 1994). Em uma etapa inicial de perfusão, o sangue é removido do fígado. Muitas soluções salinas são utilizadas para este propósito, sendo, em geral, modificações da solução salina de Hanks, embora as quantidades e tipos de sais usados variem entre os pesquisadores (BAKSI e FRAZIER, 1990 e SEGNER, 1998). As soluções empregadas são geralmente tamponadas com fosfato e/ou bicarbonato, e HEPES [N-(2-Hidroxietil) piperazine-N-(2-ácido etanosulfônico)] é frequentemente incluído. O pH depende da espécie de peixe, com valores relatados entre 7,3 e 8,0. MOON *et al.* (1985) sugeriram que menores concentrações iônicas de hidrogênio (pH 7,6) fossem empregadas em cultivos de células de peixe, se comparadas com os de mamíferos (pH 7,4). Mas, WOLF e QUIMBY (1969) relataram que cultivos primários de células de peixe eram mais bem estabelecidos em pH 7,3 - 7,4, que em valores mais elevados. O pH mais comumente utilizado em estudos com peixes é 7,4. A glucose é recomendada como uma fonte de energia (WOLF e QUIMBY, 1969 e MOON *et al.*, 1985), e a heparina é algumas vezes incluída para reduzir a coagulação sanguínea (KOBAN, 1986 e WALSH *et al.*, 1989). A maioria dos meios de perfusão inicial não contém cálcio, e a adição de um agente quelante como o EDTA (ácido Etilenodiametra acético) para remover Ca^{+2} (e assim quebrar as ligações célula-célula dependentes de cálcio) pode melhorar a obtenção de células (SEGLAN, 1976 e SEGNER, 1998). As soluções de perfusão são geralmente bem oxigenadas, tendo uma composição de 0,25-0,5% $CO_{2(g)}$ com o restante de $O_{2(g)}$. A temperatura dos tampões de perfusão depende da espécie de peixe, bem como da temperatura de aclimação. Em geral, muitos dos estudos com peixe são realizados em temperatura ambiente, embora alguns experimentos usem soluções a 0-4°C.

Em uma segunda etapa, uma ou mais enzimas para desagregação do tecido conectivo é adicionada ao meio de perfusão. Embora, em teoria, a remoção de íons cálcio deva ser suficiente, alguma atividade enzimática degradativa parece ser necessária (BAKSI e FRAZIER, 1990 e SEGNER, 1998). Na maioria das vezes, colagenase bacteriana (por exemplo de *Clostridium*) é selecionada, dissolvendo o colágeno intercelular (a ausência de cálcio facilita a subsequente separação de células pela perfusão com colagenase) (SEGLAN, 1972). Uma vez que as preparações de colagenase possuem atividades proteolíticas colaterais⁴ (SEGNER *et al.*, 1993; SEDDON e PROSSER, 1999) e sua atividade varia de lote para lote (SEDDON e PROSSER, 1999), a escolha da colagenase é

⁴ Atividade colateral se refere a presença de proteases não específicas em alguns preparados de colagenase.

crítica. Um exemplo da importância em sua escolha é com relação ao número de receptores de membrana para a insulina em hepatócitos de carpa, que depende da colagenase utilizada para o isolamento das células (SEGNER *et al.*, 1993). A concentração de colagenase difere bastante entre pesquisadores, variando de 0,3 a 50mg/ml, e deve ser selecionada para maximizar a viabilidade e rendimento em células, seguindo um tempo de perfusão específico (MOON *et al.*, 1985). Alguns meios de perfusão, incluindo o primeiro método prático publicado em 1967 (HOWARD *et al.*, 1967), também contêm hialuronidase, em concentrações de 0,4-4,0mg/ml. O uso dessa enzima é questionável e em alguns casos ela pode até danificar os hepatócitos (BAKSI e FRAZIER, 1990). O cálcio é genericamente adicionado à segunda solução de perfusão, levando em conta que a colagenase requer cálcio (SEGLAN, 1976) para atividade enzimática (além de zinco). Frequentemente, a fórmula básica para o tampão com colagenase é a mesma da solução inicial, com a exclusão dos quelantes, e a presença de glucose e HEPES, com um pH próximo do pH ótimo para a atividade da colagenase (pH 7,5). SEGLAN (1973) encontrou inibição significativa da colagenase quando na presença de magnésio, que compete com o cálcio. Logo a segunda solução de perfusão não pode conter íons magnésio (BAKSI e FRAZIER, 1990). SEDDON e PROSSER (1999) obtiveram excelente rendimento em número de células, utilizando um método não enzimático (utilizando apenas EDTA para dissociação dos hepatócitos), de $2,1 \times 10^8$ céls viáveis (85-95% de viabilidade) para 100g de massa corporal de peixe-gato.

Para a preparação dos hepatócitos de peixe, os peixes são anestesiados com MS-222 e colocados com a porção ventral para cima. Uma incisão é feita do ânus até a região branquial, expondo as cavidades peritoneal e pericárdica. Nas espécies, como os salmonídeos, que possuem uma veia porta bem desenvolvida, a perfusão do fígado é geralmente feita através da mesma, ou pela veia intestinal. Para espécies, como a carpa, que não possuem uma veia porta distinta, o fígado pode ser canulado via artéria coeliaca (BOUCHE *et al.*, 1979; WALTON e COWEY, 1979; RENAUD e MOON, 1980; KLAUNIG *et al.*, 1985; SEGNER *et al.*, 1995; VOGT e SEGNER, 1997), ou pode ser feita uma perfusão retrógrada a partir do sinus venoso do coração (BAKSI, 1988) ou ducto biliar (MORRISON *et al.*, 1985). O tempo de perfusão varia bastante para os diferentes autores, estando entre 15 e 90 minutos (SEGNER, 1998). A primeira solução limpa o fígado de sangue em 1-10 min. A segunda perfusão, com solução contendo colagenase,

geralmente é mais prolongada (20-45 min, com limite de 90 min). A perfusão pode ser inteiramente *in situ* ou o fígado pode ser removido entre o primeiro e segundo passo de perfusão e colocado em uma plataforma (SEIBERT, 1985) ou placa de Petri (WALSH *et al.*, 1985) para facilitar a recirculação da solução de colagenase. A perfusão deve continuar até o fígado se tornar maleável e macio, e mostrar sinais de digestão. A vesícula biliar e tecidos-extra são removidos, e as células são dissociadas (BAKSI e FRAZIER, 1990).

A digestão enzimática do tecido hepático é seguida por um rompimento mecânico, no qual o órgão é cortado por tesoura (PORTHE-NIBELLE e LAHLOU, 1981) ou lâminas de aço e gentilmente massageado contra gaze (BOUCHE *et al.*, 1979 e PORTHE-NIBELLE e LAHLOU, 1981), rede de plâncton (MOON *et al.*, 1985) ou uma tela de *nylon* filtrante (DANNEVIG e BERG, 1985 e WALSH *et al.*, 1985), cujos poros variam de 50 a 250µm de diâmetro. As células são coletadas em solução, lavadas repetidamente, centrifugadas em baixa rotação (40-120 x g, dependendo da espécie, tamanho celular e conteúdos de lipídeos) por 2-10 min (várias vezes com a solução de perfusão) e transferidas para o meio de cultivo final (BAKSI e FRAZIER, 1990 e SEGNER, 1998). Uma amostra da suspensão final de células é diluída, contada em um hemocitômetro, e a viabilidade das células é determinada pelo método de exclusão de azul de tripan (KLAUNIG *et al.*, 1985). Vários pesquisadores têm utilizado alternativas para o procedimento de perfusão supracitado. BHATTACHARYA *et al.* (1985) e PLISETSKAYA *et al.* (1984) perfundiram os fígados de salmão com tampão HEPES salino e então os retiraram. Os fígados foram cortados em pedaços e incubados com solução de 0,5% de colagenase em um banho de água com agitação até serem digeridos. Para estudos envolvendo peixes pequenos, o fígado é extirpado sem qualquer perfusão, cortado em pequenos pedaços, e colocado em um meio contendo uma enzima digestiva. As células são dispersas por agitação em *shaking* ou *magnetic stirring* (BAKSI e FRAZIER, 1990).

As condições para o cultivo de hepatócitos dependem primeiramente do *design* experimental. Os efeitos da temperatura em várias funções têm sido investigadas e o alcance entre 5-25°C é mais comumente usado. Para cultivos em suspensão, amostras de células podem ser retiradas por até 24h, mas a maioria dos pesquisadores as utiliza entre 1 e 4h após o início do cultivo. A concentração de células também é variável; densidades de 1×10^5 a 2×10^7 céls/ml (5-90mg/ml) têm sido relatadas. Em geral, as células são incubadas

em solução salina tamponada como a de Hanks, ou meios mais complexos como L-15 ou RPMI 1640. Suspensões são usualmente mantidas em banho de água sob agitação (*shaking water bath*) e continuamente gaseificadas com 5%CO_{2(g)} / 95%O_{2(g)} caso o meio seja tamponado por bicarbonato. A escolha do meio de incubação dependerá dos requerimentos nutricionais dos hepatócitos das espécies em particular (BAKSI e FRAZIER, 1990).

A osmolaridade deve ser considerada no cultivo de células de peixe. Peixes de água doce e marinha podem diferir na osmolaridade sanguínea e de líquidos intersticiais. Esta situação pode necessitar modificação do meio de cultivo para peixes marinhos por aumento do conteúdo final de NaCl por uma quantidade constante de 0,06M (SIGEL e BEASLEY, 1988); já para elasmobrânquios a osmolaridade é ajustada pela adição de uréia na perfusão e meio de cultivo (MONMSEN e MOON, 1987 e BALLAROTI e BOYER, 1988).

O rendimento de células após a perfusão do fígado, assim como em mamíferos, varia com a espécie, estado fisiológico, sexo e idade do peixe doador, encontrando-se entre 30 e 90% da massa inicial do fígado (MONMSEN *et al.*, 1994). Interessantemente até o estado nutricional e o tipo de dieta podem influenciar significativamente no rendimento de células obtidas (por ex. para carpa o número de células obtidas é maior em uma dieta a base de lipídeos do que a base de proteínas ou carboidratos) (SEGNER, 1998).

A suspensão celular obtida após a perfusão do fígado de teleosteos contém uma variedade de tipos celulares. As células em maior número são hepatócitos (cerca de 80% do volume de fígado intacto). As células não-hepatócitos incluem células biliares epiteliais, células sinusoidais endoteliais, células de gordura persinusoidais e melanomacrófagos (funcionalmente semelhantes às células de Kupffer presentes no fígado de mamíferos) (SEGNER, 1998). Embora o número relativo de outros tipos celulares que não hepatócitos seja pequeno, cogita-se que eles participem em um número não desprezível de importantes processos tóxicos e neoplásicos; células endoteliais podem, assim como os hepatócitos, estar envolvidas na ação de xenobiontes (HUSOY *et al.*, 1994); células biliares parecem estar envolvidas nas alterações neoplásicas do fígado (BLAIR *et al.*, 1995); e células de reserva de lipídeos podem estar envolvidas na etiologia da hepatite espongiosa (COUCH, 1991). Em peixes, o estudo de células não-hepatócitos tem sido negligenciado.

O parênquima hepático do fígado de mamíferos exibe uma zonação metabólica (JUNGERMANN e KATZ, 1989), ou seja, hepatócitos de diferentes zonas do fígado expressam diferentes funções e estruturas metabólicas. Contudo, a consideração de tal

microheterogeneidade parece ser menos importante para sistemas de teleósteos devido a não evidência disponível de que uma zonação metabólica exista no fígado de peixes (HAMPTON *et al.*, 1985; SEGNER e BRAUNBECK, 1988; MONMSEN *et al.*, 1991; OTTOLENGHI *et al.*, 1991).

Em espécies que possuem um hepatopâncreas (carpa, linguado, etc), células pancreáticas exócrinas podem ser isoladas juntamente com células do fígado, caso a perfusão seja feita pelos vasos arteriais. Aproximadamente 10% das células isoladas do fígado de carpa são pancreócitos, os quais podem ser removidos por gradiente de densidade de centrifugação (BOUCHE *et al.*, 1979), ou podem ser cultivados conjuntamente com os hepatócitos (VOGT e SEGNER, 1997). A presença de células pancreáticas não gera efeitos negativos para os hepatócitos co-cultivados (SEGNER, 1998).

1.3 Cultivo primário de hepatócitos de teleósteos em monocamada

O cultivo em suspensão, como é usado em estudos com células recém isoladas (MONMSEN *et al.*, 1994), não é apropriado para o cultivo primário de hepatócitos devido à baixa sobrevivência celular (KLAUNIG *et al.*, 1985). O tempo de incubação mais longo relatado para hepatócitos de peixe-gato em suspensão é de 24h (BAIRD *et al.*, 1986). Então, muitos laboratórios adotaram a técnica em monocamada, como é freqüentemente usado com hepatócitos de mamíferos (SEGNER, 1998). Na verdade, existem diferentes sistemas de cultivo, cada um com características específicas, como citado na Tabela 1.

Sistema	Características	Comentários
Suspensão	Células não aderidas	Curta sobrevivência celular
Monocamada	Uma camada de células aderida ao substrato de cultivo	Técnica padrão
Monocamada em biomatriz	Hepatócitos plaqueados sobre matriz extracelular	Melhora adesão; melhora fisiologia ?
Co-cultivo	Hepatócitos plaqueados sobre uma camada de não hepatócitos	Melhora fisiologia ?
Agregados	Associações esféricas entre células em suspensão	Sobrevivência prolongada; melhora fisiologia
<i>Perifusion culture</i>	Células em <i>microbeads</i> em <i>perifused column</i>	Não estático - com contínuo suprimento/remoção de meio
Fatias de fígado	Pequenos cubos ou fatias de tecido hepático	Ambiente celular conservado

Tabela 1. Sistemas de cultivo para hepatócitos de teleósteos. Fonte: SEGNER (1998).

Quando plaqueados em condições de cultivo convencionais, os hepatócitos se aderem ao plástico e se reagregam para formar monocamadas de células epiteliais granulares não proliferantes, que sobrevivem por 1-3 semanas. Os hepatócitos começam a morrer e se soltar muito cedo e o crescimento de células contaminantes aumenta rapidamente após 1-2 semanas. O ajuste dos hepatócitos ao seu novo ambiente resulta na perda completa de algumas funções (ex. indução de algumas isoenzimas do citocromo P450) (GUZELIAN *et al.*, 1977; SIRICA e PITOT, 1980; STEWARD *et al.*, 1985) e marcada atenuação de outras (ex. secreção de proteínas do plasma) (GUILLOUZO *et al.*, 1984) dentro de poucos dias. Ao mesmo tempo, as células começam a expressar funções semelhantes a células de feto (isoenzimas fetais, α -fetoproteínas) (GUGUEN *et al.*, 1975; GUGUEN-GUILLOUZO *et al.*, 1978; SIRICA *et al.*, 1979). As taxas de transcrição de genes específicos do fígado baixam a valores entre 1 e 10% daqueles encontrados no órgão, após 24h de cultivo (CLAYTON e DARNELL, 1983). A adição de soro bovino fetal ao meio de cultivo favorece a adesão dos hepatócitos ao plástico, porém as funções hepatoespecíficas são ainda mais rapidamente perdidas (JEFFERSON *et al.*, 1984).

Com hepatócitos de truta, cultivos em monocamada sofrem de baixa adesão de células do fígado em garrafas de cultivo (KLAUNIG, 1985; LIPSKY *et al.*, 1986; BLAIR *et al.*, 1990). O melhoramento na adesão pode ser obtido cobrindo a superfície das placas com matriz extracelular (HASCHEMEYER e MATHEWS, 1983; LIPSKY *et al.*, 1986; BLAIR *et al.*, 1990; RABERGH *et al.*, 1995) ou usando placas de cultivo *Falcon Primaria plates* (LIPSKY *et al.*, 1986; KOBAN *et al.*, 1987; DUAN *et al.*, 1993; MILLER *et al.*, 1993). Embora a viabilidade celular em todos os substratos permaneça alta, há uma grande variação na adesão nos diferentes substratos. Hepatócitos semeados sobre matriz extracelular completa têm alta eficiência de adesão (93%), em contraste com aqueles semeados em plástico ou superfície coberta com colágeno (20%) (BAKSI e FRAZIER, 1990). Para hepatócitos de enguia, um pré-tratamento das garrafas de cultivo com fibronectina de cavalo foi necessário para melhorar a adesão celular (HAYASHI e OOSHIRO, 1986), enquanto que hepatócitos de carpa aderem facilmente em diferentes substratos (SEGNER, 1998). É interessante perceber que PESONAN e ANDERSSON (1991) obtiveram melhora na adesão de hepatócitos de truta após aumentarem as concentrações de CaCl_2 no meio de perfusão.

O cultivo de hepatócitos em monocamada é quimicamente definido. Meio livre de soro é associado com boa viabilidade celular por um período de 5 a 8 dias de incubação *in vitro*. No entanto, a porcentagem de hepatócitos aderidos declina com o aumento do período de cultivo, o que limita sua duração (SEGNER, 1998).

As mudanças morfológicas seqüenciais no cultivo de hepatócitos em monocamada, de truta (BLAIR *et al.*, 1990), peixe-gato (SEDDON e PROSSER, 1999), enguia (WALSH *et al.*, 1985) e carpa (SEGNER, 1998) parecem congruentes. Em 12 a 24 horas após o plaqueamento, hepatócitos solitários formam agrupamentos de 2 a 10 células. As células formam filamentos finos (de diâmetro inferior a 0,1 μ m) com o substrato (superfície) e as células vizinhas (BLAIR *et al.*, 1990). Subseqüentemente, as células formam grupos progressivamente maiores e finalmente constituem cordões de células. Em paralelo, células inicialmente arredondadas tornam-se aplanadas e poligonais. O estabelecimento de interações célula-célula *in vitro* é acompanhado pelo desenvolvimento de diferenciações características de membrana, como as presentes em hepatócitos *in vivo*; complexos celulares juncionais (BLAIR *et al.*, 1995; BRAUNBECK *et al.*, 1996; VOGT e SEGNER, 1997), junções Gap (BALDWIN e CALABRESE, 1994); e formação de canálculos biliares (BLAIR *et al.*, 1990 e BRAUNBECK e STORCH, 1992). A reconstituição morfológica e eventualmente, funcional dos canálculos biliares representa um processo complexo que requer uma redistribuição extensiva e inserção de novos componentes de membrana (SEGNER, 1998). Ao mesmo tempo, isso indica que as células cultivadas restabelecem polarização celular dentro do pólo sinusoidal e biliar, o que é essencial para a função do fígado *in vivo* (SEGNER, 1998). Em microscopia eletrônica de transmissão foi observado que durante períodos de cultivo superiores a 3 dias, compartimentalização intracelular e morfologia de organelas de hepatócitos *in vitro* é marcadamente similar a ultraestrutura dos mesmos *in vivo* (BRAUNBECK e STORCH, 1992 e SEGNER *et al.*, 1995). Para períodos de cultivo superiores a 3 ou 5 dias ocorre uma degradação progressiva da ultraestrutura celular (BRAUNBECK e STORCH, 1992); em particular, ocorre formação de vesículas, fracionamento do retículo endoplasmático e drástico acúmulo de lisossomos e vacúolos autofágicos. Essa deterioração é acompanhada pelo brusco aumento de células necróticas (SEGNER, 1998).

Surpreendentemente, poucos estudos têm investigado a manutenção da diferenciação funcional de hepatócitos de teleósteos em cultivo primário. Hepatócitos de enguia

mostraram uma perda permanente na capacidade gluconeogênica durante cultivo, mas a síntese protéica aumentou continuamente (GUGUEN-GUILLOUZO e GUILLOUZO, 1983). Hepatócitos de enguia cultivados secretam lipoproteínas, porém sua composição é diferente de lipoproteínas encontradas no soro de enguia *in vivo* (YU, 1991). Hepatócitos de carpa mantiveram altos estoques de glicogênio por até 3 a 5 dias em cultivo em monocamada. Depois disto, os níveis de glicogênio declinaram continuamente, para aproximadamente 60% após 8 dias (SEGNER, 1998). Hepatócitos de peixes em cultivo expressam receptores hormonais, embora seu número tenda a decrescer com o aumento do período de incubação (MONMSEN e LAZIER, 1986; FLOURIOT *et al.*, 1993; PLISETSKAYA *et al.*, 1993; SEGNER *et al.*, 1993). A expressão gênica continua a responder a fatores endócrinos, como para vitelogênese (LIPSKY *et al.*, 1986; FLOURIOT *et al.*, 1993; SEGNER *et al.*, 1993), IGF-I (DUAN *et al.*, 1993) ou metalotineína (HYLLNER *et al.*, 1989 e GAGNÉ *et al.*, 1990).

Um aspecto da função diferenciada do fígado é a rápida perda da capacidade de metabolismo de xenobiontes em cultivos em monocamada. Particularmente os níveis de enzimas dependentes do citocromo P450 decrescem fortemente *in vitro* (GUGUEN-GUILLOUZO e GUILLOUZO, 1983 e SINGH *et al.*, 1996). Isto não representa uma perda total da atividade das enzimas, porém mais propriamente, parece ser uma desdiferenciação de células hepáticas com uma reversão a um metabolismo do tipo fetal (SEGNER, 1998). Para cultivo primário de células do fígado de teleósteos, os dados disponíveis indicam uma maior estabilidade de enzimas de biotransformação que em mamíferos (STEGEMAN *et al.*, 1993 e PESONEN e ANDERSSON, 1997). Vários autores relataram constância ou até aumento nos níveis de EROD (7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase), uma enzima catalítica associada ao CYP1A, em hepatócitos cultivados de truta (PESONEN e ANDERSSON, 1991; BRAUNBECK e STORCH, 1992; MILLER *et al.*, 1993; STEGEMAN *et al.*, 1993). A atividade de enzimas de xenobiontes da fase II, como Glutathione-S-transferase (GST) e UDP-glucuroniltransferase (UDPGT) são conservadas *in vitro* (PESONEN e ANDERSSON, 1991).

Resumidamente, parece que o cultivo de hepatócitos em monocamada em meio livre de soro ou hormônios mantém estruturas e funções diferenciadas por 5 a 8 dias. Após este período, processos degenerativos vão se tornando crescentemente importantes, como indicado por mudanças morfológicas, fisiológicas e de viabilidade celular. A regressão

funcional de hepatócitos está associada com a progressiva separação das células do substrato de cultivo (SEGNER, 1998). Interessantemente, deve ser percebido que vários pesquisadores estão trabalhando em cultivo tridimensional de hepatócitos (LANDRY *et al.*, 1985 e LI *et al.*, 1992) e que muitos hepatócitos estão aptos a completar pelo menos um ciclo de divisão celular quando cultivados em baixas densidades em presença de fator de crescimento epidermal, insulina e piruvato (MAC GOWAN, 1986 e LUETTEKE e MICHALOPOULOS, 1987).

1.4 Cultivo primário de hepatócitos: a influência do meio e do microambiente celular

Para estabelecer cultivos de longa duração de hepatócitos de teleósteos, é necessário identificar as condições de cultivo que previnam ou, ao menos, reduzam a perda da diferenciação e viabilidade de células isoladas. Os fatores que mudam com a transferência do ambiente *in vivo* para o *in vitro* são o suprimento de sangue (provisão de nutrientes, fatores endócrinos, remoção de metabólitos, etc) e o microambiente celular (contato celular heterotípico e homotípico⁵ e matriz extracelular) (SEGNER, 1998). É também concebível que fatores como componentes solúveis do meio, matriz extracelular e interações célula-célula tenham de ser recriados *in vitro* para a sobrevivência e manutenção da diferenciação fenotípica de hepatócitos cultivados por longo período (GUGUEN-GUILLOUZO e GUILLOUZO, 1983; GOULET *et al.*, 1988; GUILLOUZO *et al.*, 1990; GUGUEN-GUILLOUZO e CORLU, 1993; SKETT, 1994).

1.4.1 Fatores do meio de cultivo

Fatores do meio, desde hormônios, minerais e vitaminas até compostos como dimetilsulfonida (DMSO) influenciam as funções fisiológicas de hepatócitos cultivados de mamíferos (SKETT, 1994). O DMSO, um solvente bipolar, adicionado a um meio quimicamente definido em uma concentração final de 2%, prolonga a sobrevivência de hepatócitos de rato para mais de quarenta dias, devido à sua propriedade de remover radicais oxigênio (VILLA e GUAITANI, 1988). Várias funções hepatoespecíficas são bem preservadas, as quais incluem a síntese de transferrina, albumina, α_1 -antitripsina e ligandina, e a atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (ISOM *et al.*, 1985).

⁵ Contato celular homotípico se refere ao contato hepatócito-hepatócito, e heterotípico ao contato entre hepatócitos e outras células hepáticas.

Entretanto, o uso de DMSO por longos períodos pode ser questionado, porque ele é usado em uma alta concentração e induz várias alterações morfológicas caracterizadas pelo aparecimento de hepatócitos alongados e multinucleados (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Com exceção do DMSO, nenhum estudo até o presente demonstrou a existência de outro fator solúvel que possibilite a manutenção de hepatócitos bem diferenciados em cultivos puros⁶ por mais de poucos dias (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Em geral, há uma fuga do meio com soro devido à inconsistência no suprimento de soro e às poucas vantagens em usar soro quando um meio completo definido com propriedades similares ou até melhores está disponível (SKETT, 1994).

Para peixes, os resultados dos poucos estudos publicados indicando a importância das adições no meio para a performance de hepatócitos cultivados são muito fragmentados para recomendações conclusivas (SEGNER, 1998). Suplementações de soro aumentaram (KLAUNIG *et al.*, 1985) e reduziram (BRAUNBECK e STORCH, 1992) a sobrevivência de hepatócitos de truta *in vitro*. A adição de soro deu suporte à expressão de receptores para estrogênios e vitelogenina em cultivos em monocamada de hepatócitos de truta arco-íris (FLOURIOT *et al.*, 1993). Apesar desses efeitos benéficos, deve ser considerado que os soros de mamíferos, pela sua composição específica de lipídeos, deve despertar mudanças celulares adversas, como composição alterada da membrana ou acúmulo de lipídeos (HASCHEMEYER e MATHEWS, 1983 e TOCHER *et al.*, 1988). O uso de soro de peixe, ao invés do soro de mamíferos, como sugerido por KOCAL *et al.* (1988), sofre da falta de uma padronização e acesso fácil a um suprimento de soro (SEGNER, 1998), além do alto risco de contaminação por micoplasmas (BAKSI e FRAZIER, 1990). HAYASHI e OOSHIRO (1986) desenvolveram um meio livre de soro, mas suplementado com hormônios e nutrientes para o cultivo de hepatócitos de enguia. Este meio, quimicamente definido, influenciou positivamente na conservação da morfologia e metabolismo celular no decorrer de 10 a 15 dias de incubação *in vitro*. Em um outro estudo, DEVAUX *et al.* (1992) notaram que a adição de cortisol ou dexametasona em um meio livre de soro não afetou as atividades de biotransformação basal de hepatócitos de truta cultivados, porém acentuaram a indução de resposta à exposição a β -naftoflavona.

⁶ Cultivo puro de hepatócitos equivale a um cultivo onde apenas hepatócitos são cultivados (sem a presença de outros tipos celulares).

1.4.2 Componentes da matriz extracelular

O papel da matriz extracelular em controlar o desenvolvimento e a diferenciação celular em mamíferos está bem estabelecido, e a presença de componentes da matriz extracelular nos sinusoides hepáticos (CLÉMENT *et al.*, 1984), bem como a habilidade dos hepatócitos de secretar vários tipos de colágenos e outras glicoproteínas quando em cultura (DIEGELMANN *et al.*, 1983 e CLÉMENT *et al.*, 1988) foram demonstradas. A eficiência na adesão de hepatócitos e na longevidade dos cultivos, é aumentada quando as garrafas são cobertas com colágeno (BONNEY *et al.*, 1974), fibronectina (MARCEAU *et al.*, 1982), uma mistura de componentes extraídos do fígado de rato (ROJKIND *et al.*, 1980) ou produzidos por linhagens de células endoteliais bovinas (GUGUEN-GUILLOUZO *et al.*, 1982); diretamente plaqueadas em gels de colágeno flutuantes (MICHALOPOULOS e PITOT, 1975) ou gel de colágeno embebido em rede de *nylon* (SIRICA *et al.*, 1979). Entretanto, em geral, esses substratos orgânicos não retardam a ocorrência de mudanças fenotípicas (GUGUEN-GUILLOUZO *et al.*, 1982).

Componentes da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, ou materiais mais complexos como extrato da pele do peixe, aumentam a eficiência na adesão de hepatócitos (LIPSKY *et al.*, 1986; BLAIR *et al.*, 1990; RABERGH *et al.*, 1995). Até o presente, não existem investigações sistemáticas se esses componentes também influenciam a fisiologia de hepatócitos cultivados (SEGNER, 1998). A performance funcional e a longevidade de hepatócitos de mamíferos podem ser claramente melhoradas pela manipulação do ambiente celular, como incubar as células em uma matriz rica em laminina, denominada matrigel (BISELL *et al.*, 1987 e GUGUEN-GUILLOUZO e CORLU, 1993). Para linhagens celulares de peixe, tem sido demonstrado que matrizes extracelulares influenciam na diferenciação fenotípica (KANEKO *et al.*, 1995), mas para hepatócitos de peixe não há disponibilidade de dados conclusivos (SEGNER, 1998). KOBAN (1986) cultivou hepatócitos de peixe-gato em uma biomatriz (um extrato do tecido hepático) por 28 dias, com uma boa viabilidade, entretanto o autor não demonstrou se essa manutenção de hepatócitos diferenciados por longo período de tempo foi possível devido ao uso da biomatriz ou outros fatores. RABERGH *et al.* (1995), ao analisar a indução de tirosina aminotransferase mediada por dexametasona, em hepatócitos de truta cultivados em laminina ou poli-L-lisina, não observou influência significativa do material do substrato.

Levando em conta o fato de que os hepatócitos têm uma faixa de superfície apical dividindo duas superfícies basolaterais que estão em contato com a matriz extracelular, DUNN *et al.* (1989) cultivou hepatócitos de rato entre duas camadas de colágeno tipo I. Nessa configuração *sandwich*, os hepatócitos mantiveram uma alta taxa de secreção de albumina por mais de 40 dias.

1.4.3 Interações célula-célula

O fígado é um órgão composto por muitos tipos celulares. Os hepatócitos formam cordões de células que se comunicam por junções Gap. Eles estão rodeados por diferentes células sinusoidais e têm contatos diretos com células epiteliais, as quais formam o canal de Hering (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Conseqüentemente, ambas, interações heterotípicas (por exemplo, contatos entre hepatócitos e células biliares) quanto homotípicas (contatos entre hepatócitos) têm um importante papel na expressão das funções hepatoespecíficas (GUGUEN-GILLOUZO e GUILLOUZO, 1983; CLAYTON *et al.*, 1985; GOULET *et al.*, 1988; GUILLOUZO *et al.*, 1990). Quando em cultivo puro, hepatócitos se reagrupam, mas a comunicação intercelular por meio de junções Gap desaparece dentro de poucas horas (SPRAY *et al.*, 1987).

Várias atividades funcionais dependem da densidade celular. Funções relacionadas ao crescimento (NAKAMURA *et al.*, 1983) assim como síntese de albumina e proteínas totais (GUGUEN-GUILLOUZO, 1986) são aumentadas em cultivos de hepatócitos em baixa densidade. Uma vez que a sobrevivência celular é insignificamente menor comparativamente com hepatócitos plaqueados em alta densidade, pode ser sugerido que o aumento da atividade funcional em cultivos com baixa densidade celular poderia estar relacionado a um evento pós-transcricional (GUGUEN-GUILLOUZO, 1986). O contato célula-célula em cultivo ou o contato com uma matriz extracelular, particularmente gels de colágeno ou matrigel, diminui a expressão do gene *c-myc* em hepatócitos (SHIMBARA *et al.*, 1992), o que sugere que o contato está inibindo a transição da fase G₀ para G₁ encontrada em hepatócitos quando colocados em cultivo, logo está prevenindo a desdiferenciação (SKETT, 1994).

Em pesquisa biomédica, as informações disponíveis têm incitado o desenvolvimento de co-cultivos, onde hepatócitos são incubados juntamente com não-hepatócitos, preferencialmente células epitélio-biliares (GUGUEN-GILLOUZO e GUILLOUZO, 1983

e GUILLOUZO *et al.*, 1990), bem como em agregados multicelulares, nos quais o ambiente tridimensional, semelhante ao *in vivo*, permite prolongar a viabilidade celular *in vitro* (TONG *et al.*, 1992). As interações célula-célula parecem ser importantes, como sugerido pela tendência das células hepáticas do fígado em se reagregar após o isolamento (SEGNER, 1998).

Todavia, apenas poucos estudos têm considerado a influência das interações celulares na viabilidade e estado de diferenciação de hepatócitos de peixe (SEGNER, 1998). Co-cultivos com linhagens estabelecidas tendem a aumentar as atividades da EROD em hepatócitos, embora este efeito não seja consistentemente expressado, fato talvez relacionado ao uso dessas linhagens ao invés de células epiteliais biliares (SEGNER, 1998). Dentre as funções preservadas em co-cultivos, encontram-se a produção de proteínas plasmáticas (GUGUEN-GUILLOUZO *et al.*, 1983 e 1984; GUILLOUZO *et al.*, 1984; LEBRETON *et al.*, 1986; CONNER *et al.*, 1990), conteúdo do citocromo P450 (BÉGUÉ *et al.*, 1984 e GUILLOUZO *et al.*, 1985), metabolismo de drogas por reações da fase I e fase II (BÉGUÉ *et al.*, 1983 e GUILLOUZO *et al.*, 1988) e captação de taurocolato (FOLIOT *et al.*, 1985). A adição de corticosteróides ao meio de cultivo é requisitada para obter o “efeito de co-cultivo”, o que indica que alguns fatores solúveis são essenciais nesse modelo (GUGUEN-GUILLOUZO *et al.*, 1983). Contrariamente a hepatócitos mantidos em meio livre de soro e com hormônios definidos, hepatócitos co-cultivados retêm a capacidade de transcrever genes específicos (FRASLIN *et al.*, 1985). Eles também conseguem se comunicar uns com os outros por meio de junções Gap mesmo depois de 70 dias (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Meio condicionado ou extratos celulares de células epiteliais são inefetivos, o que sugere que o sinal primário não é um fator solúvel secretado por células epiteliais; surgiram evidências de que poderia ser uma glicoproteína localizada na membrana plasmática de ambos os tipos celulares (GUGUEN-GUILLOUZO e CORLU, 1993).

Em agregados, os contatos celulares são maximizados por pelo menos 1 mês. Os níveis de receptores para estrógenos e RNAs mensageiros para a síntese de vitelogenina são mantidos em níveis comparados com *in vivo*; a síntese de vitelogenina permanece completamente funcional e induzível durante todo o período de cultivo (FLOURIOT *et al.*, 1993); a produção de albumina e de transferrina, em hepatócitos de mamíferos, persiste por pelo menos 2 meses (TONG *et al.*, 1992). A estabilização das funções hepatoespecíficas

nos agregados não deve ser apenas causada pelo melhoramento das interações celulares, mas também pelo aumento da secreção de compostos da matriz extracelular que estão envolvidos na morfogênese dos agregados (LANDRY *et al.*, 1985).

Para o estudo de aspectos específicos da fisiologia e metabolismo do fígado, cultivo primário de hepatócitos pode ser parcialmente substituído por linhagens celulares (SEGNER, 1998). As linhagens celulares superam a limitação do uso de hepatócitos primários, que têm um alto grau de variabilidade entre preparações individuais de células do fígado (SEGNER, 1998). Boa reproduzibilidade dos dados de testes, juntamente com a facilidade no uso, fazem das linhagens celulares apropriadas como ferramenta nos estudos de projeção e diagnósticos ambientais (SEGNER, 1998). A desvantagem das linhagens celulares é a perda das funções hepatoespecíficas, limitando o seu uso em estudos fisiológicos e de mecanismos (SEGNER, 1998).

1.5 Uso de cultivo de hepatócitos para pesquisa fármaco-toxicológica e fisiológico-bioquímica: um vasto campo de investigação científica

A pesquisa toxicológica utiliza várias abordagens e metodologias para identificar riscos e compreender o processo básico que influencia a expressão de respostas toxicológicas em sistemas biológicos, requerendo a compreensão das funções normais dos hepatócitos, a fim de avaliar se respostas observadas ou não, após a exposição de toxinas são, de fato, respostas celulares adversas ou meramente respostas “adaptativas” (de ajuste ao meio) (BAKSI e FRAZIER, 1990). Uma particular e proveitosa abordagem tem sido identificar e desenvolver modelos *in vitro* que retenham as características básicas das condições mais complexas *in vivo* e que possam ser manipulados para fins de pesquisa. Modelos de pesquisa *in vitro* têm propriedades próprias, que lhes fornecem vantagens significativas em muitas áreas da pesquisa toxicológica, como o controle das condições ambientais; a eliminação de efeitos interativos sistêmicos; a redução da variabilidade entre experimentos; a possibilidade das amostras serem repetidas simultaneamente ou em seqüência; e a necessidade de pequenas quantidades de reagentes químicos para estudos de respostas com dose completa. Além do mais, eles são freqüentemente mais baratos e rápidos; e geram menores quantidades de resíduos tóxicos (BAKSI e FRAZIER, 1990).

Uma questão geralmente surge, como o porquê de se empregar cultivos primários ao invés de linhagens celulares em pesquisa toxicológica. Certamente linhagens celulares têm

vantagens em termos de conveniência de suprimento e cultivos por longo período de tempo. Contudo, linhagens de células imortalizadas não são células normais e questões sérias surgem no sentido de se as respostas dessas células representam, de fato, as respostas de células diferenciadas *in vivo* (BAKSI e FRAZIER, 1990). O cultivo primário de hepatócitos de peixe, embora não inteiramente normais, devido à ruptura das interações célula-célula, dano potencial da membrana durante a preparação, e desdiferenciação em cultivos mais longos, representam células que são centrais para a regulação metabólico-sistêmica de todo o organismo, primeiramente envolvidas no metabolismo de xenobiontes; e freqüentemente o alvo específico de toxinas (BAKSI e FRAZIER, 1990).

A maior vantagem nos modelos *in vitro* é que as inter-relações entre os vários tipos de biotransformações de drogas podem ser analisadas sob condições bem definidas, que excluem a influência de fatores extra-hepáticos complicados, e permite investigações usando tratamentos específicos em hepatócitos humanos e de outros animais (GUILLOUZO *et al.*, 1990). A expressão das funções hepatoespecíficas é regulada por fatores humorais, bem como matriz celular e interações célula-célula. Com isso, a maior desvantagem é que esses fatores não melhoram similarmente todas as funções hepáticas. Conseqüentemente, quando se usa hepatócitos isolados em transformações de xenobiontes e estudos toxicológicos, deve-se considerar cuidadosamente a escolha das condições experimentais nas quais as células retêm sua capacidade metabólica (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Uma questão importante é a correlação entre as concentrações tóxicas *in vitro* e as doses tóxicas *in vivo*. Tal correlação deve ser levada em consideração na fármaco-cinética da droga; isto permanece uma questão aberta que requer investigação mais aprofundada (GUILLOUZO *et al.*, 1997).

Algumas considerações devem ser feitas ao se utilizar os modelos *in vitro* para a pesquisa citotóxica e genotóxica:

- ✓ As células devem ser usadas durante um período em que ainda expressem enzimas metabolizantes de drogas da fase I e II, e sejam capazes de responder a indutores.
- ✓ A composição do meio pode afetar grandemente a resposta de hepatócitos isolados a agentes citotóxicos na sobrevivência e função das células, bem como nas interações com o composto a ser testado e seus metabólitos. Informações sobre a solubilidade, volatilidade, e interação com compostos do

meio do composto-teste são fundamentais. Garrafas seladas são necessárias para compostos voláteis; um solvente é usado para dissolver o composto-teste e pode ser efetivo por si mesmo; além disso, o composto pode afetar o pH, osmolaridade, turbidez do meio ou formar precipitados com os componentes do meio.

- ✓ Muitos estudos são realizados em períodos de incubação que não excedem 24 horas e com a adição de uma simples dose do composto-teste. Entretanto, devido à falta de liberação extra-hepática de compostos tóxicos e acumulação no meio de cultivo, uma incubação que exceda umas poucas horas pode ser tão longa e deve mascarar diferenças entre compostos que são diretamente tóxicos e aqueles que requerem biotransformação (PAINE e HOCKIN, 1982).
- ✓ Um amplo arranjo de parâmetros pode ser selecionado para obter informação, em níveis molecular e celular, para detectar e quantificar perturbações induzidas por compostos químicos. Esses parâmetros podem ser reversíveis ou irreversíveis; e são classificados em biomarcadores morfológicos, bioquímicos e metabólicos (mais sensíveis de todos) (GUILLOUZO *et al.*, 1997).

1.5.1 Estudos fisiológicos e bioquímicos

✓ Metabolismo energético

Poucos estudos têm, especificamente, investigado o metabolismo energético de hepatócitos de peixes, embora alguns dados estejam disponíveis, estes focalizam primariamente em algum outro aspecto do metabolismo de hepatócitos. Os índices principais para o metabolismo energético são consumo de $O_{2(g)}$ (MOERLAND e SIDELL, 1981; VAN WAARDE e KESBEKE, 1981; SEIBERT, 1985) e carga energética celular ou níveis celulares de ATP (SIMON, 1985).

✓ Metabolismo do Nitrogênio

Vários estudos têm focado as vias metabólicas que resultam na formação de amônia (VAN WAARDE e KESBEKE, 1981; CAMPBELL *et al.*, 1983; CASEY *et al.*, 1983). O maior objetivo é definir os papéis relativos dos aminoácidos e do ciclo de nucleotídeos (das bases nitrogenadas Adenina e Guanina - purinas) na produção de amônia.

✓ pH

A regulação intracelular do pH e seu efeito no metabolismo intermediário são importantes funções para todas as células. Os dados disponíveis sugerem que a enguia americana (WALSH e MOON, 1983) e a truta arco-íris (WALSH, 1986) parecem regular o pH intracelular de uma maneira similar, enquanto que o peixe-escorpião gigante (WALSH *et al.*, 1985) aparentemente regula o balanço intracelular ácido-base por uma estratégia diferente.

✓ Transporte através da membrana

Os processos fisiológicos associados com a membrana plasmática têm sido usados como índices de toxicidade. Estudos de processos de transporte em hepatócitos de peixe têm investigado o transporte de sais biliares (FRICKER *et al.*, 1987 e SMITH *et al.*, 1987), o transporte de aminoácidos (HASCHEMEYER e DETRICH, 1982; SHUTTLEWORTH e GOLDSTEIN, 1982; SHUTTLEWORTH e GOLDSTEIN, 1984; BALLAROTI e BOYER, 1988) e o transporte de lactato (WALSH, 1987). Investigações de processos de endocitose de proteínas mais complexos também têm sido feitas (DANNEVIG e BERG, 1985).

✓ Metabolismo de carboidratos

Essa área do metabolismo de hepatócitos de peixe tem recebido a maior atenção visto que a disponibilidade de substratos para a produção de energia e o estoque energético são fatores importantes na produtividade e sobrevivência de peixes. Muitos trabalhos têm investigado a gluconeogênese e os efeitos das condições ambientais na preferência do substrato. A glicogenólise também tem sido extensivamente investigada, e várias enzimas envolvidas na gluconeogênese e glicogenólise têm sido quantificadas (HAYASHI e OOSHIRO, 1979; MOERLAND e SIDELL, 1981; BHATTACHARYA *et al.*, 1985; MONMSEN *et al.*, 1985; MONMSEN, 1986). A regulação hormonal (particularmente insulina e glucagon) tem sido estudada em várias espécies (BIRNBAUM *et al.*, 1976; MONMSEN e SUAREZ, 1984; OTTOLENGHI *et al.*, 1984; FOSTER e MOON, 1987; PETERSEN *et al.*, 1987) e estudos dos efeitos de catecolaminas são relatados em dois trabalhos (BRIGHENTI *et al.*, 1987 e MONMSEN *et al.*, 1988).

✓ Síntese protéica

Vários estudos de síntese protéica têm sido conduzidos, incluindo investigações de proteínas específicas, como proteínas do choque térmico (*heat shock proteins*) (KOBAN *et al.*, 1987), proteínas mitocondriais (KENT e PROSSER, 1980), proteínas anti-

congelantes (O'GRADY *et al.*, 1982) e vitelogenina (MAITRE *et al.*, 1986). Estudos sistêmicos da regulação da síntese protéica em hepatócitos de peixe isolados não têm sido relatados, a não ser de resposta à temperatura de aclimação (KENT e PROSSER, 1980; JANKOWSKY *et al.*, 1981; O' GRADY *et al.*, 1982; SAEZ *et al.*, 1982; KOBAN, 1986; KOBAN *et al.*, 1987).

✓ Endocrinologia

Estudos limitados de ligação hormonal, captação e interação com receptores têm sido notificados (PORTHE-NIBELLE e LAHLOU, 1981; ABLETT *et al.*, 1983; FOSTER e MOON, 1986; MONMSEN e LAZIER, 1986).

✓ Metabolismo de lipídeos

O metabolismo de ácidos graxos e a síntese de fosfolipídios são importantes na regulação do estoque de energia e composição da membrana. De interesse particular em pecilotérmicos⁷ é o efeito da temperatura na composição de lipídeos na membrana. Vários estudos têm investigado o seu efeito nos padrões de síntese lipídica (HAZEL e PROSSER, 1979; HAZEL e SELLNER, 1979; HAGVE *et al.*, 1986; VOSS *et al.*, 1986) e na formação de fosfolipídios (HAZEL, 1983 e HAZEL *et al.*, 1987).

1.5.2 Estudos de toxicidade e de biotransformação de xenobiontes

O uso potencial de hepatócitos de peixes em estudos de toxicidade, seja para avaliar as relações concentração-resposta para vários biomarcadores de toxicidade, seja para estudos de mecanismos, não tem sido ainda adequadamente explorado (BAKSI e FRAZIER, 1990). Vários ensaios foram e continuam sendo desenvolvidos para avaliar a integridade da membrana (captação de azul de tripan, “vazamento” de enzimas como a lactato desidrogenase, $[K^+]$ celular, $[Ca^{++}]$ celular, “vazamento” de Cr^{51} , coloração por acridina laranja ou Iodeto de propídio, captação de vermelho neutro, captação de Diacetato de Fluresceína) ou sua função – transporte de substrato (captação de aminoácidos, de Uridina, Sulfobromoftaleína) (BAKSI e FRAZIER, 1990; GUILLOUZO *et al.*, 1990).

⁷ Até algum tempo, os organismos eram classificados quanto à capacidade de regular a temperatura, em homeotermos ou homeotérmicos – antigamente denominados de animais de sangue quente - (temperatura corporal constante) e pecilotermos ou poikotérmicos – antigamente denominados de animais de sangue frio - (temperatura corporal variável conforme a temperatura ambiental). Esta classificação está em desuso, devido ao fato de que ambos os grupos de organismos apresentam variações na temperatura estanke corporal (o que é mais constante é a temperatura média diária). Atualmente os termos mais apropriados são endotérmicos (controle principalmente fisiológico da temperatura, ou seja, interno) e ectotérmicos (controle principalmente comportamental da temperatura).

Agentes químicos tóxicos podem afetar a estrutura e função da membrana, tanto de forma direta por reação com os componentes da membrana, quanto indiretamente por alteração do estado energético celular, devido à oxidação de grupos protéicos sulfidril. Índices bioquímicos do estado das células (metabolismo energético por ensaio de tetrazólio – *MTT assay*, metabolismo energético – relação lactato/piruvato, níveis de glutatona, síntese de proteínas) podem também ser utilizados na investigação das respostas tóxicas em hepatócitos. Medições no metabolismo energético, nível de constituintes bioquímicos ou síntese de macromoléculas inserem-se nessa classe. Uma área de interesse toxicológico do ponto de vista de mecanismos, é a possibilidade de que toxinas possam produzir seus efeitos através da peroxidação de lipídeos (substâncias relativas ao ácido Tiobarbiturato – *TBA-RS assay*, produção de hidrocarbonetos voláteis, quimiluminescência, conjugados de Dieno), desorganizando os processos fisiológicos associados à membrana (BAKSI e FRAZIER, 1990). Finalmente, existem respostas específicas que podem ser avaliadas para entender os processos toxicológicos. A proliferação de peroxissomas em hepatócitos de mamíferos é relacionada aos mecanismos epigenéticos da carcinogênese hepática. A ruptura da comunicação por meio de junções Gap tem sido implicada como um biomarcador *in vitro* para a promoção de tumor. A formação de *blebs* indica uma ruptura das interações entre membrana e citoesqueleto. Por fim, a síntese de DNA extra (*unscheduled DNA synthesis*) provém evidência de danos em nível de DNA por reagentes químicos ou seus metabólitos (BAKSI e FRAZIER, 1990). Alguns grupos de pesquisa vêm investigando os efeitos de metais em hepatócitos isolados, como cádmio, mercúrio e cobre (MARION e DENISEAU, 1988), e compostos orgânicos (BAKSI e FRAZIER, 1990).

O estudo da instabilidade de enzimas do metabolismo de drogas em cultivo primário de hepatócitos, tem sido também alvo de diversos estudos de toxicidade. O nível da atividade do citocromo P450 e enzimas relacionadas decaem aproximadamente 50% nas primeiras 24h em células de roedores (GUZELIAN *et al.*, 1977; FAHL *et al.*, 1979; MASLANSKY e WILLIAMS, 1982; BÉGUÉ *et al.*, 1984). Várias análises em *immunoblotting* têm mostrado que isoenzimas do CYP1A são afetadas diferentemente dependendo da isoenzima e da composição do meio de cultivo (STEWART *et al.*, 1985; DAUJAT *et al.*, 1987; NAMIKI *et al.*, 1989). Entretanto, a quantidade de proteínas P450 determinadas espectralmente ou imunoquimicamente não necessariamente corresponde com a atividade das isoenzimas P450. Menos atenção tem sido dada a outras enzimas

metabolizantes de drogas da fase I e II, assim como as isoenzimas do CYP1A que são diferentemente preservadas *in vitro* (GRANT *et al.*, 1987 e SHERRATT e DAMANI, 1989). Algumas revisões têm discutido as vantagens e desvantagens do uso de cultivos primários nos estudos de toxicologia (KLAASSEN e STACEY, 1982; SUOLINNA, 1982; ZIMMERMAN, 1982; GUILLOUZO, 1986; TYSON, 1987). A maioria dos estudos toxicológicos tem se limitado à adição de uma simples dose de xenobionte por um curto período de tempo entre 1 e 24h, e os efeitos têm sido monitorados por numerosos biomarcadores que medem a integridade da membrana ou as funções celulares. Parece ser apropriado utilizar pelo menos dois biomarcadores (VONEN e MORLAND, 1984), e os parâmetros que acessam a função hepática são, em geral, mais sensíveis que os que medem a integridade da membrana (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Além da necrose, a apoptose é também um tipo de morte celular. Até o momento, a apoptose tem recebido pouca atenção como um possível dano irreversível, no fígado, induzido por drogas (BAYLY *et al.*, 1994), mas se constitui em um importante parâmetro que poderá ser amplamente utilizado para avaliar efeitos de contaminantes e agentes tóxicos em um futuro próximo (GUILLOUZO *et al.*, 1997).

1.5.3 Estudos de genotoxicidade

Hepatócitos são bem apropriados para muitos tipos de estudo de genotoxicidade uma vez que são capazes de metabolizar pro-mutagênicos e pro-carcinogênicos aos seus metabólitos, e por conterem sistemas de reparo de DNA bastante ativos (BAKSI e FRAZIER, 1990). Embora os hepatócitos não se repliquem em cultivo, eles podem ser induzidos a se proliferar quando expostos a agentes mitogênicos (BAKSI e FRAZIER, 1990).

O uso de peixes na pesquisa do câncer tem aumentado muito por exibirem sensibilidade a carcinógenos (HOOVER, 1984). Há também interesse no uso potencial de espécies aquáticas na toxicologia prognóstica (predizer possíveis efeitos). Dois biomarcadores genéticos têm sido utilizados em hepatócitos isolados de peixes: formação de aductos de DNA e síntese de DNA extra (*unscheduled DNA synthesis*) (BAKSI e FRAZIER, 1990). Também pode haver, por parte dos compostos potencialmente genotóxicos, a indução de respostas de reparo de DNA, mutação de loci específicos, e indução de aberrações cromossômicas ou a nível cromático (STROM *et al.*, 1987). A

formação de aductos de DNA foi observada após exposição de hepatócitos a aflatoxina B₁ (BAILEY *et al.*, 1982), benzo[a]pireno (SMOLAREK *et al.*, 1988) e outros xenobiontes. Outros biomarcadores que podem ser testados em hepatócitos de peixe, incluem formação de micronúcleo e comunicação por junções Gap (BAKSI e FRAZIER, 1990).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Isolar e cultivar hepatócitos de *Hoplias malabaricus* (traíra).

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Ajustar as metodologias encontradas em artigos científicos para o isolamento não enzimático de hepatócitos de traíra;
- ✓ Estabelecer cultivo primário dos hepatócitos;
- ✓ Verificar a viabilidade celular das células isoladas e discutir o seu uso nos estudos de toxicidade celular *in vitro*;
- ✓ Realizar uma análise qualitativa da morfologia dos hepatócitos ao longo do período de cultivo através de microscopia de luz.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos *in vitro* são fundamentais para compreensão dos mecanismos toxicológicos além de apresentarem um amplo campo experimental em outras áreas. Considerando a multifuncionalidade dos hepatócitos em vários processos metabólicos, modelos que utilizem essas células podem fornecer uma gama imensa de informação sobre processos e mecanismos biológicos, comuns a vários organismos ou específicos a uma determinada espécie. Logo, o desenvolvimento de tais modelos *in vitro* com uma espécie de peixe tropical e nativa (traíra), torna-se extremamente importante.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos exemplares de traíra utilizados

Peixes de 200-700g da espécie *Hoplias malabaricus* (Figura 1) foram obtidos na cidade de Joinville (SC), distrito de Pirabeiraba, e mantidos no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular da UFPR, individualmente em aquários de 30 litros, com aeração constante. Os aquários recebiam limpeza de 5 em 5 dias, 1 dia após a alimentação das traíras com lambaris, e os peixes permaneceram sob estas condições até serem utilizados para a obtenção dos hepatócitos, pelo período de aclimação de pelo menos 7 dias.

4.2 Preparo do meio de cultivo e soluções para perfusão

O meio de cultivo utilizado foi Dulbecco MEM (Gibco – EUA), cuja composição é apresentada na Tabela 2. Esse meio foi preparado de modo a ter uma osmolaridade final de aproximadamente 292mOsm e um pH entre 7,8 e 7,9. Os tampões utilizados foram Bicarbonato de sódio (2,2g/l) (Reagen – Brasil) e HEPES (2,5g/l) (USB – EUA). Antibióticos Estreptomicina (10µg/ml) e Penicilina (10u/ml) (ambos da Sigma – EUA) foram adicionados ao meio, que após ser preparado, foi filtrado em membrana de 47mm de diâmetro e poros de 0,22µm (Millipore – EUA) acoplada ao *Sterifil aseptic system and sterifil 47mm filter holder* (Millipore – EUA) sob pressão negativa⁸ e mantido na geladeira doublé DC 440 (Eletrolux – Brasil) a 4°C por um período máximo de 45 dias. No momento da utilização, ao meio foram acrescentados 2% de soro bovino fetal (Gibco - EUA) previamente inativado e esterilizado em unidades filtrantes descartáveis de 0,22µm (MillexTM/Millipore – Brasil).

⁸ Pressão negativa se refere à retirada de ar (diminuição da pressão). Na verdade não existe, em princípio, pressão conceitualmente negativa. O filtro utilizado é ligado em um compressor que retira o ar do copo do filtro, gerando por diferença de pressão, uma tendência dos gases da porção superior, ligada ao copo, em ocupar todo o espaço disponível, forçando assim a passagem da solução ou meio da porção superior para inferior do filtro. Entre as duas porções é que se encontra a membrana filtrante, cujo tamanho dos poros pode variar.

Sais Inorgânicos	Mg/l		
CaCl ₂ . H ₂ O	265,00	L-serina	42,00
Fe(NO ₃) ₃ . 9H ₂ O	0,10	L-treonina	95,00
KCl	400,00	L-triptofano	16,00
MgSO ₄ . 7H ₂ O	200,00	L-tirosina	104,20
NaCl	6.400,00	L-valina	94,00
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	125,00		
NaHCO ₃	3.700,00	VITAMINAS	mg/l
		Cloreto de Colina	4,00
		Pantotenato de cálcio	4,00
Aminoácidos	Mg/l	Ácido fólico	4,00
L-arginina.HCl	84,00	Inositol	7,20
L-cistina	62,57	Nicotinamida	4,00
L-glutamina	548,00	Piridoxal.HCl	4,00
Glicina	30,00	Riboflavina	0,40
L-histidina.HCl. H ₂ O	42,00	Tiamina.HCl	4,00
L-isoleucina	105,00		
L-leucina	105,00	Outros Componentes	mg/l
L-lisina.HCL	146,00	Glicose	1.000,00
L-metionina	30,00	Piruvato de sódio	110,00
L-fenilalanina	66,00	Vermelho de fenol	15,00

Tabela 2. Composição química do meio Dulbecco MEM (DMEM). Fonte: CULTILAB (2003).

- ✓ Solução de perfusão: foram testadas duas soluções para remover Ca⁺⁺ das células.
 - Solução I: conforme proposto por SEDDON e PROSSER (1999), foi utilizada uma solução composta por 2mM de EDTA (Synth – Brasil), 110mM de NaCl, 4mM KCl e 25mM NaHCO₃ (os três últimos da Reagen – Brasil) com um acréscimo de mais 6mM de NaCl para que

a osmolaridade ficasse mais próxima de 290mOsm. Após acertar o pH para 7,6⁹, esta solução foi filtrada e mantida a 4°C.

- Solução II: foi utilizada alternativamente à primeira solução, uma solução salina (PBS – pH 7,8) acrescida de EDTA, composta por 135mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 5,37mM de Na₂HPO₄, 1,76mM de KH₂PO₄ (os dois últimos da Cinética – Brasil) e 2mM de EDTA. Por se tratar de uma solução tamponada por fosfato, esta solução foi esterilizada em autoclave vertical (Phoenix eq. Científicos – Brasil) sob pressão de 1,3 atm por 40min e mantida a 4°C.
- ✓ Solução para reposição de Cálcio: SEDDON e PROSSER (1999) propuseram em seu trabalho que os hepatócitos, depois de isolados, deveriam ser lavados com uma solução que contivesse cálcio para reposição celular. A solução utilizada foi modificada para aumentar a osmolaridade, e continha 2,5mM de CaCl₂ (Reagen – Brasil), 135mM de NaCl e 4mM de KCl. Após acertar o pH para 7,6, esta solução foi filtrada e mantida a 4°C.

4.3 Isolamento das células

Para o isolamento das células foi utilizado o seguinte procedimento:

- ✓ Primeiramente o peixe foi anestesiado (0,02% de MS-222) (Sigma – Alemanha); então foi passado Riodeine tópico (Rioquímica – Brasil) por toda superfície do peixe com o auxílio de gaze (tomando cuidado para não expor as brânquias ao anti-séptico). Em seguida, foi feita uma incisão logo acima do ânus até a região onde se encontra o coração; expondo-se as cavidades cardíaca e peritoneal. Então se testou dois tipos de perfusão.
 - Perfusão *in situ* através do coração: através de Equipo de soro BD asepto 23G (Becton/Dickinson ind. Cirúrgicas – Brasil) estéril no *sinus* venoso do coração, o fígado foi perfundido por aproximadamente 40 min (foi feito um corte na porção terminal do fígado – parte posterior do corpo do peixe - para o escoamento da solução). O fígado foi retirado e cortado com o auxílio de lâminas de

⁹ O pH, das soluções e meio a serem filtrados, foi ajustado em 0,2 a 0,3 unidade abaixo do pH desejado, pois a membrana filtrante tem a capacidade de reter ions H⁺, de forma que, logo após a filtragem, há um leve aumento de pH em 0,2 a 0,3 unidade.

bisturi estéreis (Becton/Dickinson ind. Cirúrgicas – Brasil), sobre uma placa de Petri contendo a solução de perfusão (solução contendo EDTA). A suspensão de células foi colocada em tubos de 50ml (Techno Plastic Products – Suíça) com pipetas Pasteur de plástico, centrifugadas a 800-1500 rpm por 10 min na centrífuga LC-10 (Luguimac - Argentina) e lavadas 3 vezes com a solução de reposição de cálcio.

- Perfusão do fígado via veia Porta: o fígado foi transferido para uma placa de Petri contendo a solução de perfusão, com auxílio de pinças e tesoura. Ele foi perfundido através de um Equipo de soro, cuja agulha foi inserida na veia porta. Essa perfusão teve duração de mais ou menos 40 min, sendo que, de tempos em tempos, o Equipo era trocado de posição, para uma melhor perfusão de todo o órgão. Seguindo a perfusão, o fígado foi cortado por lâminas de aço e a solução contendo as células foi transferida para um tubo de 50ml, lavadas com a solução de reposição de cálcio, e centrifugadas em rotação não excedente a 1500 rpm por 10 min.

4.4 Manutenção das células

Após serem isolados e ocorrer reposição de cálcio, os hepatócitos foram diluídos em meio de cultivo e plaqueados sob lamínulas circulares (Glass Técnica - Brasil), as quais haviam sido previamente lavadas com detergente Extran 1% (Merk – Alemanha) e $\text{dH}_2\text{O}_{(l)}$. Essas lamínulas ficaram acomodadas nos 24 poços de placas de poliestireno (Techno Plastic Products – Suíça), e células também foram plaqueadas em garrafas de cultivo celular de 25cm^2 (Techno Plastic Products – Suíça). No caso das células cultivadas em placas de 24 poços, verificou-se a adesão celular em lamínulas, lamínulas cobertas com poli-L-lisina, ou lamínulas cobertas com proteínas da matriz extracelular. As concentrações celulares variavam de 2 a 5×10^5 células viáveis/poço e 2 a 5×10^6 células/garrafa. Uma alíquota da solução foi retirada para o teste de viabilidade. Cada poço recebeu 0,5ml de meio, que foi substituído a cada 3 dias, sendo que em intervalos de 24h algumas lamínulas eram retiradas e fixadas para a microscopia óptica, e uma amostra de meio era coletada para que se verificasse o pH. As células foram cultivadas em duas condições distintas, ou

dentro de um *tupperware* vedado durante o período de 144h em estufa comum (Fanem – Brasil), com temperatura de 21-27°C, e pCO₂ mantida por pastilhas de Sonrisal, ou em incubadora *Cellstar* (Queue systems – EUA) convencionalmente utilizada para cultivo de células de mamíferos, com pressão parcial de CO_{2(g)} de 5% e temperatura de 37°C.

4.5 Adesão das células ao substrato

Visando melhorar a adesão celular, algumas lamínulas foram cobertas, em um experimento posterior, com substratos gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Sílvio Sanches Veiga e Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata, ambos do Setor de Ciências Biológica da UFPR.

- ✓ Fibronectina – esta molécula foi purificada a partir de plasma humano fresco por cromatografia de afinidade em gelatina-*shepharose* (Pharmacia, LKB Biotechnology - Suécia) segundo metodologia descrita por AKIYAMA e YAMADA (1985). Esta proteína foi diluída em PBS (10µg/ml), filtrada, e permaneceu em contato com as lamínulas (300µl/poço) *overnight* a 4°C antes do uso.
- ✓ Poli-L-lisina – na concentração de 0,1mg/ml ficou em contato *overnight* a 4°C com as lamínulas no período antecedente ao plaqueamento.
- ✓ Matrigel extraído a partir da membrana basal do tumor de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), produzido em camundongo C57b1/10 (fêmeas de aproximadamente 2 meses) através de transplante serial por inoculação intramuscular (KLEINMAN *et al.*, 1985) como descrito por PAULSSON *et al.* (1987). Foi diluído em PBS (10µg/ml), filtrado, e permaneceu em contato com as lamínulas *overnight* a 4°C.
- ✓ Poli-L-lisina e matrigel – após cobrir as lamínulas com poli-L-lisina, elas foram lavadas com água *milique* estéril duas vezes e PBS estéril por uma vez. Então, foi colocado matrigel conforme o protocolo pré-estabelecido.

Após a cobertura das lamínulas com os substratos citados e a incubação, elas foram lavadas com PBS a fim de remover o material não aderido ou excesso de material, para então serem utilizadas propriamente no cultivo.

4.6 Teste de viabilidade e avaliação da morfologia celular (por microscopia óptica)

O teste de viabilidade celular utilizado foi o teste de exclusão de azul de tripan (Gibco – EUA) segundo DeRENZIS e SCHECHTMANN (1973). Para tanto, uma alíquota de células foi transferida para um *ependorf*, ao qual foi adicionado o corante vital em uma concentração de 0,5% (solução de células/corante = 1/1). Após 5min, utilizando uma câmara de *Neubauer improved* (Tiefe® - Alemanha), estimou-se a viabilidade dos hepatócitos (dentre os outros tipos celulares, os que puderam ser diferenciados, não foram considerados para o cálculo da viabilidade).

Após o período de 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h, algumas lamínulas foram lavadas três vezes com PBS, fixadas em Bouin por 5 min e etanol 70% (Vetec química fina – Brasil), lavadas em $dH_2O_{(l)}$, coradas com Giemsa (Merk – Alemanha) na diluição de 1:5 em água destilada por 10 min, desidratadas em álcool etílico (=etanol) 50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, álcool etílico e xilol (=xileno) (Quimex – Brasil) na diluição relativa de 2:1, 1:1, 1:2 e xilol. Foram, por fim, montadas em Permount (Fischer Chemicals – EUA). As imagens foram obtidas no microscópio de captura de imagens BX51 (Olympus – Japão) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

A fim de verificar a progressiva organização celular e a possibilidade de contaminação, utilizou-se o microscópio de contraste de fase DMIL com câmera fotográfica MPS30 acoplada (ambos da Leica – Alemanha), localizados no laboratório de Cultivo Celular do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR.

Todo o procedimento de obtenção, plaqueamento, troca de meio e coleta das lamínulas contendo os hepatócitos foi realizado no fluxo laminar vertical (Tecnal – Brasil) do laboratório de Cultivo Celular do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular, e o material utilizado, foi esterilizado (em autoclave a 1,3 atm e 40 min ou membrana de 0,22 μ m) ou obtido já estéril.

Outros equipamentos utilizados incluem: pHmetro (Quimis aparelhos científicos – Brasil), balança analítica (Boeco – Alemanha), agitador magnético (Fisaton – Brasil) e capela (Caspast – Brasil).

5. RESULTADOS

5.1 Perfusão do fígado

Em um primeiro momento, as duas tentativas de perfusão do fígado *in situ* via coração não deram resultado satisfatório. O número de células obtidas foi insignificante e houve contaminação já no plaqueamento dos hepatócitos. Já na perfusão do fígado em uma placa de Petri através da veia porta, houve melhor rendimento de células, maior facilidade de manipulação do órgão e equipo de perfusão, com aparente redução do risco de contaminação por manipulação. O número de células obtidas variou conforme a massa corporal do peixe, estando entre $1,05 \times 10^7$ células (para um peixe de aproximadamente 200g) e $2,08 \times 10^8$ células (para um peixe de mais ou menos 700g). O volume de solução de perfusão utilizada variou de 300 a 500ml e o tempo entre 35 e 50 min, dependendo do tamanho do fígado. Para peixes menores o fígado foi retirado quase que na totalidade, enquanto que para peixes maiores o fígado precisou ser cortado, a fim de facilitar a circulação da solução de perfusão e garantir que todo o órgão fosse perfundido. O número relativo de hepatócitos para com o total de células foi maior para a perfusão realizada totalmente sem tecidos associados ao fígado e sem pressão mecânica para separar as células.

5.2 Teste de viabilidade celular

A viabilidade celular durante as várias tentativas de isolamento e cultivo dos hepatócitos de traíra ficou entre 64,48 e 81,67%, sendo as maiores taxas de viabilidade encontradas na perfusão de fígados menores ou aparentemente mais saudáveis (consistência mais firme e coloração mais escura) e tempos mais reduzidos de perfusão.

5.3 Variação do pH do meio durante o período de cultivo

O pH do meio de cultivo variou conforme a $p\text{CO}_2$. Para as células mantidas a 37°C e $5\% \text{CO}_2(\text{g})$ o pH sofreu redução até aproximadamente 7,30 e se manteve neste valor durante as 72h iniciais de incubação, período após o qual, as células foram descartadas devido à observação de dano causado pela temperatura excessivamente alta às células. Para as células mantidas a $21\text{-}27^\circ\text{C}$ e acréscimo de Sonrisal, o pH variou bastante, com um valor mais baixo pouco tempo após o acréscimo do antiácido ($\text{pH} = 7,49$) e um valor mais

alto depois de 24-30h no *tupperware* fechado (pH = 8,01), fato esse que se repetia a cada 24-30h, quando era colocada uma nova pastilha de Sonrisal.

5.4 pH das soluções utilizadas nos experimentos após esterilização e armazenamento

- ✓ O meio de cultivo – durante o preparo do meio, no período que antecede a filtração, ele deve sofrer correção de pH, em um valor de 0,2-0,3 unidade abaixo do pH final desejado. Dessa forma, o meio com pH 7,60 logo após ser filtrado apresentou um pH de 7,85. Entretanto, com o armazenado a 4°C por alguns dias o pH do meio ficou entre 7,58 e 7,62 (meio já à temperatura ambiente).
- ✓ Solução de perfusão – a solução de perfusão tamponada por bicarbonato, após ser filtrada e armazenada, sofreu um aumento de 0,65 unidade de pH (passou de 7,6 para 7,85 após ser filtrada e para 8,50 depois de ser armazenada em geladeira – pH medido já em temperatura ambiente). Ao contrário dessa solução, a solução de PBS mais EDTA (tamponada por fosfato), tanto após ser autoclavada quanto armazenada em geladeira, apresentou pH constante de 7,85.
- ✓ Solução de reposição de cálcio – esta solução, por não apresentar tampão, foi a que sofreu maior aumento de pH após ser filtrada e armazenada; o pH passou de 7,83 para 8,67.

5.5 Adesão dos hepatócitos

Sob 37°C de temperatura, os hepatócitos não aderiram em lamínulas. Já em 21-27°C, as células aderiram após um período de 24-30h em lamínula não previamente coberta por nenhum substrato, com uma adesão não muito forte durante todo o período de cultivo. Em garrafas de cultivo, as células aparentemente não chegaram a aderir ou poucas células aderiram. Os hepatócitos apresentaram uma adesão muito mais forte com as células vizinhas (interações homotípicas e heterotípicas) do que com a superfície da lamínula. Células não hepatócitos do fígado e da túnica que o recobre apresentaram melhor adesão (mais rápida e forte) que os hepatócitos, de modo que estas células apresentaram melhor adesão quando na presença daquelas.

Para lamínulas cobertas com substratos, os hepatócitos apresentaram melhor adesão, após 40h, em matrigel, seguido por fibronectina e por poli-L-lisina mais matrigel. Lamínulas tratadas com poli-L-lisina sofreram baixa e fraca adesão celular, assim como lamínulas não pré-tratadas.

5.6 Morfologia das células

Os hepatócitos de traíra são células, em cultivo, de aproximadamente 100 μ m de diâmetro, com núcleo único de mais ou menos 18-20 μ m de raio. Estas células sofreram grandes mudanças morfológicas e de organização ao longo do período de cultivo, como segue na descrição.

Logo após o isolamento e plaqueamento (em lamínulas não cobertas com nenhum tipo de substrato), as células possuem formato arredondado (Figura 2A) e tendem a apresentar leves “projeções” da membrana plasmática, com que se tivessem reconhecendo os arredores à procura de outras células. Após alguns minutos, os hepatócitos se organizam em pequenos grupos de 2-3 células, e entre as células, o contato começa a aumentar, por uma mudança nas superfícies de contato das mesmas, que de convexas passam para superfícies mais planas (Figura 2B). Este processo continua, de modo que, após 24 horas é possível perceber uma leve diferença em termos de distribuição das células na lamínula (Figura 3A); as células deixam de apresentar distribuição homogênea, concentrando-se em grupos, passando a formar agregados de células. Muitas vezes ocorre nítida organização em várias camadas, onde os hepatócitos, em geral, tendem a aderir uns sobre os outros ou sobre outros tipos celulares, os quais apresentam maior velocidade de adesão e adesão mais forte (Figura 3D). Os não hepatócitos (com citoplasma rosa quando corados com Giemsa) parecem tentar ocupar os espaços disponíveis entre os hepatócitos, sendo que muitas dessas células apresentam projeções citoplasmáticas que lembram células com capacidade fagocítica (Figura 3G). Estas células não foram caracterizadas, entretanto, devido ao seu número e procedimento metodológico utilizado, devem se tratar basicamente de células endoteliais de vasos, células da túnica que recobre o fígado, melanomacrófagos ou outras células do parênquima hepático. Os hepatócitos após 24h de incubação, apresentam núcleo único e arredondado, com nucléolo também único e bastante evidente e citoplasma basófilo (Figura 3J). O formato das células tende para globular com arestas mais planas que arredondadas e cordões de 4-8 células são visíveis (Figuras 3G e 3J).

No período de 24 a 144h as mudanças de organização das células continuam, embora sejam menos pronunciadas. Depois de 48h de cultivo, grupos maiores de hepatócitos com 10-12 células podem ser observados (Figura 3E) e não apenas cordões lineares de células são formados, como também grupos globulares de células (ou grumos) (Figuras 2C e 3H). O formato das células não apresenta grandes mudanças, o citoplasma continua com características basofílicas, o núcleo se mantém bem delimitado, arredondado e único, com nucléolo bastante evidente (Figura 3K). Após 72h, os grupos de hepatócitos se tornam ainda maiores (Figuras 3F e 3I), em alguns casos apresentando várias camadas de células em determinadas porções do grupo ou células organizadas em grumos de 4-6 hepatócitos (Figura 3L). Com 96h de cultivo, o aspecto da cultura é semelhante ao descrito para 72h (Figuras 4D e 4G), com hepatócitos mantendo o núcleo único, nucléolo evidente e citoplasma basófilo. Depois de 120h não existem praticamente hepatócitos isolados na cultura (Figuras 4B e 4H), estando eles, quase que na totalidade, agrupados em cordões ou grumos, podendo conter mais de uma camada de hepatócitos (Figura 4E). O aspecto dessas células não apresenta mudanças morfológicas se comparadas com os períodos mais curtos de cultivo (Figura 4K). Por fim, com 144h de cultivo, cordões com mais de 40 células podem ser observados (Figura 4C). Em várias porções desses cordões há várias camadas de hepatócitos (Figuras 4F e 4I), facilmente identificados pelos diferentes planos de foco dos seus núcleos. Ambos, núcleo e nucléolo, continuam únicos e em alguns grumos é difícil determinar os limites celulares (Figura 4L).



Figura 1. Exemplo de *Hoplias malabaricus* (traíra) de aproximadamente 600g. Barra = 15cm.

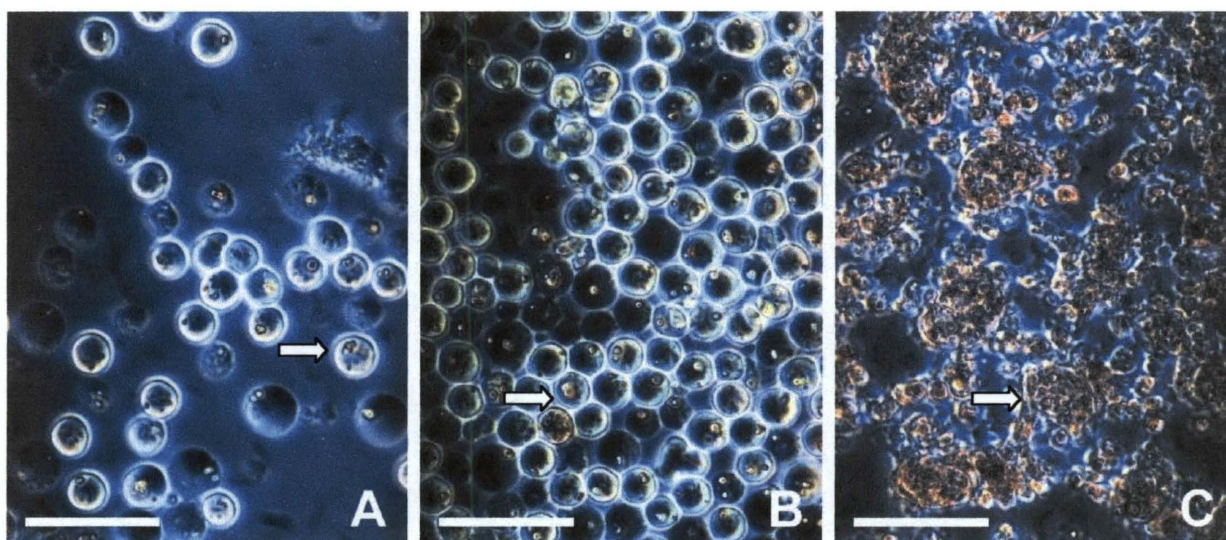


Figura 2. Hepatócitos de traíra, sob microscopia de contraste de fase, após 10h (A, B) e 144h (C) de cultivo. Células arredondadas (A) [seta], tendendo a poligonais com arestas mais definidas na superfície de contato com outras células (B) [seta] e organizadas em grumos (C) [seta]. Barra = 250 μ m.

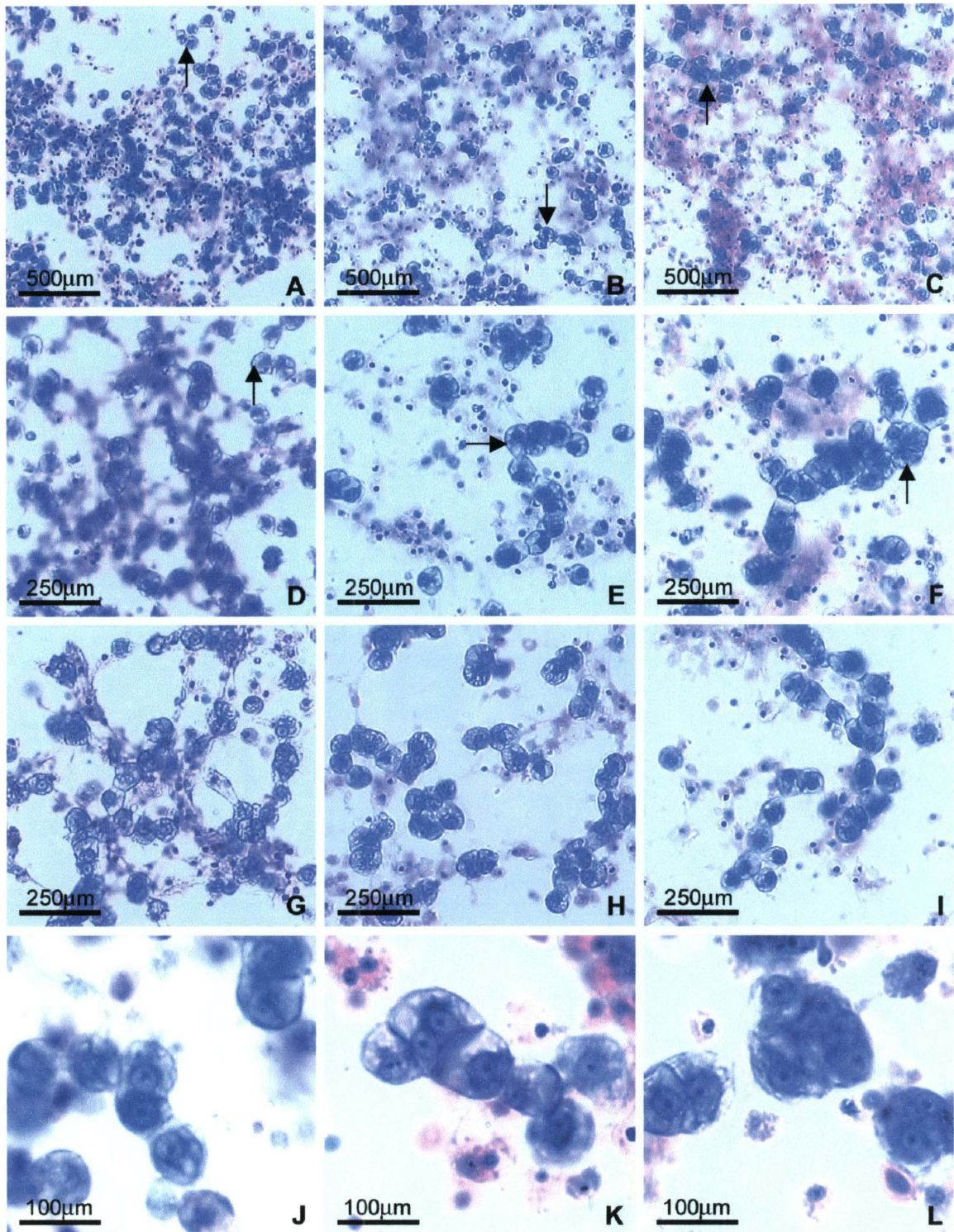


Figura 3. Hepatócitos (seta) corados com Giemsa e outros tipos celulares (citoplasma rosa) após 24h (A, D, G, J), 48h (B, E, H, K) e 72h (C, F, I, L) de cultivo. Observar a presença de núcleo único, nucléolo evidente e citoplasma basófilo nos hepatócitos e a progressiva organização das células no decorrer do período de cultivo.

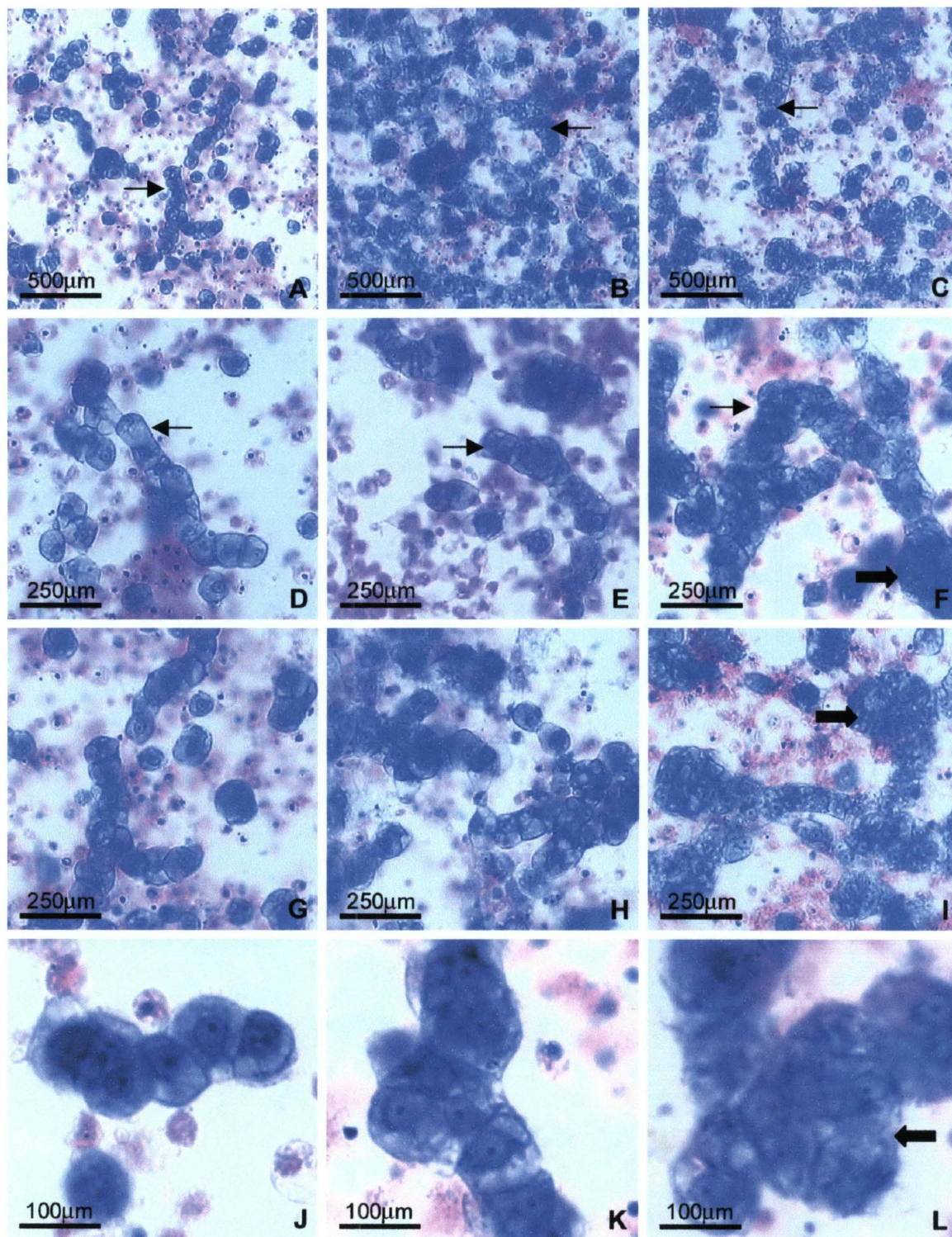


Figura 4. Hepatócitos (seta) corados com Giemsa e outros tipos celulares (citoplasma rosa) após 96h (A, D, G, J), 120h (B, E, H, K) e 144h (C, F, I, L) de cultivo. Observar a presença de núcleo único, nucléolo evidente e citoplasma basófilo nos hepatócitos e a progressiva organização das células. Nas imagens F, I e L, observar a organização em agregados com hepatócitos sobrepostos (seta larga).

6. DISCUSSÃO

A partir da década de 70, há mais ou menos 30 anos, tem aumentado o uso de hepatócitos isolados em cultivo, provendo assim uma vasta biblioteca de informações, onde hoje se encontram disponíveis em torno de 2000 novas referências divulgadas todos os anos. O primeiro método publicado, que envolvia a digestão do fígado por hialuronidase e colagenase seguida por ruptura mecânica, apresentou viabilidade de 77% e 7×10^6 céls/g de fígado (SKETT, 1994). Este método foi aprimorado e sofreu modificações ao ser utilizado por diferentes grupos de pesquisa, de acordo com a espécie doadora de células e as necessidades em cada campo de investigação.

No presente trabalho, foi clara a impossibilidade de cultivar hepatócitos de traíra em temperatura utilizada para o cultivo de células de mamíferos, o que poderia facilitar a manutenção dessas células, uma vez que as estufas de $\text{CO}_2(\text{g})$ disponíveis são utilizadas para esse fim. Em 37°C , os hepatócitos sofreram os efeitos de temperatura superior a sua capacidade de acomodação (peixes, em geral, não suportam temperaturas tão altas) e possivelmente mudanças na fluidez da membrana inviabilizaram o cultivo nestas condições. O principal aspecto negativo em não se poder utilizar tais estufas, refere-se à variação de pH, fato que se tentou contornar empregando-se pastilhas de Sonrisal, antiácido que na presença de água e baixa pCO_2 , libera $\text{CO}_2(\text{g})$. Entretanto, o Sonrisal, logo após ser utilizado, induz uma grande redução do pH do meio, necessitando de algumas horas para que a pCO_2 se normalize e o meio apresente pH próximo do desejado. Uma opção para evitar todo esse estresse de pH às células, seria a utilização de outro tampão, ao invés do bicarbonato de sódio, cuja capacidade de tamponamento estivesse próxima do pH do meio desejado (7,85) e que não dependesse da pCO_2 , como por exemplo, o tampão fosfato. As soluções descritas por SEDDON e PROSSER (1999) para o isolamento de hepatócitos, também apresentaram variações de pH quando filtradas e armazenadas em geladeira, logo elas devem ser preparadas e prontamente utilizadas, o que dificulta o planejamento de experimentos mais complexos. Alternativamente a essas soluções, a utilização de PBS acrescido de EDTA parece ser bastante viável para a perfusão do fígado, uma vez que esta solução é convencionalmente utilizada para obtenção de macrófagos peritoneais de camundongo e rato e apresenta osmolaridade dentro de uma faixa também adequada para traíra, espécie que possui osmolaridade correspondente a $299 \pm 22,7 \text{mOsm/kg H}_2\text{O}$ segundo FREIRE *et al.* (dados não publicados). Além disso, esta

solução, quando autoclavada, mantém o pH semelhante ao pH para o qual ela foi ajustada, inclusive após armazenamento por vários dias a 4°C, o que certamente proporciona menos estresse às células, maior facilidade e economia de material (não são necessários filtros de 0,22µm), maior segurança em termos de esterilidade (por causa da maior eficiência na esterilização apresentada pela autoclave, quando em comparação com a utilização de filtro). Para a reposição de cálcio, também parece ser mais interessante realizar a lavagem das células em meio de cultivo, que contém cálcio em uma concentração de 265mg/ml, pH mais estável, e nutrientes que podem ser mais prontamente disponibilizados às células.

Ao contrário da alta viabilidade celular obtida após isolamento não enzimático de hepatócitos por SEDDON e PROSSER (1999), de mais de 95% após vários experimentos, a viabilidade conseguida neste trabalho não ultrapassou 82%, possivelmente por necessidade de mais alguns ajustes na metodologia, que podem incluir: menor tempo de perfusão e acréscimo de algum substrato energético na solução de perfusão. O número de células obtidas, de $3,0 \times 10^6$ – $3,0 \times 10^7$ hepatócitos/100g de peixe, ficou bem abaixo dos $2,1 \times 10^8$ hepatócitos/100g conseguidos por SEDDON e PROSSER (1999). Isto se deve provavelmente ao fato de não se ter massageado os pedaços de fígado contra uma membrana filtrante para facilitar, sob ação mecânica, a separação das células (a maioria dos trabalhos descreve essa etapa), acrescida das diferenças no tamanho dos animais e a existência de diferenças espécie-específicas, bem como o tamanho do fígado perfundido. MONMSEN *et al.* (1994) e SEGNER (1998) citam que o rendimento em células varia conforme a espécie, estado fisiológico, sexo, idade, estado nutricional, e até tipo de dieta do peixe doador. SEDDON e PROSSER (1999) utilizaram animais de 0,3 a 1,0 kg e perfundiram o fígado em sua total extensão, enquanto que no presente trabalho, os animais eram um pouco menores (200-700g) e apenas um pedaço do fígado (porção mediana do lobo esquerdo) foi retirado e perfundido. Embora a relação seja número de células por 100g de massa corporal do animal, traíras menores apresentam fígado mais delgado, o que dificulta sua retirada do corpo e a perfusão via vasos hepáticos. Comparativamente a alguns outros trabalhos, o número de células e a viabilidade podem ser considerados mais concordantes. Por exemplo, FAISAL *et al.* (1995) obtiveram de 4 a 64×10^4 céls/g de fígado, o que resultaria, $6,4 \times 10^7$ céls/100g de fígado, com viabilidade de 80,3-96,5%. Entretanto, neste estudo os pesquisadores utilizaram *Leiostomus xanthurus* com média de 45g e um método que associava tripsina e EDTA para o isolamento das células.

SEGNER (1998) cita, em sua revisão, problemas na reprodutibilidade e robustez, encontrados em seus resultados, com relação à utilização do EDTA para dissociação de hepatócitos de peixe. Embora o isolamento totalmente não enzimático seja teoricamente menos eficiente, em termos de rendimento em número de células ou viabilidade, SEDDON e PROSSER (1999) demonstraram em seu trabalho, que pequenos ajustes na metodologia, e prática, possibilitam viabilidade celular e número de células até superior aos métodos enzimáticos que empregam collagenase, acrescido da vantagem de não ocorrer variação significativa na atividade enzimática da G6PDH (Glucose-6-fosfato desidrogenase), 6PGDH (6-Fosfogluconato desidrogenase), LDH (Lactato desidrogenase), e relação conteúdo de proteínas/contéudo de DNA em hepatócitos cultivados por 7 dias. Esses fatos, somados a alguns trabalhos que descrevem o comprometimento e a redução do número de receptores de membrana dependendo do lote e marca da collagenase empregada, e por ser o método não enzimático de menor custo, foram fundamentais para sua escolha no presente estudo.

Um procedimento muitas vezes ignorado, porém extremamente importante, refere-se em borrifar o peixe com algum “germicida”. Geralmente se usa álcool 70%, que no caso de peixes anestesiados, proporciona inconvenientes, tanto para o animal (sai do seu estado de anestesia ou apresenta movimentos-reflexo), quanto para o manuseador (dificuldades em imobilizar o animal, aumentando o risco de contaminação bacteriana). Por essas razões, optou-se em utilizar riodeine (povidine) de uso tópico, que apresenta boa capacidade anti-séptica, causa menos dano às células e não remove aparentemente o muco das placas dérmicas do peixe. O tempo de exposição ao anestésico também se mostrou importante. A traíra é um peixe muito resistente ao estresse alimentar (RIOS, 2001), baixa concentração de $O_{2(g)}$ e também à anestesia (observação pessoal). Exemplares desta espécie necessitam permanecer em contato com o anestésico MS-222 (0,02%) diluído em água por tempos que variam conforme o tamanho do animal, e só deve ser retirado após não apresentar movimento (opercular e de musculatura lateral), quando estimulado mecanicamente. Tempo de exposição inferior ao citado, gera efeito menos prolongado do anestésico, o que faz com que o animal saia do estado anestésico durante o processo de abertura da parede corporal ou extirpação do fígado.

Vários trabalhos descrevem a necessidade de substrato protéico para a adesão de hepatócitos de peixe em cultivo. Hepatócitos de truta, por exemplo, apresentam baixa

adesão em garrafas de cultivo, sendo necessário plaquear tais células sobre proteínas da matriz extracelular (BAKSI e FRAZIER, 1990; BLAIR *et al.*, 1990; RABERGH *et al.*, 1995). Da mesma forma, os hepatócitos de traíra não demonstram ter afinidade de adesão sobre lamínulas ou garrafas de cultivo, a não ser quando existem outros tipos celulares associados em grande quantidade, que favorecem a deposição e a organização dos constituintes da matriz extracelular, os quais servem de substrato para os hepatócitos. Segundo SEGNER (1998), além das especificidades com relação às superfícies dos hepatócitos em peixes, também parece que variações nos protocolos de isolamento contribuem para a capacidade de adesão celular. Dentre as várias tentativas de isolamento e cultivo, percebeu-se que processos mecânicos associados à perfusão, que pressionem pedaços de tecido, geram maior número de não hepatócitos ao final do processo, o que é interessante caso não se use *coat* de proteínas da matriz e permite, de certa forma, ter-se uma co-cultura. Todavia, quando se deseja cultivos mais puros de hepatócitos, a cobertura das lamínulas ou garrafa de cultivo, torna-se necessária. Deve-se, neste caso, ter em mente que esses substratos não retardam a ocorrência de mudanças fenotípicas e que, substratos que promovem o espreiamento celular, aumentam as alterações na expressão de genes de hepatócitos, o que corrobora a idéia de que a manutenção das funções hepatocelulares requer a preservação da forma globular das células (GUGUEN-GUILLOUZO *et al.*, 1982). Até o momento, há carência de informação a respeito dos receptores de membrana para proteínas da matriz extracelular em hepatócitos de peixe, o que dificulta a otimização de um *coat* para adesão dessas células. Com relação à espécie *Hoplias malabaricus*, parece que a fibronectina e o matrigel são, dentre os substratos testados, os mais adequados, com a vantagem da primeira ter sua composição melhor caracterizada. A simples criação de cargas positivas, pela Poli-L-lisina, na superfície das lamínulas não é suficiente para possibilitar uma melhor adesão celular, ou manter as células junto ao substrato, até que haja secreção de matriz extracelular, visto que não há interação com um sítio específico e sim apenas atração elétrica entre receptores inespecíficos da membrana (carregados negativamente) e cargas positivas da lamínula. Idealmente, o uso de proteínas de matriz extracelular de peixe seria o mais indicado. Além do tipo de matriz, a concentração da mesma é extremamente importante. MOONEY *et al.* (1992) verificaram que em baixas concentrações de matriz, há inibição da divisão celular, enquanto que em altas há estímulo da divisão e desdiferenciação. Como o objetivo, no presente estudo, tratava-se em tentar

manter hepatócitos bem diferenciados, a concentração de proteínas de matriz testada, a fim de melhorar a adesão celular, foi de 10µg/ml, que é uma concentração ótima para várias linhagens de células de mamíferos, sem ser excessivamente alta.

Os meios de cultivo para hepatócitos variam conforme o trabalho, no entanto, os mais utilizados são RPMI-1640 e L-15, geralmente com tampões bicarbonato e HEPES, e osmolaridade ajustada conforme a espécie em questão. O meio utilizado (DMEM), com base na morfologia das células, parece ser adequado para o cultivo de hepatócitos isolados de traíra. Ele foi ajustado para uma osmolaridade final de 290-300mOsm e pH 7,80-7,90, tendo em vista dados apresentados por trabalhos anteriores com traíra, realizados por FREIRE *et al.* (dados não publicado) e RIOS (2001). Segundo BAKSI e FRAZIER (1990), alterações na composição do meio de cultivo podem afetar grandemente o metabolismo dos hepatócitos de peixes. Não foram realizadas alterações na composição do meio, devido ao caráter inicial do corrente trabalho e aos poucos, e não conclusivos, dados disponíveis. FAISAL *et al.* (1995) determinaram as condições ótimas para o cultivo de células de *Leiostomus xanthurus*, testando diferentes condições de temperatura (37°C, 27°C, 21°C e 4°C) e meios (RPMI 1640, MEM, L-15 e meio199). Obtiveram bons resultados com os meios RPMI e L-15, em 21°C e 27°C (em 37°C não houve crescimento ou adesão celular), com a curiosidade de que, hepatócitos da espécie estudada proliferaram em cultivo.

Em consequência de efeitos negativos como composição alterada da membrana plasmática dos hepatócitos ou acúmulo de lipídeos (HASCHEMEYER e MATHEWS, 1983 e TOCHER *et al.*, 1988) decorrentes da utilização de soro de mamífero (em geral, soro bovino fetal) em cultivos de células de peixes, optou-se por reduzir sua concentração no meio para 2%, tendo em vista a não disponibilidade de um meio suplementado com hormônios e nutrientes, como o desenvolvido por HAYASHI e OOSHIRO (1986) ou acesso a soro de peixes, que sofre de falta de padronização e distribuição e de alto risco de contaminação por micoplasmas, quando isolado do próprio peixe pelo pesquisador (KOCAL *et al.*, 1988 e BAKSI e FRAZIER, 1990). Não foram realizadas análises que permitam afirmar se houve alterações funcionais (atenuação ou perda de determinadas funções ou expressão de funções fetais) nos hepatócitos devido ao soro, entretanto morfologicamente, hepatócitos cultivados com e sem soro bovino fetal, pelo período de até 6 dias, não apresentaram diferenças.

Devido à baixa sobrevivência celular de cultivos em suspensão (KLAUNIG *et al.*, 1985), o método de cultivo escolhido foi em monocamada. Assim como em outros trabalhos, os hepatócitos inicialmente arredondados e isolados tenderam a se organizar em cordões e agregados, tornando-se mais aplanados e poligonais. Foi verificado que as células inicialmente homoganeamente distribuídas, agregaram-se, deixando galerias livres entre grupos de hepatócitos, possivelmente reconstituindo o que os autores descrevem como canaliculos biliares. SEDDON e PROSSER (1999) explicam esse fenômeno, alegando que após um período de 2 a 3 dias, a migração das células sobre a superfície das garrafas resulta em uma mudança drástica na aparência do cultivo. Então, considerando que os hepatócitos têm capacidade migratória, o que foi descrito como alterações na superfície das células no presente trabalho, poderia especulativamente tratar-se, pela possível expressão de receptores de superfície celular (os quais passam a reconhecer a matriz extracelular secretada e organizada sobre as lamínulas ou garrafas de cultivo) de um espraiamento dos hepatócitos na tentativa de se associar a outras células, uma vez que essas células estão naturalmente organizadas em tecidos. Neste caso, a organização da matriz extracelular é o sinal que leva os hepatócitos a migrarem em determinada direção (desde que haja uma densidade mínima de células, naturalmente). A formação de agregados tridimensionais (e não monocamadas) foi comum quando os hepatócitos foram plaqueados em uma maior densidade, e estas células apresentaram facilidade em aderir fortemente umas às outras, o que é o que ocorre normalmente quando células não encontram um substrato adequado para aderir. Os agregados podem conservar atividades de biotransformação substanciais pelo período de 1 mês (CRAVEDI *et al.*, 1996), o que torna interessante o seu uso em estudos de toxicologia. TONG *et al.* (1992) demonstraram que agregados multicelulares permitem prolongar a viabilidade celular, pelo maior número de interações celulares e até o momento, de acordo com SEGNER (1998), o cultivo de agregados parece ser o sistema mais promissor para o cultivo por longo prazo de hepatócitos de teleósteos. SEGNER (1998) também menciona que hepatócitos que falham em se reagregar ou reagrupar durante o cultivo, apresentam severas perdas de propriedades funcionais, como diminuição dos conteúdos de citocromo P450. Tanto interações homotípicas quanto heterotípicas são importantes para expressão das funções hepatocelulares, então cultivos mais puros de hepatócitos parecem não ser interessantes, caso o objetivo do cultivo se refira a algum processo metabólico realizado pelos

hepatócitos. HUSOY *et al.* (1994) e BLAIR *et al.* (1995) fazem referência à importância dos não hepatócitos em processos tóxicos e neoplásicos (ação de xenobiontes, alterações neoplásicas, etc), e GUGUEN-GUILLOUZO *et al.* (1983) e GUILLOUZO *et al.* (1990), afirmam que em co-cultivos há uma produção e deposição mais prematura de componentes da matriz extracelular. Além disso, a expressão das funções hepatoespecíficas, por longos períodos de tempo, requer contato entre dois tipos celulares distintos, o que confirma a importância de cultivos não tão puros, em termos de células, ou co-cultivos associados com outras células do fígado. Adicionalmente, sabe-se que o contato célula-célula ou célula-matriz diminui a expressão do gene *c-myc*, possivelmente inibindo a rediferenciação celular (SHIMBARA *et al.*, 1992 e SKETT, 1994). Toda essa informação disponível, sugere, direta ou indiretamente, que sejam cultivadas as diferentes células extraídas do fígado, durante o processo de perfusão, o que torna a metodologia mais simples, no sentido de que não serem necessários processos para a separação das células obtidas.

A presença de nucléolo evidente, durante todo o período de cultivo, sugere que a síntese de RNA ribossômico, e conseqüentemente, a síntese protéica, não sofreram, em princípio, grandes alterações na passagem do ambiente *in vivo* para *in vitro*. Além do mais, a basofilia do citoplasma (confirmada por coloração com Hematoxilina de Harris – Eosina e também presente em cortes histológicos de fígado de peixe) deve estar relacionada à presença de alta concentração de RNA ribossômico e RNA mensageiro, com grande parte das proteínas sendo lançada no meio, o que pode ser responsável pela coloração residual na lamínula. No entanto, afirmações a esse respeito não podem ser categóricas, pois não foram feitas análises bioquímicas ou espectrométricas para determinar concentrações de proteínas hepáticas no meio, além de estudos de ultraestrutura. Citoplasma não vacuolizado, núcleo arredondado e único, células não alongadas e bem delimitadas, permitem concluir que não houve grandes alterações estruturais nas células durante o cultivo. SEGNER (1998) descreve a formação de vesículas, acúmulo de lisossomos, presença de vacúolos autofágicos, fracionamento do retículo endoplasmático e aumento de células necróticas como alterações associadas a uma degradação celular *in vitro*. GUILLOUZO *et al.* (1990) também descrevem a presença de hepatócitos alongados com vários núcleos como possíveis alterações morfológicas.

Não foram observados hepatócitos em processo de divisão celular, o que está de acordo com vários trabalhos publicados, que delineiam que os hepatócitos se reagregam formando monocamada de células granulares não proliferantes, na ausência de indutores mitogênicos.

Poder-se-ia optar, conforme o objetivo da investigação, pelo uso de linhagens já estabelecidas de células de peixe. Elas, no entanto, apresentam desvantagens se comparadas com o cultivo primário, como a perda das funções hepatoespecíficas (SEGNER, 1998), o que limita seu uso em estudos fisiológicos e de mecanismos de toxicidade. Porém, ignorando esses fatos, um empecilho igualmente grande surge, no sentido de não existirem ou não se ter conhecimento da existência de linhagens celulares de hepatócitos de peixes nativos brasileiros, até o momento. Algo que deverá ser preocupação, em futuros ensaios, é com relação à escolha das condições experimentais nas quais as células retêm sua capacidade metabólica, e mais especificamente, mantêm as vias metabólicas de interesse funcionais, como atentado por GUILLOUZO *et al.* (1990).

No caso do estudo com drogas e xenobiontes, a fácil determinação da presença de apoptose nos ensaios *in vitro*, constituir-se-á em importante e difundida ferramenta para a predição de possíveis efeitos de ambos (BAYLY *et al.*, 1994), o que sugere uma ampla utilização do cultivo primário de hepatócitos em um futuro próximo.

Aparentemente as espécies doadoras de hepatócitos são a chave para o sucesso do cultivo, sendo que a manutenção *in vitro* de células de uma espécie, por longo período de tempo, pode ser mais complicada que a manutenção de células de outra, por razões que devem incluir diferenças nas taxas de metabolismo basal e habilidades variáveis de ajuste a osmolaridade (FAISAL *et al.*, 1995). No entanto, quando características de uma espécie fazem dela um organismo sentinela (ou bioindicador) como a traíra (dados do laboratório) em alguns ecossistemas, torna-se fundamental que obstáculos sejam contornados, a fim de que se amplie o número de biomarcadores, em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Estes devem ser passíveis de utilização, combinados ou isoladamente, para o estudo e predição de efeitos tóxicos de xenobiontes sobre espécies tropicais brasileiras, disponibilizando dados que permitam uma discussão cada vez mais ampla da presença dos contaminantes nos nossos ecossistemas naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

✓ BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BAKSI, S. M. e FRAZIER, J. M. Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research: review. **Aquatic Toxicology**, v.16, p.229-256, 1990.

BAYLY, A. C.; ROBERTS, R. A.; DIVE, C. Suppression of liver cell apoptosis *in vitro* in the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin. **J. Cell Biology**, v.125, p.197-203, 1994.

BLAIR, J. B.; MILLER, M. R.; PACK, D.; BARNES, R.; TEH, S. J.; HINTON, D. E. Isolated trout liver cells: establishing short-term primary cultures exhibiting cell-to-cell interactions. **In Vitro Cell Dev. Biology**, v.26, p.237-249, 1990.

CONNER, J.; VALLET-COLLOM, I.; DAVEAU, M.; DELERS, F.; LEBRETON, J. P.; GUILLOUZO, A. Acute phase response induction in rat hepatocytes co-cultured with rat liver epithelial cells. **Biochemistry**, v.266, p.683-588, 1990.

CULTILAB. **Cultilab – meios para cultivo celular**. Sítio disponível em: <<http://www.cultilab.com.br/bdmem.html>>. Acesso em: 22 Jan. 2003.

DEVAUX, A.; PESONEN, M.; MONOD, G.; ANDERSSON, T. Glucocorticoid-mediated potentiation of P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes. **Biochem. Pharmacology**, v.43, p.898-901, 1992.

FAISAL, M.; RUTAN, B. J.; SAMI-DEMMERLE, S. Development of continuous liver cell cultures from the marine teleost, spot (*Leiostomus xanthurus*, Pisces: Sciaenidae). **Aquaculture**, v.132, p.59-72, 1995.

FONTAINE, Y. A. Adaptations *versus* accommodations: some neuroendocrine aspects in teleost fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.11, n. 1-6, p.147-154, 1993.

FREIRE, C. A.; CESTANI, M. M.; RANDI, M. A. F.; PELLETIER, É.; SANCHEZ-CHARDI, A.; AZEVEDO, M.; COSTA, J. R. M. A.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. O.. The traíra (*Hoplias malabaricus*, Characiformes) as a top food chain model for the toxicological evaluation of exposure to heavy metals on tropical freshwater environments. Manuscrito em preparação para publicação.

GUGUEN-GUILLOUZO, C. e CORLU, A. Recent progress on long-term hepatocyte primary culture: importance of cell microenvironments. **Cytotechnology**, v.11, p.3-5, 1993.

GUILLOUZO, A.; MOREL, F.; LANGOUËT, S.; MAHEO, K.; RISSEL, M. Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds. **J. hepatology**, v.26 (suppl. 2), p.73-80, 1997.

GUILLOUZO, A.; MOREL, F.; RATANASAVANH, D.; CHESNE, C.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Long-term culture of functional hepatocytes. **Toxic in vitro**, n. 4, v. 4/5, p.415-427, 1990.

MILLER, M. R.; SAITO, N.; BLAIR, J. B.; HINTON, D. E. Acetaminophen toxicity in cultured trout liver cells. II. Maintenance of cytochrome P450 1A1. **Exp. Molecular Pathology**, v.58, p.127-38, 1993.

PESONEN, M. e ANDERSSON, T. Primary hepatocyte cultures: an important model of xenobiotic metabolism. *Aquatic Toxicology*, v.39, p.253–267, 1997.

PESONEN, M. e ANDERSSON, T. Characterization and induction of xenobiotic metabolizing enzyme activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Xenobiotica*, v.21, p.461–471, 1991.

RIOS, F. S. A. **Metabolismo energético de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) (Erythridae) submetidas à privação de alimento e à realimentação.** São Carlos (SP), 2001. 104f. Tese (doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos.

SEDDON, W. L. e PROSSER, C. L. Non-enzymatic isolation and culture of channel catfish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.123A, p.9–15, 1999.

SEGNER, H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.120A, p.71–81, 1998.

SKETT, P. Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism: metabolism-based toxicity testing-solutions? *Toxicology in Vitro*, v.8, p. 491–504, 1994.

STEGEMAN, J. J.; MILLER, M. R.; WOODIN, B. R.; BLAIR, J. B. Effect of β -naphthoflavone on multiple cytochrome P450 forms in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Mar. Environmental Resources*, v.35, p.209, 1993.

VOGT, G. e SEGNER, H. Spontaneous formation of intercellular bile canaliculi and hybrid biliary-pancreatic canaliculi in co-culture of hepatocytes and exocrine pancreas cells from carp. *Cell Tissue Res*, v.289, p.191–194, 1997.

WALSH, P. J.; MOON, T. W.; MONMSEN, T. P. Interactive effects of acute changes in temperature and pH on metabolism in hepatocytes from the sea raven *Hemitripterus americanus*. *Physiol. Zoology*, v.58, p.727–735, 1985.

✓ **BIBLIOGRAFIA CITADA – trabalhos não consultados diretamente**

ABLETT, R. F.; TAYLOR, M. J.; SELIVONCHIK, D.P. The effect of high-protein and high-carbohydrate diets on Iodoinsulin binding in skeletal muscle plasma membranes and isolated hepatocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Br. J. Nutr.**, v.59, p.129-139, 1983.

AKIYAMA, S. K.; YAMADA, K. M. The interaction of plasma fibronectin with fibroblastic cells in suspension. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.4492-4500, 1985.

BAILEY, G. S.; TAYLOR, M. J.; SELIVONCHICK, D. P. Aflatoxin B, metabolism and DNA binding in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Carcinogenesis**, v.3, p.511-518, 1982.

BAIRD, W. M.; SMOLAREK, T. A.; PLAKUNOV, I.; HEVIZI, K.; KELLEY, J.; KLAUNIG, J. E. Formation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol glucuronide is a major pathway of metabolism of benzo[a]pyrene in cell cultures from bluegill fry and brown bullhead. **Symposium on Toxic Chemicals and Aquatic Life**, Seattle, WA, Sept. p.16-18, (Abstract), 1986.

BAKSI, S. M. e FRAZIER, J. M. A fish hepatocyte model for the investigation of the effects of Environmental contaminants. **Mar. Environ. Res.**, v. 243, p.141 –145, 1988.

BALDWIN, L. A. e CALABRESE, E. J. Gap junction-mediated intercellular communication in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. **Ecotoxicol. Environ Saf.**, v.28, p.201–207, 1994.

BALLATORI, N. e BOYER, J. L. Characteristics of L-alanine uptake in freshly isolated hepatocytes of elasmobranch *Raja erinacea*. **Am. J. Physiol.**, v.254, p.801-808, 1988.

BÉGUÉ, J. M.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; PASDELOUP, N.; GUILLOUZO, A. Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type. **Hepatology**, v.4, p.839-842, 1984.

BÉGUÉ, J. M.; LE BIGOT, J. F.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; KIECHEL, J. R.; GUILLOUZO, A. Cultured human adult hepatocytes: a new model for drug metabolism studies. **Biochemical Pharmacology**, v.32, p.1643-1646, 1983.

BERRY, M. N. e FRIEND, D. S. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. **J. Cell Biology**, v. 43, p.506–520, 1969.

BERRY, M. N.; EDWARDS, A. M.; BARRITT, G. J. **Isolated Hepatocytes: Preparations, Properties and Applications**. Amsterdam: Elsevier, 1991.

BHATTACHARYA, S.; PLISETSKAYA, E.; DICKHOFFAND, W. W.; GORBMAN, A. The effects of estradiol and triiodothyronine on protein synthesis by hepatocytes of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Gen. Comparative Endocrinology**, v.57, p.103-109, 1985.

BIRNBAUM, M. J.; SCHULTZ, J.; FAIN, J. N. Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes, **Am. J. Physiol.**, v.231, p.191 –197, 1976.

BISELL, D. M.; ARENSON, D. M.; MAHER, J. J.; ROLL, F. J. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. **J. Clin Invest**, v.79, p.801–812, 1987.

BLAIR, J. B.; MILLER, M. R.; PACK, D.; BARNES, R.; TEH, S. J.; HINTON, D. E. Isolated trout liver cells: establishing short-term primary cultures exhibiting cell-to-cell interactions. **In Vitro Cell Dev Biology**, v.26, p.237-249, 1990.

BLAIR, J. B.; OSTRANDER, G. K.; MILLER, M. R.; HINTON, D. E. Isolation and characterization of biliary epithelial cells from rainbow trout liver. **In Vitro Cell Dev Biology**, v.31, p.780-789, 1995.

BONNEY, R. J.; BECKER, J. E.; WALKER, R. R.; POTTER, V. R. Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis. **In Vitro**, v.9, p.399-413, 1974.

BOUCHE, G.; GAS, N.; PARIS, H. Isolation of carp hepatocytes by centrifugation on a discontinuous Ficoll gradient. A Biochemical and ultrastructural study. **Biology Cell**, v.36, p.17-29, 1979.

BRAUNBECK, T. e STORCH, V. Senescence of hepatocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in primary culture. An ultrastructural study. **Protoplasma**, v.170, p.138-159, 1992.

BRAUNBECK, T.; HAUCK, C.; SCHOLZ, S.; SEGNER, H. Mixed function oxidases in cultured fish cells: contribution of in vitro studies to the understanding of MFO induction. **Z. Angew Zoology**, v.81, p.55-72, 1996.

BRIGHENTI, L.; PUVIANI, A. C.; GAVIOLI, M. E.; OTTOLENGHI, C. Mechanisms involved in catecholamine effect on glycogenolysis in catfish isolated hepatocytes. **Gen. Comparative Endocrinology**, v.66, p.306-313, 1987.

CAMPBELL, J. W.; ASTER, P. L.; CASEY, C. A.; VORHABEN, J. E. Preparation and use of fish hepatocytes. *In: Isolation, characterization and use of hepatocytes*, edited by HARRIS, R. A. and CORNELL, N. W. Elsevier, New York, p. 31-40. 1983.

CAMPBELL, L. W.; ASTER, P. L.; VORHABEN, J. E. Mitochondrial ammoniogenesis in liver of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Am. J. Physiol.**, v.244, p.709-717, 1983.

CASEY, C. A.; PERLMAN, D.F.; VORHABEN, J. E.; CAMPBELL, J. W. Hepatic ammoniogenesis in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Molecular Physiology**, v.3, p.107-126, 1983.

CLAYTON, D. F. e DARNELL, J. E. Changes in liver-specific Compared to common gene transcription during primary culture of mouse hepatocytes. **Molecular Cell Biology**, v.3, p.1552-1561, 1983.

CLAYTON, D. F.; HARRELSON, A. L.; DARNELL, J. E. Dependence of liverspecific transcription on tissue organization. **Molecular Biology Cell**, v.5, p.2623-2632, 1985.

CLÉMENT, B.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; CAMPION, J. P.; GLAISE, D.; BOUREL, M.; GUILLOUZO, A. Long-term cocultures of adult human hepatocytes with rat liver epithelial cells: modulation of active albumin secretion and accumulation of extracellular material. **Hepatology**, v.4, p.373-80, 1984.

CLÉMENT, B.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; GRIMAUD, J. A.; RISSEL, M.; GUILLOUZO, A. Effect of hydrocortisone on deposition of types I and IV collagen in cultured rat hepatocytes. **Cell molecular Biology**, v.34, p.449-460, 1988.

COUCH, J. A. Spongiosis hepatitis: chemical induction, pathogenesis and possible neoplastic fate in a teleost fish model. **Toxicol. Pathology**, v.19, p.237-250, 1991.

CRAVEDI, J. P.; PARIS, A.; MONOD, G.; DEVAUX, A.; FLOURIOT, G.; VALOTAIRE, Y. Maintenance of cytochrome P450 content and phase I and phase II enzyme activities in trout hepatocytes cultured as spheroidal aggregates. **Comparative Biochem. Physiology**, v.113C, p.241-246, 1996.

DANNEVIG, B. H. e BERG, T. Endocytosis of galactose-terminated glycoproteins by isolated liver cells of the rainbow trout (*Salmo gairdner*). **Comparative Biochemical Physiology**, v.82B, p.683-688, 1985.

DAUJAT, M.; PICHARD, L.; DALET, C.; LARROQUE, C.; BONFILS, C.; POMPON, D.; LI, D.; GUZELIAN, P. S.; MAUREL, P. Expression of five forms of microsomal cytochrome P-450 in primary cultures of rabbit hepatocytes treated with various classes of inducers. **Biochemical Pharmacology**, v.36, p.3597-3606, 1987.

DeRENZIS, F. A. e SCHECHTMANN, A. Staining by neutral red and trypan blue in sequence for assaying vital and nonvital cultured cells. **Stain Technology**, v.48, p.135-136, 1973.

DIEGELMANN, R. F.; GUZELIAN, P. S.; GAY, R.; GAY, S. Collagen formation by the hepatocyte in primary monolayer culture and in vivo. **Science, N.Y.**, v.219, p.1343-1345, 1983.

DUAN, C.; HANZAWA, N.; TAKEUCHI, Y.; HAMADA, E.; MIYACHI, S.; HIRANO, T. Use of primary cultures of salmon hepatocytes for the study of hormonal regulation of insulin-like growth factor I expression in vitro. **Zool Sci.**, v.10, p.473-480, 1993.

DUNN, J. Y.; YARMUSH, M. L.; KOEBE, H. G.; TOMPKINS, R. G. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. **FASEB J.**, v.3, p.174-177, 1989.

FAHL, W. E.; MICHALOPOULOS, G.; SATTLER, G. L.; JEFSCOATE, C. R.; PITOT, H. C. Characteristics of microsomal enzyme controls in primary cultures of rat hepatocytes. **Archs Biochem. Biophys.**, v.192, p.61-72, 1979.

FLOURIOT, G.; VAILLANT, C.; SALBERT, G.; PELISSERO, C.; GUIRAUD, J. M.; VALOTAIRE, Y. Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates. **J. Cell Sci.**, v.105, p.407-416, 1993.

FOLIOT, A.; GLAISE, D.; ERLINGER, S.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Long-term maintenance of taurocholate uptake by adult rat hepatocytes co-cultured with a liver epithelial cell line. **Hepatology**, v.5, p.215-219, 1985.

FOSTER, G. D. e MOON, T. W. Cortisol and liver metabolism of immature American eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur). **Fish Physiol. Biochemistry**, v.1, p.113-123, 1986.

FOSTER, G. D. e MOON, T. W. Metabolism in Sea Raven (*Hemitripterus arnericanus*) hepatocytes: the effects of insulin and glucagon. **Gen. Comparative Endocrinology**, v.66, p.102-115, 1987.

FRASLIN, J. M.; KNEIP, B.; VAULONT, S.; GLAISE, D.; MUNNICH, A.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Dependence of hepatocyte specific gene expression on cell-cell interactions in primary culture. **EMBO J.**, v.4, p.2487-2491, 1985.

FRICKER, G.; HUGENTOBLER, G.; MEIER, P. J.; KURZ, G.; BOYER, J. L. Identification of a single sinusoidal bile salt uptake system in skate liver. **Am. J. Physiology**, v.253, p.3816-3822, 1987.

GAGNÉ, F.; MARION, M.; DENIZEAU, F. Metal homeostasis and metallothionein induction in rainbow trout hepatocytes exposed to cadmium. **Fund Appl Toxicology**, v.14, p.429-437, 1990.

GOULET, F.; NORMAND, C.; MORIN, O. Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes. **Hepatology**, v.8, p.1010-1018, 1988.

GRANT, M. H.; BURKE, M. D.; HAWSKWORTH, G. M.; DUTHIE, S. J.; ENGESET, J.; PETRIE, J. C. Human adult hepatocytes in primary monolayer culture. Maintenance of mixed function oxidase and conjugation pathways of drug metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v.36, p.2311-2316, 1987.

GUGUEN, C.; GUILLOUZO, A.; BOISNARD, M.; LE CAM, A.; BOUREL, M. Etude ultrastructurale de monocouches d'hépatocytes de rat adulte cultivés en présence d'hémisuccinate d'hydrocortisone. **Biol. Gastroenterology**, v.8, p.223-231, 1975.

GUGUEN-GUILLOUZO C.; SEIGNOUX, D.; COURTOIS, Y.; BRISSOT, P.; MARCEAU, N.; GLAISE, D.; GUILLOUZO, A. Amplified phenotypic changes in adult rat and baboon hepatocytes cultured on a Complex biomatrix. **Biology Cell**, v.46, p.11-20, 1982.

GUGUEN-GUILLOUZO, C. e GUILLOUZO, A. Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 5354, p.35-56, 1983.

GUGUEN-GUILLOUZO, C. Role of homotypic and heterotypic cell interactions in expression of specific functions by cultured hepatocytes. *In: Isolated and Cultured Hepatocytes*. Edited by GUILLOUZO, A. and GUGUEN-GUILLOUZO, C. p.271-296. Les Editions INSERM, Paris and John Libbey Eurotext, London, 1986.

GUGUEN-GUILLOUZO, C.; TICHONICKY, L.; SZAJNERT, M.; SCHAPIRA, F.; KRUH, J. Changes in some chromatin and cytoplasmic enzymes in primary cultures of adult rat hepatocytes. **Biology Cell**, v.31, p.225-234, 1978.

GUILLOUZO, A. Use of isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism and cytotoxicity studies. *In: Isolated and Cultured Hepatocytes*. Edited by GUILLOUZO, A. and GUGUEN-GUILLOUZO, C. p.313-331. Les Editions INSERM, Paris and John Libbey Eurotext, London, 1986.

GUILLOUZO, A.; BEAUNE, P.; GASCOIN, M. N.; BÉGUÉ, J. M.; CAMPION, J. P.; GUENGERICH, F. P.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Maintenance of cytochrome P-450 in cultured adult human hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, v.34, p.2991-2995, 1985.

GUILLOUZO, A.; BÉGUÉ, J. M.; MAURER, G.; KOCH, P. Identification of metabolic pathways of pindolol and fluperlapine in adult human hepatocyte cultures. **Xenobiotica**, v.18, p.131-139, 1988.

GUILLOUZO, A.; DELERS, F.; CLÉMENT, B.; BERNARD, N.; ENGLER, R. Long-term production of acute-phase proteins by adult rat hepatocytes co-cultured with another fiver cell type in serum-free medium. **Biochem. biophys. Res. Commun.**, v.120, p.311-317, 1984.

GUILLOUZO, A.; GRIPON, P.; RATANASAVAUH, D.; CLÉMENT, B.; GUGUEN-GUIUOUZO, C. Cultured human hepatocytes as a model system for man in pharmacotoxicological research. *In: Advances in Applied Toxicology*. Edited by DAYAN, A. D. and PAINE, A. J. vol. 1, p.77-103. Taylor & Francis Ltd, London, 1988.

GUMUCIO J. J. Hepatocyte heterogeneity: the coming of age from the description of a Biological curiosity to a partial understanding of its physiological meaning and regulation. *Hepatology*, v.9, p.154-160, 1989.

GUZELIAN, P. S.; BISSELL, D. M.; MEYER, U. A. Drug metabolism in adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Gastroenterology*, v.72, p.1232-1239, 1977.

HAGVE, T. A.; CHRISTOPHERSEN, B. O.; DANNEVIG, B. H. Desaturation and chain elongation of essential fatty acids in isolated liver cells from rat and rainbow trout. *Lipids*, v.21, p.202-205, 1986.

HAMPTON, J. A.; MCCUSKEY, P. M.; MCCUSKEY, R. M.; HINTON, D. E. Functional units in rainbow trout liver. I. Arrangement and histochemical properties of hepatocytes. *Anat Rec.*, v.213, p.166-175, 1985.

HASCHEMEYER, A. E. V. e DETRICH, H. W. Characteristics of leucine transport by isolated hepatocytes of antarctic fish at low temperatures. *Biochem. Biophys. Acta*, v.692, p.489-494, 1982.

HASCHEMEYER, A. E. V. e MATHEWS, R. W. Temperature dependency of protein synthesis in isolated hepatocytes of antarctic fish. *Physiol. Zoology*, v.56, p.78-87, 1983.

HAYASHI, S. e OOSHIRO, Z. Gluconeogenesis in isolated liver cells of the eel, *Anguilla japonica*. *J. Comparative Physiology*, v.132, p.343-350, 1979.

HAZEL, J. R. e PROSSER, C. L. Incorporation of l-¹⁴C-acetate into fatty acids and sterols by isolated hepatocytes of thermally acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Comparative Physiology*, v.134, p.321-329, 1979.

HAZEL, J. R. e SELLNER, P. A. Fatty acid sterol synthesis by hepatocytes of thermally acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Zoology*, v.209, p.105-114, 1979.

HAZEL, J. R. The incorporation of unsaturated fatty acids of the n-9, n-6 and n-3 families into individual phospholipids by isolated hepatocytes of thermally-acclimated rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Zoology*, v.227, p.167-176, 1983.

HAZEL, J. R.; HAGAR, A. F.; PRUITT, N. L. The temperature dependence of phospholipid deacylation/reacylation in isolated hepatocytes of thermally acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Biochem. Biophys. Acta*, v.918, p.149-158, 1987.

HOOVER, K. L. Use of small fish species in carcinogenicity testing. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, v.65, 409p. 1984.

HOWARD, R. B.; CHRISTENSEN, A. K.; GIBBS, F. A.; PESCH, L. A. The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *Journal of Cell Biology*, v.35, p.675-684, 1967.

HUSOY, A. M.; MYERS, M. S.; WILLIS, M. L.; COLLIER, T. K.; CELANDER, M.; GOKSOYR, A. Immunohistochemical localization of CYP1A and CYP3A-like isoenzymes in

hepatic and extrahepatic tissues of Atlantic cod, (*Gadus morhua* L.), a marine fish. **Toxicology Appl. Pharmacology**, v.129, p.294-308, 1994.

HYLLNER, S. J.; ANDERSSON, T.; HAUX, C.; OLSSON, P. E. Cortisol induction of metallothionein in primary culture of rainbow trout hepatocytes. **J. Cell Physiology**, v.139, p.24-28, 1989.

ISOM, H. C.; SECOTT, T.; GEORGOFF, I.; WOODWORTH, C.; MUMMAW, J. Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v.82, p.3252-3256, 1985.

JANKOWSKY, H. D.; HOTOPP, W.; VSIANSKY, P. Effects of assay and acclimation temperatures on incorporation of amino acids into protein of isolated hepatocytes from the European eel, *Anguilla anguilla*. **J. Therm. Biology**, v.6, p.201-208, 1981.

JEFFERSON, D. M.; CLAYTON, D. F.; DARNELL, J. E.; REID, L. M. Post-transcriptional modulation of gene expression in cultured rat hepatocytes. **Molecular cell. Biology**, v.4, p.1929-1934, 1984.

JUNGERMANN, K. e KATZ, N. Functional specialization of different hepatocyte populations. **Physiol. Rev.**, v.69, p.708-764, 1989.

KANEKO, Y.; IGARASHI, M.; IWASHITA, M.; SUZUKI, K.; KOJIMA, H.; KIMURA, S.; HASOBE, M. Effects of fish and calf type I collagens as culture substrate in the adhesion and spreading process of established fish cells. **In Vitro Cell Dev Biology**, v.31, p.178-182, 1995.

KENT, J. e PROSSER, C. L. Effects of incubation and acclimation temperatures on incorporation of U-[4]glycine into mitochondrial protein of liver cells and slices from green sunfish, *Lepomis vanellus*. **Physiological Zoology**, v.53, p.293-304, 1980.

KLAASEN, C. D. e STACEY, N. H. Use of isolated hepatocytes in toxicity assessment. *In: Toxicology of the Liver*, edited by PLAA, G. and HEWITT, W. R. Raven Press, New York, p.147-179, 1982.

KLAUNIG, J. E.; RUCH, R. J.; GOLDBLATT, P. J. Trout hepatocyte culture: isolation and primary culture. **In Vitro Cell. Dev. Biology**, v.21, p.221-228, 1985.

KLEINMAN, H.; CANNON, F. B.; LAURIE, G. W.; HASSEL, J. R. Biological activities of laminin. **J. Cell Biochem.**, v.27, p.317-325, 1985.

KOBAN, M. Can cultured teleost hepatocytes show temperature acclimation? **Am. J. Physiology**, v.250, p.211-220, 1986.

KOBAN, M.; GRAHAM, G.; PROSSER, C. L. Induction of heat-shock protein synthesis in teleost hepatocytes: effects of acclimation temperature. **Physiol. Zoology**, v.60, p.290-296, 1987.

KOCAL, T.; QUINN, B. A.; SMITH, I. R.; FERGUSON, H. W.; HAYES, M. A. Use of trout serum to prepare primary attached monolayer cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **In Vitro Cell Dev Biology**, v.24, p.304-308, 1988.

LANDRY, J.; BERNIER, O.; OUELLET, C.; GOYETTE, R.; MARCEAU, N. Spheroideal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganisation, biomatrix deposition and maintenance of functional activities. **J. Cell Biology**, v.101, p.914-923, 1985.

LEBRETON, J. P.; DAVEAU, M.; HIRON, M.; FONTAINE, M.; BIOU, M.; GILBERT, D.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Long-term biosynthesis of Complement Component C3 and alpha-1 glycoprotein by adult rat hepatocytes in a co-culture system with an epithelial cell type. *Biochemistry*, v.235, p.421-427, 1986.

LI, A. P.; COLBURN, S. M.; BECK, D. J. A simplified method for the culturing of primary adult rat and human hepatocytes as multicellular spheroids. *In Vitro Cell Develop Biology*, v.28A, p.673-677, 1992.

LIPSKY, M. M.; SHERIDAN, T. R.; BENNETT, R. O.; MAY, E. B. Comparison of trout hepatocyte culture on different substrates. *In vitro cell dev. Biology*, v.22, p.366-362, 1986.

LUETTEKE, N. C.; MICHALOPOULOS, G. K. Control of hepatocytes proliferation in vitro. *In: The Isolated Hepatocyte: Use in Toxicol and Xenobiotic Biotransformations*, edited by RAUCKMAN, E. J. and PADILLA, G. M. Academic Press, Orlando, p.93-118, 1987.

MAC GOWAN, J. A. Hepatocyte proliferation in culture. *In: Isolated and Cultured Hepatocytes*, edited by GUILLOUZO, A. and GUGUEN-GUILLOUZO, C. Les Editions INSERM, John Libbey Eurotext, Paris, p.13-38; 1986.

MAITRE, J. L.; VALOTAIRE, Y.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Estradiol stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biology*, v.22, p.337-343, 1986.

MARCEAU, N., NOEL, M.; DESCHENES, J. Growth and functional activities of neonatal and adult rat hepatocytes cultured on fibronectin-coated substratum in serum-free medium. *In Vitro*, v.18, p.1-11, 1982.

MARION, M. e DENIZEAU, F. Cytotoxic effects of heavy metal mixtures on trout hepatocytes in culture. *4th International Congress of Cell Biology*. (Abstract), 1988.

MASLANSKY, C. J. e WILLIAMS, G. M. Primary cultures and the levels of cytochrome P-450 in hepatocytes from mouse, rat, hamster and rabbit liver. *In Vitro*, v.18, 663-593, 1982.

MICHALOPOULOS, G. e PITOT, H. C. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. *Expl Cell Res.*, v.94, p.70-78, 1975.

MOERLAND, T. S. e SIDELL, B. D. Characterization of metabolic carbon flow in hepatocytes isolated from thermally acclimated killifish *Fundulus heteroclitus*. *Physiol. Zoology*, v.54, p.379-389, 1981.

MOMMSEN, T. P. Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes. *Can. J. Zoology*, v.64, p.1110-1115, 1986.

MOMMSEN, T. P. e LAZIER, C. B. Stimulation of estrogen receptor accumulation by estradiol in primary cultures of salmon hepatocytes. *FEBS Lett.*, v.195, p.269-271, 1986.

MOMMSEN, T. P. e MOON, T. W. The metabolic potential of hepatocytes and kidney tissue in the little skate, *Raja erinacea*. *J. Exp. Zoology*, v.244, 1-8, 1987.

MOMMSEN, T. P. e SUAREZ, R. K. Control of gluconeogenesis in rainbow trout hepatocytes: role of pyruvate branchpoint and phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle. *Molecular Physiology*, v.6, p.9-18, 1984.

- MOMMSEN, T. P.; DANULAT, E.; GAVIOLI, M. E.; FOSTER, D. G.; MOON, T. W. Separation of enzymatically distinct populations of trout hepatocytes. **Can. J. Zoology**, v.69, p.420-426, 1991.
- MOMMSEN, T. P.; MOON, T. W.; WALSH, P. J. Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Analytical Techniques**, edited by HOCHACHKA, P. W. and MOMMSEN, T. P. Elsevier, Amsterdam. v. 3, p.355-372, 1994.
- MOMMSEN, T. P.; WALSH, P. J.; MOON, T. W. Gluconeogenesis in hepatocytes and kidney of atlantic salmon. **Molecular Physiology**, v.8, p.89-100, 1985.
- MOMMSEN, T. P.; WALSH, P. J.; PERRY, S. F.; MOON, T. W. Interactive effects of catecholamines and hypercapnia on glucose production in isolated trout hepatocytes. **Gen. Comparative Endocrinology**, v.69, p. 1-11, 1988.
- MOON, T. W.; WALSH, P. J.; MOMMSEN, T. P. Fish hepatocytes: A model metabolic system. **Can. J. Fish. Aquatic. Sci.**, v.42, p.1772-1782, 1985.
- MOON, T. W.; WALSH, P. J.; MOMMSEN, T. P. Fish hepatocytes: a model metabolic system. **Can J. Fish Aquatic Sci.**, v.42, p.1772-1782, 1965.
- MOONEY, D.; HANSEN, L.; VACANTI, J.; LANGER, R.; FARMER, S.; INGBER, D. Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix. **Journal of Cell Physiology**, v.151, p.497-505, 1992.
- MORRISON, H.; YOUNG, P.; GEORGE, S. Conjugation of organic compounds in isolated hepatocytes from a marine fish, the plaice, *Pleuronectes platessa*. **Biochem. Pharmacology**, v.34, p.3933-3938, 1985.
- NAKAMURA, T.; TOMITA, Y.; ICHIHARA, A. Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. **J. Biochemistry**, v.94, p.1029-1035, 1983.
- NAMIKI, M.; DEGAWA, M.; MASUKO, T.; HASHIMOTO, Y. Changes in the quantity and activity of cytochrome P-450 isozymes in primary cultured rat hepatocytes. **Jap. J. Cancer Res.**, v.80, p.126-131, 1989.
- O'GRADY, S. M.; CLARKE, A.; DEVRIES, A. L. Characterization of glycoprotein antifreeze biosynthesis in isolated hepatocytes from *Pagothenia borchgrevinki*. **J. Exp. Zoology**, v.220, p.179-189, 1982.
- OTTOLENGHI, C.; PUVIANI, A. C.; BARUFFALDI, A.; BRIGHENTI, L. Effect of insulin on glycogen metabolism in isolated catfish hepatocytes. **Comparative Biochem. Physiology**, v.78A, p.705-710, 1984.
- OTTOLENGHI, C.; RICCI, D.; GAVIOLI, M. E.; PUVIANI, A. C.; FABBRI, E.; CAPUZZO, A.; BRIGHENTI, L. Separation of two populations of fish hepatocytes by digitonin infusion: some metabolic patterns and hormonal responsiveness. **Can. J. Zoology**, v.69, p.427-435, 1991.
- PAINE, A. J.; HOCKIN, L. J. The maintenance of cytochrome P-450 in liver cell culture: recent studies on P-450-mediated mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v.25, p.41-45, 1982.

- PAULSSON, M.; AUMAILLEY, M.; DEUTZMANN, R.; TIMPL, R.; BECK, R. Laminin-nidogen complex: Extraction with chelating agents and structural characterization. **Eur. J. Biochem.**, v.166, p.11-19, 1987.
- PETERSEN, T. D. P.; HOCHACHKA, P. W.; SUAREZ, R. K. Hormonal control of gluconeogenesis in rainbow trout hepatocytes: regulatory role of pyruvate kinase. **J. Exp. Zoology**, v.243, p.173-180, 1987.
- PLISETSKAYA, E. M.; FABBRI, E.; MOON, T. W.; GUTIERREZ, J.; OTTOLENGHI, C. Insulin binding to isolated hepatocytes of Atlantic salmon and rainbow trout. **Fish Physiol. Biochem.**, v.11, p.401-409, 1993.
- PLISETSKAYA, E.; BHATTACHARYA, S.; DICKHOFF, W. W.; GORBMAN, A. The effect of insulin on aminoacid metabolism and glycogen content in isolated liver cells of juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Comparative Biochem. Physiology**, v.78A, p.773-778, 1984.
- PORTHE-NIBELLE, J. e LAHLOU, B. Mechanisms of glucocorticoid uptake by isolated hepatocytes of the trout. **Comparative Biochemistry. Physiology**, v.69B, p.425-433, 1981.
- RABERGH, C. M. I.; KANE, A. S.; REIMSCHUESSEL, R.; LIPSKY, M. M. Viability and induction of tyrosine aminotransferase in rainbow trout hepatocytes cultured on laminin and polylysine in a serum-free medium. **Meth. Cell Sci.**, v.17, p.207-215, 1995.
- RANDALL, D. J. e HOAR, W. S. Special Techniques. *In: Fish physiology*, vol VI, edited by HOAR, W. S. and RANDALL, D. J. Academic Press, New York, p. 511-528, 1971.
- RENAUD, J. M. e MOON, T. W. Starvation and the metabolism in hepatocytes isolated from the American eel, *Anguilla rostrata* LeSueur. **J. Comparative Physiology**, v.135, p.127-137, 1980.
- ROJKIND, M.; GATMAITAN, Z.; MACKENSEN, S.; GIAMBRONE, M. A.; PONCE, P.; REID, L. M. Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. **J. Cell Biology**, v.87, p.255-263, 1980.
- SAEZ, L.; GOICOECHEA, O.; AMTHAUER, R. Behavior of RNA. and protein synthesis during the acclimatization of the carp. Studies with isolated hepatocytes. **Comparative Biochem. Physiology**, v.72B, p.31-38, 1982.
- SEGLAN, P. O. Preparation of isolated liver cells. **Methods Cell Biology**, v. 13, p.29-83. 1976.
- SEGLAN, P. O. Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca^{+2} on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. **Exp. Cell Res.**, v.74, p.450-454, 1972.
- SEGLAN, P. O. Preparation of rat liver cells. II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion. **Exp. Cell Res.**, v.76, p.25-30, 1973.
- SEGLAN, P. O. Preparation of rat liver cells. II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion. **Exp. Cell Res.**, v.76, p.25-30, 1972.
- SEGNER, H. e BRAUNBECK, T. Hepatocellular adaption to extreme nutritional conditions in ide, *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. **Fish Physiol. Biochem.**, v.5, p.79-97, 1988.
- SEGNER, H.; BÖHM, R.; KLOAS, W. Binding and bioactivity of insulin in primary cultures of carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes. **Fish Physiol. Biochem.**, v.11, p.411-420, 1993.

- SEGNER, H.; SCHOLZ, S.; BÖHM, R. Carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes in primary culture: morphology and metabolism. **Actes du Colloque** (Editions de L. IFREMER), v.18, p.77-82, 1995.
- SEIBERT, H. Viability control and oxygen consumption of isolated hepatocytes from thermally acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comparative Biochem. Physiology**, v.80B, p.677-683, 1985.
- SHERRATT, A. J. e DAMANI, L. A. Activities of cytosolic and microsomal drug oxidases of rat hepatocytes in primary culture. **Drug Metab. Dispos.**, v.17, p.20-25, 1989.
- SHIMBARA, N.; TAKASHIMA, M.; SATO, C.; IIZUKA, M.; KOBAYASHI, S.; TANAKA, K.; ICHIHARA, A. *C-Myc* expression is down-regulated by cell-cell and cell-extracellular matrix contacts in normal hepatocytes but not in hepatoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.184, p.825-831, 1992.
- SHUTTLEWORTH, T. J. e GOLDSTEIN, L. Fl-Alanine transport in the isolated hepatocytes of the elasmobranch *Raja erinacea*. **J. Exp. Zoology**, v.231, p.39-44, 1984.
- SHUTTLEWORTH, T. J. e GOLDSTEIN, L. Transport of 8-alanine in isolated skate hepatocytes. **Bull. Mt.Desert Isl. Biology Lab.**, v.22, p.15-18, 1982.
- SIGEL, M. M. e BEASLEY, A. R. Trypsin C. Marine teleost fish tissues. *In: Tissue culture methods and applications*, edited by KRUSE, P. F. and PATTERSON, M. D. Academic Press, New York, p.12-14, 1973.
- SIMON, E. Subcellular distribution of ATP and ADP in isolated hepatocytes of rainbow trout. **Comparative Biochem. Physiology**, v.80B, p.573-576, 1985.
- SINGH, Y.; COOKE, J. B.; HINTON, D. E.; MILLER, M. G. Trout liver slices for metabolism and toxicity studies. **Drug Metab. Dispos.**, v.24, p.7-14, 1996.
- SIRICA, A. E. e PITOT, H. C. Drug metabolism and effects of carcinogens in cultured hepatic cells. **Pharmac. Rev.**, v.31, p.205-228, 1980.
- SIRICA, A. E.; RICHARDS, W.; TSUKADA, Y.; SATTLER, C. A.; PITOT, H. C. Fetal phenotypic expression by adult rat hepatocytes on collagen gel/nylon meshes. **Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.**, v.73, p.283-287, 1979.
- SMITH, D. J.; GROSSBARD, M.; GORDON, E. R.; BOYER, J. L. Taurocholate uptake by isolated skate hepatocytes: effect of albumin. **Am. J. Physiology**, v.252, p.478-484, 1987.
- SMOLAREK, T. A.; BAIRD, W. M.; MORGAN, S.; FERIN, M.; NISHIMOTO, M.; STEIN, J. E.; VARANASI, U.; KLAUNIG, J. E. Metabolic activation of benzo(a)pyrene (BaP) to DNA-binding metabolites in primary hepatocyte cultures from fish. **American Association for Cancer Research, Annual Meeting**, v. 2459 (Abstr.), 1988.
- SPRAY, D. C.; FUJITA, M.; SAEZ, J. C.; CHOI, H.; WATANABE, T.; HERTZBERG, E.; ROSENBERG, L. C.; REID, L. M. Proteoglycans and glycosaminoglycans induce gap junction synthesis and function in primary liver cultures. **J. Cell Biology**, v.105, p.541-551, 1987.
- STEWARD, A. R.; DANNAN, G. A.; GUZELIAN, P. S.; GUEN-GERICH, F. P. Changes in the concentration of seven forms of cytochrome P-450 in primary cultures of adult rat hepatocytes. **Molecular Pharmacology**, v.27, p.125-132, 1985.

STRICKER, B. H. C. e SPOELSTRA, P. **Drug-induced Hepatic Injury**. Elsevier, Amsterdam, 1985.

STROM, S. C.; MONTEITH, D. K.; MONOHARAN, K.; NOVOTNY, A. Genotoxicity studies with human hepatocytes. *In: The Isolated Hepatocyte: Use in Toxicol and Xenobiotic Biotransformations*, edited by RAUCKMAN, E. J. and PADILLA, G. M. Academic Press, Orlando, p. 265-280, 1987.

SUOLINNA, E. M. Isolation and culture of liver cells and their use in the Biochemical research of xenobiotics. *Med. Biology*, v.60, p.237-254, 1982.

TOCHER, D. R.; SARGENT, J. R.; FRERICHS, G. W. The fatty acid Composition of established fish cell lines after long-term culture in mammalian sera. *Fish Physiol. Biochem.*, v.5, p.219-227, 1988.

TONG, J. Z.; DE LAGUSIE, P.; FURLAN, V.; CRESTEIL, T.; BERNARD, O.; ALVAREZ, F. Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids. *Exp. Cell Res.*, v.200, p.320-332, 1992.

TYSON, C. A. e GREEN, C. E. Cytotoxicity measures: choices and methods. *In: The isolated hepatocyte: use in toxicology, and xenobiotic biotransformations*, edited by RAUCKMAN, E. J. and PADILLA, G. M. Academic Press, Inc., Orlando, FL, p.119-158, 1987.

VAN WAARDE, A. e KESBEKE, F. Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.) influence of added substrates and enzyme inhibitors on ammonia production of isolated hepatocytes. *Comparative Biochem. Physiology*, v.70B, p.499-507, 1981.

VILLA, P. e GUAITANI, A. Effects and possible mechanism of action of DMSO on monooxygenase activities in cultured rat hepatocytes. *In: Proceedings of the Fifth International Workshop on In Vitro Toxicology*, Germany. p.213, 1988.

VONEN, B. e MORLAND, J. Isolated rat hepatocytes in suspension: potential hepatotoxic effects of six different drugs. *Archs Toxicology*, v.56, p.33-37, 1984.

VOSS, B.; JANKOWSKY, H. D.; WEDDIGEN, P. Temperature dependence of lipogenesis in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochem. Physiology*, v.83B, p.13-22, 1986.

WALSH, P. J. Ionic requirements for intracellular pH regulation in rainbow trout hepatocytes. *Am. J. Physiology*, v.250, p.24-29, 1986.

WALSH, P. J. Lactate uptake by toadfish hepatocytes: passive diffusion is sufficient. *J. Exp. Biology*, v.130, p.295-304, 1987.

WALSH, P. J.; MOMMSEN, T. P.; MOON, T. W.; PERRY, S. F. Effects of acid-base variables on in vitro hepatic metabolism in rainbow trout. *J. Exp. Biology*, v.L38, p. 1-11, 1989.

WALTON, M. J. e COWEY, C. B. Gluconeogenesis by isolated hepatocytes from rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comparative. Biochem. Physiology*, v.62, p.75-79, 1979.

WOLF, K. e QUIMBY, M. C. Fish cell and tissue culture. *In: Fish physiology*, edited by HOAR, W. S. and RANDALL, D. J. Academic Press, New York, p.253-305, 1969.

YU, F. G.; ANDO, S.; HAYASHI, S. Characterization of lipoprotein secreted by cultured eel hepatocytes and its Comparison with serum lipoproteins. **Cell Struct. Funct.**, v.16, p.347-355, 1991.

ZIMMERMAN, H. J. Chemical hepatic injury and its detection. *In: Toxicology of the Liver*, edited by PLAA, G. and HEWITT, W. R.. Raven Press, New York, p.1-45, 1982.