

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA**

**TRANSPLANTE DE HEPATÓCITOS NO MODELO EXPERIMENTAL DE  
HEPATOTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR PARACETAMOL EM RATOS**

**DANIELA RODRIGUES**

**TESE DE DOUTORADO**

**Porto Alegre**

**2008**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA**

**TRANSPLANTE DE HEPATÓCITOS NO MODELO EXPERIMENTAL DE  
HEPATOTOXICIDADE AGUDA INDUZIDA POR PARACETAMOL EM RATOS**

**DANIELA RODRIGUES**

**Orientadora: Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Ursula Matte**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação de Ciências em  
Gastroenterologia da Faculdade  
de Medicina da UFRGS para  
obtenção de título de Doutor.

**Porto Alegre**

**2008**

*Aos meus pais, e meus irmãos por tudo que fizeram por mim,  
pelo carinho, amizade, apoio, incentivo e modelo oferecido, elementos  
fundamentais para prosseguir na jornada da vida.*

## **Agradecimentos**

Este estudo não teria sido possível sem o valoroso auxílio prestado por várias pessoas, em diferentes ocasiões de seu curso. Agradeço a todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho:

À Prof. Dra. Themis Reverbel da Silveira, por sua incansável dedicação ao ensino e à pesquisa, exemplo a ser seguido, pela oportunidade e confiança depositada durante esta longa jornada. Obrigado pela sua grande contribuição na minha carreira. E, também, por sua competência, disponibilidade e amizade, elementos fundamentais na realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Ursula Matte, que é uma brilhante pesquisadora, com quem tive a oportunidade de enriquecer em muito meus conhecimentos, aprendendo a desenvolver a verdadeira ciência. Ao longo destes 5 anos de convivência, o sentimento é de grande admiração e respeito pelo seu trabalho. Obrigado pelas idéias, discussões científicas e por contribuir no meu crescimento intelectual e profissional. E, também, por sua disponibilidade, paciência e amizade.

Aos colegas Rafael Lucky Maurer, Carolina Uribe, Álvaro Macedo Laureano, Nelson Alexandre Kretzmann e Gabriella Rejane dos Santos, os quais foram indispensáveis na realização deste estudo. Obrigado pela parceria formada durante estes 5 anos, pela amizade, carinho, disponibilidade, paciência e compreensão nos momentos de desânimo, viabilizando a laboriosa execução deste projeto.

À Dra. Sandra Maria Gonçalves Vieira, pela grande amizade, carinho, apoio, incentivo, e pela sua cultura com sugestões e discussões científicas ao longo do desenvolvimento do estudo.

Ao Dr. Jorge Luiz dos Santos, pela amizade, incentivo, encorajamento e pela sua grande contribuição científica.

Aos colegas do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, pela amizade, carinho e pelas discussões científicas que enriqueceram este trabalho.

Aos colegas do Centro de Terapia Gênica, pelo carinho e pela amizade.

À colega Liane Marise Röhsig, do Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela presteza, dedicação, competência, e pela importante tarefa da realização de exames imprescindíveis neste estudo.

À Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Marta Cioato, e a sua equipe, pela disponibilidade e assistência.

Ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Jéferson Beck da Silva, pela sua disponibilidade.

Ao Dr. Guido Rosito, pelo auxílio na análise estatística, sempre com amizade e paciência.

À Coordenação, aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação de Ciências em Gastroenterologia, pelo apoio.

Ao Centro de Pesquisas e ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas, pelo apoio.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio financeiro.

À CAPES, pela bolsa de doutorado que possibilitou a realização deste trabalho.

*“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam.”*

*Bernard Shaw*

*"Os ideais que iluminaram meu caminho e sempre me deram coragem para enfrentar a vida com alegria foram a Verdade, a Bondade e a Beleza."*

*Albert Einstein*

## Resumo

O transplante de hepatócitos é uma modalidade terapêutica atrativa para as doenças hepáticas, assim como uma alternativa para o transplante hepático. O objetivo do presente estudo é investigar a efetividade do transplante de hepatócitos de ratos nos modelos de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg e 1,5g/kg). Os hepatócitos foram isolados de ratos Wistar machos e transplantados 24 horas após em receptoras fêmeas com hepatotoxicidade de 1g/kg. Os ratos fêmeas receberam  $1 \times 10^7$  hepatócitos (grupo 1, n=20) ou PBS (grupo 2, n=24) através da veia porta ou no baço. A análise de sobrevivência em 3 dias demonstrou que todos os animais do grupo 1 sobreviveram, enquanto 5 animais do grupo 2 morreram (P=0,03), todas as mortes ocorreram nos ratos que receberam PBS através da veia porta (P=0,001). Os níveis de alanina aminotransferase e fator V que foram medidos no experimento não mostraram diferença entre o grupo 1 e o grupo 2 em nenhum momento. A análise molecular e a histologia mostraram a presença de hepatócitos no fígado de animais transplantados através da veia porta ou pelo baço. O modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg) demonstrou que o transplante de hepatócitos de ratos aumenta a sobrevivência quando o local de injeção é na veia porta. No modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/kg), os hepatócitos foram isolados de ratos Wistar machos, e transplantados 6 horas após em receptoras fêmeas. Os ratos fêmeas receberam  $1 \times 10^7$  hepatócitos (grupo 1, n=33) ou PBS (grupo 2, n=24) no baço. A análise de sobrevivência em 3 dias demonstrou que 9 animais do grupo 1, e 9 animais do grupo 2 morreram no dia 2. Não houve diferença estatística significativa na análise de sobrevivência entre o grupo 1 e o grupo 2. Nossos dados demonstram que o isolamento de hepatócitos é um procedimento factível. O transplante de hepatócitos é uma técnica que pode ser aplicada em modelos animais de IHA levando ao aumento da sobrevivência. Entretanto, o modelo utilizado no presente estudo apresentou um alto grau de variabilidade, tornando necessária a avaliação do transplante de hepatócitos em um modelo mais reprodutível.

Palavras-chave: paracetamol, hepatotoxicidade, transplante de hepatócitos de ratos.

## Abstract

Hepatocyte transplantation is an attractive therapeutic modality for liver disease as an alternative for liver transplantation. The aim of the current study was to investigate the effectiveness of rat hepatocyte transplantation in the acetaminophen-induced acute hepatotoxicity models (1g/kg and 1,5g/kg). Hepatocytes were isolated from male Wistar rats and transplanted 24 hours later in female recipients with hepatotoxicity of 1g/kg of acetaminophen. Female rats received either  $1 \times 10^7$  hepatocytes (group1, n=20) or PBS (group 2, n=24) through the portal vein or into the spleen. Survival analyses in 3 days showed that all animals from group 1 survived, whereas 5 rats from group 2 died ( $P=0.03$ ), all deaths occurred in rats that received PBS into the portal vein ( $P=0.001$ ). Alanine aminotransferase and factor V levels measured within the experiment did not differ between groups 1 and 2 at any time point. Molecular analysis and histology showed presence of hepatocytes in liver of transplanted animals injected either through portal vein or spleen. Our data in acetaminophen-induced hepatotoxicity model (1g/kg) demonstrate that rat hepatocyte transplantation increases survival when the site of injection is into portal vein in this hepatotoxicity model. In the acetaminophen-induced acute hepatotoxicity model (1,5g/kg), hepatocytes were isolated from male Wistar rats and transplanted 6 hours later in female recipients. Female rats received either  $1 \times 10^7$  hepatocytes (group1, n=33) or PBS (group 2, n=24) into the spleen. Survival analyses in 3 days showed that 9 rats from group 1 and 9 rats from group 2 died at day 2. There was no statistical significance in survival between group 1 and group 2. Our data demonstrate that hepatocyte isolation is a feasible procedure. Hepatocyte transplantation can be used in animal models of acute liver failure increasing survival. The model of the present study show a higher variability, therefore it's necessary to evaluate hepatocyte transplantation in a more reproducible model.

Key words: acetaminophen, hepatotoxicity, rat hepatocyte transplantation.



Agradecimentos .....	iv
Resumo .....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Quadros .....	xii
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Figuras .....	xiv
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Insuficiência hepática aguda.....	1
1.2 Causas de insuficiência hepática aguda.....	2
1.3 Transplante hepático.....	4
1.4 Sistemas de suporte bioartificiais .....	6
1.5 Terapia celular .....	7
1.6 Modelos experimentais de insuficiência hepática aguda.....	9
2 JUSTIFICATIVA .....	16
3 OBJETIVOS .....	17
3.1 Geral .....	17
3.2 Específicos.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Animais.....	18
4.2 Anestesia.....	18
4.3 Padronização do isolamento de hepatócitos de ratos Wistar.....	19
4.3.1 Procedimento cirúrgico.....	19
4.3.2 Isolamento com a enzima Tripsina .....	20
4.3.3 Isolamento com enzima Colagenase.....	20
4.3.4 Obtenção de hepatócitos.....	20
4.3.5 Obtenção de hepatócitos com enzima Tripsina .....	21
4.3.5.1 Obtenção de hepatócitos de diferentes áreas do fígado.....	21
4.3.6 Obtenção de hepatócitos com enzima Colagenase .....	21
4.4 Caracterização e cultura dos hepatócitos.....	21
4.5 Criopreservação dos hepatócitos .....	22
4.6 Marcação dos hepatócitos com 4',6-Diamidino-2-fenolindol.....	22
4.7 Modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg)....	23

4.8 Transplante de hepatócitos no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg).....	23
4.9 Modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/ kg)	24
4.10 Transplante de hepatócitos no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5 g/kg).....	24
4.11 Análise bioquímica.....	24
4.11.1 Coleta das amostras de sangue.....	25
4.11.2 Análise laboratorial.....	25
4.12 Análise histológica.....	26
4.13 Análise molecular.....	26
4.14 Análise estatística.....	27
5 RESULTADOS.....	28
5.1 Padronização do isolamento de hepatócitos de ratos Wistar.....	28
5.1.1 Isolamento com enzima Tripsina.....	28
5.1.2 Isolamento com enzima Colagenase.....	28
5.2 Caracterização e cultura de hepatócitos.....	28
5.3 Criopreservação dos hepatócitos.....	29
5.4 Modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg)....	30
5.4.1 Avaliação dos níveis de ALT no modelo hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol.....	30
5.4.2 Avaliação dos níveis de FV no modelo hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol.....	31
5.4.3 Análise molecular.....	32
5.4.4 Análise histológica.....	33
5.4.5 Análise de sobrevida.....	34
5.5 Modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/kg).	35
5.5.1 Avaliação dos níveis de ALT no modelo hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol.....	35
5.5.2 Análise de sobrevida.....	36
6 DISCUSSÃO.....	37
6.1 Padronização do isolamento de hepatócitos de ratos Wistar.....	37
6.2 Viabilidade celular de hepatócitos.....	38
6.3 Criopreservação de hepatócitos.....	38

6.4 Transplante de hepatócitos nos modelos de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg e 1,5g/kg) .....	40
6.5 Limitações do estudo .....	44
7 CONCLUSÕES .....	46
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
ANEXOS .....	55

## Lista de Quadros

<b>Quadro 1</b> Causas de insuficiência hepática aguda .....	4
<b>Quadro 2</b> Critério de <i>Clichy</i> para indicação de transplante hepático na insuficiência hepática aguda.....	5
<b>Quadro 3</b> Critério do <i>King's College</i> para indicação de transplante hepático na insuficiência hepática aguda .....	5

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> Modelos cirúrgicos de insuficiência hepática aguda .....	11
<b>Tabela 2</b> Modelos farmacológicos de insuficiência hepática aguda.....	12
<b>Tabela 3</b> Coleta de sangue em relação à administração do paracetamol nos modelos de 1g/kg e 1,5g/kg .....	25
<b>Tabela 4</b> Número de hepatócitos obtidos a partir de fragmentos de diferentes tamanhos das regiões central ou periférica do fígado (valores representativos de 2 experimentos) .....	28
<b>Tabela 5</b> Viabilidade hepatocitária comparando três protocolos de criopreservação.....	30
<b>Tabela 6</b> Níveis de ALT* nos dias 0, 1 e 3, nos grupos 1 e 2 no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg) .....	31
<b>Tabela 7</b> Níveis de FV* nos dias 0, 1 e 3, nos grupos 1 e 2 no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg) .....	31
<b>Tabela 8</b> Níveis de ALT* nos dias 0, 1, 2 e 3, nos grupos 1 e 2 no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/kg).....	36

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Mecanismo de hepatotoxicidade pelo paracetamol .....	14
<b>Figura 2</b> Caracterização dos hepatócitos através da expressão de albumina por RT-PCR .....	29
<b>Figura 3</b> Gene do cromossoma Y ( <i>Sry</i> ) no fígado e no baço de animais injetados pelo baço, e apenas no fígado de animais injetados através da veia porta detectado por PCR .....	32
<b>Figura 4</b> Células DAPI-positivas (setas) no baço (A) e fígado (B) de animais injetados pelo baço ou através da veia porta (C). Insetos: Imagens DAPI negativas.....	33
<b>Figura 5</b> Hepatócitos (setas) corados por HE no baço, mostrando padrão de dispersão, aumento de 40X.....	34
<b>Figura 6-</b> Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier comparando o grupo 1 (transplante de hepatócitos) e o grupo 2 (PBS).....	35

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CTG	Centro de Terapia Gênica
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenolindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FV	Fator V
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutathiona
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina eosina
HVA	Hepatite viral A
IHA	Insuficiência hepática aguda
IP	Intraperitoneal
LEHG	Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia
NAPQI	N-acetil-p-benzo-quinona imina
NL	Nitrogênio líquido
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
p/v	Peso por volume
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase da Transcriptase Reversa
RNA	Ácido ribonucléico
RNI	<i>International normalized ratio</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
<i>Sry</i>	Gene do cromossoma Y
TP	Tempo de protrombina
UEA	Unidade de Experimentação Animal
UNOS	<i>United Network for Organ Sharing</i>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Insuficiência hepática aguda

A insuficiência hepática aguda (IHA), cujo sinônimo é falência hepática fulminante é uma condição rara, na qual ocorre uma deterioração rápida da função hepática, resultando em encefalopatia hepática, icterícia e coagulopatia em indivíduos previamente saudáveis (Sass & Shakil, 2005). O termo falência hepática fulminante foi introduzido primeiramente há 30 anos por Trey *et al.* (1968), para descrever o início de alteração do estado mental dentro de oito semanas dos sintomas iniciais em indivíduos previamente saudáveis, sem história de doença hepática prévia. O termo IHA foi proposto por O'Grady *et al.* (1993). A classificação segundo o grupo do *King's College* em três síndromes distintas depende do intervalo de tempo entre o aparecimento da icterícia e da encefalopatia hepática:

1) IHA hiperaguda-quando o intervalo entre o início da icterícia e o aparecimento da encefalopatia for inferior a sete dias.

2) IHA aguda-quando o intervalo entre o início da icterícia e o aparecimento da encefalopatia ocorrer entre oito e vinte oito dias.

3) IHA subaguda-quando o intervalo entre o início da icterícia e da encefalopatia for menor do que três meses.

Esta classificação reflete diferenças na taxa de sobrevivência para estes grupos, sendo o melhor prognóstico no grupo hiperagudo e o pior no grupo subagudo (Sass & Shakil, 2005).

A estimativa da incidência de IHA é de 2.300 a 2.800 casos por ano nos Estados Unidos, baseado em dados de programas de transplante hepático e de vigilância de casos de doença hepática aguda. Naquele país representa 0,1% de todas as mortes e 6% das mortes relacionadas ao fígado (Hoofnagle *et al.*, 1995).

A IHA geralmente causa falência de múltiplos órgãos. Os sinais e sintomas geralmente são inespecíficos, tais como: fadiga, anorexia, náusea, dor abdominal, febre e icterícia. Estes progridem até o desenvolvimento da encefalopatia hepática. A encefalopatia varia desde alterações leves como insônia e dificuldade de concentração (estágio 1) a coma profundo (estágio 4). O prognóstico é inversamente correlacionado com o grau de



encefalopatia. O edema cerebral é uma complicação neurológica comum, sendo a principal causa de morte nos estudos de autópsia de IHA (Sass & Shakil, 2005; Polson & Lee, 2005).

O fígado tem um papel importante na síntese de quase todos os fatores de coagulação e de alguns inibidores da coagulação e da fibrinólise. As principais alterações na IHA incluem disfunção plaquetária (quantitativa e qualitativa), bem como redução dos níveis circulantes de fibrinogênio e dos fatores de coagulação II, V, VII, IX e X. Isto produz o prolongamento no tempo de protrombina, o qual é amplamente usado como um indicador da gravidade do dano hepático (Sass & Shakil, 2005; Polson & Lee, 2005).

A infecção, principalmente dos tratos respiratório e urinário, desenvolve-se em 80% dos casos e a bacteremia em 20 a 25% dos casos. Os pacientes têm um risco substancial de sepse, causada principalmente pela disfunção do sistema retículo-endotelial e pela diminuição da opsonização. Os patógenos mais comumente encontrados são estafilococos, estreptococos e bacilos gram-negativos. Infecções fúngicas ocorrem em um terço dos casos, principalmente por *Candida albicans*, em pacientes com insuficiência renal e em antibioticoterapia prolongada. A infecção fúngica tem prognóstico ruim, cursa com alta mortalidade e geralmente contra-indica o transplante hepático ou complica a evolução no pós-operatório (Sass & Shakil, 2005; Polson & Lee, 2005).

As complicações cardiovasculares, hemodinâmicas e respiratórias são frequentes nestes pacientes, caracterizando-se por vasodilatação sistêmica, baixa resistência vascular sistêmica, hipotensão e aumento compensatório do débito cardíaco. As anormalidades metabólicas incluem insuficiência renal aguda, hipoglicemia, anormalidades eletrolíticas e pancreatite. A insuficiência renal aguda ocorre em 50% dos casos, determinando um mau prognóstico (Sass & Shakil, 2005; Polson & Lee, 2005).

## **1.2 Causas de insuficiência hepática aguda**

As causas da IHA variam amplamente, dependendo da localização geográfica. As duas principais causas são as hepatites virais agudas e a hepatotoxicidade decorrente de medicações. Muitos pacientes são classificados como de etiologia indeterminada (Sass & Shakil, 2005; Polson & Lee, 2005; O'Grady, 2005).

A hepatotoxicidade por paracetamol é a principal causa de IHA nos Estados Unidos (40%) e no Reino Unido (50 a 70%) (Sass & Shakil, 2005; O'Grady, 2005). Na França, Índia

e Japão, as hepatites virais são as causas mais comuns, e em segundo lugar incluem-se os pacientes com etiologia indeterminada (O'Grady, 2005).

A hepatite viral A é a principal causa de IHA em crianças no nosso meio. Entre 1996 e 2006, de 33 crianças com IHA, avaliadas pelo Programa de Transplante Hepático Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), 13 (39,4%) tinham hepatite viral A (Johann *et al*, 2006). Na Argentina, 60% dos casos pediátricos submetidos ao transplante hepático o foram devido ao vírus A (Centeno *et al*, 2002).

A identificação da causa é extremamente importante, pois influencia o prognóstico e o manejo. Ostapowicz *et al*. (2002), em estudo prospectivo, multicêntrico, correlacionaram as causas e o prognóstico de 308 casos de IHA. Os pacientes com hepatite viral A, hepatotoxicidade pelo paracetamol e isquemia hepática tiveram uma sobrevida na lista ao curto prazo, sem transplante maior do que 50%. Já os pacientes, com doença hepática de causa indeterminada, ou causado por outras drogas (exceto o paracetamol), hepatite viral B e hepatite auto-imune tiveram uma sobrevida menor do que 25% sem transplante. O transplante hepático foi realizado em apenas 6% dos pacientes do grupo paracetamol, quando comparado com 51% do grupo induzido por outras drogas e 36% no grupo de causa indeterminada (Ostapowicz *et al*, 2002). As causas de IHA estão listadas no Quadro 1.

O *Acute Liver Failure Study Group* avaliou 1.147 pacientes adultos de 23 centros nos Estados Unidos entre 1998 e 2007. A causa mais freqüente de IHA foi a intoxicação por paracetamol, correspondendo a 46% dos casos. Neste período de nove anos, houve um aumento gradual na proporção de casos de IHA por paracetamol, e diminuição das taxas de hepatite viral A e B. Em torno de 45% dos pacientes recuperaram-se sem necessidade de transplante. Dos 44% restantes dos pacientes que foram listados para transplante, 25% receberam o enxerto, 10% morreram na lista de espera e 9% se recuperaram. Em todo o grupo, 30% dos pacientes morreram (Lee *et al*, 2008).

## Quadro 1- Causas de insuficiência hepática aguda

<b>A- Viral</b> Vírus: A, B, Delta, E, Citomegalovírus, Epstein-Barr, Herpes simples, Adenovírus, da febre hemorrágica.
<b>B- Drogas e toxinas</b> <b>Dose dependente:</b> paracetamol, tetracloreto de carbono, <i>Amanita phalloides</i> , toxina do bacilo <i>Cereus</i> , sulfonamidas, tetraciclina, <i>Ecstasy</i> . <b>Idiossincráticos:</b> halotano, isoniazida, rifampicina, ácido valpróico, anti-inflamatórios não-esteróides, dissulfiram.
<b>C- Vascular</b> Insuficiência cardíaca direita, síndrome de Budd-Chiari, doença veno-oclusiva, isquemia hepática.
<b>D- Metabólica</b> Fígado gorduroso da gravidez, doença de Wilson, síndrome de Reye, galactosemia, tirosinemia, intolerância hereditária de frutose.
<b>E- Miscelânea</b> Infiltração maligna (metástases hepáticas, linfoma), hepatite autoimune, sepse.

Fonte: Polson & Lee, 2005.

### 1.3 Transplante hepático

A única intervenção terapêutica com benefício em pacientes com IHA é o transplante hepático. Os riscos de um transplante hepático de emergência envolvendo a falência de múltiplos órgãos devem ser contrabalançados com a possibilidade de sobrevida com tratamento de suporte. Devido a uma taxa de mortalidade da IHA, em torno de 80%, é necessário identificar precocemente os casos irreversíveis para providenciar o órgão e evitar que complicações da doença excluam a possibilidade de transplante (Polson & Lee, 2005).

Alguns critérios de seleção para identificar estes pacientes têm sido utilizados. Em 1986, pesquisadores franceses (Bernuau *et al*, 1986) avaliaram uma coorte de 115 pacientes com hepatite viral B e IHA, sendo criado o Critério de *Clichy*, que inclui: a dosagem do fator V (FV), a idade do paciente, a ausência de positividade do HBsAg, o nível de alfa feto-proteína, sendo estes fatores preditivos independentes de sobrevida em análise multivariada. Atualmente, o transplante hepático na IHA é indicado conforme os seguintes critérios (Quadro 2), modificados a partir do estudo inicial.

**Quadro 2-** Critério de *Clichy* para indicação de transplante hepático na insuficiência hepática aguda

Encefalopatia hepática (grau 3 ou 4) e
I- Dosagem de FV <20% em pacientes com menos de 30 anos
II- Dosagem de FV <30% em pacientes com mais de 30 anos

FV- fator V. Fonte: Bernuau *et al*, 1986.

O'Grady *et al.* (1989), do Hospital *King's College* de Londres avaliaram retrospectivamente, 588 pacientes com IHA e definiram as seguintes variáveis com significado prognóstico: causa da doença, idade do paciente, duração da icterícia, nível de bilirrubina, tempo de protrombina, pH arterial e creatinina (Sass & Shakil, 2005; Polson & Lee, 2005). As variáveis que constituem o Critério do *King's College*, estão descritas no Quadro 3.

**Quadro 3-** Critério do *King's College* para indicação de transplante hepático na insuficiência hepática aguda

<b>Paracetamol</b> I- pH <7.3 (independente do grau de encefalopatia) ou três dos seguintes: II- Grau 3 ou 4 de encefalopatia, TP > 100 segundos (RNI > 6.5) e Creatinina > 300 µmol/L (3.4 mg/dL)
<b>Outras etiologias</b> I- TP > 100segundos (RNI > 6.5) independente do grau de encefalopatia ou três dos seguintes: II- Idade < 10 ou > 40 anos III- Etiologia: hepatite não-A, hepatite não-B, hepatite por halotano, droga idiossincrática IV- Duração da icterícia antes da encefalopatia superior a sete dias V- TP> 50segundos (RNI > 3.5) VI- Bilirrubina total >300 µmol/L (17.5 mg/dL)

TP-tempo de protrombina; RNI-*international normalized ratio*. Fonte: O'Grady *et al*, 1989.

Nos Estados Unidos, todos os pacientes com IHA que tem indicação para transplante hepático devem ser listados como UNOS 1 (*United Network for Organ Sharing*), que é o grau de prioridade máximo na lista. Um retardo na inclusão em lista pode aumentar a

possibilidade de uma complicação que irá contra-indicar o transplante. As contra-indicações incluem: malignidade extra-hepática (raro em casos de falência hepática), sepse extra-hepática não-controlada, falência de múltiplos órgãos e dano cerebral irreversível (Sass & Shakil, 2005).

Nos Estados Unidos, em uma série de 200 pacientes, submetidos a transplante hepático por IHA em um período de 17 anos, a taxa de sobrevida em 1 ano foi de 74% e em 5 anos foi de 67% (Farmer *et al*, 2003). Em outro estudo realizado no Reino Unido em pacientes com IHA e hepatite soronegativa, a sobrevida após o transplante hepático foi de 81% em 1 ano e 73% em 5 anos (Wigg *et al*, 2005).

Os autores de um estudo multicêntrico, prospectivo avaliaram crianças e adolescentes com IHA em 9 centros da Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica e México entre 2001 e 2002. Oitenta e oito casos foram analisados, sendo 5 anos a média da idade. Trinta e cinco casos eram do Brasil, 33 casos eram da Argentina e os demais 20 casos, do Chile, Colômbia, Costa Rica e México. Trinta e sete pacientes (42%) eram anti-HVA IgM positivos, sendo que 17 (46%) destes pacientes foram transplantados. A taxa de mortalidade nos pacientes transplantados foi a metade em relação aos não transplantados (28% vs. 57%) (Ciocca *et al*, 2007). Em um estudo realizado em Porto Alegre, em uma série de 315 pacientes adultos transplantados até Fevereiro de 2003, 5% dos casos foram por IHA (Marroni *et al*, 2003).

#### **1.4 Sistemas de suporte bioartificiais**

Além do transplante hepático, devido à escassez de órgãos, outros sistemas de suporte têm sido testados, incluindo: 1) fígado bioartificial utilizando terapia celular e 2) métodos extracorpóreos baseados em hemodiálise, hemofiltração, hemoperfusão com carvão, diálise com albumina (MARS) e plasmaferese (Sass & Shakil, 2005; Polson & Lee, 2005; O'Grady, 2005).

Apesar de relatos de casos promissores em séries pequenas, nenhum estudo controlado mostrou benefício na sobrevida ao longo prazo. Hepatócitos também têm sido utilizados em circuitos extracorpóreos, mas poucos ensaios clínicos controlados foram publicados, nos quais os dados preliminares não sugeriram benefício (Sass & Shakil, 2005; Polson & Lee, 2005).

## 1.5 Terapia celular

A terapia celular vem ganhando destaque como possível alternativa ao transplante hepático. Recentemente, o transplante de hepatócitos passou a ser considerado um tratamento potencial para as doenças metabólicas hepáticas hereditárias e para a IHA. Ele tem como vantagens evitar o risco de uma cirurgia de grande porte, diminuir mortalidade e pode ser utilizado como ponte até o transplante hepático. Porém, uma das maiores limitações da terapia celular para as doenças hepáticas é a disponibilidade e a função dos hepatócitos humanos (Dhawan *et al*, 2005, 2006; Nussler *et al*, 2006; Hughes *et al*, 2005). Entre as doenças metabólicas hepáticas tratadas com transplante de hepatócitos estão: a síndrome de Crigler-Najjar tipo I (Fox *et al*, 1998), a doença de depósito de glicogênio tipo 1a (Muraca *et al*, 2002), as desordens do ciclo da uréia (Horslen *et al*, 2003; Mitry *et al*, 2004), e a deficiência congênita do fator VII de coagulação (Dhawan *et al*, 2004).

A terapia celular na IHA deveria suprir o metabolismo hepático, a secreção de proteínas como os fatores de coagulação e albumina, e estabilizar os parâmetros hemodinâmicos. Uma revisão de ensaios clínicos realizados em dezenove pacientes com IHA de seis centros demonstrou que hepatócitos frescos ou criopreservados foram infundidos na artéria esplênica ou na veia porta. O número de hepatócitos administrados variou de  $10^7$  a  $10^{10}$  células, o que corresponde a aproximadamente 5% da massa hepática normal. Observou-se uma redução nos níveis de amônia, bilirrubinas e uma melhora da encefalopatia hepática (Najimi & Sokal, 2008). Embora os resultados sejam positivos, a avaliação da terapia celular na IHA é de difícil interpretação devido às grandes variações no curso da doença, às múltiplas etiologias, ao tratamento de suporte complexo e à taxa de recuperação espontânea em torno 20% (Nussler *et al*, 2006). Na IHA a quantidade de massa hepática perdida é maior do que nas doenças metabólicas hereditárias, o que dificulta o tratamento por transplante de hepatócitos (Strom *et al*, 1997).

Nas doenças metabólicas hereditárias e na IHA, a arquitetura hepática está geralmente intacta, isto possibilita que a administração dos hepatócitos seja na veia porta ou na veia mesentérica inferior. Quando a arquitetura hepática está desorganizada, a infusão de hepatócitos pode ocasionar hipertensão porta ou embolia pulmonar. Este fato levou à procura de sítios ectópicos, sendo o baço um dos mais estudados, pela facilidade de acesso e pelo menor risco de sangramento abdominal após a infusão. Se o número de células do enxerto e a

sua capacidade metabólica serão suficientes, permanece uma questão em aberto (Nussler *et al*, 2006).

Um dos principais problemas na terapia celular nas doenças hepáticas é a limitada disponibilidade dos hepatócitos humanos. Devido à limitada oferta de fígados para o isolamento de hepatócitos, associada ao fato de que os fígados com esteatose são comumente rejeitados para transplante clínico, os fígados com esta alteração representam uma fonte potencial de células hepáticas. Dhawan *et al*. (2005), contudo, destacam a necessidade de aprimorar o processo de isolamento e purificação dos hepatócitos de fígados com esteatose, permitindo que estes sejam utilizados no transplante e também armazenados por longos períodos de tempo em temperatura fria, empregando protocolos de criopreservação. Muitas das células injetadas não irão para o enxerto do fígado receptor, podendo ser eliminadas pelo sistema retículo-endotelial ou sofrerão perda da viabilidade precocemente. Métodos que aumentem a migração das células para o enxerto do receptor e a subsequente re-população hepática serão de grande benefício (Dhawan *et al*, 2005).

Protocolos de criopreservação para hepatócitos humanos têm sido utilizados, porém as funções essenciais dos hepatócitos podem ser prejudicadas pela criopreservação, e isto pode ter conseqüências importantes na evolução do transplante. Os hepatócitos são muito sensíveis ao dano do congelamento, prejudicando a sua atividade metabólica, e a diminuição da eficiência de fixação dos hepatócitos criopreservados é o principal problema destas células, pois a aderência é relevante no transplante de hepatócitos como parte do processo de enxerto (Dhawan *et al*, 2005; Terry *et al*, 2006, 2007).

A capacidade dos hepatócitos criopreservados eliminarem o corante vital Azul de Trypan que é uma medida da integridade da membrana está diminuída se comparada aos hepatócitos frescos. Nos hepatócitos humanos esta queda pode ser de 20 a 30% após a criopreservação (Coundouris *et al*, 1993; Dou *et al.*, 1992; Ostrowska *et al*, 2000). Outros autores têm demonstrado que a viabilidade hepatocitária humana pode ser mantida após a criopreservação com diferentes protocolos (Chesne *et al*, 1993; de Sousa *et al*, 1996; Terry *et al*, 2006). Variações na evolução da criopreservação podem ser devido a muitos fatores, mas um fator de sucesso é a qualidade dos hepatócitos antes do congelamento, independente das características dos diferentes protocolos de criopreservação (Terry *et al*, 2006).

A síntese protéica é um marcador sensível de viabilidade celular, pois requer energia metabólica, importação de aminoácidos trans-membrana e um alto grau de organização celular (Terry *et al*, 2006). A síntese protéica é geralmente diminuída nos hepatócitos após a

criopreservação (De Loecker *et al*, 1993). A produção de albumina em hepatócitos humanos criopreservados mostrou ser a metade do que nos hepatócitos frescos isolados (Alexandre *et al*, 2002). A diminuição na secreção de proteína após a criopreservação poderia ser decorrente de um defeito de reorganização do aparato secretor, evidenciado pela falta de proliferação dos filamentos do citoplasma e neocanalículos vistos nos hepatócitos frescos, mas ausente após a criopreservação (Dou *et al*, 1992).

## **1.6 Modelos experimentais de insuficiência hepática aguda**

Terblanche & Hickman, (1991), em estudo clássico, descreveram seis pré-requisitos de um modelo animal de IHA. São eles: reversibilidade, reprodutibilidade, morte por falência hepática, janela terapêutica, modelos de grandes animais e risco mínimo às pessoas envolvidas na pesquisa. A reversibilidade leva em conta o fato de que a IHA em humanos é potencialmente reversível e, portanto, o tratamento efetivo pode aumentar a sobrevivência. Reprodutibilidade é um objetivo requerido para padronizar o modelo animal. A morte por falência hepática deve refletir o padrão clínico humano do curso de eventos após o dano, e a morte deve ser diretamente relacionada ao dano hepático. A janela terapêutica é o tempo decorrente entre o dano hepático e a morte, que deve ser suficiente para permitir o tratamento e a observação dos seus efeitos. Modelos de grandes animais embora sejam preferíveis, são menos utilizados que modelos murinos pela sua praticidade. Finalmente, o risco mínimo às pessoas envolvidas na pesquisa envolve a proteção ao pessoal do laboratório (Filipponi & Mosca, 2001; Rahman & Hodgson, 2000).

Os modelos animais de IHA podem ser classificados em três categorias: modelos cirúrgicos, modelos de drogas hepatotóxicas e modelos hepatotóxicos e cirúrgicos combinados (Terblanche & Hickman, 1991; Filipponi & Mosca, 2001; Rahman & Hodgson, 2000; Newsome *et al*, 2000).

Os modelos cirúrgicos podem ser divididos em três grupos: variações de hepatectomia parcial, hepatectomia total e desvascularização parcial ou total do fígado (Filipponi & Mosca, 2001; Rahman & Hodgson, 2000; Newsome *et al*, 2000). Os modelos cirúrgicos estão descritos na tabela 1.

Os modelos de drogas hepatotóxicas são utilizados extensivamente no modelo de IHA. As drogas mais comumente utilizadas nos últimos 30 anos têm sido paracetamol,



galactosamina, tetracloreto de carbono, tioacetamida e mais recentemente, concanavalina A e lipopolissacarídeos (Filipponi & Mosca, 2001; Rahman & Hodgson, 2000; Newsome *et al*, 2000). Os modelos farmacológicos estão descritos na tabela 2.

Os modelos combinados envolvem *shunt* porto-cava ou desvascularização parcial associado à administração de drogas (Filipponi & Mosca, 2001).

**Tabela 1-** Modelos cirúrgicos de insuficiência hepática aguda

<b>Modelo</b>	<b>Animal</b>	<b>Resultados</b>
<b>Hepatectomia parcial</b>		
Panis <i>et al</i> , 1997	Rato	Diminuição da sobrevida em ressecções >85%
Rogers <i>et al</i> , 1996		Aumento de AST, TNF- $\alpha$ , hipoglicemia tardia
<b>Ressecção/ ligadura</b>		
Eguchi <i>et al</i> , 1997	Rato	Encefalopatia grau 3, hipoglicemia tardia Aumento da amônia, lactato e TP
<b>Hepatectomia total</b>		
Hickman <i>et al</i> , 1974	Porco	Sobrevida 15-26 hs, encefalopatia pré-terminal, hipoglicemia e aumento de AST
<b>Desvascularização parcial</b>		
Tonnesen <i>et al</i> , 1976 <sup>a</sup>	Porco	75 minutos clampeamento-50% de sobrevida
Tonnesen <i>et al</i> , 1977		6 horas de clampeamento-10% sobrevida
DeGroot <i>et al</i> , 1987		Aumento de AST e hipoglicemia tardia
<b>Desvascularização total</b>		
Tonnesen <i>et al</i> , 1976 <sup>b</sup>	Porco	Letargia e coma-10 a 15 hs
Ring Larsen <i>et al</i> , 1979		Aumento da encefalopatia, AST e PIC
Hanid <i>et al</i> , 1979		Ondas lentas no EEG

AST-aspartato amino transferase; TNF- $\alpha$ -fator de necrose tumoral alfa; TP-tempo de protrombina; PIC-pressão intracraniana; EEG-eletroencefalograma. Fonte: Rahman & Hodgson, 2000.

**Tabela 2-** Modelos farmacológicos de insuficiência hepática aguda

<b>Modelo</b>	<b>Animal</b>	<b>Resultados</b>
<b>D-Galactosamina</b>		
Kalpana <i>et al</i> , 1999 ; Blitzer <i>et al</i> , 1978 ; Sielaff <i>et al</i> , 1995	Porcos, Coelhos, Cães	Encefalopatia, coma, aumento de AST, ALT, BT, lactato, amônia e necrose hepática.
Diaz Buxo <i>et al</i> , 1997	Cães	Coagulopatia e necrose hepática.
<b>Paracetamol</b>		
Miller <i>et al</i> , 1976 ; Francavilla <i>et al</i> , 1989 ; Kelly <i>et al</i> , 1992	Porcos e Cães	Encefalopatia, coma, aumento de AST, ALT, BT, acidose metabólica e necrose hepática.
Walker <i>et al</i> , 1980	Camundongo	Necrose hepática
Henne-Bruns <i>et al</i> , 1988	Porcos	Necrose hepática, metahemoglobina.
Salam <i>et al</i> , 2005	Ratos	Aumento de AST, ALT, necrose hepática.
<b>Tetracloroeto de carbono</b>		
Nayak <i>et al</i> , 1970, 1975 ; Shi <i>et al</i> , 1998	Ratos	Pobrememente reprodutível; coma em estágio tardio e encefalopatia mínima.
<b>Tioacetamida</b>		
Peeling <i>et al</i> , 1993 ; Zimmermann <i>et al</i> , 1989 ; Bruck <i>et al</i> , 1998	Ratos	Encefalopatia, aumento de AST, TP, amônia, acidose metabólica e necrose hepática.
<b>Concanavalina A</b>		
Leist & Wendel, 1996; Ganter <i>et al</i> , 1995, 1997; Tiegs, 1997	Ratos e camundongos	Aumento de AST, amônia, TNF- $\alpha$ , acidose metabólica e necrose hepática.

**Tabela 2-** Modelos farmacológicos de insuficiência hepática aguda

<b>Modelo</b>	<b>Animal</b>	<b>Resultados</b>
<b>Lipopolissacarídeos</b>		
Nolan, 1978, 1989; Bhagwandeem <i>et al</i> , 1987 ; Sneed <i>et al</i> , 1997	Ratos	Sem encefalopatia, morte de 4-8hs. Aumento de AST, lactato, acidose metabólica e necrose hepática.

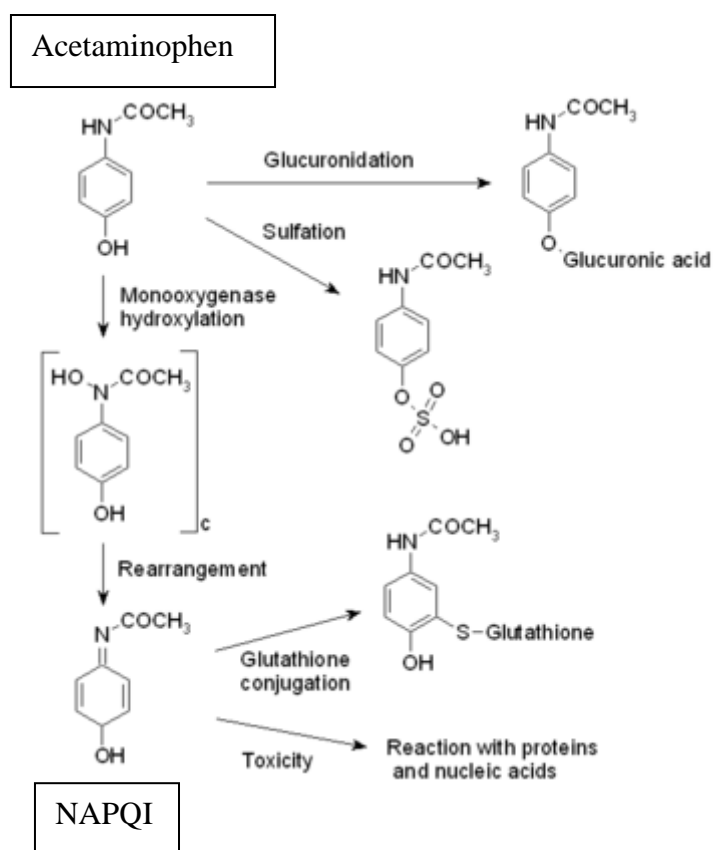
AST-aspartato amino transferase; ALT-alanina aminotransferase; TP-tempo de protrombina; PIC-pressão intracraniana; BT-bilirrubina total, TNF- $\alpha$ -fator de necrose tumoral alfa. Adaptado de Rahman & Hodgson, 2000; Newsome *et al*, 2000.

O paracetamol é comumente usado como analgésico e antipirético, e em geral é uma droga bastante segura. Este tem uma absorção aproximada de 30 minutos e os níveis relatados como terapêuticos variam de 10 a 30  $\mu\text{g/mL}$ . O paracetamol é metabolizado no fígado. Em circunstâncias normais a droga sofre biotransformação por uma combinação de glucuronidação com adição de sulfato, sendo excretada nos rins. A lesão hepática não está associada apenas com a intoxicação ou altas doses da droga, pois pode ocorrer em uso crônico com baixas doses (<4g/dia), particularmente na presença de fatores predisponentes, como o consumo crônico de álcool e terapia antiepiléptica (Rumack, 2004; Kaplowitz, 2004; Wallace, 2004). A dose máxima recomendada para adultos é até 4g/dia.

Após uma dose excessiva, a farmacocinética inicial permanece a mesma da dose terapêutica até o momento em que os eventos tóxicos alterem o padrão metabólico. A saturação da rota metabólica normal do citocromo P450, acarreta a formação excessiva do metabólito intermediário altamente reativo N-acetil-p-benzo-quinona imina (NAPQI). Em doses terapêuticas, o NAPQI é eficazmente detoxificado pela glutathiona (GSH). Na intoxicação, a conjugação do NAPQI com a GSH leva a depleção da GSH no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos, havendo a lesão hepática (Rumack, 2004; Kaplowitz, 2004; Wallace, 2004; Reide *et al*, 2005) (Figura 1).

Contudo, existe controvérsia se uma depleção importante apenas da GSH é tóxica (levando à perda da defesa contra as espécies reativas endógenas normalmente produzidas na mitocôndria), ou se os metabólitos reativos atacam tióis protéicos normalmente produzidos na mitocôndria, levando à perda da função e morte celular (Reide *et al*, 2005). O NAPQI se liga

de forma covalente a resíduos protéicos de cisteína para formar os aductos de paracetamol. Estes aductos protéicos são formados por espécies altamente reativas de superóxido e óxido nítrico, que aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial com liberação de superóxido na mitocôndria, ocasionando um evento celular letal (Wallace, 2004; Reide *et al*, 2005). Esta ligação covalente do NAPQI a proteínas apresenta uma excelente correlação de toxicidade com o paracetamol. Estes aductos ocorrem apenas nos hepatócitos centrolobulares que desenvolveram necrose e a toxicidade não tem sido relatada na sua ausência ou apenas na depleção da GSH (Reide *et al*, 2005).



**Figura 1-** Mecanismo de hepatotoxicidade pelo paracetamol (imagem modificada). Disponível em: <<http://www.worldofmolecules.com/drugs/>>. Acesso em: 14/11/2008.

Vários fatores determinam a dose hepatotóxica de paracetamol, entre eles os níveis de citocromo CYP2E1, as dosagens basais da GSH no citosol e na mitocôndria, a capacidade de

produção da GSH e a capacidade de sulfatação e de glicuronidação do paracetamol (Reide *et al*, 2005).

A toxicidade do paracetamol em ratos é semelhante a dos humanos, também é acompanhada por um aumento na síntese de óxido nítrico e formação de aductos de proteína nitro-tirosina. Estes aductos se formam pela adição de nitratos na tirosina, formando o peroxinitrato, uma espécie altamente reativa gerada do superóxido e do óxido nítrico. O peroxinitrato geralmente é detoxificado pela GSH, que está depletada pelo NAPQI (Reide *et al*, 2005). Existe uma marcada variação nas espécies e na idade relacionada à susceptibilidade, refletindo presença, ausência ou efetividade das enzimas do citocromo P450. Alguns modelos animais com porcos e cães, utilizaram o fenobarbital quatro dias antes do paracetamol para induzir o citocromo P 450 levando a IHA (Miller *et al*, 1976; Francavilla *et al*, 1989).

Considerando a importância da IHA e a necessidade de terapias alternativas, julgamos oportuno avaliar o papel do transplante de hepatócitos no modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol em ratos.

## 2 JUSTIFICATIVA

O manejo da IHA continua a ser um dos principais problemas na prática clínica. O transplante hepático ainda é o único tratamento efetivo, porém sua aplicação é limitada pela falta de doadores de órgãos, a dificuldade de encontrar um doador adequado em curto espaço de tempo e pelo seu alto custo. Os sistemas de fígado bio-artificiais com métodos extracorpóreos baseados em hemodiálise, hemofiltração, hemoperfusão com carvão, diálise com albumina (MARS) e plasmaferese ainda não demonstraram benefício na sobrevivência ao longo prazo. O transplante de hepatócitos isolados apresenta algumas vantagens, tais como: 1) células de um único doador podem ser utilizadas para tratar vários receptores, 2) a criopreservação celular permite o tratamento repetido de um único receptor e 3) a manipulação *in vitro* pode diminuir a imunogenicidade celular. Em paciente com doenças metabólicas hepáticas hereditárias um pequeno número de hepatócitos seria suficiente para substituir a enzima deficiente. Na IHA, porém, a quantidade de massa hepática perdida é maior do que nas doenças metabólicas hereditárias. Nesta situação, o fígado nativo tem potencial para regeneração e o transplante de hepatócitos poderia ser utilizado como ponte até o transplante hepático definitivo.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Avaliar o transplante de hepatócitos no modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol em ratos.

### **3.2 Específicos**

- Padronizar a técnica de isolamento de hepatócitos de ratos Wistar;
- Avaliar diferentes protocolos de criopreservação dos hepatócitos;
- Avaliar o efeito do transplante de hepatócitos por meio da determinação da alanina aminotransferase e do fator V;
- Verificar a presença dos hepatócitos dos doadores nos receptores por intermédio de marcadores histológicos;
- Verificar a presença dos hepatócitos dos doadores nos receptores utilizando análise molecular;
- Comparar a sobrevivência até o terceiro dia, dos animais tratados (transplante de hepatócitos) com a dos não-tratados (controles).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo, de caráter experimental, foi realizado no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG), na Unidade de Experimentação Animal (UEA), no Laboratório de Patologia, no Laboratório de Patologia Clínica e no Centro de Terapia Gênica (CTG) do HCPA. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do HCPA, sendo que todos os experimentos seguiram as normas para uso de animais de laboratório.

### 4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos como doadores, e ratos Wistar fêmeas, como receptores. Os animais foram obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS) e da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e ficavam em observação durante 15 dias antes da realização do experimento. Os animais eram mantidos na UEA do Centro de Pesquisas do HCPA sob temperatura controlada (entre 18°C e 22°C) com ciclo sono-vigília de 12 horas, no máximo 5 ratos por gaiola, e eram alimentados com ração e água *ad libitum*.

### 4.2 Anestesia

No modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol 1g/kg, os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com Ketamina 50mg/kg (Dopalen, Vetbrands, Brasil) e Xilazina 20mg/kg (Virbaxyl 2%, Virbac, Brasil), (Filho, 2006) para: 1) isolamento de hepatócitos, 2) coleta ocular e 3) cirurgia para transplante de hepatócitos ou injeção de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pela veia porta ou baço.

No modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol 1,5g/kg, os animais foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano 1mL/mL (Forane, Farmasa, Brasil), com dose de indução de 5% e depois com dose de manutenção de 3%, no volume de O<sub>2</sub> de 2 litros para: 1) cirurgia de transplante de hepatócitos pelo baço, 2) injeção de PBS pelo baço.

### **4.3 Padronização do isolamento de hepatócitos de ratos Wistar**

#### **4.3.1 Procedimento cirúrgico**

Os hepatócitos foram isolados a partir do fígado de ratos Wistar machos com peso que variou de 350g a 500g. A técnica utilizada foi perfusão em duas etapas, com solução tampão e dissociação dos hepatócitos com enzima (Seglen, 1976).

Na primeira etapa, houve a canulação da veia porta e abertura da veia cava inferior para retirada do sangue do fígado com solução tampão com débito de 700ml/h controlado por bomba de infusão. A velocidade de infusão não ultrapassou 25mL/min para não ocorrer formação de bolhas e não haver a distensão do fígado.

Na segunda etapa, houve a canulação da aurícula D para atingir a veia supra-hepática sendo a veia cava inferior clampeada para iniciar a perfusão com a solução contendo a enzima. A perfusão ocorreu através da veia porta, passando pelo fígado e saindo pela veia supra-hepática. Nesta segunda etapa do experimento, que durou de 8 a 10 minutos, ocorria a dissociação dos hepatócitos e o fígado perdia a turgência. Durante as duas etapas utilizaram-se os antibióticos Penicilina/Streptomicina 1% (Gibco, Invitrogen).

#### **4.3.2 Isolamento com a enzima Tripsina**

Inicialmente, em um subgrupo de 18 animais, o isolamento ocorreu com a enzima Tripsina. Na primeira etapa da perfusão utilizou-se a solução tampão 150mL do meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, LGC Biotecnologia, Brasil). Na segunda etapa da perfusão foi utilizado 150mL de DMEM contendo 5mL da enzima Tripsina na concentração de 0,25% por volume (p/v), (*Invitrogen, Canada*). Após o término da perfusão, houve a passagem de 50mL de DMEM. Os fragmentos de fígado obtidos foram colocados em 30mL de DMEM e antibiótico a 1%.

#### **4.3.3 Isolamento com enzima Collagenase**

Na primeira etapa da perfusão utilizou-se a solução tampão Hank's (meio HBSS), 150mL de meio HBSS sem cálcio, magnésio ou vermelho fenol (Gibco, LGC Biotecnologia,

Brasil) e EDTA sal dissódico (Nuclear, Brasil). Na segunda etapa da perfusão utilizou-se 150mL de meio Hank's, com Cloreto de Cálcio (Vetec, Brasil) e a enzima Colagenase Type II, 0,015% (p/v), (*Gibco, Invitrogen Corporation*). Os fragmentos de fígado obtidos foram colocados em 30mL de Hank's e antibiótico a 10%.

#### **4.3.4 Obtenção de hepatócitos**

O processo de obtenção dos hepatócitos foi realizado na capela de fluxo laminar do CTG. Os fragmentos de fígado obtidos foram pesados e transferidos para a placa de Petri para sua fragmentação. A suspensão de células foi filtrada em gaze estéril para separar o tecido conjuntivo dos restos de parênquima não fragmentado. Conforme a enzima utilizada, foram seguidos diferentes protocolos de centrifugação e lavagens descritos a seguir. Os hepatócitos tiveram a sua viabilidade celular avaliada em Câmara de Neubauer pelo método de exclusão do Azul de Trypan, utilizando a diluição de 90 $\mu$ L de Azul de Trypan e 10 $\mu$ L de hepatócitos.

#### **4.3.5 Obtenção de hepatócitos com enzima Tripsina**

Três ciclos de centrifugação a 1500 RPM por 10 minutos e três lavagens com 5mL de DMEM foram realizados. Na última lavagem os hepatócitos foram re-suspendidos em 2mL de DMEM.

##### **4.3.5.1 Obtenção de hepatócitos de diferentes áreas do fígado**

Após o processo de isolamento dos hepatócitos com a enzima Tripsina, os fragmentos hepáticos foram separados de maneira aleatória conforme as regiões hepáticas (central ou periférica) e conforme o peso (1g, 500mg e 100mg).

#### **4.3.6 Obtenção de hepatócitos com enzima Colagenase**

Os fragmentos de fígado obtidos foram pesados e transferidos para um frasco com 30mL de Hank´s com antibiótico a 5% e na sequência para outro frasco com 30mL de Hank´s com antibiótico a 2%. Três ciclos de centrifugação a 800 RPM por 5 minutos e três lavagens com 3mL de solução Hank´s foram realizados. Na última lavagem os hepatócitos foram re-suspendidos em 1mL de PBS (Laborclin, Brasil). Os hepatócitos foram mantidos em gelo até o momento do transplante.

#### 4.4 Caracterização e cultura dos hepatócitos

Após o isolamento dos hepatócitos, uma alíquota de 500 µL foi armazenada a -80°C para posterior avaliação da função hepatocitária. Cinco amostras aleatórias de diferentes procedimentos de isolamento com a enzima Colagenase foram analisadas através da Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR) para detecção da expressão de albumina. O ácido ribonucléico (RNA) foi extraído utilizando um kit comercial (*Easy RNA, Qiagen, Germany*) seguindo as instruções do fabricante. A conversão de cópias de ácido desoxirribonucléico (cDNA) foi realizado, utilizando a enzima Superscript (*Invitrogen, USA*) a partir de 3µg de RNA. A RT-PCR utilizou os seguintes *primers* à 42°C, com 40 ciclos (senso 5' TTGTATGAATATGCAAGAAG 3', anti-senso 5' CACTCTTCCCAGGTTTCTTG 3'). A detecção dos produtos da PCR foi visualizada em gel 1,5% de agarose corado com brometo de etídio.

Após o isolamento, foram plaqueados  $1 \times 10^6$  hepatócitos em garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup> (Costar), com 3mL de DMEM, 10% de soro bovino fetal (SBF), (Invitrogen, Brasil) e 2% de antibiótico, sendo mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após vinte quatro horas, as células eram observadas para detectar possível contaminação.

#### 4.5 Criopreservação dos hepatócitos

Após a contagem dos hepatócitos na câmara de Neubauer, os mesmos foram centrifugados a 1500 RPM durante 10 minutos, sendo retirado o sobrenadante e re-suspendidos em meio de congelamento na capela de fluxo laminar. O meio de congelamento consistiu em DMEM, 20% de SBF e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), (Labsynth, Brasil) sem antibiótico. Após foram colocados em vials e armazenados em nitrogênio líquido (NL). No processo de descongelamento os vials foram retirados do NL, e colocados congelados na

estufa a 37°C, a fim de sofrer choque térmico. Após foram transferidos para um tubo de 15mL, centrifugados a 1500 RPM durante 10 minutos e re-suspendidos em DMEM para contagem em câmara de Neubauer.

Durante o processo de criopreservação dos hepatócitos foram desenvolvidos três protocolos de congelamento e descongelamento comparando diferentes temperaturas, a fim de melhorar a viabilidade hepatocitária:

- 1) Congelamento imediato em NL
- 2) Congelamento a -20°C e após 24 horas, em NL
- 3) Congelamento a -80°C a após 24 horas, em NL

No descongelamento foi utilizado o processo inverso nos três protocolos.

#### **4.6 Marcação dos hepatócitos com 4',6-Diamidino-2-fenolindol**

Em um subgrupo de 11 animais, os hepatócitos foram marcados antes da injeção com DAPI (4',6-Diamidino-2-fenolindol, *Roche Mannheim, Germany*) 2.7mg/mL (Chedrawy *et al.*, 2002), para avaliar o padrão de migração dos hepatócitos doadores de acordo com diferentes sítios de injeção (veia porta ou baço).

Após a contagem em câmara de Neubauer, foram adicionados 6µL de DAPI (até 10<sup>7</sup> hepatócitos), ou 7µL de DAPI (acima de 10<sup>7</sup> hepatócitos) em tubos de 15mL contendo 1mL de PBS com hepatócitos. Os tubos foram envoltos em papel alumínio e mantidos durante 20 minutos em gelo protegidos da luz. Após foram realizadas duas centrifugações a 1500 RPM durante 10 minutos e duas lavagens com PBS. Na última lavagem os hepatócitos foram re-suspendidos em PBS para posterior contagem em Câmara de Neubauer. Todos os procedimentos foram realizados de forma estéril em capela de fluxo laminar. Os hepatócitos foram mantidos envoltos em papel alumínio e gelo até o momento do transplante.

#### **4.7 Modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg)**

O modelo de hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol foi adaptado de Salam *et al.* (2005). A solução oral de paracetamol na concentração de 200mg/mL (Medley, Brasil) foi administrada na dose única de 1g/kg i.p. em ratos Wistar fêmeas, com peso variando de 200g a 350g. Quatro dias antes da i.p., os animais receberam Fenobarbital (Fenocrisis 4%, Brasil) na dose de 350mg/L (Beales & McLean, 1996) na água para induzir

as enzimas do citocromo P-450 e potencializar a subsequente toxicidade do paracetamol. O fenobarbital foi ofertado na água até o último dia do experimento (dia 3). Os animais que sobreviveram foram sacrificados no dia 3.

#### **4.8 Transplante de hepatócitos no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg)**

Os hepatócitos ( $1 \times 10^7$ ) foram administrados 24 horas após a hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol em ratos Wistar fêmeas. Quarenta e quatro animais foram separados em 2 grupos: grupo 1, transplante de hepatócitos (n=20) e grupo 2, PBS (n=24). A injeção de hepatócitos ou PBS foi realizada através da veia porta ou no baço.

Nos animais que receberam a injeção através da veia porta (n=23), uma incisão longitudinal abdominal de 3cm foi realizada e um volume de 1mL of PBS (contendo ou não  $1 \times 10^7$  hepatócitos) foi lentamente injetado na veia porta. Gelfoam (Cuntanplast, Mascia Brunelli Spa, Milano, Italy) foi colocado no local da injeção para evitar sangramento.

Nos animais que receberam injeção no baço (n=21), uma incisão vertical de 2cm abaixo do rebordo costal esquerdo foi realizada e o baço exposto. Um volume de 1mL de PBS (contendo ou não  $1 \times 10^7$  hepatócitos) foi lentamente injetado no baço.

#### **4.9 Modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/ kg)**

Neste modelo foi utilizada a solução oral de paracetamol manipulada, na concentração de 300mg/ml (Pharmaplus, Brasil), sendo administrada na dose única de 1,5g/kg via i.p. em ratos Wistar fêmeas, com peso variando de 200g a 350g. Quatro dias antes da i.p., os animais receberam Fenobarbital (Fenocrisis 4%, Brasil) na dose de 350mg/L na água. O fenobarbital foi ofertado na água até o dia 3. Os animais que sobreviveram foram sacrificados no dia 3.

#### **4.10 Transplante de hepatócitos no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5 g/kg)**

Os hepatócitos ( $1 \times 10^7$ ) foram administrados 6 horas após a hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol em ratos Wistar fêmeas.

Cinquenta e sete animais foram separados em 2 grupos: grupo 1, transplante de hepatócitos (n=33) e grupo 2, PBS (n=24). A injeção de hepatócitos ou PBS foi realizada apenas no baço, com volume de 500µl de PBS (contendo ou não  $1 \times 10^7$  hepatócitos), conforme técnica descrita no item 4.8.

#### 4.11 Análise bioquímica

As amostras de sangue foram testadas no Laboratório de Patologia Clínica e no Serviço de Hemoterapia do HCPA.

##### 4.11.1 Coleta das amostras de sangue

As amostras de sangue para dosagem de FV e ALT foram coletadas através de punção ocular com tubo capilar. As amostras de ALT e FV foram coletadas nos seguintes tempos conforme descrito abaixo na tabela 3.

**Tabela 3-** Coleta de sangue em relação à administração do paracetamol nos modelos de 1g/kg e 1,5g/kg

<b>Dia</b>	<b>Modelo de 1g/kg</b>	<b>Modelo de 1,5g/kg</b>
Dia 0	Menos de 24 horas	Menos de 24 horas
Dia 1	24 horas	6 horas
Dia 2	-	32 horas
Dia 3	72 horas	56 horas

O processo de coleta das amostras para dosagem do FV foi minucioso para não ativar a cascata de coagulação e alterar o resultado do teste. O capilar da coleta foi lavado em Citrato de sódio e as amostras, coletadas com 0,2µl de Citrato de sódio, sendo colocadas imediatamente em tubos Eppendorf contendo Citrato de sódio 0,11M em uma relação 2:10 de anticoagulante e sangue. Estes foram homogeneizados e centrifugados a 2600 RPM, por 15 minutos. O plasma foi separado em tubos Eppendorf em alíquotas de 1mL e congelado a -80°C até o momento da realização dos testes.

As amostras da ALT foram centrifugadas a 4000 RPM durante 5 minutos, sendo retirado o sobrenadante e armazenado o soro a -20°C.

#### **4.11.2 Análise laboratorial**

A ALT foi medida através do método enzimático com ultravioleta no equipamento Roche/Hitachi ACN 685E. Os resultados foram expressos em UI/l.

O FV foi testado em equipamento automatizado (*STA Compact, Diagnostica Stago, Asnieres, France*), em duplicata, na diluição 1:5 em tampão de Owren-Koller, pela rota extrínseca da coagulação, utilizando-se tromboplastina de tecido cerebral de coelho (*Neoplastine CI Plus, Diagnostica Stago, Asnieres, France*) e plasma substrato humano deficiente em FV (*STA Deficient V, Diagnostica Stago, Asnieres, France*). As curvas de referência foram realizadas com calibrador específico (*Unicalibrator, Diagnostica Stago, Asnieres, France*) e simultaneamente foi testado um controle de qualidade de nível normal e um de nível patológico (*System Control N + P, Diagnostica Stago, Asnieres, France*). Os resultados foram expressos em percentual de atividade (%).

#### **4.12 Análise histológica**

Os ratos Wistar fêmeas que sobreviveram até o dia 3, foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. As amostras de fígado e baço foram coletadas e colocadas em solução de formol a 10% por, no mínimo, 24 horas. Cortes de blocos de parafina não corados foram observados sob microscópio de fluorescência e as células DAPI-positivas foram contadas em 100 campos, utilizando lente de imersão.

As amostras de baço foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para visualizar os hepatócitos injetados.

#### **4.13 Análise molecular**

Em um subgrupo de 12 animais que receberam hepatócitos do modelo de 1g/kg, as amostras de fígado e baço foram coletadas no dia 3 para análise molecular. As amostras de tecido foram congeladas em NL, e armazenadas a -80°C. Nos animais que receberam hepatócitos injetados no baço, foi realizada a RT-PCR para expressão de albumina utilizando



os mesmos *primers* descritos no item 4.4. O RNA extraído das amostras de fígado foi utilizado como controle positivo.

Nos animais que foram injetados através da veia porta ou baço, o DNA foi extraído com Trizol (*Invitrogen, USA*) para análise do gene do cromossoma Y (*Sry*) por PCR utilizando os seguintes *primers* à 50°C (senso 5' AAGCGCCCCATGAATGCATT 3', anti-senso 5' CAGCTGCTTGCTGATCTCTG 3'). A Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada como controle interno positivo para ambas reações de RT-PCR e PCR. Os *primers* para GAPDH foram: senso 5' CAGCAATGCATCCTGCAC 3', anti-senso 5' GAGTTGCTGTTGAAGTCACAGG 3'). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

#### **4.14 Análise estatística**

Os dados foram analisados no pacote estatístico SPSS 15.0 (*Statistical Package for Social Science*). Os níveis de ALT e FV foram expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil. As diferenças nos níveis de ALT e FV foram avaliadas através do teste de Friedman. A correlação de Spearman foi utilizada para comparar FV e ALT no dia 1. A curva de sobrevida de Kaplan-Meier foi realizada para comparar a sobrevida entre o grupo 1 e o grupo 2 no modelo de 1g/kg. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar a sobrevida entre o grupo 1 e o grupo 2 no modelo de 1,5g/kg. A hipótese foi testada para  $\alpha=0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Padronização do isolamento de hepatócitos de ratos Wistar

Os hepatócitos foram isolados a partir de fígados com peso variando de 15g a 20g, utilizando-se 2 métodos distintos: digestão com Tripsina e digestão com Colagenase.

#### 5.1.1 Isolamento com enzima Tripsina

O número de hepatócitos obtidos variou de  $1,2 \times 10^6$  células/mL a  $2,1 \times 10^7$  células/mL e a viabilidade foi  $>90\%$ . Quando foram analisadas separadamente as regiões central e periférica do fígado, observou-se que não houve diferença na média do número de hepatócitos isolados, conforme mostrado na tabela 4.

**Tabela 4-** Número de hepatócitos obtidos a partir de fragmentos de diferentes tamanhos das regiões central ou periférica do fígado (valores representativos de 2 experimentos)

Peso do fragmento	Número de hepatócitos isolados da região central (células/mL)	Número de hepatócitos isolados da região periférica (células/mL)
1 g	$2,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$
500mg	$1,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
100mg	$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$

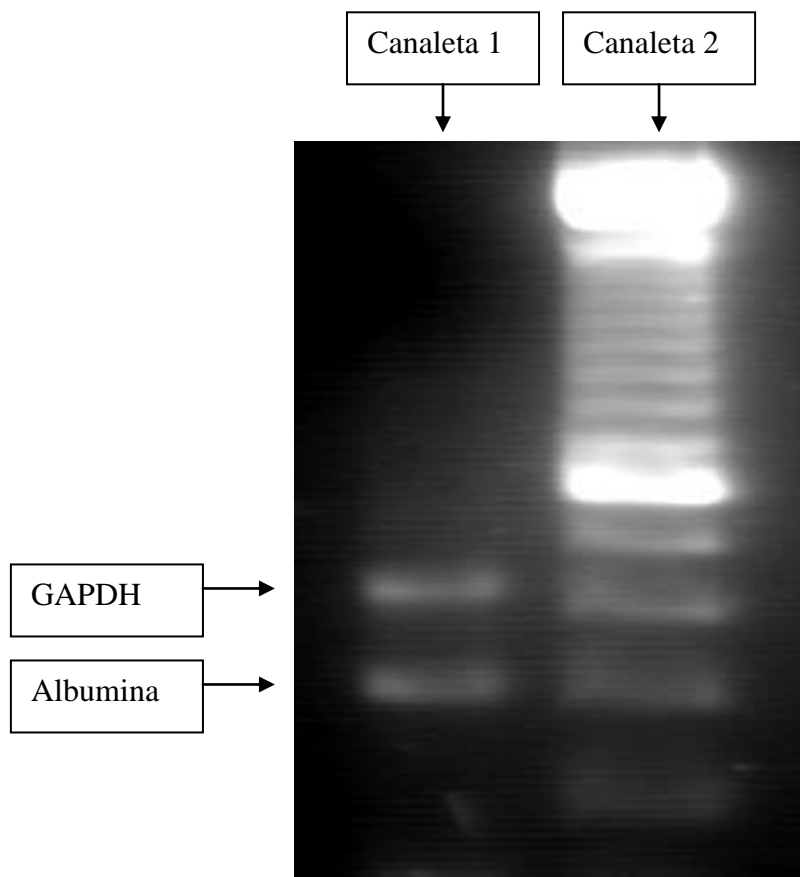
#### 5.1.2 Isolamento com enzima Colagenase

O número de hepatócitos variou de  $2,5 \times 10^7$  células/mL a  $2,2 \times 10^8$  células/mL e a viabilidade dos hepatócitos foi  $>90\%$ . Uma vez que o número de hepatócitos obtidos com a Colagenase foi maior do que com a Tripsina, os experimentos subsequentes foram todos realizados utilizando-se esta técnica (com exceção dos protocolos de criopreservação).

### 5.2 Caracterização e cultura de hepatócitos

A expressão de albumina foi utilizada para confirmar a viabilidade e a função dos hepatócitos após o isolamento com a enzima Colagenase. Em todas as cinco amostras de

cinco procedimentos de isolamento diferentes, a expressão de albumina foi detectada por RT-PCR, como demonstrado na figura 2.



**Figura 2-** Caracterização dos hepatócitos através da expressão de albumina por RT-PCR. Canaleta 1- amostra de hepatócitos isolados, canaleta 2- marcador de peso molecular. A banda superior representa o controle interno (GAPDH) e a banda inferior, a expressão de albumina.

Nos hepatócitos mantidos em cultura para avaliar contaminação, houve evidência de contaminação naqueles isolados com Tripsina, mas não nos isolados com Colagenase.

### 5.3 Criopreservação dos hepatócitos

Inicialmente o processo de criopreservação foi realizado diretamente no NL e a viabilidade hepatocitária após 2 semanas de congelamento variou de 21% a 47%.

A fim de melhorar a viabilidade hepatocitária, três protocolos de criopreservação em diferentes temperaturas foram desenvolvidos. Os hepatócitos foram criopreservados durante

2 semanas e no descongelamento foi utilizado o processo inverso ao de congelamento nos três protocolos. Os dados obtidos neste experimento estão na tabela 5 e no Anexo I.

**Tabela 5-**Viabilidade hepatocitária comparando três protocolos de criopreservação

<b>Protocolos de criopreservação</b>	<b>Número de hepatócitos isolados e congelados (células/mL)</b>	<b>Viabilidade hepatocitária (%)</b>
Imediato em NL	$1,05 \times 10^7$	75
-20°C e após 24 horas, NL	$8,1 \times 10^6$	87
-80°C e após 24 horas, NL	$1,02 \times 10^7$	96

NL-nitrogênio líquido.

#### **5.4 Modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg)**

Quarenta e quatro ratos Wistar fêmeas foram utilizados no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg). O critério de inclusão utilizado foram os níveis de ALT 1,5 vezes acima dos valores basais no dia 1 (24 horas após a administração do paracetamol).

Vinte animais receberam transplante de hepatócitos (Grupo 1) e 24 animais receberam PBS (Grupo 2). Nos animais do grupo 1 (n=20) a veia porta foi o local de injeção em 8 animais e o baço em 12 animais. Nos animais do grupo 2 (n=24) a veia porta foi o local de injeção em 15 animais e o baço em 9 animais.

##### **5.4.1 Avaliação dos níveis de ALT no modelo hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol**

A mediana dos níveis de ALT nos dias 0, 1 e 3 nos grupos 1 e 2 no modelo de 1g/kg está descrita abaixo na tabela 6.

**Tabela 6-**Níveis de ALT\* nos dias 0, 1 e 3, nos grupos 1 e 2 no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg)

<b>Dia do experimento</b>	<b>Grupo 1 (n)</b>	<b>Grupo 2 (n)</b>	<b>P</b>
Dia 0	41,0 (32,2-47,0) 20	52,0 (42,2-52,7) 24	NS
Dia 1	166,5 (120,2-401,2) 20	193,5 (107,0-327,2) 24	NS
Dia 3	42,0 (29,0-51,0) 19	34,0 (30,5-48,5) 17	NS

ALT-alanina aminotransferase; \*Valores expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartil e em UI/l. NS = não significante.

A mediana da ALT no dia 1 nos 44 animais foi de 188,5 UI/l (116,7UI/l-330,7 UI/l). Em todos os 44 animais, os níveis de ALT no dia 1 aumentaram com significância estatística no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol pelo teste de Friedman ( $P < 0,0001$ ). Em três animais no dia 3, não foi possível avaliar a dosagem de ALT por problemas técnicos, e 5 animais morreram antes do final do experimento.

#### **5.4.2 Avaliação dos níveis de FV no modelo hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol**

A mediana dos níveis do FV nos dias 0, 1 e 3 nos grupos 1 e 2 no modelo de 1g/kg está descrita abaixo na tabela 7.

**Tabela 7-** Níveis do FV\* nos dias 0, 1 e 3, nos grupos 1 e 2 no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg)

<b>Dia do experimento</b>	<b>Grupo 1 (n)</b>	<b>Grupo 2 (n)</b>	<b>P</b>
Dia 0	222,0 (177,5-390,7) 20	188,0 (144,0-252,7) 24	NS
Dia 1	163,5 (90,5-207,7) 20	107,0 (63,2-153,2) 24	NS
Dia 3	300,0 (195,0-414,0) 19	270,0 (219,2-772,2) 14	NS

FV-fator V; \*Valores expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartil e em %. NS = não significante.

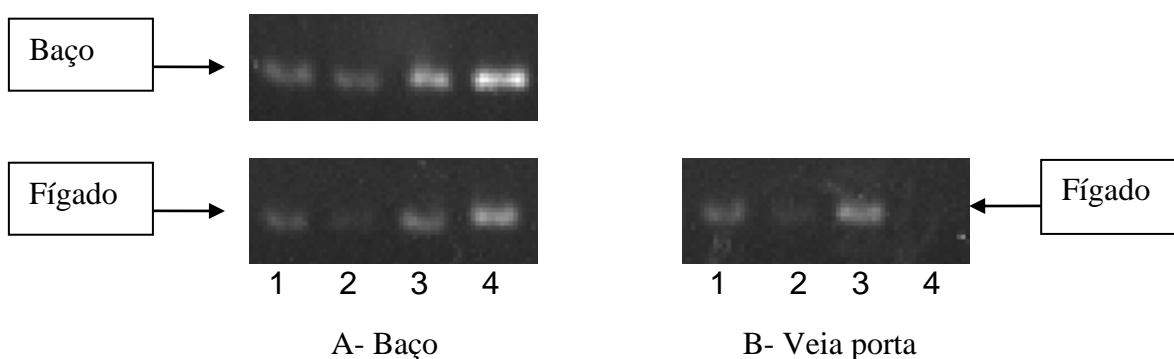
A mediana do FV no dia 1 nos 44 animais foi de 125,0% (67,0%-196,5%). Em todos os 44 animais, os níveis de FV no dia 1 diminuíram com significância estatística no modelo hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol pelo teste Friedman ( $P = 0,004$ ). Em seis

animais no dia 3, não foi possível avaliar a dosagem do FV por problemas técnicos, e 5 animais morreram antes do final do experimento.

Houve uma correlação inversa leve entre FV e ALT no dia 1 ( $r=-0,026$ ;  $P=0,040$ ).

### 5.4.3 Análise molecular

A migração dos hepatócitos no dia 3 (72 horas após o transplante de hepatócitos) foi avaliada no fígado e no baço por PCR para o gene do *Sry* em órgãos de receptores femininos. Nos quatro fígados de animais injetados através da veia porta, o *Sry* foi positivo em 3, e o controle interno positivo, (GAPDH) foi positivo em quatro. Por outro lado, o *Sry* foi detectado em todos os 4 baços de animais injetados pelo baço e nos 4 fígados dos mesmos animais. Os dados estão demonstrados abaixo na figura 3.

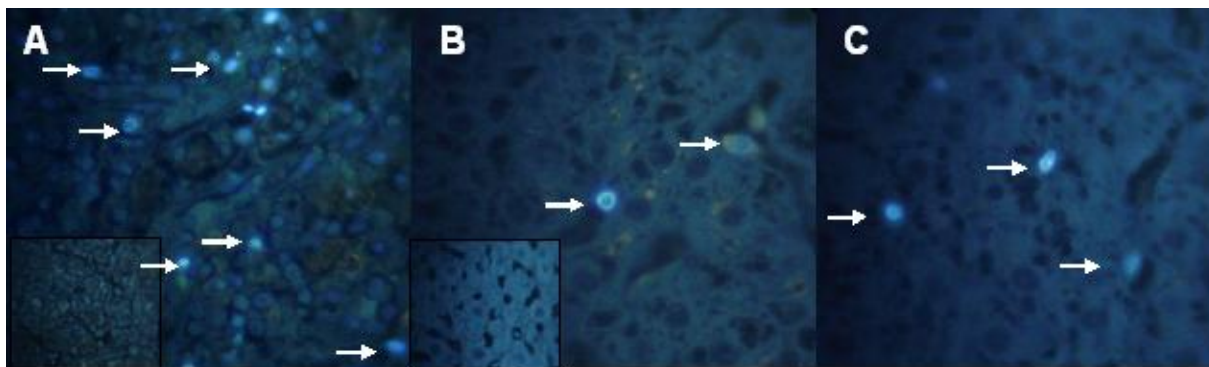


**Figura 3-** Gene do cromossoma Y (*Sry*) no fígado e no baço de animais injetados pelo baço (A), e apenas no fígado de animais injetados através da veia porta (B) detectados por PCR.

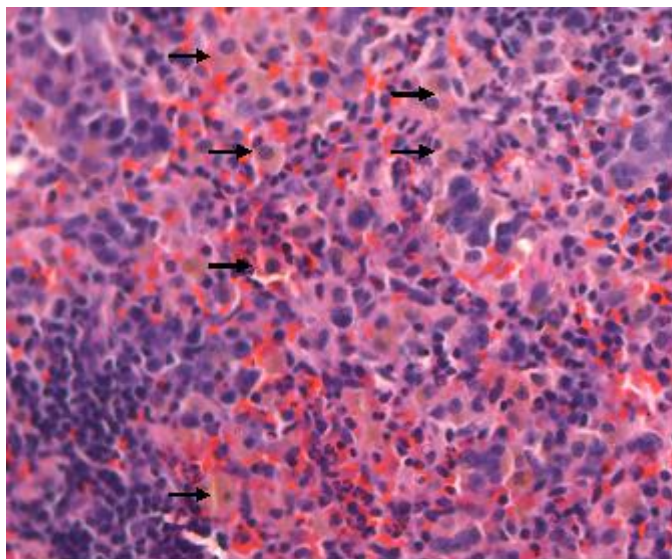
Em um subgrupo de 8 animais injetados pelo baço, a expressão de albumina por RT-PCR não foi detectada em nenhum animal, embora todos fossem positivos para GAPDH, um gene *housekeeping* utilizado como controle interno, e as amostras de fígado usadas como controle positivo, também fossem positivas.

#### 5.4.4 Análise histológica

O número de hepatócitos DAPI-positivos no fígado de cinco animais injetados através da veia porta variou de 12 a 130, com uma média de  $61,2 \pm 44,6$  células coradas por animal. Nos seis animais injetados pelo baço, o número de hepatócitos DAPI-positivos no fígado variou de 0 a 81, com uma média de  $50,0 \pm 31,8$  células coradas por animal. Nestes seis animais, o número de hepatócitos DAPI-positivos no baço, variou de 75 a 414, com uma média de  $166,2 \pm 127,3$  células coradas por animal. (Figura 4). Os hepatócitos também foram visualizados no baço por coloração com HE (Figura 5).



**Figura 4-** Células DAPI-positivas (setas) no baço (A) e fígado (B) de animais injetados pelo baço ou através da veia porta (C). Insetos: Imagens DAPI-negativas.

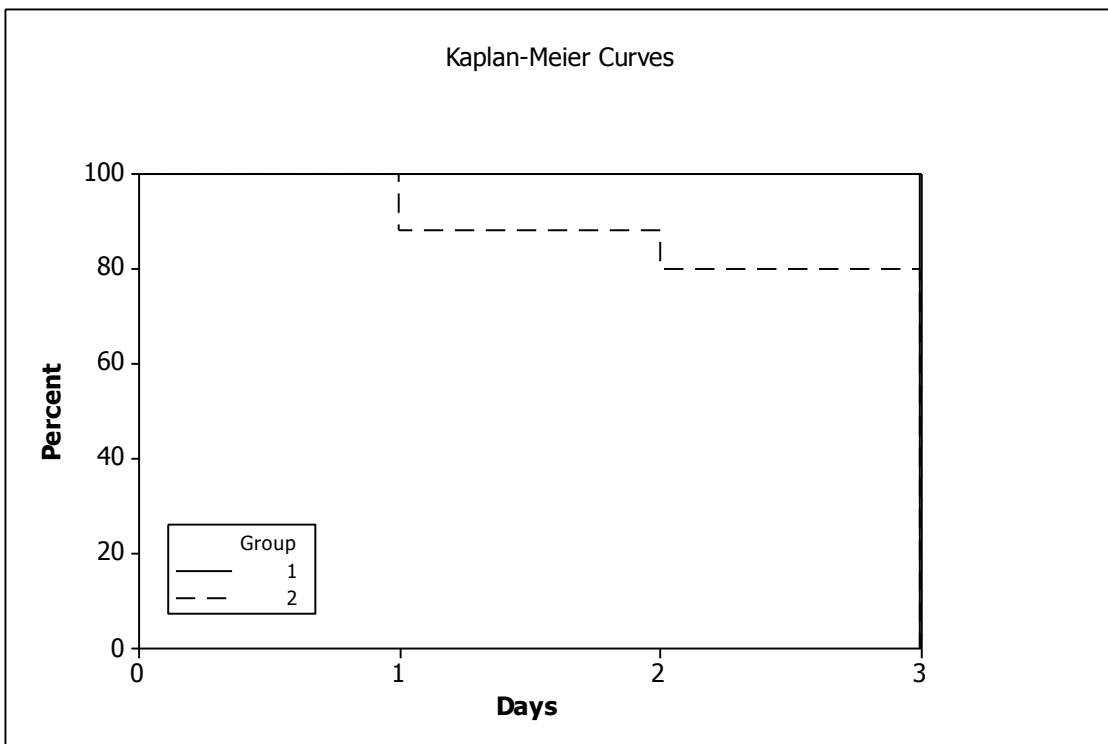


**Figura 5-** Hepatócitos (setas) corados por HE no baço, mostrando padrão de dispersão, aumento de 40X.

#### **5.4.5 Análise de sobrevida**

A análise de sobrevida nos 44 animais demonstrou que 39 animais sobreviveram até o final do experimento (dia 3). Todos os animais que receberam hepatócitos (grupo 1) sobreviveram até o dia 3, porém cinco animais que receberam PBS (grupo 2) morreram, três dia 1 e dois no dia 2 ( $P=0,03$ ), (Figura 6). Todas as mortes ocorreram nos animais que receberam PBS através da veia porta ( $P=0,001$ ).





**Figura 6-** Curva de sobrevida de Kaplan-Meier comparando o grupo 1 (transplante de hepatócitos) e o grupo 2 (PBS).

### 5.5 Modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/kg)

Cinquenta e sete ratos Wistar fêmeas foram utilizados no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/kg). O critério de inclusão utilizado foram os níveis de ALT 1,5 vezes acima dos valores basais no dia 1 (6 horas após a administração do paracetamol). Dezesete animais não foram incluídos no estudo, pois morreram entre a administração do paracetamol e o momento da cirurgia.

Os níveis de ALT no dia 1 (6 horas após a administração do paracetamol) 1,5 vezes acima dos valores basais foram utilizados com critério de inclusão.

Trinta e três animais receberam transplante de hepatócitos (Grupo 1) e 24 animais receberam PBS (Grupo 2) através do baço.

#### 5.5.1 Avaliação dos níveis de ALT no modelo hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol

A mediana dos níveis de ALT nos dias 0, 1, 2 e 3 nos grupos 1 e 2 no modelo de 1,5g/kg está descrita abaixo na tabela 8.

**Tabela 8-** Níveis de ALT\* nos dias 0, 1, 2 e 3, nos grupos 1 e 2 no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/kg)

<b>Dia do experimento</b>	<b>Grupo 1 (n)</b>	<b>Grupo 2 (n)</b>	<b>P</b>
Dia 0	40,0 (31,5-43,5) 33	42,5 (38,2-49,5) 24	NS
Dia 1	107,0 (79,0-137,0) 33	100,5 (90,2-123,0) 24	NS
Dia 2	145,0 (114,0-225,0) 23	96,0 (67,5-150,7) 18	NS
Dia 3	53,5 (38,5-126,7) 24	51,0 (33,0-80,8) 15	NS

ALT-alanina aminotransferase; \*Valores expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartil, em UI/L. NS = não significante.

A mediana da ALT no dia 1 nos 57 animais foi de 103,0 UI/L (82,5UI/L-124,5 UI/L). Em todos os 57 animais, os níveis de ALT no dia 1 aumentaram com significância estatística no modelo de hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol pelo teste de Friedman ( $P < 0,0001$ ). Em um animal no dia 2, não foi possível avaliar a dosagem de ALT por problemas técnicos, e dezoito animais morreram antes do final do experimento.

Nestes animais não foi realizada a dosagem de FV.

### **5.5.2 Análise de sobrevida**

A análise de sobrevida nos 57 animais demonstrou que 39 animais sobreviveram até o final do experimento (dia 3). Nove animais do grupo 1 (27%) e nove animais do grupo 2 (37%) morreram, todos no dia 2. Não houve diferença estatística significativa na análise de sobrevida entre o grupo 1 e o grupo 2 através do teste exato de Fisher ( $P > 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

O manejo da IHA continua a ser um dos principais problemas na prática clínica. O transplante hepático ainda é o único tratamento efetivo, porém sua aplicação é limitada pela falta de doadores de órgãos, a dificuldade de encontrar um doador adequado em curto espaço de tempo e pelo seu alto custo (Sass & Shakil, 2005; Polson & Lee, 2005). Este foi o primeiro estudo experimental com transplante de hepatócitos em nosso meio e, portanto, abrangeram todas estas etapas desde a padronização do isolamento até a sua aplicação em um modelo de IHA.

### 6.1 Padronização do isolamento de hepatócitos de ratos Wistar

Na padronização do isolamento de hepatócitos de ratos machos Wistar, foi utilizada inicialmente a enzima Tripsina, pela sua disponibilidade, custo baixo e principalmente pela questão da curva de aprendizado. Porém, o número de hepatócitos obtidos variou de  $1,2 \times 10^6$  células/mL a  $2,1 \times 10^7$  células/mL, sendo a quantidade inadequada para o transplante de hepatócitos, já que o mínimo seria  $1 \times 10^7$  hepatócitos (Dhawan *et al*, 2005; Najimi & Sokal, 2008).

No isolamento de hepatócitos, utilizando a enzima Tripsina, foram analisadas as regiões central e periférica do fígado, não ocorrendo diferença na média do número de hepatócitos isolados, conforme mostrado na tabela 4. Este procedimento comparando as diferentes regiões do fígado foi realizado na tentativa de obtenção de um maior número de hepatócitos após o isolamento. No isolamento de hepatócitos com a enzima Colagenase, o número de hepatócitos variou de  $2,5 \times 10^7$  células/mL a  $2,2 \times 10^8$  células/mL, o que possibilitou a realização do transplante de hepatócitos.

### 6.2 Viabilidade celular de hepatócitos

A viabilidade celular foi  $>90\%$  pelo Azul de Trypan, o qual avalia a integridade da membrana celular, método usado amplamente na literatura (Horslen *et al*, 2003; Mitry *et al*, 2004; Dhawan *et al*, 2004; Terry *et al*, 2007; Coundouris *et al*, 1993; Dou *et al*, 1992; Ostrowska *et al*, 2000) O teste para a viabilidade celular avalia a estrutura dos hepatócitos, mas não define se eles estão funcionantes, sendo isto de extrema importância no transplante

de hepatócitos. A síntese protéica é um marcador sensível de viabilidade e função celular, pois requer energia metabólica, importação de aminoácidos trans-membrana e um alto grau de organização celular (Terry *et al*, 2006). Uma das principais características dos hepatócitos é a produção de albumina. Em todas as cinco amostras de cinco procedimentos de isolamento diferentes, a expressão de albumina foi detectada por RT-PCR, como demonstrado na figura 2. Este achado demonstrou que os hepatócitos, após o isolamento com a enzima Colagenase, eram viáveis e funcionais, portanto poderiam ser transplantados.

### 6.3 Criopreservação de hepatócitos

Um dos principais problemas na terapia celular nas doenças hepáticas é a limitada disponibilidade dos hepatócitos humanos. O número e/ou qualidade dos hepatócitos isolados de fígados não transplantáveis não permitem uma ampla aplicabilidade do transplante de hepatócitos (Nussler *et al*, 2006). Dhawan *et al.* (2005), já chamavam a atenção para a necessidade de aprimorar o processo de isolamento, purificação dos hepatócitos e o armazenamento por longos períodos de tempo em temperatura fria, empregando protocolos de criopreservação.

Inicialmente, optamos pelo processo de criopreservação com os hepatócitos isolados com a enzima Tripsina, diretamente no NL e a viabilidade hepatocitária após 2 semanas de congelamento variou de 21% a 47%. A fim de melhorar a viabilidade hepatocitária, três protocolos de criopreservação em diferentes temperaturas foram desenvolvidos (Tabela 5). A viabilidade hepatocitária conforme o protocolo utilizado foi respectivamente, de 75%, 87% e 96%. O congelamento controlado e lento é aceito como melhor estratégia para os hepatócitos criopreservados. Os protocolos de congelamento foram inicialmente baseados neste achado, sendo que a diminuição constante da temperatura (geralmente  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) era realizada na unidade de resfriamento celular, até  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, antes de ser transferido para  $<-140^{\circ}\text{C}$ . Porém, como a taxa de congelamento não era bem controlada, a suspensão celular poderia ser resfriada mais lentamente ou mais rapidamente (Terry *et al*, 2006). Com o advento dos *freezers* controlados, protocolos de congelamento mais específicos puderam ser desenvolvidos. Um decréscimo na temperatura de  $1,9^{\circ}\text{C}/\text{min}$  de  $4^{\circ}\text{C}$  para  $-30^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente de  $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$  para  $-30^{\circ}\text{C}$  para  $-150^{\circ}\text{C}$  foi adotado por vários autores (Dou *et al*, 1992; de Sousa *et al*, 1996; Alexandre *et al*, 2002).

Diener *et al.* (1993) desenvolveram um protocolo de congelamento controlado por computador para criopreservação de hepatócitos de ratos. A base do protocolo levou em

consideração o efeito da dinâmica de congelamento da suspensão celular, em particular determinando se cristais de gelo eram formados na suspensão celular. Este protocolo atingiu uma viabilidade hepatocitária de 86%, quando comparado a 27% por imersão direta em NL, 48% para um protocolo de congelamento rápido (-38°C/min) e 79% para um protocolo de congelamento lento e linear (-2°C/min).

Os protocolos de criopreservação para hepatócitos humanos têm sido utilizados, porém as funções essenciais dos hepatócitos podem estar prejudicadas pela criopreservação, e isto pode ter conseqüências importantes na evolução do transplante de hepatócitos. O desenvolvimento e a otimização de protocolos de criopreservação de hepatócitos ainda são necessários, e a investigação dos mecanismos envolvidos na perda da eficiência de fixação celular, o qual é relevante para o enxerto (Dhawan *et al*, 2005; Terry *et al*, 2006,2007).

Devido às dificuldades da criopreservação já destacadas acima, optamos em não utilizar no transplante os hepatócitos criopreservados no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol.

#### **6.4 Transplante de hepatócitos nos modelos de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg e 1,5g/kg)**

O modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol preencheu quatro dos seis critérios de Terblanche & Hickman como reversibilidade, morte por falência hepática, janela terapêutica e risco mínimo às pessoas envolvidas na pesquisa. Porém, dois critérios não foram preenchidos como a reprodutibilidade e modelo em grandes animais (Terblanche & Hickman, 1991).

Na hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol em humanos, os níveis de ALT aumentam no dia 1, atingem o pico no dia 3 e diminuem no dia 4 (Rumack, 2004). No nosso modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg), os animais tiveram o pico dos níveis de ALT no dia 1, começaram a diminuir no dia 2 e retornaram aos valores basais no dia 3. Lee *et al.* (2008) analisando 1.147 casos de IHA induzida por paracetamol em humanos, demonstraram que os níveis de ALT foram muito elevados (de 2,138 UI/l a 6,731 UI/l). Salam *et al.* (2005), demonstraram no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg) em ratos Wistar, que os níveis de ALT foram menores em comparação com os humanos, com média de  $256,5 \pm 11,2$  UI/l. Belardinelli *et al.* (2008), utilizando também o modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg) em

ratos Wistar, obteve uma média dos níveis de ALT de  $281,4 \pm 187,4$  UI/l. Estes achados são similares aos nossos resultados, 188,5 UI/l (116,7UI/l-330,7UI/l) no dia 1, utilizando 1g/kg ip. Todos os 44 ratos fêmeas incluídos no nosso estudo, apresentavam níveis de ALT 1,5 vezes acima dos valores basais. Entretanto, a reprodutibilidade dos nossos dados, não foram tão homogêneos como os de Salam *et al.* (2005), demonstrado pela grande variabilidade observada.

Considerando que o nível de ALT não é um bom marcador para função hepática e prognóstico em humanos, decidimos incluir o FV no modelo de hepatotoxicidade aguda induzida pelo paracetamol em ratos. Em humanos, o Critério de *Clichy* (Bernuau *et al.*, 1986) é utilizado na indicação de transplante hepático na IHA (Quadro 2). Estes valores são associados à mortalidade espontânea maior de 90% independente da causa. No entanto, os resultados do FV nos 44 ratos Wistar fêmeas tiveram grande variação, mesmo nos valores basais 198,0% (159,7%-299,0%), e foram menores em comparação com Karges *et al.* (1994), que encontraram valores entre 512% e 781% em ratos Wistar.

No modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg), a mediana do FV no dia 1 foi de 125,0% (67,0%-196,5%), e os valores no dia 3 do grupo 1 (transplante de hepatócitos) foi de 300,0% (195,0%-414,0%), e no grupo 2 (PBS) foi de 270,0% (219,2%-772,2%). Mesmo assim, foi detectada uma correlação inversa leve comparando o FV no dia 1 e ALT no dia 1 ( $r=0,26$ ;  $P=0,040$ ), sugerindo que houve dano hepático com esta dose de paracetamol. Este dado é corroborado pelo aumento significativo nos níveis de ALT e diminuição dos níveis do FV nos 44 animais no dia 1 ( $P<0,001$ ). É importante ressaltar a originalidade do teste do FV no modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol em ratos. Portanto, consideramos este modelo útil para estudar o efeito do transplante de hepatócitos na sobrevida de ratos Wistar.

O transplante de hepatócitos apresenta muitas vantagens em relação ao transplante hepático. A propósito, células de um único doador podem ser utilizadas em muitos receptores (Grompe *et al.*, 1999). Na nossa experiência, um doador macho pode prover hepatócitos frescos para no mínimo 10 receptoras fêmeas. Hepatócitos frescos isolados têm mostrado melhor desempenho em relação aos hepatócitos criopreservados em vários estudos (Jamal *et al.*, 2000; Fuller *et al.*, 1983; David *et al.*, 2001), e os hepatócitos são sensíveis ao dano no congelamento, diminuindo sua eficácia no enxerto (Dhawan *et al.*, 2005; Terry *et al.*, 2006).

Os hepatócitos podem ser transplantados diretamente no fígado, ou através da veia porta e no baço. Embora, o local ideal para a infusão de hepatócitos, bem como o seu

estabelecimento ainda não esteja determinado, o fígado parece ser o local ideal para os hepatócitos transplantados (Terry *et al*, 2006). Atualmente, o baço é um dos locais mais utilizados para infusão de hepatócitos pela sua acessibilidade e menor risco de sangramento intra-abdominal.

Os hepatócitos dos doadores transplantados no baço tendem a migrar para outros órgãos, particularmente o fígado do hospedeiro (Ponder *et al*, 1991; Markus *et al*, 1997; Shibata *et al*, 2006). Se o número de células do enxerto no baço e sua capacidade metabólica serão suficientes permanece uma questão aberta (Terry *et al*, 2006). No nosso estudo, investigamos o enxerto dos hepatócitos no fígado e no baço por meio da análise do gene do cromossoma Y (*Sry*) por PCR em órgãos de receptoras fêmeas, e marcamos as células transplantadas com o DAPI. Nos animais injetados através da veia porta, o *Sry* foi positivo em três de quatro fígados, enquanto que em quatro baços de quatro diferentes animais o *Sry* foi positivo. Nestes mesmos animais, o *Sry* do fígado foi positivo em todos eles. Isto demonstrou que os hepatócitos transplantados no baço migram para o fígado do hospedeiro, este achado que é sustentado pelos hepatócitos DAPI-positivos no fígado de seis animais transplantados no baço. Não foi detectada nenhuma diferença no número de hepatócitos DAPI-positivos no fígado de animais injetados através da veia porta ou no baço. Esta falta de diferença no número de células DAPI-positivas não é facilmente explicada. Poderíamos assumir que os fígados de ratos injetados através da veia porta apresentariam um grande número de hepatócitos, todavia alguns estudos sugerem a necessidade de um espaço para o enxerto no receptor (Shibata *et al*, 2006). No nosso modelo, não foi realizada hepatectomia parcial ou irradiação hepática, e talvez o número de células mortas no momento da injeção do paracetamol não tenha sido o suficiente para criar um ambiente permissivo para o enxerto dos hepatócitos. De qualquer modo, os animais tiveram algum grau de lesão hepática, pois os hepatócitos permaneceram no baço, e isto tem sido sugerido como requerimento para o estabelecimento de hepatócitos transplantados no baço (Ponder *et al*, 1991).

Um segundo ponto a ser considerado na injeção de hepatócitos no baço é se eles permanecem funcionantes no baço. Shibata *et al*. (2006) investigaram a repopulação hepática, utilizando hepatócitos pequenos e hepatócitos frescos primários transplantados no baço, para avaliar a implantação e a função celular em ratos. Após 12 semanas de transplante, sinais do cromossoma Y foram detectados no baço e os hepatócitos residentes no baço estavam expressando albumina, embora em um padrão disperso no grupo de hepatócitos frescos primários. Nos nossos dados, mesmo quando o *Sry* foi positivo no baço, a expressão

de albumina não foi detectada no subgrupo de oito animais do grupo 1 injetado pelo baço. Antes do transplante, a expressão de albumina foi detectada em cinco diferentes procedimentos, para confirmar que os hepatócitos eram viáveis e funcionais. Uma possível explicação para este achado é que os hepatócitos frescos têm um padrão de distribuição de dispersão no baço (Shibata *et al*, 2006) e quando coletamos amostras do baço para a detecção de expressão de albumina por RT-PCR talvez tenhamos perdido hepatócitos. Por outro lado, não podemos descartar a hipótese que os hepatócitos no baço entram em processo de desdiferenciação causado pela perda dos contatos intercelulares com as células vizinhas do hospedeiro, diminuindo os genes específicos de transcrição dos hepatócitos (Nicoluzzi *et al*, 2004).

Nossos dados demonstraram que todos os animais do grupo 1 (n=20) sobreviveram até o final do experimento (dia 3). Todos os animais que receberam hepatócitos (n=12) ou PBS (n=9) no baço sobreviveram até o dia 3. Os cinco animais que morreram eram do grupo 2 (PBS), sendo que o local de injeção utilizado foi a veia porta. Isto sugere que a injeção no baço é um procedimento menos invasivo comparado com a injeção através da veia porta. Por outro lado, como a mortalidade foi restrita ao grupo 2 (PBS), poderíamos especular que o transplante de hepatócitos teria um efeito protetor. Ao mesmo tempo, este estudo sugere que o nosso modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1g/kg) é limitado, e que a hepatotoxicidade não é tão intensa, porque quando um procedimento menos invasivo (injeção no baço) foi utilizado, todos os animais sobreviveram, independente do grupo de tratamento. Quando foi utilizado um procedimento mais invasivo, como a injeção na veia porta, o transplante de hepatócitos aumentou a sobrevida em relação ao grupo que recebeu PBS (P=0,001).

Em virtude disso, decidimos desenvolver um modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/kg), pois consideramos que os animais não estavam tão doentes, e que aumentando o grau de lesão hepática poderíamos então detectar uma diferença maior na sobrevida entre o grupo 1 (transplante de hepatócitos) e o grupo 2 (PBS).

Este modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/kg) teve uma série de modificações desde o paracetamol utilizado e a sua concentração, o momento do transplante de hepatócitos ou injeção de PBS, o tipo de anestesia no momento do transplante, a coleta ocular no dia 2 e a via de acesso utilizada, cujos motivos serão explicados a seguir.

Inicialmente, utilizamos o paracetamol (Medley) na sua concentração de 200mg/mL na dose de 1,5g/kg em um subgrupo de 10 animais, que morreram algumas horas após a



administração do paracetamol (não incluídos no estudo). Quando foi realizada a necropsia destes animais evidenciou-se grande volume do paracetamol ip, pois com o aumento da dose aumentou o volume a ser injetado. Optamos então por formular o paracetamol na concentração de 300mg/mL em farmácia de manipulação, a fim de diminuir o volume a ser injetado.

Em razão dos animais terem adoecido mais neste modelo, decidimos realizar o transplante de hepatócitos ou injeção de PBS, 6 horas após a administração do paracetamol. Ao mesmo tempo, consideramos que o transplante precoce (6 horas) poderia ter algum benefício em relação ao transplante mais tardio (24 horas).

Inicialmente utilizamos como anestesia Ketamina e Xilazina nos procedimentos de coleta ocular e no momento do transplante de hepatócitos ou injeção de PBS, porém vários animais morreram após a anestesia com Ketamina e Xilazina no momento da cirurgia. Em função disso, utilizamos o anestésico inalatório Isoflurano, o qual tem recuperação mais rápida, no momento da cirurgia. A via de acesso utilizada foi o baço por ser menos invasiva.

No modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol (1,5g/kg), a mediana dos níveis de ALT no dia 1 foi de 103,0 UI/l (82,5UI/l-124,5UI/L). Todos os 57 ratos fêmeas incluídos no nosso estudo apresentavam níveis de ALT no dia 1 (6 horas após a administração do paracetamol), 1,5 vezes acima dos valores basais. Entretanto, a reprodutibilidade dos dados foi baixa, devido à grande variabilidade observada. A mediana dos níveis de ALT no dia 3 no grupo 1 foi de 53,3UI/l (38,5UI/l-126,7UI/l) e no grupo 2 foi de 51,0UI/l (33,0UI/l-80,8UI/l), demonstrando que retornaram aos valores basais.

Este modelo demonstrou que houve dano hepático com esta dose de paracetamol. Este dado tem suporte pelo aumento significativo nos níveis de ALT nos 57 animais no dia 1 ( $P < 0,001$ ). Portanto, consideramos este modelo útil para estudar o efeito do transplante de hepatócitos na sobrevivência de ratos Wistar.

Trinta e três animais receberam transplante de hepatócitos (Grupo 1) e 24 animais receberam PBS (Grupo 2) através do baço. Nossos resultados demonstraram que 39 animais sobreviveram até o final do experimento (dia 3). Nove animais do grupo 1 (27,3%) e nove animais do grupo 2 (37,5%) morreram, todos no dia 2. Não houve diferença estatística significativa na análise de sobrevivência entre o grupo 1 e o grupo 2. A mortalidade ocorreu da mesma forma nos dois grupos, independente do tratamento quando um procedimento menos invasivo (injeção no baço) foi utilizado. Uma simulação de cálculo de tamanho de amostra demonstrou que para um  $P = 0,05$ , unicaudal e um poder estatístico de 80% seriam necessários 269 animais por grupo, para detectar uma diferença na mortalidade entre os dois grupos.

## **6.5 Limitações do estudo**

No presente estudo foram encontradas algumas limitações como a reprodutibilidade do modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol em ratos Wistar, pois alguns animais não tiveram dano hepático, e aqueles que o apresentaram, este ocorreu de maneira heterogênea. Outro aspecto a ser salientado foi a grande variabilidade do teste do FV, que associado ao fato da inexistência de outros estudos em ratos Wistar em modelo de hepatotoxicidade aguda, dificultou a comparação, e talvez não possa ser considerada uma limitação, mas sim deve ser valorizado.

O isolamento de hepatócitos é um procedimento factível, no entanto sua aplicação em protocolos clínicos exigirá uma adequação dos métodos de isolamento. O transplante de hepatócitos é uma técnica que pode ser aplicada em modelos animais de IHA levando ao aumento da sobrevida. Entretanto, o modelo utilizado no presente estudo apresentou um alto grau de variabilidade, o que torna necessária a avaliação do transplante de hepatócitos em modelos mais reprodutíveis.

## 7 CONCLUSÕES

- A técnica de isolamento de hepatócitos de ratos Wistar foi padronizada com a enzima Colagenase, que se demonstrou adequada em relação à quantidade, viabilidade e funcionabilidade dos hepatócitos.
- Os protocolos de criopreservação de hepatócitos demonstraram que o congelamento e descongelamento gradativos produzem uma melhor viabilidade hepatocitária.
- O transplante de hepatócitos não alterou os valores de ALT e FV no modelo de 1g/kg avaliado em até 3 dias, enquanto que o modelo de 1,5g/kg não alterou os valores de ALT avaliados em até 3 dias.
- Foi possível verificar a presença de hepatócitos doadores no fígado e no baço de animais injetados pelo baço e no fígado de animais injetados através da veia porta através da coloração com DAPI.
- Foi possível verificar a presença de hepatócitos doadores no fígado e no baço de animais injetados pelo baço e no fígado de animais injetados através da veia porta através da detecção do gene do cromossoma Y (*Sry*) por análise molecular.
- A comparação da sobrevivência em até 3 dias após a indução de hepatotoxicidade aguda foi realizada em dois modelos: 1g/kg e 1,5g/kg de paracetamol. No modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol 1g/kg, o transplante de hepatócitos através da veia porta demonstrou um aumento da sobrevivência, sugerindo um efeito protetor. No modelo de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol 1,5g/kg, não houve diferença na sobrevivência entre os dois grupos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexandre, E.; Viollon-Abadie, C.; David, P. et al. Cryopreservation of adult human hepatocytes obtained from resected liver biopsies. *Cryobiology* 2002; 44: 101-113.

Beales, D.; McLean, A.E.M. Protection in the late stages of paracetamol-induced liver cell injury with fructose, cyclosporine A and trifluoperazine. *Toxicology* 1996; 107: 201-208.

Belardinelli, M.C.; Pereira, F.; Baldo, G. et al. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology* 2008; 247: 1-5.

Bernuau, J.; Goudeau, A.; Poynard, T. et al. Multivariate analysis of prognostic factors in fulminant hepatitis B. *Hepatology* 1986; 6: 848-651.

Bhagwandeem, B.S.; Grimes, S.D.; Schultze, A.E. et al. Endotoxin induced hepatic necrosis in rats on an alcohol diet. *J Pathol* 1987; 152: 47-53.

Blitzer, B.L.; Waggoner, J.G.; Jones, E.A. et al. A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* 1978; 74: 664-671.

Bruck, R.; Oren, R.; Shirin, H. et al. Hypothyroidism minimizes liver damage and improves survival in rats with thioacetamide induced fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1998; 27: 1013-1020.

Centeno, M.A.; Bes, D.F.; Sasbon, J.S. Mortality risk factors of a pediatric population with fulminant hepatic failure undergoing orthotopic liver transplantation in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2002; 3:227-233.

Chedrawy, E.G.; Wang, J.S.; Nguyen, D.M. et al. Incorporation and integration of implanted myogenic and stem cells into native myocardial fibers: Anatomic basis for functional improvements. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124:584-590.

Chesne, C.; Guyomard, C.; Fautrel, A et al. Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and humans beings after cryopreservation. *Hepatology* 1993; 18: 406-414.

Ciocca, M.; Moreira-Silva, S.F.; Alegria, S. et al. Hepatitis A as an etiological agent of Acute Liver Failure in Latin America. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26 (8): 711-715.

Coundouris, J.A.; Grant, M.H.; Engeset, J. et al. Cryopreservation of human adult hepatocytes for use in drug metabolism and toxicity results. *Xenobiotica* 1993; 12: 1399-1409.

David, P.; Alexandre, E.; Audet, M. et al. Engraftment and albumin production of intrasplenically transplanted rat hepatocytes (Sprague-Dawley), freshly isolated versus cryopreserved, into Nagase analbuminemic rats (NAR). *Cell Transplant* 2001; 10: 67-80.

De Loecker, P.; Fuller, B.J.; Koptelov, V.A. et al. Metabolic activity of freshly prepared and cryopreserved hepatocytes in monolayer culture. *Criobiology* 1993; 30(1):12-81.

de Sousa, G.; Langouët, S.; Nicolas, F. et al. Increase of cytochrome P-450 1A and glutathione transferase transcripts in culture hepatocytes from dogs, monkeys, and humans after cryopreservation. *Cell Biol Toxicol* 1996; 12:351-358.

Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders . *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:431-435.

Dhawan, A.; Mitry, R.R.; Hughes RD. Hepatocyte transplantation for metabolic disorders, experience at King's College hospital and review of literature. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 457-460.

Dhawan, A.; Mitry, R.R.; Hughes, R.D. et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* 2004; 78: 1812-1814.

Diaz-Buxo, J.A.; Blumenthal, S.; Hayes, D. et al. Galactosamine-induced fulminant hepatic necrosis in unanesthetized canines. *Hepatology* 1997; 25: 950-957.

Diener, B.; Utesch, D.; Beer, N. et al. A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics. *Cryobiology* 1993; 30: 116-127.

Disponível em: < [www.worldofmolecules.com/drugs](http://www.worldofmolecules.com/drugs)>. Acesso em: 14/11/2008.

Dou, M.; de Sousa, G.; Lacarelle, B. et al. Thawed human hepatocytes in primary culture. *Cryobiology* 1992; 29(4):454-469.

Farmer, D.G.; Anselmo, D.M.; Ghobrial, R.M. et al. Liver transplantation for fulminant hepatic failure: experience with more than 200 patients over a 17-year period. *Ann Surg* 2003; 237: 666-675.

Filho, A.P.F.S. Sedação, analgesia e anestesia geral em ratos. In: Rhoden, E.L.; Rhoden, C.R. *Princípios e Técnicas em Experimentação Animal*. Editora da UFRGS; 2006. p. 45-53.

Filipponi, F.; Mosca, F. Animal models of fulminant hepatic failure: need to test liver support devices. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 607-613.

Fox, I.J.; Chowdhury, J.R.; Kaufman, S.S. et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422-1426.

Francavilla, A.; Makowka, L.; Polimeno, L. et al. A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 96: 470-478.

Fuller, B.J.; Lewin, J.; Sage, L. Ultrastructural assessment of cryopreserved hepatocytes after prolonged ectopic transplantation. *Transplantation* 1983; 35: 15-18.

Ganter, F.; Kusters, S. ; Wendel, A. et al. Protection from T-cell-mediated murine liver failure by phosphodiesterase inhibitors. *J Pharmacol Exp* 1997; 280: 53-60.

Ganter, F.; Leist, M.; Lohse, A.W. et al. Concanavalin-A induced T-cell-mediated injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 1995; 21: 190-198.

Grompe, M.; Laconi, E.; Shafritz, D.A. Principles of therapeutic liver repopulation. *Semin Liver Dis* 1999; 19:7-14

Henne-Bruns, D.; Arrwohl, J.; Broelsch, C. et al. Acetaminophen-induced acute hepatic failure in pigs: Controversial results to other animal models. *Res Exp Med (Berl)* 1988; 188: 463-472.

Hoofnagle, J.H.; Carithers, R.L. Jr.; Shapiro, C. et al. Fulminant hepatic failure: summary of a workshop. *Hepatology* 1995; 21: 240-252.

Horslen, S.P.; McCowan, T.C.; Goertzen, T.C. et al. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003; 111: 1262-1267.

Hughes, R.D.; Mitry, R.R.; Dhawan A. Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience. *J R Soc Med* 2005; 98: 341-345.

Jamal, H.Z.; Weglarz, T.C.; Sandgren, E.P. Cryopreserved mouse hepatocyte retain regenerative capacity in vivo. *Gastroenterology* 2000; 118: 390-394.

Johann, L.M.; Oliveira, J.G.; Moraes, L.R. et al. Evolução de pacientes pediátricos com insuficiência hepática aguda por hepatite viral A nos últimos dez anos. *Revista HCPA* 2006; 26 (Supl 1): 155.

Kalpana, K.; Ong, H.S.; Soo, K.C. et al. An improved model of galactosamine-induced fulminant hepatic failure in the pig. *J Surg Res* 1999; 82: 121-130.

Kaplowitz, N. Acetaminophen Hepatotoxicity: What do we know, what don't we know, and what do we do next? *Hepatology* 2004; 40: 23-26.

Karges, H.E.; Funk, K.A.; Ronneberger, H. Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 793-797.

Kelly, J.H.; Koussayer, T.; He, D.E. et al. An improved model of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure in dogs. *Hepatology* 1992; 15: 329-335.

Lee, W.M.; Squires, R.H. Jr.; Nyberg, S.L. et al. Acute Liver Failure: Summary of a Workshop. *Hepatology* 2008; 47:1401-1415.

Leist, M.; Wendel, A. A novel mechanism of murine hepatocyte death inducible by concanavalin A. *J Hepatol* 1996; 25: 948-959.

Markus, P.M.; Koenig, S.; Krause, P. et al. Selective intraportal transplantation of DiI-marked isolated rat hepatocytes. *Cell Transplantation* 1997; 6: 455-462.

Marroni, C.A.; Brandão, A.B.M.; Zanotelli, M.L. et al. Transplante hepático em adultos. *Rev AMRIGS* 2003; 47: 29-37.

Miller, D.J.; Hickman, R.; Fratter, R. et al. An animal model of fulminant hepatic failure: A feasibility study. *Gastroenterology* 1976; 71: 109-113.

Mitry, R.R.; Dhawan, A.; Hughes, R.D. et al. One liver, three recipients-segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1614-1616.

Muraca, M.; Gerunda, G.; Néri, D. et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002; 359: 317-318.

Najimi, M.F.S.; Sokal, E.M. Cell transplantation in the treatment of liver diseases. *Pediatr Transplantation* 2008; 12: 6-13.

Nayak, N.C.; Chopra, P.; Dhar, A. et al. Diverse mechanisms of hepatocellular injuries due to chemicals: evidence in rats administered carbon tetrachloride or dimethylnitrosamine. *Br J Exp Pathol* 1975; 56: 103-112.

Nayak, N.C.; Chopra, P.; Ramalingaswami, V. The role of liver cell endoplasmic reticulum and microsomal enzymes in carbon tetrachloride toxicity: an in vivo study. *Life Sci* 1970; 9: 1431-1439.

Newsome, P.N.; Plevris, J.N.; Nelson, L.J. et al. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transplant* 2000; 6: 21-31.

Nicoluzzi, J.E.L.; Repka, J.C.D.; Rocha, L.C.A. et al. Assessment of bioartificial liver using human hepatocytes immunoprotected by macroencapsulation. *Rev Col Bras Cir* 2004; 31: 311-317.

Nolan, J.P. Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury- an idea whose time has come again. *Hepatology* 1989; 10: 887-891.

Nolan, J.P.; Leibowitz, A.I. Endotoxin and the liver. Modification of acute carbon tetrachloride injury by polymyxin b-an antiendotoxin. *Gastroenterology* 1978; 75: 445-449.

Nussler, A.; Konig, S.; Ott, M. et al. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver disease. *J Hepatol* 2006; 45: 144-159.

O'Grady, J.G. Acute liver failure. *Postgrad Med J* 2005; 81:148-154.

O'Grady, J.G.; Alexander, G.J.; Hayllar, K.M. et al. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 97: 439-445.

O'Grady, J.G.; Shalm, S.W.; Williams, R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993; 342: 272-275.



Ostapowicz, G.A.; Fontana, R.J.; Schiodt, F.V. et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 2002; 137: 947-954.

Ostrowska, A.; Bode, D.C.; Pruss, J. et al. Investigation of functional and morphological integrity of freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes. *Cell Tissue Bank* 2000; 1: 55-68.

Peeling, J.; Shoemaker, L.; Gauthier, T. et al. Cerebral metabolic and histological effects of thioacetamide-induced liver failure. *Am J Physiol* 1993; 265: G572-G578.

Polson, J.; Lee, W.M. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology* 2005; 41: 1179-1197.

Ponder, K.P.; Gupta, S.; Leland, F. et al. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intransplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1217-1221.

Rahman, T.M.; Hodgson, HJ. Animals models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 145-157.

Reid, A.B.; Kurten, R.C.; McCullough, S.S. et al. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 509-516.

Rumack, B.H. Acetaminophen Misconceptions. *Hepatology* 2004; 40: 10-15.

Salam, O.M.E.A.; Baiuomy, A.R.; El-Shenawy, S.M. et al. Effect of pentoxifylline on hepatic injury caused in the rat by the administration of carbon tetrachloride or acetaminophen. *Pharmacol Res* 2005; 57: 596-603.

Sass, D.A.; Shakil, A.O. Fulminant hepatic failure. *Liver Transplant* 2005; 11: 594-605.

Seglen, P.O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13: 29-83.

Shi, J.; Aisaki, K.; Ikawa, Y. et al. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* 1998; 153: 515-525.

Shibata, C.; Mizuguchi, T.; Kikkawa, Y. et al. Liver Repopulation and long-term function of rat small hepatocyte transplantation as an alternative cell source for hepatocyte transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 78-87.

Sielaff, T.D.; Hu, M.Y.; Rollins, M.D. et al. An anesthetized model of lethal canine galactosamine fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1995; 21: 796-804.

Sneed, R.A.; Grimes, S.D.; Schultze, A.E. et al. Bacterial endotoxin enhances the hepatotoxicity of allyl alcohol. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 144: 77-87.

Strom, S.C.; Fischer, R.A.; Thomposon, M.T. et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997; 63: 559-569.

Terblanche, J.; Hickman, R. Animals models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 770-774.

Terry, C.; Dhawan, A.; Mitry, R.R. et al. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology* 2006; 53: 149-159.

Terry, C.; Dhawan, A.; Mitry, R.R. et al. Pre-incubation of rat and human hepatocytes with cryoprotectants prior to cryopreservation can improve viability and function on thawing. *Liver Transplant* 2006; 12: 165-177.

Terry, C.; Hughes, R.D.; Mitry, R.R. et al. Cryopreservation-induced nonattachment of human hepatocytes: role of adhesion molecules. *Cell Transplant* 2007; 16 (6): 639-647.

Tiegs, G. Experimental hepatitis and role of cytokines. *Acta Gastroenterol Bel* 1997; 60: 176-179.

Trey, C.; Lipworth, L.; Chalmers, T.C. et al. Fulminant hepatic failure: presumable contribution to halothane. *N Engl J Med* 1968; 279: 798-801.

Walker, R.M.; Racz, W.J.; McElligott, T.F. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Lab Invest* 1980; 42: 181-189.

Wallace, J.L. Acetaminophen hepatotoxicity: NO to the rescue. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 1-2.

Wigg, A.J.; Gunson, B.K.; Mutimer DJ. Outcomes following liver transplantation for seronegative acute liver failure: experience during a 12-year period with more than 100 patients. *Liver Transpl* 2005; 11 (1): 27-34.

Zimmermann, C.; Ferenci, P.; Pifl, C. et al. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology* 1989; 9: 594-601.

## **ANEXOS**

**Anexo I**-Publicação nos Anais de 26<sup>a</sup> Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Anexo II**-Artigo científico encaminhado para publicação

**FRESHLY ISOLATED HEPATOCYTE TRANSPLANTATION IN  
ACETAMINOPHEN-INDUCED HEPATOTOXICITY MODEL IN RATS**

Daniela Rodrigues<sup>a,b</sup>, Themis Reverbel da Silveira<sup>a,c</sup>, Ursula Matte<sup>c,d,e\*</sup> **and the Study Group  
on Experimental Hepatology**

<sup>a</sup> Experimental Hepatology and Gastroenterology Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Post Graduation Program: Sciences in Gastroenterology, Faculdade de Medicina, UFRGS, Brazil

<sup>c</sup> Post Graduation Program in Adolescent and Child Health, UFRGS, Brazil

<sup>d</sup> Post Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Brazil

<sup>e</sup> Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

The present study was performed at Experimental Hepatology and Gastroenterology Laboratory and Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS, Brazil

Running title: Rat hepatocyte transplantation.

\*Corresponding author: Ursula Matte, PhD

Address: Gene Therapy Center, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil Zip code: 90035-903

Phone: + 55 51 33598841; Fax: + 55 51 33598011

E-mail address: [umatte@hcpa.ufrgs.br](mailto:umatte@hcpa.ufrgs.br)

## ABSTRACT

**Context** - Hepatocyte transplantation is an attractive therapeutic modality for liver disease as an alternative for orthotopic liver transplantation. **Objective** - The aim of the current study was to investigate the feasibility of freshly isolated rat hepatocyte transplantation in acetaminophen-induced hepatotoxicity model. **Methods** - Hepatocytes were isolated from male Wistar rats and transplanted 24 hours after APAP administration in female recipients. Female rats received either  $1 \times 10^7$  hepatocytes or PBS through the portal vein or into the spleen and were sacrificed after 48 hours. **Results** - Alanine aminotransferase levels measured within the experiment did not differ between groups at any time point. Molecular analysis and histology showed presence of hepatocytes in liver of transplanted animals injected either through portal vein or spleen. **Conclusion** - These data demonstrate the feasibility and efficacy of hepatocyte transplantation in the liver or spleen in a mild APAP-induced hepatotoxicity model.

**HEADINGS:** Acetaminophen; hepatotoxicity; rat hepatocyte transplantation

## RESUMO

**Contexto** - O transplante de hepatócitos é uma modalidade terapêutica atrativa para doenças hepáticas como uma alternativa ao transplante hepático ortotópico. **Objetivos** - O objetivo do presente estudo foi investigar a factibilidade do uso de hepatócitos frescos isolados de ratos em um modelo de hepatotoxicidade induzida por Paracetamol. **Métodos** – Hepatócitos foram isolados de ratos Wistar machos e transplantados 24 horas após a administração de Paracetamol em receptores fêmeas. As ratas receberam  $1 \times 10^7$  hepatócitos ou PBS pela veia porta ou no baço e foram sacrificadas após 48 horas. **Resultados** – Os níveis de alanina aminotransferase medidos durante o experimento não diferiram entre os grupos em nenhum momento. Análises moleculares e histológicas demonstraram a presença de hepatócitos no fígado dos animais transplantados pelo baço ou pela veia porta. **Conclusão** - Os dados indicam a factibilidade e eficácia do transplante de hepatócitos no fígado ou baço em um modelo de hepatotoxicidade leve induzida por Paracetamol.

**DESCRITORES:** Paracetamol; hepatotoxicidade; transplante de hepatócitos em ratos

## INTRODUCTION

Orthotopic liver transplantation (OLT) has emerged as an effective treatment for acute liver failure (ALF) and end-stage liver disease. However, wider application of this therapy is limited primarily by lack of donors. Therefore other liver support systems, such as extracorporeal systems and cellular therapy are under evaluation <sup>(19,20,25)</sup>.

Hepatocyte transplantation has been used as a treatment for liver-based metabolic diseases such as Crigler-Najjar syndrome type I <sup>(7)</sup>, glycogen storage disease type 1a <sup>(15)</sup>, urea cycle defects <sup>(9,14)</sup> and congenital deficiency of coagulation factor VII <sup>(6)</sup>. For ALF, hepatocyte transplantation can be used to bridge patients to whole-organ transplantation, decreasing mortality and avoiding the risks of undertaking a major surgery <sup>(5,18)</sup>. Up to a maximum of 5% of normal liver mass can be transplanted into the splenic artery or the portal vein, leading to a reduction in ammonia, bilirubin levels and improvement in hepatic encephalopathy <sup>(16)</sup>.

Acetaminophen (APAP) toxicity is the leading cause of ALF in the United States and United Kingdom, accounting for 46% up and 70% of cases, respectively <sup>(12,25)</sup>. The mechanism of liver toxicity is well established. The saturation of the normal metabolic pathway to cytochrome P450 metabolism leads to the excessive formation of highly reactive intermediate *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI). At therapeutic doses, NAPQI is efficiently detoxified by glutathione (GSH). In overdose, conjugation of NAPQI with GSH leads to GSH depletion, and NAPQI covalently binds to cysteine residue in proteins to form acetoaminophen adducts. These protein adducts are formed from highly reactive species of superoxide and nitric oxide and that increases the permeability of mitochondrial membrane with release of superoxide of the mitochondria, a lethal event for the cell <sup>(11,22)</sup>.



In the present study, the feasibility of freshly isolated rat hepatocyte transplantation in APAP-induced hepatotoxicity model either injected through the portal vein or into the spleen was investigated.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Animals***

Male and female Wistar rats at least eight-week-old were kept at Experimental Animal Unit of Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA), under controlled temperature (between 18°C and 22°C) in 12-h light-dark cycle. Rats were given standard laboratory rodent chow and water *ad libitum*. Male rats were used as hepatocyte donors and female rats were used as recipients. This study was approved by Research and Ethics Committee of HCPA and all procedures were in accordance with guidelines for research use of laboratory animals.

### ***APAP-induced hepatotoxicity model***

The APAP-induced hepatotoxicity model was adapted from Salam et al. <sup>(24)</sup>. An oral solution of APAP at 200mg/ml concentration (Medley, Brazil) was administered in a single dose of 1g/kg via intraperitoneal injection in female rats weighing 200-350g. Four days before the intraperitoneal injection, animals received Phenobarbital (Fenocrisis 4%, Brazil) at 350mg/L in drinking water to induce cytochrome P-450 enzymes to potentiate subsequent APAP-toxicity <sup>(2)</sup>. Phenobarbital was offered until the last day of the study (day 3). Animals were euthanized at day 3 after APAP administration.

### ***Hepatocyte isolation***

Hepatocytes were isolated from male rats weighing 350-500g by perfusion of liver with modified two-step Collagenase technique <sup>(26)</sup>. In the first step, portal vein was cannulated and inferior vena cava was opened to remove blood with HBSS medium without calcium, magnesium and phenol red (LGC Biotecnologia, Brazil) and EDTA (Nuclear, Brazil) with a 700ml/h flow controlled by pump infusion. In the second step, superior vena cava was cannulated and inferior vena cava was clamped for perfusion with HBSS medium, 1 M calcium chloride (Vetec, Brazil) and Type II Collagenase 2% (Gibco, Invitrogen Corporation, USA). Penicillin/Streptomycin 1% (Gibco, Invitrogen, USA) was added to all of the above solutions.

Liver fragments obtained were kept in HBSS medium and 10% antibiotics and were taken to a laminar flow hood. The fragments were transferred to vials with HBSS medium and decreasing 5% to 2% antibiotics solution. Liver sections were minced and the cell suspension was passed through a gauze mesh, centrifuged three times at 800 RPM for 5 minutes and washed in HBSS medium three times. In the last washing, hepatocytes were resuspended in Phosphate buffered saline (PBS), (Laborclin, Brazil) and cell viability was determined by Trypan's blue exclusion.

In a subgroup of eleven randomly chosen animals, cells were stained prior to injection with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, Roche Mannheim, Germany) 2.7mg/mL to assess the migration pattern of donor hepatocytes according to the different sites of injection (portal vein or spleen) <sup>(3)</sup>.

### ***Hepatocyte transplantation***

Hepatocytes ( $1 \times 10^7$ ) were administered 24 hours after APAP-induced hepatotoxicity in female rats. Animals were anesthetized with 50mg/kg of Ketamine (Dopalen, Vetbrands, Brazil) and 20mg/kg of Xilazine (Virbaxyl 2%, Virbac, Brazil) intraperitoneally.

Forty-four female rats were separated in four groups: group PV-H received hepatocyte transplantation through the portal vein (n=8), group PV-PBS received PBS through the portal vein (n=15), group SPL-H received hepatocyte transplantation into the spleen (n=12), and group SPL-PBS received PBS into the spleen (n=9). In animals that received the injection into the portal vein, a longitudinal 3 cm abdominal incision was performed, and a volume of 1 ml of PBS (containing or not  $1 \times 10^7$  hepatocytes) was slowly injected into the portal vein. Gelfoam (Cuntanplast, Mascia Brunelli Spa, Milano, Italy) was applied to the site of injection in order to avoid bleeding. In animals that received injection into the spleen, a vertical 2cm abdominal incision below left costal edge was performed and the spleen was exposed. A volume of 1 ml of PBS (containing or not hepatocytes) was slowly injected into the spleen pulp. Rats were sutured in layers with Polyglactine 4-0 (Vycril Ethicon, SP, Brazil) and in the skin with Mononylon 4-0 (Monocryl Ethicon, SP, Brazil). Animals recovered in the cage.

### ***Biochemistry***

Blood was collected at time point 0 (before APAP administration), and at days 1 and 3 after APAP administration through retroorbital puncture under anesthesia. Samples for alanine aminotransferase (ALT) were centrifuged at 4000 RPM for 5 minutes, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . ALT was measured using ultraviolet enzyme method at Roche/Hitachi ACN 685E equipment.

### ***Histology***

Animals that survived until day 3 were sacrificed in  $\text{CO}_2$  chamber. Liver and spleen samples were collected and placed in 10% buffered formalin solution for 24 hours. Unstained paraffin embedded sections were observed under fluorescent microscopy and the number of

DAPI-positive cells was counted in 100 high power fields. In addition, spleen slides were stained with H&E to visualize injected hepatocytes.

### ***Molecular analysis***

To detect the presence of donor cells, DNA was extracted with Trizol (Invitrogen, USA) from liver and spleen samples and PCR for *Sry* gene was performed using the following primers at 50°C (for 5' AAGCGCCCCATGAATGCATT 3', rev 5' CAGCTGCTTGCTGATCTCTG 3'). PCR products were visualized in 1.5% agarose gels stained with Ethidium Bromide <sup>(1)</sup>.

In a subgroup of eight animals from group SPL-H spleen samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C to perform Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for albumin expression. Total RNA was extracted using a commercial kit (Easy RNA, Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. Conversion to cDNA was performed using Superscript II (Invitrogen, USA) from 3 µg of RNA. RT-PCR was performed using the following primers at 42°C for 40 cycles (for 5' TTGTATGAATATGCAAGAAG 3', rev 5' CACTCTTCCCAGGTTTCTTG 3'). PCR products were visualized in 1.5% agarose gel stained with Ethidium Bromide. RNA extracted from liver samples was used as positive control.

*Gapdh* was used as positive internal control both for RT-PCR and PCR reactions. Primers for *Gapdh* were: for 5' CAGCAATGCATCCTGCAC 3', rev 5' GAGTTGCTGTTGAAGTCACAGG 3').

### ***Statistics***

Statistics was performed using SPSS 12.0 (Statistical Package for Social Science). ALT levels were expressed as the median  $\pm$  quartiles. Differences in ALT levels were assessed using Friedman's test.

## **RESULTS**

### ***APAP-induced hepatotoxicity model***

At day 1, ALT levels increased with statistical significance in all 44 animals by Friedman's test ( $P < 0.0001$ ). At day 3, ALT levels returned to basal values in all groups, without difference among the groups (Table 1).

### ***Hepatocyte transplantation and survival analysis***

Hepatocytes were isolated from male Wistar rats' livers weighing from 15g to 20g. The number of isolated hepatocytes ranged between  $2.54 \times 10^7$  cells/mL and  $2.22 \times 10^8$  cells/mL. Viability of hepatocytes was  $>90\%$  by Trypan's blue exclusion test, and  $1 \times 10^7$  hepatocytes were transplanted.

Survival analyses showed that 39 animals survived until the end of experiment (day 3). All animals that received hepatocytes (groups PV and SPL) survived until day 3, however five rats that received PBS through the portal vein died, three on day 1 and two on day 2.

### ***Histology***

The presence of transplanted cells was determined by DAPI-staining prior to injection. The number of DAPI-positive hepatocytes in the liver of animals injected through the portal vein ranged from 12 to 130, with a mean of  $61.2 \pm 44.6$  stained cells per animal. In animals injected

through the spleen, the number of DAPI-positive hepatocytes in the liver ranged from 0 to 81, with a mean of  $50.0 \pm 31.8$  stained cells per animal. In these animals, the number of DAPI-positive hepatocytes in the spleen ranged from 75 to 414, with a mean of  $166.2 \pm 127.3$  stained cells per animal. The presence of hepatocytes in spleen was also visualized on H-E slides (figures 1 and 2).

### ***Molecular analysis***

The engraftment of hepatocytes at day 3 in liver and spleen by PCR analysis for Y-chromosome gene (*Sry*) in female recipient organs was investigated. *Sry* was positive in livers or spleens from animals injected through the portal vein or into the spleen.

In order to determine if spleen transplanted hepatocytes remained functional albumin expression was analyzed in the spleen of 8 animals from group SPL-H. Albumin expression by RT-PCR was not detected in any animal, although all of them were positive for *Gapdh* and liver samples used for positive control were also positive.

## DISCUSSION

Hepatocyte transplantation presents many advantages over OLT. For instance, cells from a single liver donor can be used by many recipients<sup>(8)</sup>. In our experience, a male donor rat could provide fresh hepatocytes for at least 10 female recipients. Freshly isolated hepatocytes have been shown to perform better than cryopreserved cells in many studies<sup>(4,10)</sup>, and hepatocytes are known to be very sensitive to freezing damage, decreasing their attachment efficiency and engraftment<sup>(28)</sup>. Therefore, this study aimed to test fresh hepatocyte transplantation in a rat model of APAP-induced hepatotoxicity.

In APAP-induced hepatotoxicity in humans, alanine aminotransferase (ALT) levels start to increase from day 1, peak at day 3 and start to decrease at day 4<sup>(23)</sup>. In our study, animals had the ALT levels peak at day 1, started to decrease at day 2 and had returned to basal values at day 3. Lee et al.<sup>(12)</sup>, analyzing 1,147 cases of APAP-induced ALF in humans demonstrated that ALT levels are very high (2,138 to 6,731). However, in APAP-induced hepatotoxicity in rats ALT levels are lower in comparison with humans, around of  $256.5 \pm 11.2$ <sup>(24)</sup>. That finding is similar to our results, 188.5 (116.7-330.7) at day 1, using a single dose of APAP 1g/kg i.p.. Even though, high mortality rates were not observed and no signs of extensive liver damage were seen by ALT or histology on day 3.

Hepatocytes can be transplanted directly into the liver or through the portal vein and in the spleen pulp. Although the optimal site for hepatocyte infusion and settlement has not yet been determined, the liver seems to be the natural home of transplanted hepatocytes<sup>(13)</sup>. The spleen is currently the most widely used recipient site for hepatocyte infusion because of its accessibility. Although separated from the portal blood flow, donor hepatocytes transplanted into the spleen have been shown to migrate to other organs, particularly to the host liver<sup>(27)</sup>. Whether the number of engrafted cells in the spleen and their metabolic capacity will be sufficient remains an open question<sup>(18)</sup>.

In this study, the engraftment of hepatocytes in liver and spleen was investigated by PCR analysis for Y-chromosome gene (*Sry*) in female recipient organs and staining the transplanted cells with DAPI. In all hepatocyte transplantation groups, *Sry* was positive in liver tissue. This shows that hepatocytes transplanted into the spleen have migrated to the host liver, a finding that is also supported by DAPI-positive hepatocytes in the liver from six animals transplanted into the spleen.

No differences were found in the number of DAPI-positive hepatocytes in the liver of animals injected into the portal vein or into the spleen. This lack of difference in the number of DAPI-positive cells is not easily explained. One would assume that the liver of rats injected through the portal vein would present a greater number of hepatocytes, however some studies suggest that a space for cell engraftment is necessary in the recipient <sup>(27)</sup>. In this study partial hepatectomy or hepatic irradiation were not performed, and maybe the number of dead cells at the time of injection was not sufficient to create a permissive environment for hepatocyte engraftment. Nevertheless, these animals had some degree of lesion, as hepatocytes did remain in the spleen, and it has been suggested that this is required for the establishment of transplanted hepatocytes in rat spleens <sup>(21)</sup>.

A second point to be considered for spleen hepatocyte injection is whether they remain functioning in the spleen. Shibata et al. <sup>(27)</sup> showed signals of Y-chromosome detectable in the spleen and spleen-resident hepatocytes expressing albumin 12 weeks after intrasplenic transplantation of freshly isolated hepatocytes in rats. In the data presented here, even though *Sry* was positive in spleen, albumin expression was not detected in a subgroup of 8 animals injected into the spleen. One possible explanation for this finding is that, as fresh hepatocytes have a scattered pattern of distribution within the spleen <sup>(27)</sup>, when spleen samples were collected for RT-PCR for albumin expression, hepatocytes could have been lost. On the other hand, the hypothesis that hepatocytes in the spleen underwent a dedifferentiation process



caused by the loss of intercellular contacts with neighbouring host cells, decreasing specific hepatocyte genes transcription<sup>(17)</sup>, cannot be ruled out.

In conclusion, data presented here shows the feasibility and efficacy of hepatocyte transplantation in the liver or spleen in a mild APAP-induced hepatotoxicity model.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Sandra Maria Gonçalves Vieira and Jorge Luiz dos Santos for reviewing the manuscript. We also thank Marta Cioato and the team of the Experimental Animal Unit at HCPA for their assistance. This work was supported by FIPE-HCPA.

**Study Group on Experimental Hepatology:** Rafael Lucky Maurer<sup>a</sup>, Carolina Uribe Cruz<sup>c,d</sup>, Alvaro Macedo Laureano<sup>a</sup>, Nelson Alexandre Kretzmann<sup>d,e</sup>, Gabriella Rejane dos Santos<sup>d</sup>

## REFERENCES

1. Baldo G, Giugliani R, Uribe C, Belardinelli MC, Duarte ME, Meurer L, da Silveira TR, Matte U Bone marrow mononuclear cell transplantation improves survival and induces hepatocyte proliferation in rats after CCl(4) acute liver damage. *Dig Dis Sci*. 2010 Dec;55(12):3384-92.
2. Belardinelli MC, Pereira F, Baldo G, Vicente Tavares AM, Kieling CO, da Silveira TR, Meurer L, Soares Duarte ME, Giugliani R, Matte U. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology*. 2008 2;247(1):1-5.
3. Chedrawy EG, Wang JS, Nguyen DM, Shum-Tim D, Chiu RC. Incorporation and integration of implanted myogenic and stem cells into native myocardial fibers: Anatomic basis for functional improvements. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:584-590.
4. David P, Alexandre E, Audet M, Chenard-Neu MP, Wolf P, Jaeck D, Azimzadeh A, Richert L. Engraftment and albumin production of intrasplenically transplanted rat hepatocytes (Sprague-Dawley), freshly isolated versus cryopreserved, into Nagase analbuminemic rats (NAR). *Cell Transplant* 2001; 10: 67-80.
5. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders . *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:431-435.
6. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, Arya R, Wade JJ, Vema A, Heaton ND, Rela M, Mieli-Vergani G. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* 2004; 78: 1812-1814.

7. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422-1426.
8. Grompe M, Laconi E, Shafritz DA. Principles of therapeutic liver repopulation. *Semin Liver Dis* 1999;19:7-14.
9. Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, Fox IJ. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003; 111: 1262-1267.
10. Jamal HZ, Weglarz TC, Sandgren EP. Cryopreserved mouse hepatocyte retain regenerative capacity in vivo. *Gastroenterology* 2000; 118: 390-394.
11. Kaplowitz N. Acetaminophen Hepatotoxicity: What do we know, what don't we know, and what do we do next? *Hepatology* 2004; 40: 23-26.
12. Lee WM, Squires Jr. RH, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute Liver Failure: Summary of a Workshop. *Hepatology* 2008; 47: 1401-1415.
13. Michalopoulos GK. Liver regeneration: Molecular mechanisms of growth control. *FASEB J* 1990; 4: 176-187.
14. Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, Heaton ND, Karani JB, Mieli-Vergani G, Rela M. One liver, three recipients-segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1614-1616.
15. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G, Burlina AB. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002; 359: 317-318.

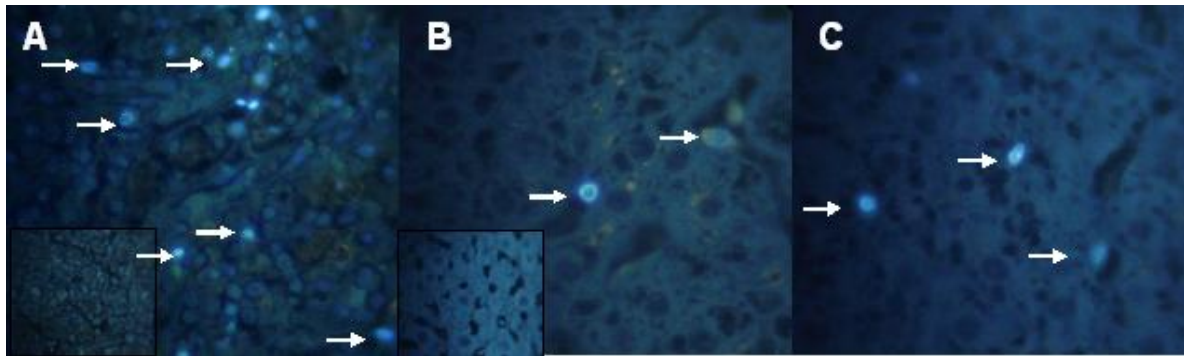
16. Najimi M SF, Sokal EM. Cell transplantation in the treatment of liver diseases. *Pediatr Transplantation* 2008; 12: 6-13.
17. Nicoluzzi JEL, Repka JCD, Rocha LCA, Campos ACL, Caron PE, Parc R. Assessment of bioartificial liver using human hepatocytes immunoprotected by macroencapsulation. *Rev Col Bras Cir* 2004; 31: 311-317.
18. Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gabelein G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Manns M, Strom SC, Hengstler JG. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver disease. *J Hepatol* 2006; 45: 144-159.
19. O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J* 2005; 81:148-154.
20. Polson J, Lee WM. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology* 2005; 41: 1179-1197.
21. Ponder KP, Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, Demayo J, Ledley FD, Chowdhury JR and Woo SLC. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intransplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1217-1221.
22. Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 509-516.
23. Rumack BH. Acetaminophen Misconceptions. *Hepatology* 2004; 40: 10-15.
24. Salam OMEA, Baiuomy AR, El-Shenawy SM, Hassan NS. Effect of pentoxifylline on hepatic injury caused in the rat by the administration of carbon tetrachloride or acetaminophen. *Pharmacol Res* 2005; 57: 596-603.

25. Sass DA, Shakil AO. Fulminant hepatic failure. *Liver Transplant* 2005; 11: 594-605.
26. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13: 29-83.
27. Shibata C, Mizuguchi T, Kikkawa Y, Nobuoka T, Oshima H, Kawasaki H, Kawamoto M, Katsuramaki T, Mitaka T and Hirata K. Liver Repopulation and long-term function of rat small hepatocyte transplantation as an alternative cell source for hepatocyte transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 78-87.
28. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology* 2006; 53: 149-159.

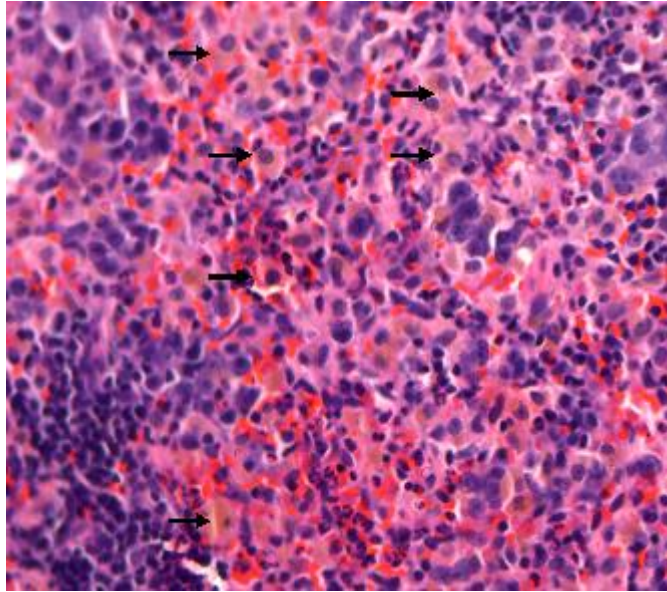
Table 1. Mean and range of ALT levels in rats submitted to APAP-induced hepatotoxicity.

Group (n)	Time (days)		
	0	1*	3
PV-H	42.0 (37.0-54.0)	267.0 (140-543.8)	43.5 (34.0-62.0)
PVPBS	36.0 (32.0-43.0)	130.0 (103.0-215.0)	39.0 (27.0-51.0)
SPL-H	57.5 (49.8-61.0)	197.5 (102.8-403.8)	38.5 (34.0-61.8)
SPL-PBS	43.5 (35.3-47.0)	158.0 (84.03-02.0)	31.0 (28.0-34.0)

\*Values at day 1 are statistically different from days 0 and 3 for all groups (Friedman's test,  $P < 0.0001$ ) but not among groups at any time point.



**Figure 1** – DAPI-positive cells (arrows) in spleen (A) and liver (B) of animals injected into the spleen or into the portal vein (C). Insets: DAPI negative images.



**Figure 2-** H-E staining of the spleen, showing scattered hepatocytes (arrows), magnification 40X.