

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO EDUARDO LEAL NICOLUZZI



**VIABILIDADE DO FÍGADO BIOARTIFICIAL
UTILIZANDO HEPATÓCITOS HUMANOS
IMUNOPROTEGIDOS POR MACROENCAPSULAÇÃO**

**CURITIBA
2.002**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

João Eduardo Leal Nicoluzzi

**VIABILIDADE DO FÍGADO BIOARTIFICIAL
UTILIZANDO HEPATÓCITOS HUMANOS
IMUNOPROTEGIDOS POR MACROENCAPSULAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a obtenção do
grau acadêmico de Doutor.

Coordenador : Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos

Orientador : Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha

Co-orientador : Dr. João Carlos Domingues Repka

**Curitiba
2.002**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

Ata do julgamento da 61ª tese de doutorado e do 266º do Curso para conclusão do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Nível Doutorado da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno: Dr. João Eduardo Leal Nicoluzzi com o título: "VIABILIDADE DO FÍGADO BIOARTICIAL UTILIZANDO HEPATÓCITOS HUMANOS IMUNOPROTEGIDOS POR MACROENCAPSULAÇÃO", tendo como orientador o Prof. Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha e Co-orientador Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, realizada em quatro de abril de dois mil e dois.

Às oito horas do dia quatro de abril de dois mil e dois, no Auditório do 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná, teve início a prova em epígrafe, constituída a Comissão Examinadora pelos Professores: Renato F. Silva, Marcel Cerqueira Cesar Machado, Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas, Jorge Eduardo Fouto Matias e Júlio Cesar Uili Coelho, sendo este último Presidente da Comissão. Aberta a sessão foi apresentada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Comissão convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Comissão Examinadora, obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Comissão Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto necessário. Os conceitos e notas atribuídos foram: Prof. Dr. Renato F. Silva: conceito "A" e equivalência "10"; Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado: conceito "A" e equivalência "10"; Prof. Dr. Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas: conceito "A" e equivalência "10"; Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias: conceito "A" e equivalência "10"; Prof. Dr. Julio Cesar Uili Coelho: conceito "A" e equivalência "10". Voltando a sala de sessão, o senhor Presidente da Comissão leu os conceitos do Parecer Conjunto, dando como final o conceito "A" e equivalência a "10", e a recomendação de que a tese com o título já referido, possa ser publicada na forma final nos meios de divulgação científica adequados, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos componentes da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Renato F. Silva

Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado

Prof. Dr. Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas

Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Prof. Dr. Júlio Cesar Uili Coelho



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA COMISSÃO EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**

Aluno: **JOÃO EDUARDO LEAL NICOLUZZI**


Título da Tese: **“VIABILIDADE DO FÍGADO BIOARTICIAL
UTILIZANDO HEPATÓCITOS HUMANOS IMUNOPROTEGIDOS
POR MACROENCAPSULAÇÃO**

CONCEITOS EMITIDOS:

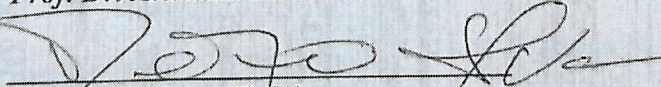
<i>Prof. Dr. Alexandre Coutinho T. de Freitas</i>	- Conceito emitido	A	Equivalência	10
<i>Prof. Dr. Renato F. Silva</i>	- Conceito emitido	A	Equivalência	10
<i>Prof. Dr. Jorge Eduardo Foto Matias</i>	- Conceito emitido	A	Equivalência	10
<i>Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado</i>	- Conceito emitido	A	Equivalência	10
<i>Prof. Dr. Julio Cesar Uili Coelho</i>	- Conceito emitido	A	Equivalência	10

Conceito Final de Avaliação: A

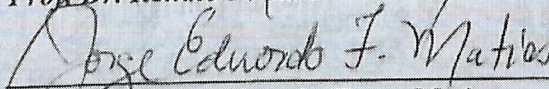
Curitiba, 4 de abril de 2002




Prof. Dr. Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas



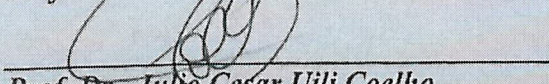
Prof. Dr. Renato F. Silva



Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias



Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado



Prof. Dr. Julio Cesar Uili Coelho

Dedicatória

Aos meus pais Adolar e Ilésia, minha irmã Andréa, minha esposa Luciane e meus filhos Augusto e Arthur.

Agradecimentos

Consigo aqui, cumprindo um dever gratíssimo, meus agradecimentos àqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para a minha formação como Médico-Cirurgião ou na elaboração deste trabalho.

Ao Laboratório de Cirurgia experimental do Hôpital Saint-Antoine, Unité 402 INSERM, pelas condições ideais de pesquisa e de treinamento vividas por mim durante um ano.

Ao Departamento de Pós-Graduação em Clínica-Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná pela minha acolhida entre seus alunos.

Ao Doutor Adolar Nicoluzzi que participou ativamente em todas etapas da minha formação tendo sido fundamental na minha constituição tanto como pessoa quanto como cirurgião a quem tudo devo.

Ao Doutor Gerson Laux por toda sua dedicação aos residentes do Hospital Cajuru tendo jamais hesitado em prestar sua ajuda nos momentos mais difíceis. Que ele saiba que lhe sou extremamente agradecido por tudo. Foi um prazer todos os plantões juntos.

Ao Doutor Pedro Caron responsável pela minha confirmação como cirurgião proporcionando todas as condições para meu pleno desenvolvimento cirúrgico. Sem ele jamais poderia ter aplicado tudo que aprendi.

Ao Professor Doutor Giocondo Villanova Artigas responsável pela minha ida à França e grande incentivador de todos os meus sonhos.

Ao Professor Rolland Parc, Hôpital Saint-Antoine, que me acolheu em seu serviço com grande receptividade tendo sido responsável pela minha formação em cirurgia digestiva.

Ao Professor Didier Houssin, Hôpital Cochin, responsável pela minha formação em transplante hepático adulto e por toda sua disponibilidade.

Ao Professor Jean-Bernard Otte, Hôpital Saint-Luc, que durante o período que estivemos juntos foi uma honra ter sido formado por alguém tão expressivo quanto ele no mundo do transplante.

Ao Doutor Nidal Denhi, Hôpital Saint-Antoine, por todo seu apoio durante todos os anos no exterior e por todas as portas que ele me abriu, aproveito aqui para lhe ser eternamente grato.

Ao Professor João Carlos Repka, que com seu grande bom humor e competência foi fundamental para o complemento desta tese.

A Doutora Véronique Barbu, Hôpital Saint-Antoine, principal responsável no auxílio à execução deste trabalho.

Ao Professor Doutor Luís Carlos Rocha, por ter aceitado me orientar neste trabalho.

	Lista de Abreviaturas	
	Lista de Tabelas	
	Lista de Figuras	
	Resumo	
	Abstract	
1	Introdução	1
2	Revisão da Literatura	3
3	Material e Método	19
	3.1. Delineamento Experimental	19
	3.2. Animais	20
	3.3. Isolamento de Hepatócitos Humanos	20
	3.4. Encapsulação	22
	3.4.1. Material	22
	3.4.2. Macroencapsulação	22
	3.5. Procedimento cirúrgico para implantação intra-abdominal de hepatócitos encapsulados	23
	3.6. Avaliação Morfológica	23
	3.7. Extração de ARN/ADN	24
	3.8. Reação em Cadeia da Polimerase (RT PCR)	25
	3.8.1. Transcrição reversa do ARN	25
	3.8.2. Amplificação do ADNc por PCR	26
	3.8.3. Detecção dos produtos amplificados	27
	3.9. Northern Blot	29
	3.10. Método Estatístico	31
4	Resultados	32
5	Discussão	41
6	Conclusões	47
	Referências Bibliográficas	48

Lista de Abreviaturas

HEPES	-	[N-(2-Hydroxyetil) piperazina N'-2 ácido etanosulfônico]
THI	-	Transplante de hepatócitos Isolados
p/v	-	Peso em relação a volume
UI/l	-	Unidade internacional por litro
mM	-	Milimolar
μUI	-	Micro unidades internacionais
rpm	-	Rotações por minuto
Å	-	Ângstrons
μl	-	Microlitros
PBS	-	Solução salina tamponada e fosfatada
xg	-	Gravidade
ADN	-	Ácido Desoxirribonucléico
ARN	-	Ácido Ribonucléico
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
β2m	-	Beta 2 microglobulina
μM	-	Micromol
Alb	-	Albumina
N	-	Normal
mCi/ml	-	Milicurie por mililitro
D	-	dia
CMH	-	Complexo maior de histocompatibilidade

Lista de Tabelas

Tabela 1	Demonstrativo do delineamento experimental	19
Tabela 2	Composição da solução tampão para a dissociação do tecido hepático	20
Tabela 3	Composição da solução enzimática	21
Tabela 4	Composição do líquido de Carlson (pH 7,42)	24
Tabela 5	Composição da solução tampão de transcrição reversa ...	26
Tabela 6	Composição da solução tampão para reação em cadeia de polimerase para albumina e β_2 microglobulina	26
Tabela 7	Meio de pré-hibridação e hibridação dos produtos amplificados	28
Tabela 8	Composição do meio de pré-hibridação para northern blot	30
Tabela 9	Meio de hibridação para northern blot	30

Lista de Figuras

Figura 1	Aspecto da fibra pronta para a implantação em ratos	23
Figura 2	Dia 0 - (A) Fotomicrografia de hepatócitos encapsulados aderidos à parte interna da fibra (B) Hepatócitos Binucleados	32
Figura 3	Dia 3 - Fotomicrografia de hepatócitos organizados em camadas	33
Figura 4	Dia 3 - Fotomicrografia de hepatócitos encapsulados demonstrando organelas intracelulares preservadas. (A) hepatócitos iniciando a formação de canalículos biliares. (B) Retículo endoplasmático rugoso	34
Figura 5	Dia 7 - Fotomicrografia de hepatócitos encapsulados. (A) hepatócitos em lise. (B) hepatócitos viáveis	35
Figura 6	Dia 14 - Fotomicrografia de hepatócitos encapsulados. (A) reação inflamatória na parte externa da fibra. (B) hepatócitos em vias de lise	36
Figura 7	Qualidade dos ADN extraídos	37
Figura 8	Resultados RT PCR para Albumina (157 pares de bases) e β_2 microglobulina (114 pares de bases)	39
Figura 9	Detecção do ARNm da albumina por northern Blot	40

Resumo

Introdução : O transplante de hepatócitos xenogênicos, encapsulados em membranas semi-permeáveis, pode ser utilizado no futuro em situações tais como em uma insuficiência hepática fulminante. Porém, em um estudo anterior foi observada uma perda precoce da expressão de genes hepatocitários específicos em hepatócitos humanos encapsulados. **Objetivo** : O objetivo portanto do presente trabalho é o de avaliar o papel da resposta imunológica ao transplante de hepatócitos encapsulados nesta perda da expressão genética. **Método** : Os hepatócitos humanos foram isolados a partir de fragmentos hepáticos, encapsulados em fibras e transplantados em ratos imunocompetentes. Nos dias 03, 07 e 14 após o transplante, as fibras foram coletadas. A morfologia e a expressão dos genes foram comparadas aos dos hepatócitos encapsulados e não transplantados do início do experimento (D-0). O mRNA da albumina humana foi quantificado tanto por RT-PCR quanto por Northern blot. A resposta imunológica contra os hepatócitos foi avaliada através do ADN hepatocitário na busca de apoptose do núcleo celular e pelo aumento da expressão do CMH de classe I. **Resultados** : Os aspectos morfológicos dos hepatócitos, avaliados por microscopia óptica e eletrônica, mantiveram-se até o sétimo dia após o transplante. Não observou-se a presença de células envolvidas com a resposta imunológica do receptor no interior das fibras. Os transcritos da albumina foram detectados até dia 14. Entre os dias 03 e 07, os transcritos eram de 30% em relação ao dia 0. A análise do DNA hepatocitário mostrou bandas bem preservadas sem a presença de fenômenos de apoptose nos diferentes dias de avaliação. Não ocorreu aumento da expressão do CMH de classe I. **Conclusões**: Este trabalho permite demonstrar que os hepatócitos humanos encapsulados e transplantados em ratos permanecem viáveis apesar de uma diminuição da expressão de determinados genes. Este fenômeno porém, não se deve à uma resposta imunológica do receptor, mas sobretudo ao próprio processo de isolamento celular. A fase seguinte deverá provavelmente ser a análise do comportamento deste modelo numa situação de insuficiência hepática aguda fulminante.

Palavras-chave : Transplante ; Hepatócito ; Fígado Artificial ; Biomateriais.

Abstract

Background: Xenogeneic hepatocytes encapsulated in semipermeable membranes could be used in the future for the treatment of acute liver failure. However, in a previous study encapsulated human hepatocytes presented an early decrease of hepatocyte specific gene expression. **Aims:** The purpose of this study is to investigate the immunological consequences of intraperitoneal implantation of encapsulated xenogeneic hepatocytes on gene expression. **Method:** Freshly isolated human hepatocytes were encapsulated in hollow fibers and transplanted in the peritoneal cavity of immunocompetent rats. The fibers were explanted for analysis at D3, D7 and D14 following transplantation. Morphological features under light and electron microscopy and gene expression were compared to those of non-transplanted encapsulated hepatocytes (D0). Human albumin mRNAs were quantified by RT-PCR and Northern blot. Immunological activity against human hepatocytes was assessed by the analysis of hepatocytes DNA searching for nucleolar apoptosis and also by the rise on MHC class I expression. **Results:** Transplanted hepatocytes were more than 60% viable and exhibited morphological criteria of hepatocytic differentiation up to D7. At no time cells involved with the immunological response were observed inside the fibers. Albumin transcripts were also detected up to D14. At D3 and D7, albumin mRNA levels were of 30 %, compared to control D0 hepatocytes. The DNA analysis shown well preserved bands with no apoptosis at any time of evaluation. There was no rise on MHC class I expression. **Conclusions:** Human hepatocytes remain viable following encapsulation and intraperitoneal transplantation in rat. Although there is a decrease in gene expression this is not due to a host response against those cells. It seems that this effect is rather related to the process of hepatocyte isolation itself. The next step will be testing this system in a real condition of acute hepatic failure.

Key words: Transplantation ; Hepatocyte ; Artificial liver ; Biomaterials.

1. Introdução

O transplante hepático ortotópico constitui atualmente tratamento de escolha para doença hepática grave ou terminal. Esta intervenção comporta grande risco operatório, o paciente é submetido a tratamento imunossupressor por toda a vida e o custo desta terapia é elevado. Ressalta-se também que, no nosso meio, a doação de órgãos não condiz com a demanda, acarretando aumento na fila de espera, com conseqüentes agravos do estado clínico destes pacientes e piores resultados dos transplantes, razão porquê, certas equipes começaram a recorrer a outras alternativas, tais como o doador vivo, o *split liver*¹, ou ao xenotransplante.

O transplante de hepatócitos isolados como recurso para suprir insuficiência hepática poderia ser, em certos casos, alternativa ao transplante com fígado inteiro. Principalmente em casos de hepatite fulminante, a assistência hepática através da reposição de hepatócitos isolados, poderia dar tempo à regeneração hepática ou mesmo, de se obter um órgão isogrupo de qualidade, funcionando neste caso, como "ponte", até a obtenção de um órgão adequado (NORDLINGER et al. 1994).

Existem basicamente dois sistemas de assistência hepática : o fígado bioartificial externo ou bioreator e o fígado bioartificial implantável. O princípio de funcionamento do bioreator, assemelha-se à hemofiltração através de membrana biocompatível contendo hepatócitos.

O fígado bioartificial consiste na implantação de hepatócitos isolados no fígado, no baço, ou no peritônio. O peritônio oferece como vantagens maior espaço para acomodá-los com superfície ideal para trocas metabólicas. Para que os hepatócitos permaneçam viáveis e funcionais no peritônio devem, obrigatoriamente serem previamente fixados sobre suportes, ou colocados em cápsulas (DEMETRIOU et al. 1986).

¹ Técnica cirúrgica descrita em 1989 por Pichlmayer e colaboradores, na qual o fígado é dividido para dois receptores simultaneamente, Geralmente um receptor adulto que recebe o lobo direito e o receptor pediátrico o lobo esquerdo

Com a perspectiva de desenvolvimento do fígado bioartificial implantável em humanos, NICOLUZZI et al. 2000 aplicaram a técnica de encapsulação de hepatócitos de roedores em hepatócitos humanos, porém observaram neste trabalho, perda precoce de determinados fatores de diferenciação dos hepatócitos transplantados, o que levantou a hipótese de avaliar a real capacidade da fibra de encapsulação em proteger os hepatócitos transplantados contra a agressão imunológica do organismo receptor, uma vez que tratava-se de uma combinação extremamente discordante, homem-rato.

Portanto, os objetivos do presente estudo são :

1. Averiguar a capacidade da fibra de encapsulação em proteger hepatócitos humanos transplantados em ratos, tendo como indicadores a diminuição da expressão gênica, a perda precoce de fatores de diferenciação, e se existem causas imunológicas envolvidas nestas perdas.
2. Avaliar o DNA destas células, na procura de apoptose e determinar por RT-PCR a expressão do complexo maior de histocompatibilidade (CMH) de classe I nos hepatócitos transplantados, através do estudo do gene da β_2 microglobulina.
3. Utilizar técnicas de biologia molecular e microscopia eletrônica para análise de viabilidade hepatocitária.

2. Revisão da Literatura

2.1. Técnicas de Transplante de Hepatócitos Isolados

2.1.1. Preparação de Hepatócitos

Os hepatócitos utilizados podem ser provenientes de duas origens : a partir de indivíduos sadios ou de linhagens celulares cultivadas em cultura. No primeiro caso, o transplante pode ser do tipo singênico, proveniente de um indivíduo de mesmo genótipo, não ocorrendo neste caso, reações de rejeição, porém é uma situação específica à experimentação animal, situação na qual se dispõem de gerações “puras”. No transplante alogênico, proveniente de um indivíduo diferente, porém da mesma espécie, ocorre rejeição alogênica do tipo celular. No caso de transplante xenogênico, proveniente de espécies diferentes, as células podem sofrer uma reação hiperaguda xenogênica do tipo humoral.

No caso das linhagens celulares cultivadas, trata-se de células de origens diversas, que foram submetidas artificialmente à transformações que lhes permitem sobreviver indefinidamente em cultura.

2.1.2. Dissociação Hepática

Tradicionalmente foi o rato o animal mais utilizado experimentalmente como doador (e receptor) de hepatócitos em razão do seu baixo custo. Os hepatócitos são isolados do resto do parênquima hepático por digestão enzimática através da perfusão in situ do fígado inteiro ou de fragmentos hepáticos.

A dissociação hepática por cateterização in situ da veia porta e perfusão de colagenase foi descrita por BERRY et al. em 1969 e depois modificada por SEGLEN et al. em 1976. Num primeiro tempo, um tampão, sem Ca^{++} nem Mg^{++} , é perfundido à 37°C através da veia porta com o intuito de romper as junções intercelulares. Na seqüência a solução de dissociação contendo colagenase (0,025 à 0,05%), associada ao Ca^{++} é perfundida. Ao término da perfusão, o fígado é retirado, a cápsula de Glisson removida e as células dispersadas por simples agitação. A suspensão celular é na seqüência filtrada e posteriormente lavada. Alguns autores associam ainda à colagenase tanto à dispase (HERRING et al. 1983) quanto à hialuronidase (SEGLEN et al. 1976).

A dissociação hepática com o EDTA foi descrita por Wang et al. em 1985. Ela consiste na perfusão portal de um tampão sem Ca^{++} , contendo o EDTA, oxigenado e

aquecido à 37°C. Ao término da perfusão, o fígado é retirado e cortado em fragmentos os quais são colocados em um tampão contendo Ca^{++} . Na seqüência os hepatócitos são submetidos à uma purificação por centrifugação sob Percoll, o que permite a eliminação das células mortas e das células não parenquimatosas. O número de células obtidas por este processo é inferior ao precedente (RIBEIRO et al. 1992), porém a viabilidade celular é equivalente (Wang et al. 1985).

No caso do grande animal, no qual a perfusão de colagenase seria muito cara, REES et al. em 1981, desenvolveram um sistema de digestão enzimática por canulação de ramos portais ex situ. Este método permitiu igualmente o isolamento de hepatócitos humanos provenientes de biópsias cirúrgicas (BALLET et al. 1984 e VONS et al. 1991).

A digestão enzimática também pode ser feita por injeção direta de enzima no parênquima hepático (WOODS et al. 1982) ou por imersão do fígado na solução de dissociação (Fry, 1981).

A dissociação hepatocitária por perfusão in situ com colagenase é o método mais utilizado, porque é o que dá os melhores resultados em termos de número de hepatócitos recuperados ($50,5 \pm 26,6 \times 10^6$ células/g de tecido) (MORSIANI et al. 1985). O EDTA oferece uma viabilidade celular equivalente, porém com um rendimento inferior. Para a dissociação de hepatócitos humanos à partir de biópsias cirúrgicas é a colagenase o método de escolha.

2.1.3. Linhagens Celulares

É possível, como alternativa à dissociação hepática, a utilização de linhagens hepatocitárias. Estas linhagens crescem rapidamente em cultura e permitem a obtenção de uma massa celular importante. A linhagem deve conservar uma boa diferenciação para uma aplicação terapêutica. Além disso, a utilização de células modificadas expõe teoricamente, no caso de passagem na circulação geral, ao aparecimento de câncer. São portanto células que convêm utilizar-se em circuito fechado extra-corpóreo, o que já foi aplicado ao grande animal (SUSSMAN et al. 1992), ou sob forma encapsulada no caso de transplante de hepatócitos isolados (THI).

2.2. Conservação de Hepatócitos Isolados

Apesar dos progressos recentes, a duração da conservação do fígado continua muito inferior a do rim (KALAYOGLU et al. 1988). A solução UW (Universidade de Wisconsin) permite um tempo de isquemia fria prolongada de até 20 horas. Um dos objetivos do THI seria o de prolongar este tempo de conservação para poder constituir um banco de hepatócitos disponíveis a qualquer momento, permitindo-se transplantar diversos receptores à partir de um único doador.

As condições de conservação devem preservar tanto a viabilidade quanto a atividade funcional e a diferenciação celular. Dependendo do modo de THI, a conservação dos hepatócitos pode utilizar tanto a cultura celular quanto a criopreservação.

2.2.1. Cultura de Hepatócitos

Em condições habituais de cultura, hepatócitos acondicionados em placas de Petri sem suporte específico perdem suas junções celulares em 12 à 24 horas, suas atividades específicas dentro de 3 a 5 dias e morrem em 1 a 2 semanas (REID et al. 1984). Com o intuito de manter-se hepatócitos viáveis com manutenção de sua atividade funcional e possibilidade de cultura em tempos mais prolongados, várias técnicas foram propostas : cultura de hepatócitos sem soro, cultura em presença de fatores de crescimento, co-cultura (CLEMENT et al. 1984), cultura sobre matriz ou em três dimensões (SUSSMAN et al. 1992). A cultura em presença de 2 % de DMSO é igualmente uma maneira de manter-se a diferenciação hepatocitária em cultura primária, de eliminar-se as células não parenquimatosas, de evitar-se a necessidade de recorrer-se à suportes de cultura e de permitir a manutenção da síntese de ADN e da proliferação celular (ISOM et al. 1985).

2.2.2. Criopreservação

A criopreservação dos hepatócitos à -196°C em um meio de cultura contendo 10% de DMSO é possível (KUSANO et al. 1981). Após reaquecimento rápido à 37°C e eliminação do DMSO por lavagem, hepatócitos foram transplantados no baço de ratos singênicos. Um mês após o transplante, os hepatócitos intra-esplênicos

conservavam a coloração ao PAS e haviam adotado, no centro do parênquima esplênico, uma organização idêntica à de hepatócitos não congelados (FULLER et al. 1983). Havia contudo uma diminuição de 50% da viabilidade em relação ao período anterior ao transplante, após um mês de criopreservação (KUSANO et al. 1981).

2.3. Locais de Implantação Celular

O local ideal para o THI deve ser de fácil acesso, oferecer um volume suficiente para recebê-los, conter fatores hepatotróficos e permitir uma individualização fácil dos hepatócitos transplantados para poder diferenciá-los do resto do parênquima hepático.

No início utilizou-se a veia porta (MATAS et al. 1976 e SUTHERLAND et al. 1977), pois pensava-se que o parênquima hepático era indispensável à sobrevivência dos hepatócitos. Contudo, este local de implante não permite a diferenciação clara dos hepatócitos do doador do parênquima do receptor; além disso, a injeção portal apresenta um risco de trombose. Na seqüência injetou-se hepatócitos no músculo (GROTH et al. 1977), no pâncreas (JIRTLE et al. 1982), nos pulmões (SELDEN et al. 1984), ou sob a cápsula renal (RICORDI et al.). Os estudos mais recentes têm utilizado o baço, o pâncreas e o peritônio.

2.3.1. Implantação no Baço

O baço foi utilizado como local de injeção por diversos autores (MINATO et al. 1984 ; MITO et al. 1979 ; DEMMA et al. 1986 ; PANIS et al. 1990) por ser um órgão de fácil acesso e também por ser fácil a posterior localização dos hepatócitos. O baço do rato têm a capacidade de receber entre 0,4 à 1 ml de suspensão de hepatócitos em uma concentração de 1×10^7 hepatócitos/ml (MINATO et al. 1984 e DEMMA et al. 1986).

O implante no baço permite aos hepatócitos à proximidade ao sangue portal, o que, para alguns autores asseguraria a eles contato com fatores de crescimento. Além disso acredita-se também que a polpa vermelha esplênica favorece a organização dos hepatócitos em estrutura hepática, pois se observa o aparecimento de neo-ácinos e de trama reticular (DARBY et al. 1986). Na polpa esplênica

hepatócitos singênicos se mantiveram visíveis em microscopia óptica até 16 (MITO et al. 1979) e 21 meses (DARBY et al. 1986), com porcentagem de hepatócitos ocupando de 30 a 50% do volume esplênico (PANIS et al. 1990)

2.3.2. Implantação no no Pâncreas

O transplante de hepatócitos singênicos no pâncreas não acarretou pancreatite (VROEMEN et al. 1988). Após duas semanas os hepatócitos se organizavam em cordões e conjugavam a bilirrubina, porém ocupavam apenas 4% do parênquima pancreático. JAFFE et al. em 1988 após injetarem hepatócitos singênicos em baços de ratos, observaram que os mesmos conservaram sua vascularização. Observaram ainda que os hepatócitos, após migração pela veia esplênica, não se desenvolviam apenas no baço mas também no pâncreas onde formavam figuras como “rosetas” em torno das ilhotas de Langerhans. Este resultado, assim como a observação do transplante conjunto de hepatócitos e de ilhotas de Langerhans (RICORDI et al. 1988) sugerem que as ilhotas secretam fatores de crescimento benéficos para a sobrevivência e proliferação dos hepatócitos (JAFFE et al 1988 e LEGRELLE et al. 1992). Além disto, o pâncreas poderia ser um local interessante para o THI pela facilidade de escoamento da bile para o duodeno através do Wirsung.

2.3.3. Implantação no Peritônio

No peritônio, escolhido principalmente pela sua grande capacidade volumétrica, obteve-se resultados desapontadores nos primeiros experimentos nos quais simplesmente injetava-se hepatócitos sem nenhum tipo de suporte. (MAKOWKA et al. 1980 ; SUTHERLAND et al 1977 ; MINATO et al. 1984). Porém quando transplantou-se hepatócitos isolados em conjunto com partículas de Dextran recobertas de colágeno (microsuportes) no peritônio, observou-se que as células aderiam ao material o que favorecia uma neo-vascularização (DEMETRIOU et al. 1986).

Atualmente os dois locais de preferência para o THI são o baço e o peritônio. O baço, que apresenta um volume limitado para receber um grande número de células, é de fácil acesso no rato. Além disso o transplante no baço permite que se

analise facilmente as células transplantadas, sendo que normalmente observa-se a formação de canalículos biliares e a organização em camadas. O peritônio tem como vantagem permitir o implante de um número mais significativo de células e o de colocar os hepatócitos sobre suportes ou cápsulas. O peritônio parece mais adaptado que o baço para aplicação clínica.

2.4. Viabilidade e Função dos Hepatócitos

A maioria dos estudos utilizou primeiramente hepatócitos de origem singênica, suprimindo desta maneira a interferência da rejeição na análise dos resultados. Estes estudos permitiram a validação do conceito de THI. Foram utilizados nestes estudos três critérios para comprovar o interesse do THI para fins terapêuticos :

- 1) os hepatócitos deveriam manter-se vivos;
- 2) os hepatócitos deveriam ser capazes de proliferar em caso de necessidade;
- 3) os hepatócitos deveriam manter-se diferenciados.

2.4.1. Estudos Morfológicos

Hepatócitos singênicos transplantados no baço sobreviveram e formaram traves celulares até 16 meses após o THI (KUSANO et al. 1982). Em microscopia óptica, a coloração PAS mostrou uma diminuição progressiva do número de partículas de glicogênio nos hepatócitos, apesar dos mesmos se reorganizarem progressivamente em traves. Em microscopia eletrônica, a estrutura sinusoidal reaparecia 6 meses após o THI. A 16 meses ainda observava-se um espaço de Disse, células endoteliais e células de Ito. Estes dados foram confirmados no rato (WOODS et al. 1982 ; FULLER et al. 1983 ; JIRTLE et al. 1982) e no porco (NORDLINGER et al. 1985).

No pâncreas hepatócitos singênicos de rato ainda continham partículas de glicogênio 12 semanas após o transplante. Os hepatócitos estavam organizados em traves celulares, porém não evidenciou-se estruturas que se parecessem com lóbulos hepáticos (VROEMEN et al. 1988).

No caso de transplante intra-peritoneal utilizando-se hepatócitos singênicos sobre micro-suportes, observou-se o aparecimento de elementos biliares e de

estruturas intra-citoplasmáticas intactas até 60 dias pós trasplante (DEMETRIOU et al 1986). Além disto hepatócitos encapsulados transplantados no peritônio mantiveram o caractere PAS-positivo (CAI et al. 1988).

Em alguns casos, as células hepáticas transplantadas adquirem as características próprias à doença do receptor (HILLAN et al 1989). Hepatócitos transplantados no baço de ratos portadores de cirrose induzida por tetracloreto de carbono, organizavam-se em nódulos circundados por tecido fibroso e apresentavam vacúolos de degeneração. Hepatócitos injetados no baço de animais colestáticos assumiam o aspecto de células de transição. Concluiu-se então que os hepatócitos transplantados poderiam sofrer a influência de fatores produzidos pelo receptor os quais agiriam na sua diferenciação.

2.4.2. Multiplicação de Hepatócitos Transplantados

Inúmeros marcadores de proliferação celular foram utilizados pós THI. A captação da timidina permitiu demonstrar a proliferação de hepatócitos transplantados no baço com pico uma semana após o THI. VROEMEN et al em 1988 propuseram um índice de proliferação que seria a relação entre a incorporação da bromodeoxiuridina (captada na fase S) pelos hepatócitos intra-esplênicos e pelos hepatócitos do receptor, para avaliar a multiplicação específica dos hepatócitos transplantados. A autohistoriografia foi utilizada por NORDLINGER et al. em 1987 para avaliar a proliferação hepatocitária no baço. Após injeção de hepatócitos encapsulados na cavidade peritoneal de camundongos em insuficiência hepática aguda, o número de células viáveis no interior das cápsulas aumentou após o transplante, o que sugere a existência de fatores de proliferação (MAGANTO et al. 1988).

2.4.3. Atividade Funcional dos Hepatócitos Transplantados

O controle da manutenção da diferenciação celular após THI foi realizado através do estudo da síntese das seguintes substâncias : γ -glutamil transpeptidase, α -ornitina carbamil transferase (MAGANTO et al. 1988), alfa-fetoproteína e albumina (MITO et al. 1979). O problema reside justamente na diferenciação entre a atividade

funcional do fígado do receptor e dos hepatócitos transplantados. PANIS et al em 1990 utilizaram um modelo de baço isolado e perfundido, contendo hepatócitos isolados, para demonstrar que um ano após o THI duas atividades metabólicas específicas dos hepatócitos se mantinham : o clearance da antipirina (o que reflete a atividade de mono-oxigenases citocromo P-450 dependentes) e a síntese da albumina avaliada pela captação de ^{35}S -metionina.

A medida da captação de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA (ácido hepático iminodiacético) por cintilografia permite avaliar a função de captação dos hepatócitos no baço (WOODS et al.1982 e CUERVAS et al 1985). A captação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA pelos hepatócitos foi constatada até i ano após o THI. Este método permite ainda a localização de hepatócitos em locais distantes do local de implante primário.

A expressão do ARNm da albumina e dos citocromos P-450 foi igualmente avaliada nos hepatócitos transplantados no baço (MAGANTO et al. 1990). A persistência de um aumento da síntese de ARNm pelo fenobarbital, 15 meses após o THI, demonstra a existência de atividade funcional do hepatócito.

Após o desenvolvimento das técnicas de transfecção (introdução de um gene em uma célula utilizando-se um vírus, adenovirus ou retrovirus), certos autores utilizaram hepatócitos isolados transgênicos como marcadores de localização e de atividade dos hepatócitos transplantados. GUPTA et al em 1990 transplantaram no baço hepatócitos isolados de camundongo os quais expressavam o antígeno HBs. A atividade funcional dos hepatócitos foi avaliada pela detecção do antígeno HBs no soro e a localização dos hepatócitos transplantados foi efetuada por hibridação in situ no parênquima esplênico.

2.5. Aplicações Terapêuticas Experimentais

2.5.1. Correção de um déficit enzimático

A utilização de animais portadores de déficit enzimático como receptores, permite avaliar-se indiretamente a existência de hepatócitos funcionais através da dosagem de substâncias que não eram anteriormente sintetizadas pelo receptor. O rato Gunn, animal deficitário em uridina difosfato glucoroniltransferase , foi utilizado em diferentes modelos de THI intra-esplênica (MATAS et al. 1976 ; GROTH et al.

1977; VROEMEN et al 1986), em transplante hepatocitário intra-peritoneal fixados em micro-suportes (DEMETRIOU et al 1986) e em transplante hepatocitário imunoprotégidos por encapsulação (DIXIT et al 1990). Hepatócitos humanos fixados à micro-suportes foram utilizados em ratos Nar (analbuminêmicos), atímicos (MOSCIONI et al 1989). O THI utilizando-se hepatócitos alogênicos normais na cavidade peritoneal ou na veia porta de coelhos Watanabe (deficientes em receptores ao LDL) acompanhou-se de diminuição da concentração sérica de colesterol (WILSON, 1991).

Nos modelos com animais portadores de déficits da função hepática, a dificuldade reside no fato de avaliar-se somente a atividade funcional dos hepatócitos transplantados e não a atividade residual do fígado do receptor ou de hepatócitos ectópicos. Por exemplo no modelo com o rato Gunn, a diminuição da concentração da bilirrubina total, induzida no receptor pelo THI (o qual permite a conjugação e portanto a eliminação da bilirrubina) poderia ser igualmente explicada por um aumento da excreção realizada pelo próprio fígado do receptor. Foi de fato demonstrado que em ratos Gunn tratados pelo soro anti-linfocitário, observava-se uma diminuição da bilirrubina mesmo sem THI simultâneo (SEBROW et al 1980). Ainda a ausência de bilirrubina conjugada após esplenectomia em ratos Gunn que haviam recebido THI intra-esplênica poderia ser explicada pela presença de hepatócitos funcionais extra-esplênicos, resultado de migração no momento do THI (VROEMEN et al 1986).

2.6. Correção da Insuficiência Hepática Fulminante

A hepatite fulminante pode ser induzida no rato artificialmente através da administração de dimetilnitrosamina (SUTHERLAND et al. 1977) ou de D-galactosamina (SOMMER et al. 1979), produtos reconhecidamente hepatotóxicos, ou pela oclusão simultânea da veia porta e da artéria hepática 48 h após a criação de um shunt porto-cava latero-lateral e ressecção simultânea do lobo esquerdo (SOMMER et al 1980). A correção da insuficiência hepática pode ser avaliada através do aumento da sobrevivência dos animais submetidos ao THI em relação ao grupo controle. MAKOWKA et al em 1980 não observaram aumento significativo da sobrevivência dos animais, após THI, tanto em hepatite fulminante induzida

quimicamente quanto cirúrgica. SOMMER et al em 1979 demonstraram aumento da sobrevida de ratos Gunn após transplante de hepatócitos singênicos, porém sem que se tenha sido obtido correção associada da hiperbilirrubinemia. Em outros estudos, foi demonstrado que tanto a injeção de citosol quanto de sobrenadante de cultura hepatocitária apresentavam o mesmo efeito que o THI em relação ao aumento de sobrevida dos animais (MAKOWKA et al. 1981 e BAUMGARTNER et al. 1983). Ainda nestes mesmos estudos não se observou diferenças significativas na sobrevida dos ratos. Em outro estudo também não se observou diferenças significativas na sobrevida de animais em insuficiência hepática aguda induzida pela D-galactosamina, independente da injeção de hepatócitos singênicos, alogênicos ou xenogênicos (MAKOWKA, 1980), o que poderia ser explicado tanto por um efeito imunossupressor da D-galactosamina a qual permitiria uma sobrevida prolongada dos hepatócitos alo ou xenogênicos, ou pelo fato que a sobrevida, mesmo de curta duração dos hepatócitos alo ou xenogênicos fosse suficiente para reduzir a mortalidade.

2.7. Hepatectomia Cirúrgica

Para causar um quadro prolongado e significativo de insuficiência hepática aguda no rato por cirurgia, a hepatectomia deve compreender pelo menos 70% do fígado, ou seja ressecar pelo menos o lobo esquerdo e os lobos medianos (ZIEVE et al. 1985 e DEMETRIOU et al. 1988). Minato et al em 1984 realizando hepatectomias à 75%, associadas à anastomose porto-cava em ratos, demonstraram aumento da sobrevida de animais que receberam hepatócitos singênicos 3 dias antes do ato cirúrgico. MICHALOPOULOS et al em 1982 sugeriram que existe ação do HGF (fator de crescimento hepatotrófico) na estimulação da proliferação do parênquima hepático e dos hepatócitos transplantados o que veria a influenciar na sobrevida dos animais submetidos à ressecções hepáticas de 2/3 do parênquima. Observou-se que ocorre um menor ganho na sobrevida após hepatectomia que em animais em insuficiência hepática induzida quimicamente. Isto se deve provavelmente primeiro devido à uma hipoglicemia severa pós-hepatectomia, o que mata rapidamente os ratos, e segundo às vezes a massa hepática restante é muito reduzida para permitir uma regeneração ulterior eficaz.

2.8. Mecanismos Hipotéticos do efeito do THI na Insuficiência Hepática Aguda

Demonstrou-se que existe aumento da sobrevida de ratos em insuficiência hepática fulminante após transplante de hepatócitos isolados, mesmo quando estas células transplantadas representam apenas 3 a 5% da massa hepática total (PANIS et al. 1990). Certos autores sugeriram que atividade metabólica dos hepatócitos transplantados não seria diretamente responsável pelo aumento da sobrevida constatada em ratos em insuficiência hepática aguda.

Outras hipóteses são possíveis :

- a) O efeito do THI poderia ser na verdade devido a presença no citosol hepatocitário de fatores hepatotróficos : pois observou-se que a injeção isolada de citosol aumentava a regeneração hepática (WIEDERKEHR, 1990) ; que o sobrenadante de culturas hepatocitárias (BAUMGARTNER et al. 1983), mesmo de culturas não hepatocitárias (BUCHER et al. 1985) estimularam igualmente a regeneração hepática em determinados modelos ; ainda que o transplante de hepatócitos com viabilidade diminuída (MAKOWKA et al.1980), de frações sub-celulares (MAKOWKA et al.1981) e até mesmo de medula óssea (MAKOWKA et al.1980) foram acompanhadas de aumento significativo da sobrevida de ratos em insuficiência hepática aguda. Em resumo estes diferentes estudos têm a demonstrar a mesma conclusão, ou seja que as células transplantadas liberam fatores de regeneração hepática.
- b) Outro mecanismo proposto para explicar o aumento da sobrevida após injeção celular seria um aumento da atividade do sistema reticulo-endotelial. HIYASHI et al em 1981 demonstraram que ocorre uma depressão do sistema reticulo-endotelial após hepatectomia à 70%. Ainda a estimulação prévia do sistema reticulo-endotelial por injeção de estreptococos piogênicos aumentou a sobrevida de ratos em insuficiência hepática fulminante (EBATA et al 1985). A explicação para este fenômeno é desconhecida. Não demonstrou-se a participação do sistema reticulo-endotelial após transplante de hepatócitos ou de esplenócitos (DEMMA et al. 1986).

2.9. Correção da Insuficiência Hepática Crônica

A cirrose causada pelo tetracloreto de carbono foi muito utilizada como modelo de insuficiência hepática crônica. Porém não é um modelo ideal de estudo, pois o ciclo da uréia não é deprimido (SNODGRASSS, 1989) e a encefalopatia hepática que é associada à cirrose apresenta-se neste modelo com alterações diversas de difícil interpretação (MULLEN et al. 1989).

RIBEIRO et al. em 1992 demonstraram que em ratos portadores de encefalopatia hepática crônica induzida por anastomose porto-cava latero-lateral, os distúrbios de comportamento eram corrigidos pelo transplante de hepatócitos singênicos. Ainda que 3 meses pós-THI, a atividade locomotora e exploradora dos ratos normalizava-se em relação aos grupos controle. Também foi constatada correção concomitante da concentração plasmática do triptofano e da glutamina.

2.10. Perspectivas Futuras

2.10.1. Aperfeiçoamento de Bioreatores

Uma outra alternativa para utilização de hepatócitos isolados seria a utilização de um fígado bio-artificial extracorpóreo. A técnica mais simples seria a hemodiálise através de um meio de cultura contendo os hepatócitos em suspensão (MATSUMURA et al. 1987). O principal inconveniente deste modelo seria a sobrevida curta das células. Uma maneira para tentar melhorar esta sobrevida seria a cultura tridimensional dos hepatócitos no bioreator, fixados sobre suportes, para daí serem colocados em contato com a circulação extra-corpórea (WOLF et al. 1979). Experimentalmente hepatócitos fixados em cápsulas de alginato e colocados em contato com a circulação sanguínea de ratos Gunn conjugaram a bilirrubina endógena destes animais (FREMOND et al 1994). SUSSMAN et al em 1992 fixaram sobre suportes hepatócitos provenientes de linhagem humanas e demonstraram que era possível a correção de certos caracteres de encefalopatia hepática em cães. Em 24 a 48 horas, 2 de 3 animais puderam ser desconectados do bioreator.

2.10.2. Terapia Gênica e THI

A terapia gênica se propõe a tratar certas afecções através da inoculação de um gene exógeno sadio em um organismo receptor doente. Essa técnica,

inicialmente descrita para as células hematopoiéticas (KARLSON, 1991), foi também idealizada para os hepatócitos os quais constituem um alvo privilegiado quando são local de erro inato do metabolismo (déficit de receptor LDL ou doença do ciclo da uréia por exemplo). Além disso, o fígado apresenta importante atividade de síntese protéica e situação na circulação geral que permitiria utilizá-lo como local de produção de proteína circulante. A incorporação do gene pode ser feita tanto por injeção do ADN diretamente no fígado (DUBENSKI et al. 1984), quanto por via periférica ou intraportal após encapsulamento do ADN nos liposomos (KANEDA et al. 1989), ou pela associação do ADN à proteínas carreadoras. A transferência de informação genética à célula alvo pode também ser feita por vírus e mais particularmente retrovírus (FERRY et al. 1991). Com o auxílio de retrovírus a transferência (transfecção) pode ser feita ex vivo para células em cultura (WILSON et al. 1990). O tratamento consiste na retirada de uma amostra de hepatócitos, através de hepatectomia parcial, cultura celular, infecção das culturas com o retrovírus recombinante e posteriormente um reimplante de células no sistema porta. As células geneticamente modificadas colonizam o fígado e podem representar após o transplante de 0,5 à 2% da massa hepatocitária total (KAY et al. 1992). A alternativa a este método seria à realizar a transferência genética in vivo através da perfusão do órgão isolado com um preparado de vetores vitais. Demonstrou-se que a expressão do gene exógeno podia ser detectado em 1 a 5% dos hepatócitos e permanecia estável durante um ano (FERRY et al. 1991).

2.10.3. Transplante de Hepatócitos Alo ou Xenogênicos

Os hepatócitos normais exprimem pouco as moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (CMH) de classe I e nada ou quase nada as moléculas de classe II. Durante o fenômeno de rejeição do alo-transplante, os hepatócitos exprimem de maneira importante as moléculas de classe I, mas continuam geralmente a não expressar as de classe II. Apesar da ausência da expressão do CMH de classe II, o qual desempenha um papel primordial na antigenicidade de uma célula, os hepatócitos são antigênicos e são destruídos por um receptor alogênico (CALMUS et al. 1991). Na maioria das combinações alogênicas, os hepatócitos são rejeitados em 4 a 7 dias na ausência de tratamento imunossupressor concomitante.

Existem quatro técnicas que podem ser utilizadas para retardar ou suprimir a rejeição : a utilização de imunossupressão, a irradiação dos hepatócitos com raios ultra-violeta (UV), o THI sobre suportes e a encapsulação celular.

2.10.4. Utilização de Imunossupressão

A ciclosporina A aumenta a sobrevida de hepatócitos transplantados no baço (MORSIANI et al. 1985 e COBOURN et al. 1987). Neste caso, o alo-transplante intra-esplênico de hepatócitos corrigiu o déficit enzimático de ratos Gunn até 21 dias pós THI (MAGANTO et al. 1988 e MAKOWKA et al. 1986). A utilização de imunossupressão conjuntamente ao THI faz com que perca-se uma grande parte do interesse da utilização deste método, uma vez que o objetivo do transplante celular é justamente o de causar a menor morbidade possível.

2.10.5. Irradiação dos Hepatócitos com UV

Os UV, principalmente os UV B, alteram a resposta imunológica do receptor através da modificação da apresentação antigênica implicada na rejeição do alo-enxerto (DEEG, 1988). Células hepáticas provenientes de ratos Wistar, injetadas por via intra-portal em ratos analbuminêmicos, com ou sem irradiação pelos UV B e sem cultivo prévio, normalizaram a concentração de albumina 2 semanas após o transplante foram após este período diminuindo progressivamente. No caso de células previamente cultivadas durante 20 horas, porém não submetidas à irradiação, a concentração de albumina manteve-se por 6 semanas. No caso da associação cultivo e irradiação, a concentração de albumina permaneceu estável até 32 semanas após o transplante. Foi portanto demonstrado um efeito potencializador da irradiação com UV mais cultivo de hepatócitos alogênicos na redução da imunogenicidade e no aumento da sobrevida de hepatócitos em combinação alogênica (BOREL et al. 1992).

2.10.6. Transplantes de Hepatócitos Isolados em Suportes

Além da vantagem da neovascularização que ocorre quando os hepatócitos são transplantados neste material, os suportes oferecem também uma superfície de adesão , além de bloquear o sistema retico-endotelial. Eles podem desta maneira

reduzir a resposta imunológica dirigida contra as células hepáticas. A utilização de micro-suportes por DEMETRIOU et al. em 1986 permitiu suporte hepático até 6 dias em ratos analbuminêmicos e em ratos Gunn que haviam recebido hepatócitos alogênicos. Este suporte chegava até 28 dias com hepatócitos singênicos (DEMETRIOU et al 1986).

O transplante de hepatócitos sobre micro-suportes tornou possível a sobrevivência de 40% dos ratos submetidos à hepatectomia de 90%, enquanto que 100% dos animais que não receberam THI morreram em 3 a 5 dias. Este resultado foi observado tanto quando utilizou-se hepatócitos singênicos quanto alogênicos. Quando os hepatócitos foram transplantados 3 dias antes da hepatectomia, a hipoglicemia profunda que segue-se à cirurgia foi reduzida. No 28º dia pós transplante os animais sobreviventes foram autopsiados. Observou-se que os micro-suportes contendo hepatócitos singênicos estavam envolvidos com tecido fibro-colágeno com rica neo-vascularização ; enquanto que os hepatócitos alogênicos estavam completamente destruídos (DEMETRIOU et al 1988).

2.10.7. Encapsulação

A microencapsulação foi descrita pela primeira vez por Chang em 1964. Este método inicialmente concebido para o imuno-isolamento das ilhotas de Langerhans (LIM, 1980), foi utilizado mais tarde para transplantar hepatócitos na cavidade peritoneal. O princípio desta técnica é o de proteger as células hepáticas do ataque imunológico do receptor através de uma membrana semi-permeável, preservando-se simultaneamente as trocas metabólicas das células implantadas. O processo de encapsulação é variável : os hepatócitos podem ser encapsulados isoladamente ou em pequeno número. Também é possível introduzi-los em uma macro-cápsula previamente fabricada. A injeção de hepatócitos alogênicos encapsulados no peritônio aumentou significativamente a sobrevivência de camundongos em insuficiência hepática aguda ocasionada pela D-galactosamina (WONG et al. 1988). Foi observada em ratos Gunn síntese de bilirrubina por hepatócitos alogênicos encapsulados (BRUNI et al 1989).

As membranas de encapsulação utilizadas provocam comumente uma reação inflamatória e processos de fibrose peri-capsular com conseqüente ameaça à

proteção contra a rejeição. Para tentar contornar este problema as micro-cápsulas constituídas com sal de alginato à 2%, inicialmente utilizadas por CHANG, foram recobertas com grupos aminas como a poli-L-lisina (CAI et al. 1988) com o intuito de diminuir a reação inflamatória pericapsular, porém sem grande sucesso. Para melhorar este sistema de proteção celular foi aperfeiçoado no Laboratório de Cirurgia Experimental do *Hôpital* Saint-Antoine, Paris-França. outros tipos de fibras de encapsulação semi-permeáveis à partir de um copolímero de poliacrilonitrilo matalilsulfonato (AN69 Hospal França) transformado em hidrogel. Estas membranas são biocompatíveis e capazes de proteger os hepatócitos transplantados das reações imunológicas do receptor ao mesmo tempo que assegura as trocas metabólicas das células sem induzir fibrose peri-capsular (HONIGER et al. 1995).

Desta maneira foi demonstrado que o transplante intraperitoneal de hepatócitos alogênicos encapsulados nas fibras de hidrogel (AN69) permitia o aumento da taxa de sobrevida e a regeneração do fígado nativo de animais após hepatectomia de 95% (ROGER et al. 1996). Em uma combinação xenogênica foi demonstrada a correção de déficit enzimático em ratos Gunn assim como aumento da sobrevida de ratos em insuficiência hepática aguda, ambos estudos sem imunossupressão (GOMEZ et al. 1997, ROGER et al. 1998).

Com a perspectiva da aplicação clínica utilizando-se hepatócitos humanos transplantados neste material para corrigir insuficiência hepática aguda, a manutenção da viabilidade e da função desse hepatócitos é fundamental. Durante uma etapa inicial houve uma fase de aprendizado e posterior aperfeiçoamento da técnica de isolamento e encapsulação de hepatócitos humanos, a qual diferia da técnica realizada em animais. Numa fase posterior demonstrou-se que após encapsulação e transplante em ratos, os hepatócitos humanos mantêm diferentes critérios de diferenciação porém com uma diminuição progressiva com o passar do tempo (NICOLUZZI et al. 2000). Contudo se estes resultados foram devido à um mecanismo imunológico isto não pode ser confirmado.

3. Material e Método

3.1 Delineamento experimental

Este estudo foi realizado nos laboratórios de Cirurgia Experimental da Unidade U402 do Hospital Saint Antoine da Universidade de Paris VI - França.

As fases seguidas para atingir os objetivos propostos foram : Isolamento de Hepatócitos Humanos; Encapsulação e transplantação dos hepatócitos humanos isolados em ratos Lewis; Eutanásia dos animais e coleta de amostras para as avaliações nos dias 3, 7 e 14 pós-implantação.

Foram realizadas cinco séries experimentais, cada série comportando seis ratos, dos quais três recebiam três fibras com hepatócitos e outros três ratos recebiam uma fibra vazia (controle). Foram transplantadas três fibras com hepatócitos em cada rato do grupo experimento para que uma fosse destinada para avaliações morfológicas, e as demais para as avaliações de biologia molecular.

Tabela 1 Demonstrativo do delineamento experimental :

Séries Experimentais	Número de ratos	Número de ratos por sub-grupos		Número de rato submetidos às avaliações		
		Controle (C)	Experimento (E)	Dia 3	Dia 7	Dia14
1	6	3	3	1C e 1E	1C e 1E	1C e 1E
2	6	3	3	1C e 1E	1C e 1E	1C e 1E
3	6	3	3	1C e 1E	1C e 1E	1C e 1E
4	6	3	3	1C e 1E	1C e 1E	1C e 1E
5	6	3	3	1C e 1E	1C e 1E	1C e 1E
Totais	30	15	15	5C 5E	5C 5E	5C 5E

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Saint Antoine e foram aplicadas as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná.

3.2 Animais

Foram utilizados 30 ratos machos singênicos Lewis provenientes do Centro de Criação R. Janvier (Le Genest Saint-Ile, França), com pesos médios de 200g, como receptores de hepatócitos humanos encapsulados.

Foram submetidos às mesmas condições ambientais e de manejo, dispondo de alimentação e água *ad libitum* antes e após o transplante.

3.3 Isolamento de hepatócitos humanos

Os hepatócitos foram isolados a partir de fragmentos hepáticos humanos, obtidos durante hepatectomias para ressecção de metástases ou tumores benignos hepáticos. Os hepatócitos foram isolados através de dissociação enzimática segundo a técnica descrita por BERRY et al. em 1969 e SEGLEN et al. em 1976.

Os fragmentos foram pesados e introduzidos quatro catéteres nos orifícios vasculares principais que se apresentavam em sua superfície. Os demais orifícios vasculares foram ocluídos com pontos de sutura. Na seqüência, foi feita a lavagem do sangue contido nestes fragmentos com 1 litro de solução tampão HEPES a 37 °C, com débito em torno de 10 ml/min/cateter.

Tabela 2 Composição da Solução Tampão para a dissociação do tecido hepático :

Produto	Concentração (gramas / litro)
NaCl	8,00
KCl	0,20
HEPES	2,38
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,10
H ₂ O destilada (qsp)	1000ml

O passo seguinte, consistia na perfusão de 500ml de solução tamponada fosfatada com collagenase, em débito de 5ml/minuto/cateter.

Tabela 3 Composição da Solução Enzimática :

Produto	Concentração
NaCl	8,00g/l
KCl	0,20g/l
HEPES	2,38g/l
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,10g/l
Colagenase D	0,05%
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,075%

No final da perfusão, os fragmentos de fígado foram colocados em placa de Petri contendo meio de cultura L-15 Leibovitz enriquecido (SIGMA[®]- L4386) à temperatura de 37°C. A cápsula de Glisson foi removida e os hepatócitos separados lentamente por agitação moderada. A seguir foram lavados duas vezes em meio de cultura L-15 enriquecido, contendo 0,2% (p/v) de Albumina Bovina (SIGMA[®]- A2153), 10.000UI/l de PenicilinaG, 10mg/l de Estreptomicina, 2mM de Glutamina (SIGMA[®]- G9003), 100μUI/l de Insulina, 26mM de NaHCO₃ e 10% de Soro Fetal Bovino (SIGMA[®]- C5155). Foram realizados dois ciclos de centrifugação a 600rpm.

A fim de eliminar as células mortas e aumentar a pureza celular os hepatócitos foram diluídos em solução contendo 1 volume do meio de cultura, 0,9 volume de Percoll e 0,1 volume de PBS 10X concentrado, e então centrifugados à 3000 rpm, durante 8 minutos a 4°C. As células hepáticas foram contadas com o auxílio de célula de Malassez e sua viabilidade foi analisada pelo teste de exclusão com Eritrosina (KRAUSE et al. 1984). A partir do isolamento de mais de 120x10⁶ hepatócitos viáveis, dava-se continuidade ao experimento.

3.4. Encapsulação

3.4.1. Material

O material de encapsulação era composto por uma fibra de hidrogel, com diâmetro interno de 0,8 mm, espessura de 0,1 mm e comprimento de 2 m, desenvolvida a partir da membrana de diálise AN- 69 (Societé Hospal, R et D. Int, France).

A fibra foi obtida pela coextrusão de solução contendo 6% do polímero AN-69 (Poliacrilonitrilo-metalilsulfonato de sódio), 91% de dimetil-sulfoxida (DMSO) e 3% de soro fisiológico. O hidrogel obtido pela separação das fases desta solução em soro fisiológico contém 83% de água. A permeabilidade das fibras medidas por difusão é de 83% para a albumina, de 13% para os IgG e nula para IgA e IgM. A porosidade é estimada entre 150 e 165 kDA (HONIGER et al. 1995).

3.4.2. Macroencapsulação

Sob câmara de fluxo laminar, as fibras foram descontaminadas durante 20 minutos em Dialox (Solução de ácido paracético a 3%), diluído à 10% em soro fisiológico e posteriormente enxaguadas em soro fisiológico. A eliminação do Dialox foi controlada com papel iodado. A suspensão celular, contendo 1×10^7 hepatócitos/ml foi introduzida em dois metros de fibra através de cateter venoso 22G. As cápsulas eram ocluídas em suas extremidades com clip cirúrgico e posteriormente depositadas em meio de cultura L15 enriquecido e conservados por uma hora em estufa com 95% de ar ambiental e 5% de CO₂, até a oportunidade do transplante.

abdominal de ratos



3.5. Procedimento cirúrgico para implantação intra-abdominal de hepatócitos encapsulados

Os animais, foram anestesiados por inalação com éter sulfúrico e submetidos à laparotomia mediana e implantação na cavidade peritoneal de três fibras, cada uma contendo dez milhões de hepatócitos com viabilidade superior à 95%, em cada rato do grupo experimento e uma fibra com meio L 15, em cada rato do grupo controle. Foi realizado profilaxia antibiótica per-operatória por via intra-peritoneal com 1000UI de penicilina e 1mg de estreptomicina.

3.6 Avaliação Morfológica

A avaliação histológica foi realizada após coleta das fibras e sua fixação em solução de Carlson por 3 dias. Foi realizada a microscopia eletrônica em cortes de 0,5mm, corados por Azul de Toluidina e em cortes ultra-finos

eletrônica em cortes de 0,5mm, corados por Azul de Toluidina e em cortes ultra-finos de 600 A°, contrastados com acetato de uranila e chumbo, em microscópio eletrônico Zeiss EM 10. Foram assim avaliadas a morfologia dos hepatócitos, bem como possíveis células responsáveis pelo fenômeno da rejeição no interior das fibras de encapsulação.

Tabela 4 *Composição do líquido de Carlson*
(pH : 7,42) :

Produtos	Volume
Solução de NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O a 2,25%	720 ml
Formaldeído 40%	180 ml
Solução de NaOH a 2,5%	100 ml

3.6 Extração de ARN/ADN

O processo utilizado para extração dos ácidos nucleicos baseou-se na absorção de ARN/ADN em coluna de silício (ARN/ADN mini kit, Qiagen). As fibras após extração foram lavadas em solução de PBS (1X) à 4°C, congeladas em nitrogênio líquido para a posterior maceração e suspensão em 500µl de solução de lise. Este produto era então misturado à 500 µl de tampão QRV1 fornecido no kit.

Após o período de centrifugação à 15000 x g à 4°C por 20 minutos, o sobrenadante era precipitado com 0,8 volume de isopropanol. Após precipitação dos ácidos nucleicos, foi realizada uma nova centrifugação à 15000 x g à 4°C durante 30 minutos. O soluto obtido foi resuspenso em 0,15 ml de tampão QRL1 à 60°C. Na seqüência as amostras foram misturadas com 1,35 ml de tampão QRV2 e centrifugadas 5 minutos à 5000 x g à 4°C. Após equilíbrio das colunas com 1 ml de tampão QRE, a mistura foi depositada, os ADN recolhidos e os ARN fixados nas colunas foram dissolvidos pelo tampão QRU, aquecidos à 45°C e então precipitados com 1 volume de isopropanol à 4°C.

Os ADN recolhidos foram uma vez mais depositados sobre as colunas, dissolvidos com o tampão QF, aquecido à 45°C e precipitados com 0,7 volume de isopropanol à temperatura ambiente. Os ácidos nucléicos foram centrifugados 30 minutos à 15000 x g à 4°C, os solutos de ADN ou ARN foram lavados 2 vezes em etanol 70% e os sobrenadantes eliminados por centrifugação durante 20 minutos à 15000 à 4°C. Os solutos de ARN foram finalmente resuspendidos em 10µl de água Rnase-free e os de ADN em 10µl de água destilada.

A quantificação dos ácidos nucléicos foi medido pela densidade óptica (DO) à 260 nm. Para se obter uma preparação de ARN pura, a relação DO 260/DO 280 deveria estar compreendida entre 1,8 e 2. A qualidade dos ARN/ADN obtidos era verificada sobre gel não desnaturante de Agarose a 1%. No caso do ADN a verificação de sua qualidade sobre o gel demonstrava se os mesmo estava fragmentado ou não comprovando-se daí a apoptose celular.

3.8. Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

3.8.1. Transcrição reversa do ARN

Um µg de ARN total foi “reversamente transcrito” em ADN complementar (ADNc) com a enzima transcriptase inversa Superscript™ (Life Technologies, Cergy Pontoise®). Para cada µg de ARN em um volume de 5 µl previamente desnaturado à 68°C, foram acrescentados 15µl de Solução Tampão de Transcrição reversa (Tabela 5).

A transcrição reversa em ADNc, foi realizada à 42°C durante uma hora. Na seqüência a enzima era desnaturada à 68°C durante 5 minutos para parar a reação.

Os controles negativos, foram solução sem ADN e o soluto obtido a partir das fibras vazias transplantadas nos animais. Os ADNc eram

mantidos à -80°C se fosse o caso de conservá-los para uma utilização ulterior ou mantidos à 4°C se fossem ser usados imediatamente para uma reação de PCR.

Tabela 5 *Composição da Solução Tampão de Transcrição reversa*

Produtos	Quantidade
Tampão Rtase	1x
DNTP	0,5 mM
DTT	10 mM
PD (N) ₆	5 μM
Rtase Superscript™	10 UI/μl
H ₂ O estéril qsp	20 ml

3.8.2. Amplificação do ADNc por PCR.

A PCR foi realizada com 2 μl de ADNc ao qual foi acrescentado 48 μl de mix PCR contendo as sequências necessárias para a co-amplificação.

Tabela 6 *Composição da Solução Tampão para Reação em Cadeia de Polimerase para Albumina e β₂ microglobulina*

Composição	Concentração
Tampão	1X
DNTP	0,1 mM
Sequen. S Alb	0,05 μM
Sequen. AS Alb	0,05 μM
Sequen. S β ₂ m	0,01 μM
Sequen. AS β ₂ m	0,1 μM
Taq Polimerase	0,025 UI/μl
H ₂ O estéril qsp	10 ml

As seqüências oligonucleotídicas escolhidas para a albumina, Alb S : 5'CTT GAA TGC GCT GAT GAC AGG 3' (senso) e Alb AS : 5' G CAA GTC AGC AGG CAT CTC ATC 3' (anti-senso) estão situadas respectivamente nos exon 7 e 8, e amplificaram uma seqüência de 157 pares de bases.

Foi também realizada uma co-amplificação com o gene da α_2 microglobulina, a qual serviu ao mesmo tempo como controle da albumina e também como critério de avaliação do aumento da expressão do CMH de classe I nos hepatócitos. As seqüências (2 mS : 5`AC CCC ACT GAA AAA GAT GA 3` (senso) e (2 mAS : 5` ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG 3` (anti-senso) conduziram à uma seqüência de 114 pares de bases.

Cada amostra foi recoberta com 25 μ l de óleo mineral a fim de evitar a evaporação durante os ciclos de amplificação. A PCR foi realizada em um termociclo de ADN (perkin-Elmer-Cetus) segundo programa de "touch down" (Don et al. 1991): desnaturação à 94(C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos associando-se uma desnaturação à 94(C durante 1 minuto, emparelhamento das seqüências durante 1 minuto e alongamento à 72(C durante 1 minuto 30. Durante os 10 primeiros ciclos, a temperatura para favorecer o emparelhamento diminuía a cada 2 ciclos em 2(C, iniciando-se em 68(C até chegar à 58(C. Após o último ciclo, todas as amostras foram submetidas à um alongamento à 72(C durante 8 minutos.

3.8.3. Detecção dos produtos amplificados

9 μ l de produto de PCR, diluídos com um μ l de azul polarizado foram depositados em um gel de agarose 2,5 %, contendo 0,5 (g/ml de brometo de etidium para que se pudesse visualizar os produtos de PCR em luz ultravioleta (UV). A migração foi realizada à 80 V em Tris Borato EDTA (TBE) 1X.

Em seguida o gel foi desnaturado com NaOH 0,4 N durante 15 minutos e em seguida transferido por capilaridade para uma membrana de nylon polarizada. Após uma transferência de duas horas e quinze à temperatura ambiente, a membrana foi neutralizada com Standard Sodium Fosfato EDTA (SSFE) 2X durante 2 minutos e acondicionada para hibridação. A confirmação da boa qualidade da transferência foi confirmada pelo desaparecimento dos produtos PCR no gel verificados em luz UV.

As sondas oligonucleotídicas de albumina (5'TCA CAG CAT TCC TTC AGT TTA CTG GAG ATC 3') e da (2 microglobulina (5'CTG CTT ACA TGT CTC GAT CCC ACT TAA CTA TCT TGG GCT G 3') foram marcadas com ³²P (ATP, 10 mCi/ml, (3(l) e com T4 quinase (10 U/(l, 1(l). A radioatividade específica das sondas foi determinada por contagem em efeito Cerenkov após purificação em colônia "Probe Quant™ G-50" (Pharmacia).

A membrana de nylon carregada, sobre a qual foram fixados os DNA, foi pré-hibridada à 42°C, sob agitação constante, durante 1 à 2 horas em um forno de hibridação. O meio de pré-hibridação (tabela 7) foi substituído por meio de hibridação, de composição idêntica, porém contendo a sonda marcada (2×10^6 com/ml).

Tabela 7 Meio de pré-hibridação e Hibridação dos produtos amplificados

Componente	Quantidade
SSPE	6X
Denhardt	5X
Heparina	0,5 mg/ml
SDS	0,1 %
H2O estéril qsp	10 ml

A hibridação foi realizada à 42°C, sob agitação constante durante toda uma noite em um forno de hibridação. A membrana foi na seqüência lavada em tampão SSPE 6X Sódium Dodecil Sulfato (SDS) 0,1 % durante 30 minutos à 55°C. A mesma seqüência foi sucessivamente realizada com a sonda β_2 microglobulina e depois com a albumina.

A membrana foi exposta, em presença de uma tela intensificadora, para autoradiografia com um filme Hyperfilm MP (Amersham). A intensidade das bandas da albumina e da β_2 microglobulina, obtidas à partir das autoradiografias foi quantificada por densitometria utilizando-se o programa NIH image/Fotolook.

3.9. Northern Blot

Foram colhidos 5 μg de RNA total para cada amostra e na seqüência misturados à 15 μl de uma solução contendo 500 μl de formamida deionizada, 178 μl de formaldeído à 37% e 100 μl de um tampão fosfato 10X concentrado.

Após desnaturação das estruturas secundárias à 68 °C, as amostras coradas com 2 μl de azul de depósito (0,25% xileno cianol, 0,25% azul de bromofenol, 50% glicerol, 1mM EDTA) foram depositadas sobre um gel de agarose formaldeído desnaturante. Na seqüência a eletroforese foi conduzida sob uma voltagem de 20 V durante a noite em presença de tampão fosfato 1X com recirculação do tampão. Esta recirculação constante do tampão fosfato permitiu manter-se o pH constante.

Após migração, o gel foi desnaturado em uma solução de NaOH 50 mM – NaCl 10 mM, duas vezes em 15 minutos ; coradas durante 15 minutos em solução de acetato de amônia (NH_4 Ac) 150 mM de brometo de etidium 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; e descoradas durante 15 minutos em solução de NH_4 Ac 150 mM. O gel foi então transferido por capilaridade sobre uma membrana de nylon (Amersham) na presença de solução NH_4 Ac 150 mM. A transferência foi efetuada durante 5 h em temperatura ambiente. Após transferência para a membrana, os RNA foram revelados sob radiação ultra-violeta durante 5 minutos.

Todas as sondas com exceção da sonda oligonucleotídica 28S, foram preparadas por RT-PCR, purificadas sobre gel de agarose e também por um kit de purificação de bandas de gel GFXTM (Pharmacia). As sondas de albumina (157 bp), $\beta_2\text{m}$ (114 bp), e 28S foram marcadas com 5 μl de $\alpha\text{dCTP P}^{32}$ (10 mCi/ml, 3000 Ci/mole) com um kit Megaprime (Amersham). As sondas foram purificadas sobre colunas Probe QuantTM G50 (Pharmacia). A radioatividade das sondas foi

determinada por contagem em efeito Cerenkov. A membrana de nylon foi pré-hibridada (Tabela 8) dentro de um forno de hibridação à 42°C durante 2 horas.

Tabela 8 Composição do meio de Pré-hibridação para Northern Blot

Produtos	Quantidade
SSPE	6 X
Denhardt	5 X
SDS	0,1%
PPNa	0,1%
Heparina	0,5 mg/ml
Formamida	50%
SsDNA	100 µg/ ml
Tampão DEPC	100ml

E depois hibridada em um meio (Tabela IX) contendo a sonda de interesse marcada com ^{32}P desnaturada por calor.

Tabela 9 Meio de hibridação para Northern Blot

Produtos	Quantidade
SSPE	6X
Denhardt	5 X
SDS	0,1%
PPNa	0,1%
Heparina	0,5 mg/ml
Formamida	50%
Tampão DEPC	100ml
Sonda de interesse	2×10^6 com / ml de solução

A hibridação foi realizada à 42°C, sob agitação constante em um forno de hibridação, durante uma noite. A membrana foi lavada com diferentes soluções adstringentes de acordo com a sonda utilizada (albumina, $\beta_2\text{m}$ e 28S). Na seqüência foi exposta à um filme Biomax MS junto com uma tela intensificadora à -80°C. A intensidade das bandas do autoradiograma respectivo foi quantificada por densitometria utilizando-se para este fim o programa NIH image/Fotolook. Todos os resultados foram relacionados ao 28S, RNA ribossômico utilizado como referência.

3.10. Método Estatístico

Neste trabalho foram realizadas 5 séries representativas não comparáveis entre si. Portanto as variáveis quantitativas foram expressas sob forma de média \pm desvio padrão.

No caso dos resultados do rendimento do isolamento dos hepatócitos antes e após gradiente de Percoll utilizou-se o teste de Wilcoxon sendo que considerou-se significativo quando $p \leq 0,05$

4. Resultados

4.1 Isolamento dos Hepatócitos Humanos

O rendimento de hepatócitos isolados obtidos após digestão enzimática, com colagenase, dos fragmentos hepáticos foi em média de $5,5 \times 10^6$ células vivas por grama de fígado, com viabilidade de 65% previamente ao gradiente de Percoll.

Após a separação das células hepáticas vivas e mortas em Percoll foi observado aumento significativo da viabilidade ($p \leq 0,03$) porém com diminuição também significativa do rendimento ($p \leq 0,03$). A pureza da solução final contendo hepatócitos foi próxima de 100%.

4.2. Resultados Morfológicos :

No dia zero, 2h após encapsulação, o aspecto das células no interior das fibras em corte semi-fino era o de hepatócitos isolados normais, por vezes binucleados. Alguns começavam a aderir-se entre si e à parede das fibras de encapsulação (figura 2).

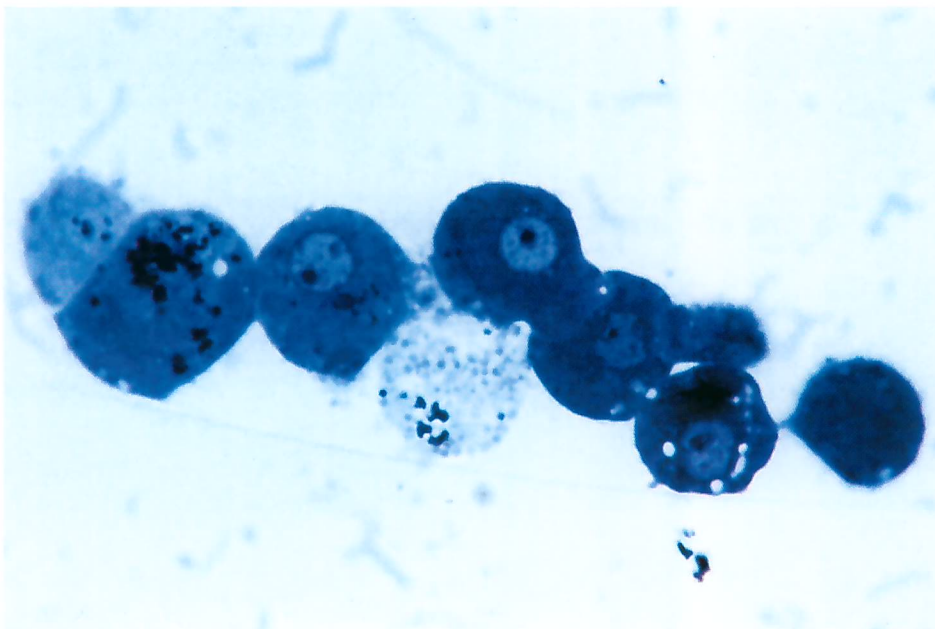


Figura 2 : Dia 0 - (A) Fotomicrografia de hepatócitos encapsulados aderidos à parte interna da fibra (B) Hepatócitos Binucleados (1250x)

No dia 3, maior quantidade de hepatócitos estavam em contato uns com os outros e aderiam à parede das fibras. As células formavam traves, organizadas em duas camadas. A análise ultra estrutural mostrou núcleos com nucléolos presentes, estruturas citoplasmáticas bem conservadas com mitocôndrias e retículo endoplasmático granular intacto. A membrana plasmática formava microvilosidades e canalículos biliares podiam ser observados na junção das células.

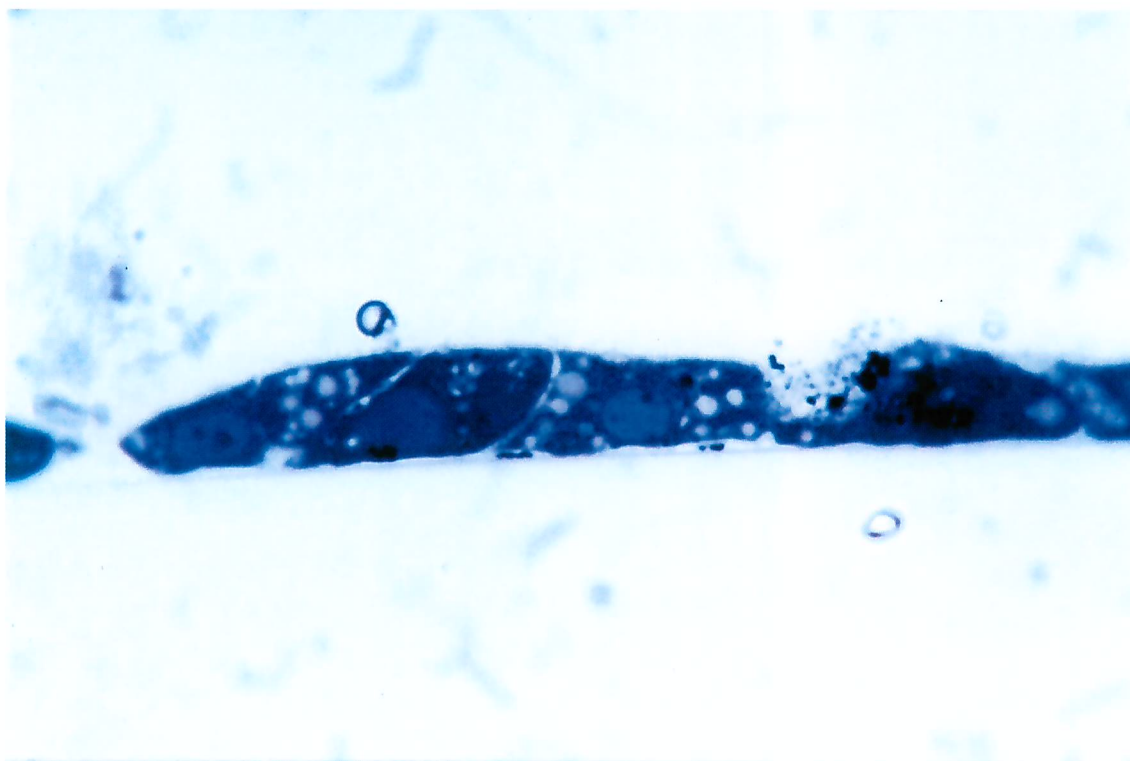


Figura 3 : Dia 3 - Fotomicrografia de hepatócitos organizados em camadas (400x)

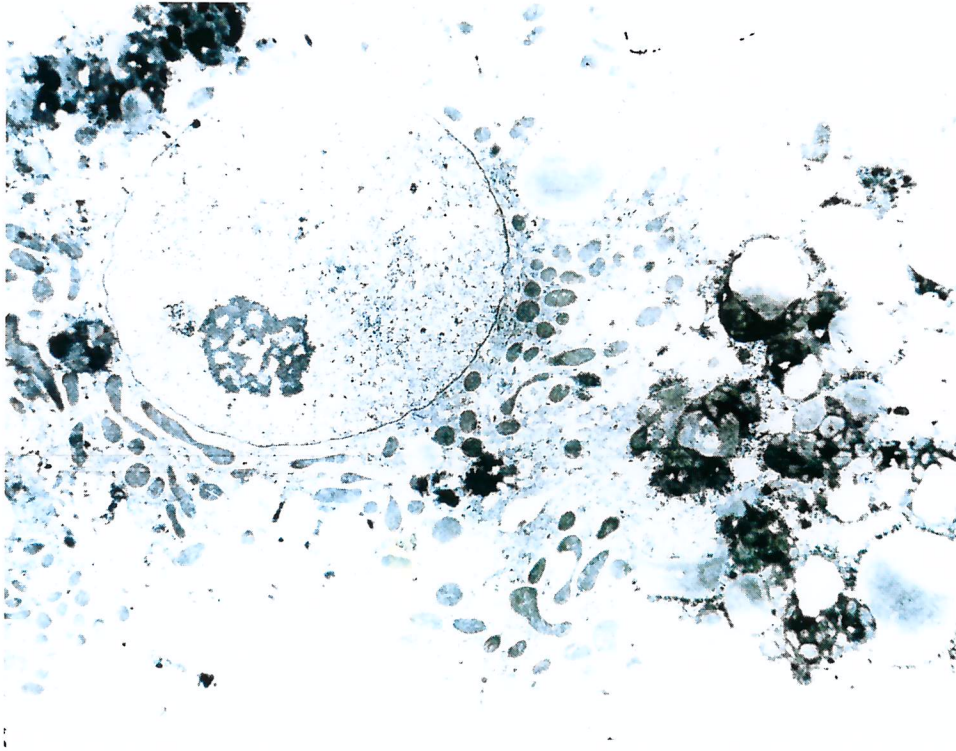


Figura 4 : Dia 3 - Fotomicrografia eletrônica de varredura de hepatócitos encapsulados demonstrando organelas intracelulares preservadas. (A) hepatócitos iniciando a formação de canalículos biliares. (B) Retículo endoplasmático rugoso. (3150x)

No sétimo dia de evolução, a maioria dos hepatócitos estavam bem conservados e organizados em traves pluricelulares aderentes à parede das fibras. Certas células (< 40%) em via de lise eram igualmente visíveis (figura 5).



Figura 5 : Dia 7 - Fotomicrografia de hepatócitos encapsulados. (A) hepatócitos em lise. (B) hepatócitos viáveis (400x).

No décimo quarto dia de evolução, a maioria das células estavam lisadas ou em via de lise com desaparecimento da membrana citoplasmática. Não foram observados sinais de apoptose (fragmentação e/ou condensação nuclear) nem de mitoses a D-3, D-7 ou D-14, tão pouco de linfócitos ou outros elementos celulares envolvidos nos fenômenos de rejeição do tipo celular.

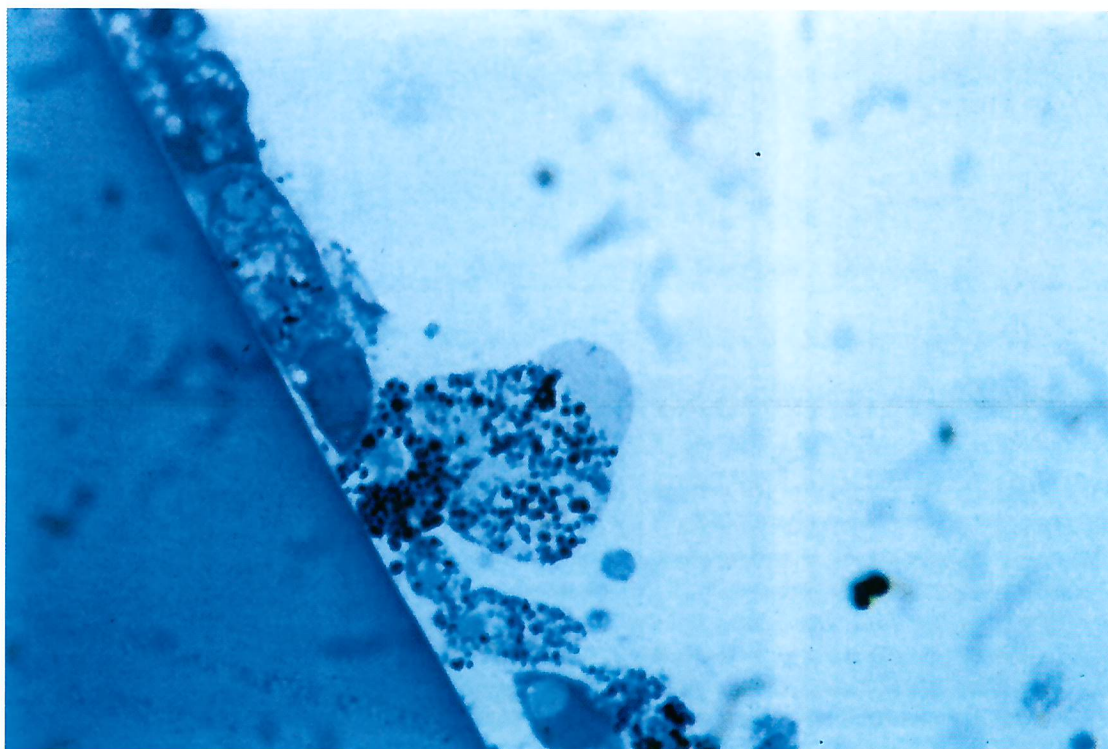


Figura 6 : Dia 14 - Fotomicrografia de hepatócitos encapsulados. (A) reação inflamatória na parte externa da fibra. (B) hepatócitos em vias de lise (400x).

4.3. Qualidade dos ADN extraídos

Após migração sobre gel de agarose foi observado uma intensidade constante das bandas nos dias D-0, D-3 e D-7 com uma diminuição do sinal a D-14. Não foram observados, qualquer processo de fragmentação compatível com apoptose celular (figura 7).

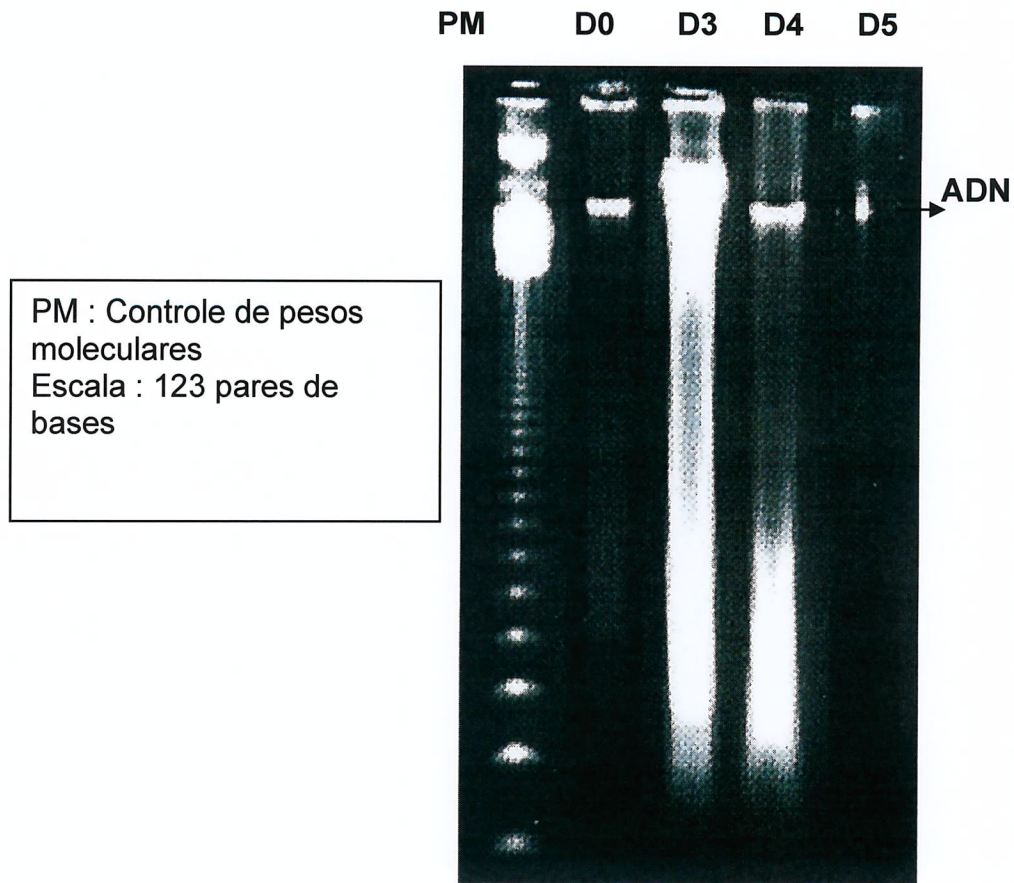


Figura 7 : Qualidade dos ADN extraídos

4.4. Detecção do ARNm da albumina e da β_2m através de RT-PCR semi-quantitativa

Após várias tentativas foi determinado que a quantidade ideal de seqüências oligonucleotídicas da β_2m deveria ser 2 vezes mais elevadas que as da albumina.

A figura 8 representa os sinais obtidos após eletroforese dos produtos PCR durante uma cinética de amplificação, em um gel de agarose 2,5% corado pelo BET.

Demonstra-se que a D-0 o nível máximo do produto de amplificação do RNAm da albumina era atingido já a partir de 24 ciclos. Entre D-3 e

D-7, o produto de amplificação era detectado já a 24 ciclos, porém o nível máximo só era atingido entre 28-30 ciclos. Enquanto que a D-14 o sinal era muito mais fraco, detectável unicamente a partir de 30 ciclos.

Quanto ao sinal da β_2m não havia modificação entre D-0 e D-3, diminuía a D-7 e estava ausente a D-14.

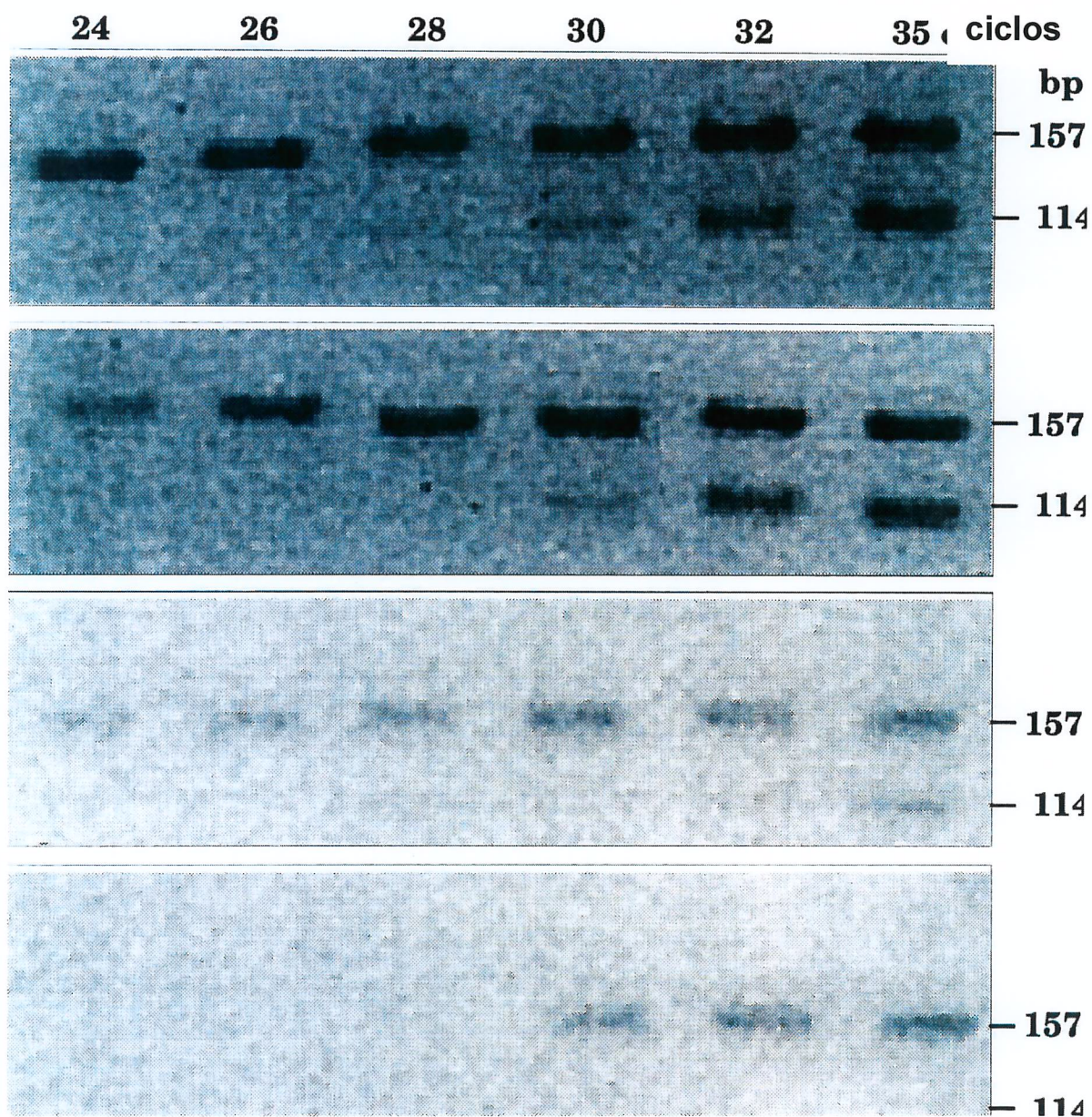


Figura 8 : Resultados RT PCR para Albumina (157 pares de bases) e β_2 microglobulina (114 pares de bases)

4.5. Detecção do RNAm da albumina por Northern blot

Os resultados da análise dos RNAm da albumina mostraram diminuição em relação à D-0, já a partir de D-3, de maneira mais importante que observado nos resultados de RT-PCR.

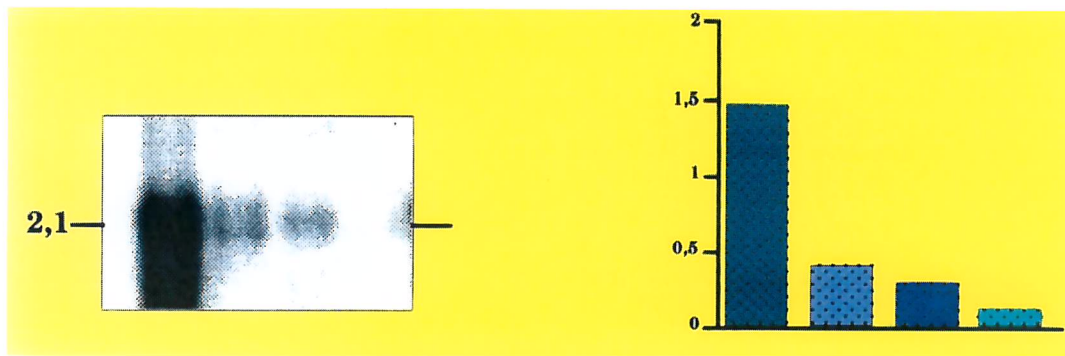


Figura 9 : Detecção dos ARN_m da albumina por Northern blot

5. Discussão

Diferentes tipos de membranas de encapsulação foram desenvolvidas para proteger tanto células alogênicas quanto xenogênicas dos fenômenos de rejeição. Sendo que a maior parte delas eram feitas de alginato (DIXIT et al. 1990, HIRAI et al. 1993, KASAI et al. 1992, BRUNI et al. 1989). Embora a sobrevivência de células xenogênicas encapsuladas neste tipo de material chegou até 29 dias (WONG, et al. 1988), foi difícil de recuperar-se os hepatócitos microencapsulados da cavidade peritoneal e avaliar a sua viabilidade.

É por este motivo que foi utilizado neste estudo fibras de encapsulação de hidrogel (AN-69). A biocompatibilidade deste material já está bem estabelecida (HONIGER, et al. 1995) e a porosidade estimada entre 150 e 165 KDa é maior do que a do alginato usado para microencapsulação (porosidade estimada entre 50 a 120 KDa) (WEN et al. 1998). Graças a esta maior porosidade, a maior parte das proteínas sintetizadas pelos hepatócitos podem ser liberadas através da membrana, com exceção apenas daquelas com grande peso molecular como o fibrinogênio por exemplo, ao mesmo tempo que previne o contato direto das células transplantadas com o IgM e grande parte dos componentes do complemento do receptor (HONIGER, et al. 1995). Além disso a recuperação pós-transplante deste tipo de material é simples e permite sem maiores dificuldades o estudo do material encapsulado.

Poucos estudos relatam o transplante de hepatócitos humanos (MOSCIONI, et al. 1989, MITO, et al.1991). Em um destes estudos, as células hepáticas humanas foram isoladas a partir de segmentectomias e

autotransplantadas sem imunossupressão em pacientes portadores de insuficiência hepática crônica. O sítio de implantação foi o baço no qual a persistência de hepatócitos foi evidenciada por scanner, sem que uma melhora clínica tenha sido demonstrada (MITO, et al.1991). Em outro estudo, hepatócitos humanos transplantados sobre carreadores, permitiu a correção de deficiência enzimática em ratos Gunn atímicos até o 30º dia. Entretanto, neste mesmo estudo, hepatócitos humanos também foram transplantados em ratos Gunn imunocompetentes, sem imunossupressão, e nestes, a correção da deficiência enzimática durou menos que 5 dias (MOSCIANI, et al. 1989). Quando foi anteriormente utilizada a mesma técnica para transplante de hepatócitos alogênicos ou xemogênicos, de origem murina sem imunossupressão em ratos, a sobrevivência dos hepatócitos transplantados e a produção de albumina foram observados até o 90º dia (BALLADUR, et al. 1995). A correção de deficiências enzimáticas e aumento da sobrevivência de ratos em vigência de insuficiência hepática aguda foram assim obtidas (GOMEZ, et al. 1997, ROGER, et al. 1998).

Este estudo demonstra portanto que existem diferenças entre os resultados da encapsulação e transplante de hepatócitos humanos em relação aos de origem murina. Observou-se no presente trabalho, com técnicas de biologia molecular, que os hepatócitos humanos são capazes de sobreviver até pelo menos D-7 com aspecto ultraestrutural de hepatócitos bem diferenciados, assim como de conservar sua capacidade de síntese demonstrada pela expressão do gene da albumina. Uma das hipótese para essas diferenças é que nos outros trabalhos foram utilizados critérios convencionais de análise de viabilidade celular, como

dosagem de proteína, atividade de citocromo P-450 e características morfológicas. Estes métodos podem perder em sensibilidade para pequenas reduções de viabilidade celular em relação às técnicas de biologia molecular (WEN, et al. 2000). Uma outra hipótese para explicar estas discrepâncias seria de origem imunológica, pois as combinações xenogênicas dos trabalhos anteriores eram menos discordantes (GOMEZ, et al. 1997, ROGER, et al. 1998). Porém neste estudo, pensando-se numa resposta do tipo celular, em momento algum foram observadas células implicadas no processo de rejeição no interior das fibras de encapsulação. Quanto a uma reação do tipo humoral, apesar dos hepatócitos expressarem baixos níveis de xenoantígenos (CALMUS, et al. 1993, FUJIOKA, et al. 1995) eles são rapidamente destruídos, como foi demonstrado em um estudo anterior do laboratório, no qual estes quando injetados em ratos sem encapsulação foram totalmente destruídos em menos de sete dias (WEN, et al. 1998). Porém quando encapsulados, como no nosso caso, o mesmo trabalho demonstrou que mesmo 30 dias após o transplante eles ainda eram capazes de produzir albumina em cultura. Observou-se ainda que a partir de D-7 detectava-se a formação tanto de Ac anti-albumina humana, quanto anti-hepatócitos humanos, porém a membrana de encapsulação era capaz de protegê-los desta imunização por pelo menos 30 dias sem perda da sua função.

Neste trabalho, pela primeira vez na literatura, serviu-se de técnicas de biologia molecular para evidenciar-se o ataque do receptor contra as células humanas encapsuladas. Como visto, o DNA das células manteve-se íntegro

por todo período de estudo comprovando-se a ausência de apoptose celular e indiretamente ausência de um mecanismo imunológico.

Ainda em relação às moléculas do CMH de classe I, as quais estão envolvidas no processo de apresentação de antígenos aos linfócitos T citotóxicos CD8+, geralmente só se exprimem nos hepatócitos em caso de estimulação (Calmus et al. 1991). O principal fator capaz de modular a expressão celular do CMH é a resposta imunológica (Calmus et al 1991), sendo o interferon do tipo γ o principal mediador capaz de induzir as moléculas do CMH. Experimentalmente a rejeição do fígado se acompanha de forte expressão de moléculas do CMH : expressão de moléculas de classe I nos hepatócitos e de classe II nos canais biliares, sendo que estas alterações aparecem progressivamente e são máximas no 7º dia (Fabble et al. 1987). Enquanto que no presente estudo observou-se diminuição progressiva da expressão da β_2m , a qual é constituinte do CMH do tipo I e portanto este fenômeno observado não é condizente com resposta imunológica contra os hepatócitos humanos transplantados. Então a partir desses resultados assim como dos resultados prévios da mesma equipe, existe portanto um grau de imunização contra às células humanas encapsuladas porém este fenômeno não é capaz nem de induzir a apoptose destas células e nem de prejudicar suas funções pelo menos a curto prazo.

Pensando-se na utilização deste modelo para períodos mais longos de necessidade, foi inicialmente sugerido que a resposta humoral não apresentaria efeito deletério mesmo a longo prazo na função de células xenogênicas como hepatócitos e ilhotas pancreáticas (WEN, et al 1998, LANZA, et al. 1994).

como hepatócitos e ilhotas pancreáticas (WEN, et al 1998, LANZA, et al. 1994). Porém recentemente um estudo demonstrou que associando-se um curto ciclo de imunossupressão com ciclosporina, eliminava-se a imunização contra hepatócitos xenogênicos e prolongava-se de maneira significativa a redução do colesterol sérico em coelhos Watanabe (GUNSALUS, et al. 1997). Em um estudo do Laboratório de Cirurgia Experimental do Hôpital Saint-Antoine, justamente abordando então esta questão, utilizou-se hepatócitos humanos, porém derivados de linhagem celular do tipo HepG2, encapsulados e transplantados em ratos e submetidos a um curto ciclo de ciclosporina conseguia-se eliminar-se a imunização anteriormente demonstrada e prolongava-se suas funções por pelo menos 60 dias (WEN, et al. 2000).

Estes resultados sugerem portanto que existe um certo grau de dano crônico às células xenogênicas induzido pela resposta humoral ou por fatores solúveis liberados das células T ativadas. Portanto a encapsulação pode prevenir o contato direto entre células encapsuladas e anticorpos naturais IgM, assim como de componentes do complemento. Porém a via indireta de apresentação do antígeno pode resultar na produção de anticorpos ou de mediadores inflamatórios (GILL, et al. 1995) que teriam efeito deletério na função hepatocitária após 30 dias do transplante (WEN, et al. 2000).

Observou-se uma discordância entre o bom aspecto das células encapsuladas e transplantadas, com os resultados da expressão do gene da albumina, os quais apresentaram uma queda significativa já precocemente principalmente no Northern blot. O que a princípio poderia ser creditado

erroneamente a uma diminuição de viabilidade celular, deve-se porém à uma reação da própria célula ao processo de isolamento celular. A ruptura das comunicações celulares leva à uma saída dos hepatócitos da fase de latência G₀, na qual eles são mantidos in vivo e sua entrada na fase G₁ do ciclo celular (ILYIN, et al. 1998), a qual se acompanha de uma diminuição da transcrição dos genes hepatocitários específicos. Teoricamente neste modelo deve ser possível estimular-se a proliferação hepatocitária como observado in vitro (BLOCK, et al. 1996). Vários estudos demonstraram aumento da proliferação de hepatócitos transplantados no baço (GUPTA, et al. 1987, KATO, et al. 1996, JIANG, et al. 1997, YAMAGUCHI, et al. 1997) ou sobre esponjas biodegradáveis (MOONEY, et al. 1997) após tanto uma hepatectomia à 70% quanto após injeção de fatores de crescimento por via exógena.

6. Conclusões

Este trabalho permitiu portanto a demonstração que em modelo xenogênico extremamente discordante, hepatócitos humanos encapsulados e transplantados em ratos sem imunossupressão, permaneceram viáveis durante pelo menos sete dias.

Durante este período os critérios estruturais de diferenciação se mantiveram. A expressão do gene de função hepatocitária de síntese se manteve ainda que com uma perda precoce em relação a D-0. Foi comprovado que este fenômeno não se deve à uma reação imunológica, mas sim provavelmente à uma reação da célula hepática ao traumatismo do isolamento celular.

Resta determinar, agora que a questão imunológica foi respondida, como este modelo iria se comportar numa situação de insuficiência hepática aguda experimental antes de se passar à aplicação clínica.

Referências Bibliográficas

1. BALLADUR, P.; CREMA, E.; HONIGER, J.; CALMUS, Y.; BAUDRIMONT, M.; DELELO, R.; CAPEAU, J.; NORDLINGER, B. Transplantation of allogeneic hepatocytes without immunosuppression: Long-term survival. *Surgery*, 1995; 117:189-194.
2. BALLEET, F.; BOUMA, M.; WANG, S.R. AMIT, N.; MARIA, S.J.; INFANTE, R. Isolation, culture and characterization of adult human hepatocytes from surgical liver biopsies. *Hepatology*, 1984; 4: 849-854.
3. BAUMGARTNER, D.; LA PLANTE O'NEILL, P.; SUTHERLAND, D.; NAJARIAN, J. Effects of intrasplenic injection of hepatocytes, hepatocyte fragments and hepatocyte culture supernatants on D-galactosamine-induced liver failure in rats. *Eur. Surg. Res.*, 1983; 15: 129-135.
4. BERRY, M.N.; FRIEND, D.S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell. Boil.*, 1969; 43:506-520.
5. BLOCK, G.D.; LOCKER, J.; BOWEN, W.C.; PETERSEN, B.E.; KATYAL, S.; STROM, S.C. et al. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF α in a chemically defined (HGM) medium. *J. Cell. Boil.*, 1996; 132:1133-1149.
6. BOREL RINKES, I.H.M.; BIJMA, A.M.; KAPPERS, W.A.; SINAASAPPEL, M.; HOEK, F.J.; JANSEN, P.L.M. VALERIO, D.; TERPSTRA, O.T. Evidence of metabolic activity of adult and fetal rat hepatocytes transplanted into solid supports. *Transplantation*, 1992; 54: 210-214.
7. BRUNI, S.; CHANG, T.M.S. Hepatocytes immobilized by microencapsulation in artificial cells effects on hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Biomat Art Cells Artif Organs*, 1989;17: 403-411.
8. BUCHER, N.L.; PATEL, V.; COHEN, S. Hormonal factors concerned with liver regeneration. In Bucher, N.L., ed. *Hepatotropic factors*. Ciba Foundation Symposium 55. Amsterdam: Elsevier: 45-67.
9. CAI, Z.; SHI, Z.; O'SHEA, G.M.; SUN, A.M. Microencapsulated hepatocytes for bioartificial liver support. *Artif. Organs.*, 1988; 12: 388-393.
10. CALMUS, Y.; AYANI, E.; CARDOSO, J.;HOUSSIN, D.; WEILL, B. Target antigens of hyperacute xenogeneic rejection in the rat to guinea pig and guinea pig to rat discordant combination. *Transplantation*, 1993; 56:778-785.
11. CALMUS, Y.; WEILL, B.; POUPON, R. Expression hépatique des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. *Gastroenterol. Lin. Biol.*, 1991; 15: 110-119.
12. CHANG, T.M.S. Semipermeable microcapsules. *Science*, 1964; 146: 522-525.
13. CLÉMENT, B.; GUGUEN-GUILLOUZO, C.; CAMPION, J.P.; GLAISE, D.; BOUREL, M.; GUILLOUZO, A. Long-term co-cultures of adult human hepatocytes with rat liver epithelial cells. Modulation of albumin secretion and accumulation of extracellular material. *Hepatology*, 1984; 4: 373-380.
14. COBOURN, C.S.; MAKOWKA, L.; FALK, J.A.; FALK, R.E. Allogeneic intrasplenic hepatocyte transplantation in the Gunn rat using cyclosporin A immunosuppression. *Transplantation*, 1986; 42; 537-541.
15. CUERVAS-MONS, V.; CIENFUEGOS, J.A.; MAGANTO, P.; RODRÍGUEZ, V.; EROLES, G.; PINEDO, I.; SANTAMARIA, L.; RAMOS, J.; ORTIZ, J.L.; CASTILLO-OLIVARES, J.L. Long-term evaluation of isolated syngeneic

- hepatocytes transplanted into the normal rat spleen by Tc ^{99m}Tc-HIDA scintigraphy. *Transplantation* 1985; 39:87-90.
16. DARBY, H.; SELDEN, C.; HODGSON, H.J. Prolonged survival of cyclosporin-heated allogenic hepatocellular implants. *Transplantation*, 1986; 42: 325-326.
 17. DEEG, H.J. Ultraviolet irradiation in transplantation biology, manipulation of immunity and immunogenicity. *Transplantation*, 1988; 45: 845-851.
 18. DEMETRIOU, A.A.; REISNER, A.; SANCHEZ, J.; LEVENSON, S.M.; MOSCIONI, A.D.; CHOWDHURY, J.R. Transplantation of microcarrier-attached hepatocytes into 90% partially hepatectomized rats. *Hepatology*, 1988; 8:1006-1009.
 19. DEMETRIOU, A.A.; WHITING, J.; FELDMAN, D.; LEVENSON, S.M.; CHOWDHURU, N.R.; MOSCIONI, A.D.; KRAM, M.; CHOWDHURY, J.R. Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes. *Sciences*, 1986; 233:1190-1192.
 20. DEMMA, I.; HOUSSIN, D.; CAPRON, M.; MINATO, M.; MORIN, J.; GIGOU, M.; SZEKELY, A.M.; BISMUTH, H. Therapeutic efficacy of the transplantation if isolated failure: a study of the mechanism. *Eur. Surg. Res.*, 1986; 18: 12-18.
 21. DIXIT, V.; DARVASI, R.; ARTHUR, M.; BREZINA, M.; LEWIN, K.; GITNICK, G. Restoration of liver function in Jun rats without immunosuppression using transplanted microencapsulated hepatocytes. *Hepatology*, 1990; 12:1342-1349.
 22. DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, 1991; 19:4008.
 23. DUBENSKY, T.W.; CAMPBELL, B.A.; VILLAREA, L. Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 7529-7533.
 24. EBATA, H.; OIKAWA, I.; MITO, M. Rejection of allogenic hepatocytes and fetal hepatic tissue transplanted into the rat spleen. *Transplantation*, 1985; 39: 221-223.
 25. FABLE, J.W.; MILTON, A.D.; SPENCER, S.; SETTAF, A.; HOUSSIN, D. Regulation of alloantigen expression in different tissues. *Transp Proc*, 1987; 19:45-9.
 26. FERRY, N.; DUPLESSIS, O.; HOUSSIN, D.; DANOS, O.; HEARD, J.M. Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 3655-3659.
 27. FREMOND, B.; MALAUDAIN, C.; GUYOMEROL, C.; CHESNES, C.; GUILLOUZO, A.; CAMPION, J.P. Correction of bilirubin conjugation in the Gunn rat using hepatocytes immobilized in alginate gel beads, as an extracorporeal bioartificial liver. *Cell. Transplant*, (in press).
 28. FRY, J. Preparation of mammalian hepatocytes. *Methods Enzymol*, 1981; 77:130.
 29. FUJIOKA, H.; CRAMER, D.; YASUNAGA, C.; TUSO, P.; WU, G.; MAKOWKA, L. Differential patterns of reaction of human natural antibodies to pig hepatocytes and vascular endothelium. *Liver Transplant Surg.*, 1995; 1:85-93.
 30. FULLER, B.J.; LEWIN, J.; SAGE, L. Ultrastructural assessment of cryopreserved hepatocytes after prolonged ectopic transplantation. *Transplantation*, 1983; 15: 15-18.

31. GILL, R.; WOLF, L. Immunobiology of cellular transplantation. *Cell Transplant*, 1995;4:361-370
32. GOMEZ, N.; BALLADUR, P.; CALMUS, Y.; BAUDRIMONT, M.; HONIGER, J.; DELELO, R.; MYARA, A.; CREMA, E.; TRIVIN, F.; CAPEAU, J.; NORDLINGER, B. Evidence for survival and metabolic activity of encapsulated xenogeneic hepatocytes transplanted without immunosuppression in jun rats. *Transplantation*, 1997; 63:1718-1723.
33. GROTH, C.G.; ARBORGH, B.; BJÖRHEN, C.; SUNDBERG, B.; LINDGREN, G. Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyl-transferase deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant Proc.*, 1977; 9: 313-316.
34. GUNSALUS, J.R.; BRADY, D.A.; COULTER, S.M.; GRAY, B.M.; EDGE, A.S.B. Reduction of serum cholesterol in Watanabe rabbits by xenogeneic hepatocellular transplantation. *Nat Med.*, 1997; 3:48-53.
35. GUPTA, S. A novel system for transplantation of isolated hepatocytes utilizing HbsAg-producing transgenic donor cell. *Transplantation*, 1990; 50: 472-475.
36. GUPTA, S.; JOHNSTONE, R.; DARBY, H.; SELDEN, C.; PRICE, Y.; HODGSON, H.J. Transplanted isolated hepatocytes: effect of partial hepatectomy on proliferation of long-term syngeneic implants in rat spleen. *Pathology*, 1987; 19:28-30.
37. HERRING, A.; RAYCHAUDHURI, R.; KELLEY, S.; IYPE, T. Repeated establishment of diploid epithelial cell cultures from normal and partially hepatectomized rat. *In vitro*, 1983; 19: 576-588.
38. HILLAN, K.J.; BURT, A.D.; GEORGE, W.D.; MALSWEEN, R.N.M.; GRIFITHS, M.R.; BRADLEY, J.A. Intrasplenic hepatocyte in rats with experimental liver injury: morphological and morphometric studies. *J. Pathol*, 1989; 156: 67-73.
39. HIRAI, S.; KASAI, S.; MITO, M. Encapsulated hepatocyte transplantation for the treatment of D-galactosamine-induced acute hepatic failure in rats. *Eur Surg Res*, 1993, 25:193-202.
40. HIYASHI, H.; HIRASAWA, H.; SUGAI, T.; KOBAYASHI, H.; ODAKA, M.; SATO, H. Depresión of reticuloendothelial system phagocytic activity following massive hepatectomy and its treatment with ATP-MgCl₂ administration. *Eur. Surg. Res.*, 1981; 13: 105.
41. HONIGER, J.; BALLADUR, P.; MARIANI, P.; CALMUS, Y.; VAUBOURDOLLE, M.; DELELO, R. et al. Permeability and biocompatibility of a new hydrogel used for encapsulation of hepatocytes. *Biomaterials*, 1995; 16:753-759.
42. ILYN, G.; LOYER, P.; CORLY, A.; CARIOU, S.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Prolifération et maintien des activités fonctionnelles des hépatocytes in vitro. Dans: FRANCO, D.; BOUDJEMA, K.; VARET, B. eds. *Ilots de Langerhan et hépatocytes: vers une utilisation thérapeutique*. Paris: INSERM 1998; 161-169.
43. ISOM, K.C. SEXOTT, T.; GEORGOFF, I.; WOODWORTH, C.; MUMMAW, J. Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985; 82: 3252-3256.
44. JAFFE, V.; DARBY, H. SELDEN, S.; HODGSON, H.J.F. The growth of transplanted liver cells within the pancreas. *Transplantation*, 1988; 45: 497-498.
45. JIANG, B.; SAWA, M.; YAMAMOTO, T.; KASAI, S.; Enhancement of proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in cirrhotic rats by hepatic stimulatory substance. *Transplantation*, 1997; 63:131-135.

46. JIRTLE, R.L.; MICHALOPOULOS, G. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. *Cancer Res.*, 1982; 42: 3000-3004.
47. KALAYOGLU, M.; STRATTA, R.J. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet*, 1988; 4: 548-559.
48. KANEDA, Y.; IWAI, K.; UCHIDA, T. Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science*, 1989; 243: 375-378.
49. KARLSON, S. Treatment of genetic defects in hematopoietic cell function by gene transfer. *Blood*, 1991; 78: 2481-2492.
50. KASAI, S.; SAWA, M.; HIRAI, S.; NISHIDA, Y.; ONODERA, K.; YAMAMOTO, T.; MITO, M. Beneficial effect of hepatocyte transplantation on hepatic failure in rats. *Transplant Proc*, 1992; 24:2990-2992.
51. KATO, K.; ONODERA, K.; SAWA, M.; IMAI, M.; KAWAHARA, T.; KASAI, S.; MITO, M. Effect of hepatocyte growth factor on the proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1996; 222:101-106.
52. KAY, M.A.; BAILEY, P.; ROTHENBERG, S.; LELAND, F.; FLEMING, L.; PONDER, K.P.; LIU, T.; FINEGOLD, M.; DARLINGTON, G.; POKORNY, W. et al. Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 89-93.
53. KRAUSE, A.W.; CARLEY, W.W.; WEBB, W.W. Fluorescent erythrosine B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. *J. Histochem Cytochem*, 1984; 32:1084-1090.
54. KUSANO, M.; EBATA, H.; ONISH, T.; SAITO, T.; MITO, M. Transplantation of cryopreserved isolated hepatocytes into the rat spleen. *Transplant Proc.*, 1981; 13: 848-854.
55. KUSANO, M.; MITO, M. Observations on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterology*, 1982; 86: 616-628.
56. LANZA, R.; BEYER, A.; CHICK, W. Xenogeneic humoral responses to islets transplanted in biohybrid diffusion chambers. *Transplantation*, 1994; 57:1371-1375.
57. LEGRELLE, M.; CAPRON, F.; DAVID, P.; ALTMAN, J.J. Co-cultures et co-greffes d'îlots de Langerhans et d'hépatocytes: rôle hépatotrope du pancréas endocrine (résumé). *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 1992; 16: A145.
58. LIM, R. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, 1980; 210: 908-910.
59. MAGANTO, P.; CIENFUEGOS, J.A.; SANTAMARIA, L. Cryopreservation and transplantation of hepatocytes: an approach for culture and clinical application. *Cryobiology*, 1988; 25: 311-322.
60. MAGANTO, P.; TRABER, P.G.; RUSNELL, C.; DOBBINS, W.O.; KEREN, D.; GRUMUCIO, J.J. Long-term maintenance of the adult pattern of liver specific expression for P450b, P-450c. albumine and alpha-fetoprotein genes in intrasplenically transplanted hepatocytes. *Hepatology*, 1990; 4: 585-592.
61. MAKOWKA, L. Allogeneic and xenogeneic hepatocyte transplantation in experimental experimental hepatic failure. *Transplantation*, 1980; 30: 429-434.

62. MAKOWKA, L.; FALK, R.E.; ROSTEIN, L.E.; FALK, J.A.; NOSSAL, N.; LANGER, B.; BLENDIS, L.M.; PHILLIPS, M.J. Reversal of experimental acute hepatic failure in the rat. *J. Surg. Res.*, 1980; 29: 479-487.
63. MAKOWKA, L.; FALK, R.E.; ROTSTEIN, L.E.; FALK, J.A.; NOSSAL, N.; LANGER, B.; BLENDIS, L.M.; PHILLIPS, M.J. Reversal of toxic and xenogeneic hepatocyte transplantation. *Surgery*, 1980; 88: 244-253.
64. MAKOWKA, L.; ROSTEIN, L.E.; FALK, J.A.; ZUCK, R.; LANGER, B.; BLENDIS, L.M.; PHILLIPS, M.J. Studies into the mechanism of reversal of experimental acute hepatic failure by hepatocyte transplantation. *Can. J. Surg.*, 1981; 24: 39-43.
65. MATAS, A.J.; SUTHERLAND, D.E.; STEFFES, M.W.; MAUER, S.M.; LOWE, A.; SIMMONS, R.L.; NAJARIAN, J.S. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science*, 1976; 192: 892-894.
66. MATSUMURA, K.N.; GUEVARA, G.R.; HUTSON, H.; HAMILTON, W.L.; RIKIMARY, M.; YAMASAKI, G. MATSUMURA, M.S. Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report. *Surgery*, 1987; 2: 97-103.
67. MICHALOPOULOS, G.K.; ZARNEGAR, R.; APPASAMY, R. Hepatocyte growth factor (HGF). In: Bernuau, D.; Feldmann, G, eds. *Liver regeneration*. Paris: John Libbey Eurotexte, 1982: 85-101
68. MINATO, M.; HOUSSIN, D.; DEMMA, I.; MORIN, J.; GIGOU, M.; SZEKEY, A.M. BISMUTH, H. Transplantation of hepatocytes for treatment of surgically induced acute hepatic failure in the rat. *Eur Surg Res*, 1984; 16:162-169.
69. MITO, M.; EBATA, H.; KUSANO, M.; ONISHI, T.; SAITO, T.; SAKAMOTO, S. morphology and function if isolated hepatocytes transplanted inti rat spleen. *Transplantation*, 1979; 28: 499-505.
70. MITO, M.; KUSANO, M. Hepatocyte transplantation in man. *Cell. Transplant.*, 1991; 290:160-166.
71. MOONEY, D.J.; SANO, K.; KAUFMANN, P.M.; MAJAHOD, H.; SCHLOO, B.; VACANTI, J.P.; LANGER, R. Long-term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable polymer sponges. *J. biomed. Mater. Res.*, 1997; 37:413-420.
72. MORSIANI, E.; FOLGI, L.; GORINI, P.; RICCI, D.; MAZZONI, M. Preparation and allotransplantation of isolated hepatocytes in partially hepatectomized rats. *Ital. J. Surg. Sci.*, 1985; 15: 23-25.
73. MOSCIONI, A.D.; CHOWDHURY, J.R.; BARBOUR, R.; BROWN, L.L.; CHOWDHURY, N.R.; COMPETIELLO, L.S.; LAHIRI, P.; DEMETRIOU, A.A. Human liver cell transplantation. Prolonged function in athymic-Gunn and athymic-analbuminecmic hybrid rats. *Gastroenterology*, 1989; 96:1546-1551.
74. MULLEN, K.D.; MC CULLOUGH, A.J. Problem with animal models of chronic liver disease: suggestion for improvement of standardization. *Hepatology*, 1989; 9: 500-503.
75. NICOLUZZI, J.E.; BARBU, V.; BAUDRIMONT, M.; LAKEHAL, F.; BECQUEMONT, L.; CHAFAI, N. et al. Viabilité et état de différenciation des hépatocytes humains immunoprotégés par macroencapsulation et transplantés chez le rat. *Gastroenterol. Clin. Biol*, 2000; 24:342-348.

76. NORDLINGER, B.; BOUMA, M.E.; WANG, S.R.; VERTHIER, N.; HUGUET, C.; INFANTE, R. High-yield preparation of porcine hepatocytes for long survival after transplantation in the spleen. *Eur. Surg. Res.*, 1985; 17: 377-382.
77. NORDLINGER, B.; BOUMA, M.E.; WANG, S.R.; VERTHIER, N.; HUGUET, C.; INFANTE, R. High yield preparation of porcine hepatocytes for long survival after transplantation in the spleen. *Eur Surg Res*, 1985; 17:377-382.
78. NORDLINGER, B.; MARIANI, P.; CALMUS, Y. Transplantation d'hépatocytes isolés. Etat des connaissances actuelles et perspectives. *Gastroenterol Clin. Biol.*, 1994; 18:68-77.
79. NORDLINGER, B.; WANG, S.R.; BOUMA, M.E.; VERTHIER, N.; HILLAN, K.; DELELO, R. INFANTE, R. Can hepatocytes proliferate when transplanted into the spleen: Demonstration by autohistoradiography in the rat. *Eur Sur Res.*, 1987; 19: 381-387.
80. PANIS, Y.; PUTS, J.P.; BALLEET, F.; PENIN, E., DELELO, R.; VERTHIER, N.; NORDLINGER, B. The isolated perfused rat spleen. An original method for studying the function of hepatocytes transplanted into the spleen. *Transplantation*, 1990; 49:756-759.
81. PICHLMAYER, R.; RINGE, B.; GUBERNATIS, G. et al. Transplantation einer spenderleber auf zwis empfangen (split liver transplantation) eine neue methode in der weitzenwicklung der lebesegment transplantation. *Langenbecks Arch Chir*, 1989; 373: 127.
82. REES, J.A.; BYARD, J.L. Isolation and culture of adult hepatocytes from liver biopsies. *In vitro*, 1981; 17: 935-941.
83. REID, L.M.; JEFFERSON, D.M. Culturing hepatocytes and other differentiated cells. *Hepatology*, 1984; 4: 548-559.
84. RIBEIRO, J.; BALLEET, F.; PANIS, Y.; DELELO, R.; LEGENDRE, C.; NORDLINGER, B. Intransplenic hepatocellular transplantation corrects hepatic encephalopathy in portacaval shunted rats. *Hepatology*, 1992; 15: 12-18.
85. RIBEIRO, J.; NORDLINGER, B.; BALLEET, F.; CYNOBER, L.; COUDRAY-LUCAS, C.; BAUDRIMONT, M.; LEGENDRE, C.; DELELO, R.; PANIS, Y. Intrasplenic hepatocellular transplantation corrects hepatic ebcephalopathy in porto-caval shunted rats. *Hepatology*, 1992; 15:12-18.
86. RICORD, C.; FLYE, M.W.; LACY, P.E. Renal subcapsular transplantation of clusters of hepatocytes in conjunction with pancreatic islets. *Transplantation*, 1988; 45: 1148-1151.
87. ROGER, V.; BALLADUR, P.; HONIGER, J.; BAUDRIMONT, M.; DELELO, R.; ROBERT, A.; CALMUS, Y.; CAPEAU, J.; NORDLINGER, B. Internal bioartificial liver with xenogeneic hepatocytes prevents death from acute liver failure: an experimental study. *Ann. Surg.*, 1998; 228:1-7.
88. ROGER, V.; BALLADUR, P.; HONIGER, J.; DELELO, R.; BAUDRIMONT, M.; ROBERT, A.; CALMUS, J.; CAPEAU, J.; NORDLINGER, B. Un bon modèle d'insuffisance hépatique aiguë: l'hépatectomie de 95%. *Chirurgie*, 1996; 121:470-473.
89. SEBROW, O.; GATMAITAN, Z.; ORLANDI, F.; CHOWDHURY, R.; ARIAS, I.M. Replacement of hepatic UDP-glucoronyl transferase activity in homozygous Gunn rats. *Gastroenterology*, 1980; 78: 1332.
90. SEGLEN, P.O.; Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell. Boil.*, 1976; 13:29-83.

91. SELDEN, C.; GUPTA, S.; JOHNSTONE, R.; HODGSON, H.J.F. The pulmonary vascular bed as a site for implantation of isolated liver cells inbred rats. *Transplantation*, 1984; 38: 81-83.
92. SNODGRASS, P.J. Urea cycle enzyme activities are normal and inducible by a high-protein diet CCl₄ cirrhosis of rats. *Hepatology*, 1989; 9: 373-379.
93. SOMMER, B.G.; SUTHERLAND, D.E.R.; SIMMONS, R.L.; NAJARIAN, J.S. Hepatocellular transplantation for treatment of D-galactosamine-induced acute liver failure in rats. *Transplant Proc.*, 1979; 11: 578-584.
94. SOMMER, B.G.; SUTHERLAND, D.E.R.; SIMMONS, R.L.; NAJARIAN, J.S. Hepatocellular transplantation for experimental ischemic acute liver failures in dogs. *J. Surg. Res.*, 1980; 29: 319-325.
95. SOMMER, B.G.; SUTHERLAND, D.E.R.; SIMMONS, R.L.; NAJARIAN, J.S. Hepatocellular transplantation for treatment of D. Galactosamine induced acute liver failure in rats. *Transplant Proc*, 1979; 11: 578-584.
96. SUSSMAN, N.L.; CHONG, M.G.; KOUSSAYER, T.; HE D.; SHANG, T.A.; WHISENNAND, H.H. KELLY, J.H. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology*, 1992; 16: 60-65.
97. SUTHERLAND, D.E.R.; NUMATA, M.; MATAS, A.J.; SIMMONS, R.L. NAJARIAN, J.S. Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery*, 1977; 82: 124-132.
98. VONS, C.; PEGORIER, J.P.; GIRARD, J.; KOHL, C.; IVANOV, M.A.; FRANCO, D. Regulation of fatty acid metabolism by pancreatic hormones in cultured human hepatocytes. *Hepatology*, 1991; 13: 1126-1130.
99. VROEMEN, J.P.A.M.; BUURMAN, W.A.; HEIRWEGH, K.P.; VAN DER LINDER, C.J.; KOSSTRA, G. The cytogenetic behavior of donor hepatocytes after syngenic hepatocyte transplantation into the spleen. *Transplantation*, 1988; 45: 600-607.
100. WANG, S.R.; RENAUD, G.; INFANTE, J.; CATALA, D.; INFANTE, R. Isolation of rat hepatocytes with EDTA and their metabolic function in primary culture. *In vitro*, 1985; 21: 526-530.
101. WEN, L.; CALMUS, Y.; HONIGER, J.; CONTI, F.; CAPEAU, J.; WEILL, B. et al. Encapsulated xenogeneic hepatocytes remain functional after peritoneal implantation despite immunization of the host. *J Hepatol*, 1998; 26:960-970.
102. WEN, L.; GRUDE, P.; CONTI, F.; HONIGER, J.; CAPEAU, J.; NORDLINGER, B.; WEILL, B.; CALMUS, Y. Suppression of humoral immunization against encapsulated xenogeneic hepatocytes and prolongation of their function by 2-week cyclosporine treatment in the rat. *Surgery*, 2000; 127:301-308.
103. WIEDERKEHR, J.C.; Hepatocyte transplantation for the low density lipoprotein receptor-deficient state: a study in Watanabe rabbit. *Transplantation*, 1990; 50: 466-471.
104. WILSON, J.M. Transplantation of allogeneic hepatocytes into LDL-receptor-deficient rabbits leads to transient improvement in hypercholesterolemia. *Clin. Biotechnol.*, 1991; 3: 21-26.
105. WILSON, J.M.; CHOWDHURY, N.R.; GROSSMAN, M.; WASJMAN, R.; EPSTEIN, A.; MULLIGAN, R.C. MULLIGAN, R.C.; CHOWDHURY, J.R. Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 8437-8441.

106. WOLF, C.F.W.; CARS, H.; SUBRAMIAN, V.A.; MC COY, C.H. A rat model for study of bilirubin conjugation by a cultured cell artificial capillary liver assist device. *Int. J. Artif. Organs*, 1979; 2: 97-103.
107. WONG, H.; CHANG, T.M.S. The viability and regeneration of artificial cells microencapsulated rats hepatocytes xenograft transplants in mice. *Biomat Art Cells Artif Organs*, 1988; 16:731-739.
108. WOODS, R.J.; FULLER, B.J.; ATTENBUROW, V.W.; MUTT, L.M.; HOBS, K.E.F. Functional assessment of hepatocytes after transplantation into rat spleen. *Transplantation*, 1982; 33: 123-126.
109. YAMAGUCHI, Y.; HAMAGUCHI, H.; YAMADA, S.; FUJIKAWARA, K.; HIGASHIO, K.; MIYANARI, N.; ICHIGUCHI, O.; GOTO, M.; MORI, K.; OGAWA, M. Recombinant human hepatocytes growth factor facilitates biliary transport after hepatocyte transplantation in Eisai hyperbilirubinemic rats. *Dig. Dis. Sci.*, 1997; 42:522-528.
110. ZIEVE, L.; ANDERSON, W.R.; LINDBLAD, S. Course of hepatic regeneration after 80 to 90% resection of normal rat liver. *J. Lab. Clin. Med.*, 1985; 331-336