

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular

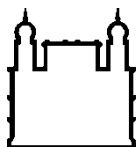
Laboratório de Comunicação Celular

Transplante Hepatocitário: Uma Alternativa Terapêutica para a Insuficiência Hepática Aguda.

Liana Monteiro da Fonseca Cardoso

Rio de Janeiro,

Outubro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Laboratório de Comunicação Celular**

Liana Monteiro da Fonseca Cardoso

Transplante Hepatocitário: Uma Alternativa Terapêutica para a Insuficiência Hepática Aguda.

**Tese apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Biologia
Celular e Molecular**

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves

RIO DE JANEIRO,

Outubro de 2019

Cardoso, Liana Monteiro da Fonseca .

Transplante Hepatocitário: Uma Alternativa Terapêutica para a Insuficiência Hepática Aguda. / Liana Monteiro da Fonseca Cardoso. - Rio de Janeiro, 2019.

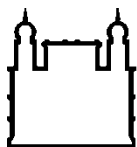
116 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientador: Luiz Anastacio Alves.

Bibliografia: f. 93-112

1. Fígado. 2. Transplante de Fígado. 3. Terapia Celular. 4. Hepatócitos. 5. Criopreservação. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Laboratório de Comunicação Celular**

Transplante Hepatocitário: Uma Alternativa Terapêutica para a Insuficiência Hepática Aguda

ORIENTADOR:

Dr. Luiz Anastacio Alves

REVISOR (A):

Dr. Vinicius Cotta de Almeida – Fundação Oswaldo Cruz – IOC

EXAMINADORES:

Dr. Vinicius Cotta de Almeida – Fundação Oswaldo Cruz – IOC

Dr. Paulo de Assis Melo – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dr. Robson Coutinho Silva – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dra. Helene Santos Barbosa – Fundação Oswaldo Cruz - IOC

Dr. Milena Barcza Stockler Pinto – Universidade Federal Fluminense (UFF)

Aprovada em: _____ / _____ / _____

Trabalho realizado no Laboratório de Comunicação Celular do Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, sob orientação do Dr. Luiz Anastacio Alves.

COLABORADORES:

Dr^a. Andrea Henriques Pons – Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

Dr. Marcelo Alves Pinto – Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

Dr. Lúcio Filgueiras Pacheco Moreira – Rede Estadual de Transplantes de Fígado do Rio de Janeiro

Dr. Kalil Madi – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Patologia.

AGÊNCIAS FINANCIADORAS:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

IOC – Instituto Oswaldo Cruz.

Dedico este trabalho à minha família (mãe, irmã e filha) que são a minha base e inspiração de todos os dias, se em algum momento eu não desisti foi porque sempre estiveram ao meu lado. Dedico ainda, ao meu orientador Luiz Anastacio por acreditar que eu poderia chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aqui termino mais essa etapa da minha vida, foi um longo caminho, foram quatro anos dedicados a finalizar um sonho que com certeza não seria realizado sem o apoio, o carinho, a dedicação e o trabalho em conjunto de algumas pessoas. Assim, gostaria de deixar registrado o meu agradecimento a vocês que fizeram parte dessa caminhada e que de forma direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído.

Agradeço em primeiro lugar a Deus e a todos os seus mensageiros, que sempre foram o meu amparo e a minha luz. E mesmo quando tudo parecia tão difícil, quando as forças pareciam se esgotar, algo mais forte e invisível aos olhos humanos surgia... no vento, na luz do sol, no sorriso de quem acreditava em mim... e assim foi possível acreditar que mesmo depois de um dia inteiro de trabalho e aquele experimento que insistia em dar errado ainda sim, existia um novo dia para tentar, recomeçar. Obrigada “Pai”, pelas pessoas incríveis que estiveram ao meu lado e que puderam tornar esse momento possível.

Agradeço à minha filha, Ana Beatriz, você é tudo que eu preciso ter para sempre seguir em frente. Tu és a luz da minha vida, o meu caminho e direção. Sei das vezes que fiquei ausente, que deixei de brincar ou de te levar ao cinema, mas tenhas a certeza que tudo isso foi justamente para ser um exemplo, para ser profissionalmente capaz de me tornar uma pessoa melhor em busca dos nossos sonhos, dos seus sonhos. Sou eternamente grata a Deus por ser sua mãe, você não tem a noção do amor incondicional que sinto por você.

Agradeço à minha família, meu pai, o meu exemplo de vida, de força, que mesmo na ausência material se faz eterno nos meus dias, quem me deixou os melhores exemplos para que eu me tornasse um ser humano melhor; minha mãe, pela sua força e garra de manter a nossa família unida, inabalável diante de tantas dificuldades já ultrapassadas e fazer com que todos os dias sejam uma vitória, por cuidar do nosso lar, por nos amar e principalmente pela sua paciência comigo; minha irmã, a pessoa mais inteligente que conheço, obrigada acima de tudo por ser minha companheira por ser tão especial na

minha vida, por acreditar no meu sucesso, por cuidar tão bem da Bia por ser a dinda mais perfeita que ela poderia ter, você é incrível. Tenham a certeza que vocês foram fundamentais em todo o processo pois, fizeram inúmeros esforços para que eu chegasse até aqui.

Agradeço à minha madrinha, Marina, eu realmente não tenho palavras para lhe agradecer tudo o que fazes, és como uma mãe, àquela que se preocupa desde a hora que saio de casa até a hora de voltar... suas preocupações diárias em tornar a minha vida melhor, lutar pelo meu sucesso e conquistas, você é a pessoa mais humana que eu conheço, um anjo em forma de gente que está em minha vida para me iluminar.

Agradeço ao meu orientador, Luiz, quem dedicou extensos 8 anos para me orientar. Até mesmo antes do Mestrado, preocupado com minha formação profissional, serei eternamente grata pela sua confiança e por acreditar na minha capacidade de desenvolver esse projeto grandioso o qual tenho orgulho de trabalhar. Sou capaz de olhar para trás e reconhecer o quanto evoluí, o nível de conhecimento que adquiri, a capacidade de desenvolver um pensamento crítico, de escrever um artigo científico, de orientar um aluno... Eu realmente não sou a Liana que chegou aqui no LCC. Muito obrigada por ser esse excelente orientador e fazer todo esforço possível para que este trabalho pudesse ser concluído.

Agradeço ao meu grande amigo e companheiro de laboratório, Anael, quem me recebeu há alguns anos atrás no LCC e aceitou a difícil missão de me orientar e compartilhar comigo até hoje parte do seu conhecimento. Obrigada por ter contribuído para a minha vida científica e por se tornar esse amigo tão especial de todos os dias, por tornar as horas de trabalho no laboratório mais leves e divertidas, por sempre me ajudar e me orientar no LCC e na vida. Você é um ser incrível!!!

Agradeço a uma pessoa que foi muito além do laboratório, Tatiane, a aluna de iniciação científica que se tornou uma amiga que levarei para a vida. “Tati” você foi fundamental para o término deste trabalho. Obrigada por me ajudar nos experimentos com os animais, mesmo sem gostar de manipulá-los, por você sempre estar disposta a me ajudar e se esforçar para que tudo desse certo.

Este trabalho tem a sua participação direta. E acima de tudo por me ouvir e me apoiar nos momentos de desespero, de estresse e difíceis. Obrigada Parceeeira!!!

Agradeço aos amigos de laboratório pela ajuda e pelas conversas nas horas vagas. Agradeço a Cristina pela imensa ajuda nas dúvidas com os textos, com as correções de resumos, com as palavras de incentivo e força e pela amizade carinhosa de sempre. Ao Prof. Rodrigo, por sempre contribuir com suas opiniões e sempre estar disposto a ajudar com os protocolos. Agradeço ao Prof. Pedro, com quem pude trabalhar durante algum tempo, obrigada pela oportunidade e por compartilhar sempre conosco seu conhecimento. Agradeço à Natiele, por ser minha companheira de jornada desde a seleção do Mestrado, com quem sempre compartilhei as angustias e sucessos. Agradeço a Alejandra, por estar sempre disposta a ajudar, pela doçura dos dias, por sempre ter uma palavra de conforto, pelo apoio e por chorar junto, por se importar de verdade com o meu trabalho e com a minha vida pessoal e pelos chás da tarde. Agradeço ao Dinarte por estar sempre pronto a ajudar e contribuir com idéias. Agradeço à Miriam por compartilhar parte desse projeto comigo e dar continuidade a linha de terapia celular com doenças hepáticas. Agradeço a alguém ímpar que chegou nesse laboratório tirando um pouco do nosso sossego, mas que trouxe mais risos e descontração às nossas tardes e tornou nosso ambiente muito mais divertido, um ser único que se tornou um grande amigo, um Piauiense que vai deixar saudades, obrigada Edson. Agradeço à Bruna, minha mais recente aluna de iniciação científica que chegou a pouco tempo mas foi capaz de desenvolver em alguns meses a capacidade incrível de me ajudar, de me acompanhar e aprender muito rápido a experimentação animal, você vai longe!!! Agradeço à Ivone pelo apoio em vários momentos durante essa jornada, sempre facilitando as burocracias existentes na Fiocruz.

Agradeço à Dra. Andrea Henriques Pons, por acompanhar a minha trajetória desde o início do mestrado, por contribuir com seu conhecimento e ajuda sempre que recorri e por ser colaboradora do nosso projeto. Agradeço ao Dr. Marcelo Alves Pinto, por apoiar o nosso trabalho desde a implementação da

nossa idéia, por acreditar no meu potencial em desenvolver este projeto e pela colaboração ao longo desses anos.

Agradeço ao Dr. Vinicius Cotta por aceitar o convite para revisar esta Tese com tão pouco tempo.

Agradeço aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuir para a avaliação do nosso trabalho.

A todos vocês, muito obrigada!!!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

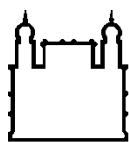
Transplante Hepatocitário: Uma Alternativa Terapêutica para a Insuficiência Hepática Aguda

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Liana Monteiro da Fonseca Cardoso

Dentre as doenças hepáticas que acometem o fígado, a insuficiência hepática aguda (IHA) destaca-se pela rápida perda da função hepática, com um alto índice de mortalidade que, em alguns estudos clínicos, pode chegar a 80%. A causa mais comum de IHA no Brasil é a hepatite viral, seguida pela hepatite medicamentosa e intoxicação exógena. Embora existam terapias visando o tratamento de IHA, o transplante hepático ainda é a única opção terapêutica definitiva para pacientes com doença hepática terminal. No entanto, a escassez de órgãos para o transplante impõe limitação ao número de pacientes beneficiados. Consequentemente, um grande número de pacientes permanece nas filas de espera, contribuindo para elevar o índice de mortalidade. Alguns procedimentos para estender o número de pacientes beneficiados com transplantes têm sido realizados, dentre eles podemos citar o transplante inter-vivo e o transplante hepático dominó. Vale ressaltar que, tais alternativas ainda são insatisfatórias quando relacionadas com o número de pacientes que precisam do transplante. Assim, a proposta do transplante hepatocitário pode melhorar a qualidade de vida até o transplante ou mesmo levar à recuperação espontânea do paciente. Contudo, o maior desafio para a ampla aplicação clínica desse método é a disponibilidade de quantidade, com qualidade suficiente das células do fígado para o transplante. Uma possível solução seria a utilização de fígados rejeitados para o transplante, associado à otimização dos processos de isolamento, e de criopreservação de hepatócitos provenientes desses órgãos. Nesse contexto, o presente trabalho propõe uma caracterização geral, em modelo experimental, de protocolo para terapia celular baseada na coleta de populações de células hepáticas de órgãos rejeitados para o transplante ortotópico, associado à otimização da criopreservação para a criação de bancos de células com vistas ao futuro tratamento de IHA. Para isso, neste trabalho, desenvolvemos um modelo químico de IHA utilizando uma dose única de 400 mg/Kg de acetaminofeno i.p. E um modelo de macroesteatose, doadores de células submetidos a uma dieta deficiente em metionina e colina. Nossos resultados demonstraram que é possível realizar a separação entre os hepatócitos com altos níveis de esteatose das células com pouca ou nenhuma vesícula lipídica utilizando dois processos de centrifugação. Além disso, a terapia celular com a infusão de hepatócitos, apresentaram um leve aumento na sobrevivência, com diminuição das enzimas hepáticas AST e ALT além do aumento da produção de albumina quando comparado ao grupo dos animais que não foram submetidos à terapia celular. Para a otimização da criopreservação, utilizamos algoritmos de *machine learning* como ferramenta de previsão às melhores condições de congelamento para hepatócitos murinos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HEPATOCYTE TRANSPLANTATION: A THERAPEUTIC ALTERNATIVE FOR ACUTE LIVER FAILURE

ABSTRACT

DOCTORAL THESIS

Liana Monteiro da Fonseca Cardoso

Among the liver diseases that affect the liver, acute liver failure (ALF) stands out for the rapid loss of liver function, with a high mortality rate that can reach 80% in some clinical studies. The most common cause of ALF in Brazil is viral hepatitis, followed by drug hepatitis and exogenous intoxication. Although there are therapies aimed at treating HAI, liver transplantation is still the only definitive therapeutic option for patients with terminal liver disease. However, the shortage of organs for transplantation imposes limitations on the number of patients benefited. Consequently, a large number of patients remain in the queues, contributing to increase the mortality rate. Some procedures to extend the number of transplant recipients have been performed, including inter-vivo transplantation and domino liver transplantation. It is noteworthy that such alternatives are still unsatisfactory when related to the number of patients who need the transplant. Thus, the proposed hepatocyte transplant can improve the quality of life until transplantation or even lead to spontaneous recovery of the patient. However, the biggest challenge for the wide clinical application of this method is the availability of sufficient quality of liver cells for transplantation. A possible solution would be the use of rejected livers for transplantation, associated with the optimization of isolation processes, and cryopreservation of hepatocytes from these organs. In this context, the present work proposes a general characterization, in an experimental model, of a protocol for cell therapy based on the collection of liver cell populations from rejected organs for orthotopic transplantation, associated with the optimization of cryopreservation for the creation of cell banks aiming at future treatment for ALF. Therefore, in this work, we developed a chemical model of ALF using a single dose of 400 mg/kg of acetaminophen i.p. It is a macrosteatosis model, donors of cells undergoing a methionine and choline deficient diet. Our results demonstrated that it is possible to separate hepatocytes with high levels of steatosis from cells with little or no lipid vesicle using two centrifugation processes. In addition, cell therapy with hepatocyte infusion showed a slight increase in survival, with decreased liver enzymes AST and ALT in addition to increased albumin production when compared to the group of animals that did not undergo cell therapy. For the optimization of cryopreservation, we used machine learning algorithms as a tool to predict the best freezing conditions for murine hepatocytes.

LISTA DE ABREVIATURAS

LPS - Lipopolissacarídeo
CK – Células de Kupffer
NK - Células Natural Killer
NKT - Células T Natural Killer
LSECs - Células Endoteliais Sinusoidais Hepáticas
HSCs - Células Estreladas Hepáticas
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
HEP - Hepatócitos
IHA – Insuficiência Hepática Aguda
DCs - Células Dendríticas
IL-10 – interleucina 10
PD-L1 - ligante-1 de morte celular programado
EH - Encefalopatia Hepática
ALT – Alanina aminotransferase
AST – Aspartato Aminotransferase
TGO – Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP - Transaminase glutâmico-pirúvica
INR – Razão Normalizada Internacional
APAP – Acetaminofeno
HEV – Vírus da Hepatite E
HBV - Vírus da Hepatite B
TF - Transplante de Fígado
TH – Transplante de hepatócitos
EUA - Estados Unidos da América
ABTO - Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos

LISTA DE ABREVIATURAS

- THD - Transplante Hepático Dividido
- TFD - Transplante de Fígado Dominó
- TFDV – Transplante de Fígado de Doador Vivo
- DLT - *Domino Liver Transplantation*
- TFA - Transplante de Fígado Auxiliar
- APHLT – *Auxiliary Partial Heterotopic Liver Transplantation*
- APOLT - *Auxiliary Partial Orthotopic Liver Transplantation*
- TFS - Transplante de Fígado Split
- KCH - *King's College Hospital*
- MELD - *Model for End-Stage Liver Disease*
- ACP - agente crioprotetor
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- PACs - proteínas anticongelantes
- GPAC - glicoproteínas anticongelantes
- DMC – dieta deficiente em metionina e colina
- DMEM - Meio Eagle's Dulbecco's Modificado
- DHGNA - doença hepática gordurosa não alcoólica
- EHNA – esteato hepatite não alcoólica
- HBSS - *Hank's buffered salt solution*
- HTK - Solução Histidine-tryptophan-ketoglutarate
- UW - Solução da Universidade de Wisconsin
- IA – Inteligência Artificial
- ML – *Machine learning*
- SNS – Serviço Nacional de Saúde

SUMÁRIO	PÁGINAS
Resumo	x
Abstract	xi
Lista de abreviaturas	xii
Lista de figuras	xvi
Lista de tabelas e quadros	xvii
Capítulo I – Introdução	01
1.1. O Fígado Humano	02
1.1.1. Imunidade e tolerância imunológica no fígado	09
1.2. Anatomia e composição do fígado de camundongos	11
1.3. Insuficiência Hepática Aguda (IHA)	14
1.4. Transplante hepático	20
1.4.1. Estratégias cirúrgicas ao transplante de fígado	22
1.4.2. Estratégias terapêuticas experimentais de suporte ao transplante hepático	26
1.5. Terapia Celular - Transplante de hepatócitos	29
1.6. Criopreservação	36
1.6.1. Animais tolerantes ao congelamento	42
1.6.2. Obtenção e Criopreservação de Hepatócitos	45
1.7. Inteligência artificial: <i>machine learning</i> , <i>deep learning</i> e suas aplicações na área da saúde	51
Capítulo II – Objetivos	60
2.1. Objetivo geral	61
2.2. Objetivos específicos	61
Capítulo III – Resultados	62
3. Descrição dos resultados	63
3.1. Artigo 1	64
3.2. Artigo 2	65
3.3. Artigo 3	66
3.4. Artigo 4	67
Capítulo IV – Discussão	68
4.1. Discussão	69
Capítulo V – Conclusões	88
5.1 Conclusões	89

Capítulo VI – Referências	92
Capítulo VII – Apêndices	113

LISTA DE FIGURAS

	PAGINAS
Figura 1.1. Localização anatômica e aparência externa do fígado	03
Figura 1.2. Estrutura do fígado.....	04
Figura 1.3. Ilustração microanatômica da localização das células do fígado no lóbulo hepático em condição saudável	05
Figura 1.4. Composição celular do fígado	06
Figura 1.5. Tipos celulares presentes no fígado.....	08
Figura 1.6. Diversos tipos de insultos às células hepáticas	09
Figura 1.7. Posição anatômica e anatomia do fígado de camundongos	12
Figura 1.8. Cortes histológicos da organização celular do fígado de camundongos.....	13
Figura 1.9. Características clínicas da IHA em diversos órgãos adaptado de Bernal <i>et al</i> , 2014.	15
Figura 1.10. Sistemas de Classificação para Insuficiência Hepática Aguda.	16
Figura 1.11. Estatística do número de pacientes que necessitam realizar o transplante e o número de transplantes de fígado que são realmente realizados	21
Figura 1.12. Transplante de fígado dominó (TFD).....	26
Figura 1.13. Transplante de órgãos e terapias alternativas utilizando células hepáticas	29
Figura 1.14. Locais para infusão de hepatócitos.....	33
Figura 1.15. Transplante Dominó Hepatocitário (TDH)	36
Figura 1.16. Etapas de criopreservação celular	39
Figura 1.17. Esquema representativo das diferentes subáreas da Inteligência Artificial.....	54
Figura 1.18. Estrutura de um neurônio biológico e a transmissão da informação através das sinapses	56
Figura 1.19. Representação Simplificada do Neurônio Matemático ...	57
Figura 4.1. Representação de etapas críticas envolvidas na terapia com células do fígado e as barreiras de cada etapa.....	76

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	PAGINAS
Tabela 1.1. Relação da incidência de edema cerebral nos pacientes com IHA e do prognóstico (sem transplante hepático) desses pacientes de acordo com a classificação do King's College Hospital .	17
Tabela 1.2. Lista de doenças hepáticas humanas tratadas com transplante de hepatócitos	31
Tabela 1.3. Vantagens da terapia celular frente ao transplante de fígado.	31
Tabela 1.4. Alguns exemplos de ACP comumente usados e suas aplicações.	42
Tabela 1.5. Estratégia de tolerância ao congelamento desenvolvida por algumas espécies de animais.....	44
Tabela 1.6. Novas abordagens inspiradas na natureza e de bioengenharia para a criopreservação em comparação com os métodos clássicos.....	45
Tabela 4.1. Doses de acetaminofeno utilizadas na literatura para indução de hepatotoxicidade aguda	72
Tabela 4.2. Pré-requisitos de um modelo experimental de IHA de acordo com Terblanche e Hickman (1991).....	72
Quadro 1.1. Fórmula para calcular o índice MELD	19

CAPÍTULO I
1.INTRODUÇÃO

1.1. O FÍGADO HUMANO

O fígado é um órgão que executa um conjunto complexo de mais de 500 funções, desempenhando um papel fundamental na manutenção da homeostase corporal. Esse órgão é responsável pelo metabolismo, síntese, armazenamento e redistribuição de nutrientes, incluindo o metabolismo de carboidratos, lipídios, aminoácidos e vitaminas (1, 2). Além disso, o fígado realiza a síntese de proteínas do complemento e de fase aguda, produção de albumina, bilirrubina, enzimas microsomais e citoplasmáticas, lipoproteínas e ácidos biliares bem como a produção dos fatores de coagulação. É o principal órgão desintoxicante do corpo, removendo os xenobióticos pela conversão metabólica e excreção biliar (3). É um órgão glandular e está envolvido por uma cápsula, a cápsula de Glisson. Está localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal abaixo do diafragma e encontra-se protegido pela caixa torácica (figura 1.1 A) e mantém a sua posição anatômica através de ligamentos (4, 5). São eles: o ligamento falciforme que liga o fígado à parede abdominal anterior e os ligamentos coronário anterior e posterior, que o sustentam na face inferior do diafragma (figura 1.1 B). Embora não sejam verdadeiros ligamentos, esses anexos são avasculares e estão em continuidade com a cápsula de Glisson ou o equivalente ao peritônio visceral do fígado. Esse órgão apresenta dois lobos principais, o lobo lateral direito e o lobo lateral esquerdo, e dois lobos acessórios, o lobo quadrado e o lobo caudado (6, 7). É um órgão muito vascularizado e em repouso recebe até 30% de sangue total por minuto, mais do que qualquer outro órgão. Assim, o volume total de sangue no corpo humano circula pelo fígado aproximadamente 360 vezes por dia (5). O fígado apresenta um duplo aporte sanguíneo, dividido exclusivamente entre a artéria hepática e a veia porta. A maior parte, de 75% a 80%, do suporte sanguíneo deriva da veia porta, transportando sangue pouco oxigenado e rico em nutrientes. Este sangue origina-se do estômago, em todo percurso do trato gastrointestinal, do reto e do baço, e contém grandes concentrações de antígenos de componentes dietéticos e produtos de bactérias intestinais, tal como a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS). A artéria hepática recebe de 20% a 25% do suprimento de sangue, fornecendo sangue rico em oxigênio. O sangue que deixa o fígado é drenado para a veia cava inferior através das veias hepáticas (4, 5).

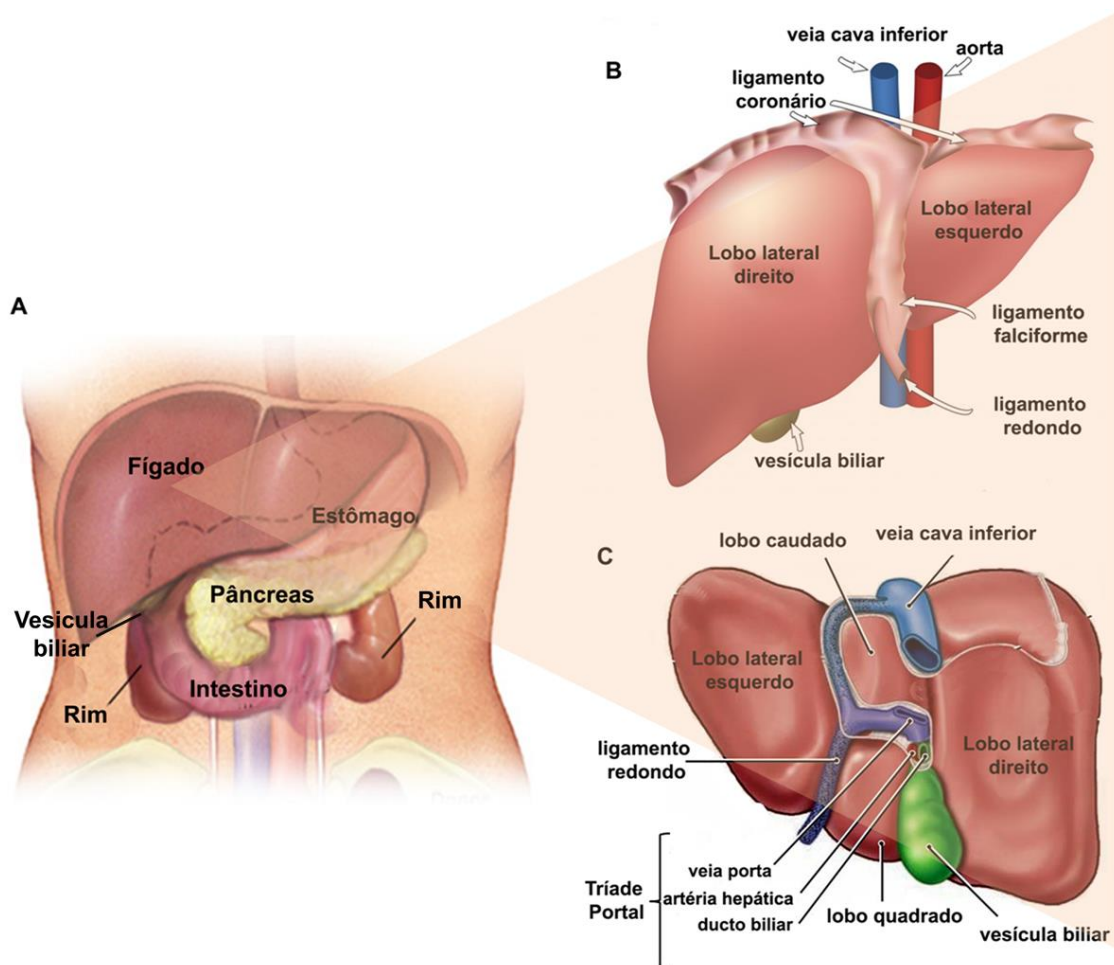


Figura 1.1 Localização anatômica e aparência externa do fígado humano. Em A, a figura ilustra a relação anatômica do fígado com outros órgãos como, a vesícula biliar, o estômago, o pâncreas e o intestino. Em B, visão anterior do fígado ilustrando o ligamento falciforme, na superfície do diafragma, que divide o fígado em lobo direito e esquerdo; o ligamento coronário que sustenta o órgão na face inferior do diafragma; o ligamento redondo, que é o resíduo ocluído da veia umbilical fetal. Na letra C, a visão posterior do fígado ilustrando os quatro lobos, são eles: lobo esquerdo e direito, lobo caudado e lobo quadrado. Além disso, a triáde portal, formada por ramos da veia porta hepática, artéria hepática, da e do ducto biliar. As figuras foram criadas e modificadas com imagens disponíveis na internet.

Histologicamente, o fígado está dividido em lóbulos. Os lóbulos hepáticos são as unidades estruturais e funcionais do fígado e apresentam uma arquitetura hexagonal multicelular, formada por cordões de hepatócitos orientados em direção à veia centrolobular (ou veia central), separados por capilares sanguíneos fenestrados denominados sinusóides, como ilustrado na figura 1.2 A e B (2, 8).

Lóbulos vizinhos estão rodeados por triádes portais, compostas por ramos do ducto biliar, da veia porta, e da artéria hepática. A partir do hilo, em uma área de espessamento da cápsula de Gilsson, há uma ramificação contínua da artéria hepática e da veia porta formando uma rede de capilares chamados sinusóides (8, 9). Os sinusóides podem ser considerados como uma rede de capilares

envolvidos por células endoteliais fenestradas e dessa forma, são projetados para permitir a transição facilitada de moléculas e mediadores celulares entre os sinusóides e os hepatócitos. Além disso, são povoados por macrófagos residentes, as células de Kupffer (CK). Existe ainda um pequeno espaço entre o revestimento de células endoteliais e a membrana apical dos hepatócitos denominada Espaço de Disse, como representado na figura 1.2 C e 1.3 (10).

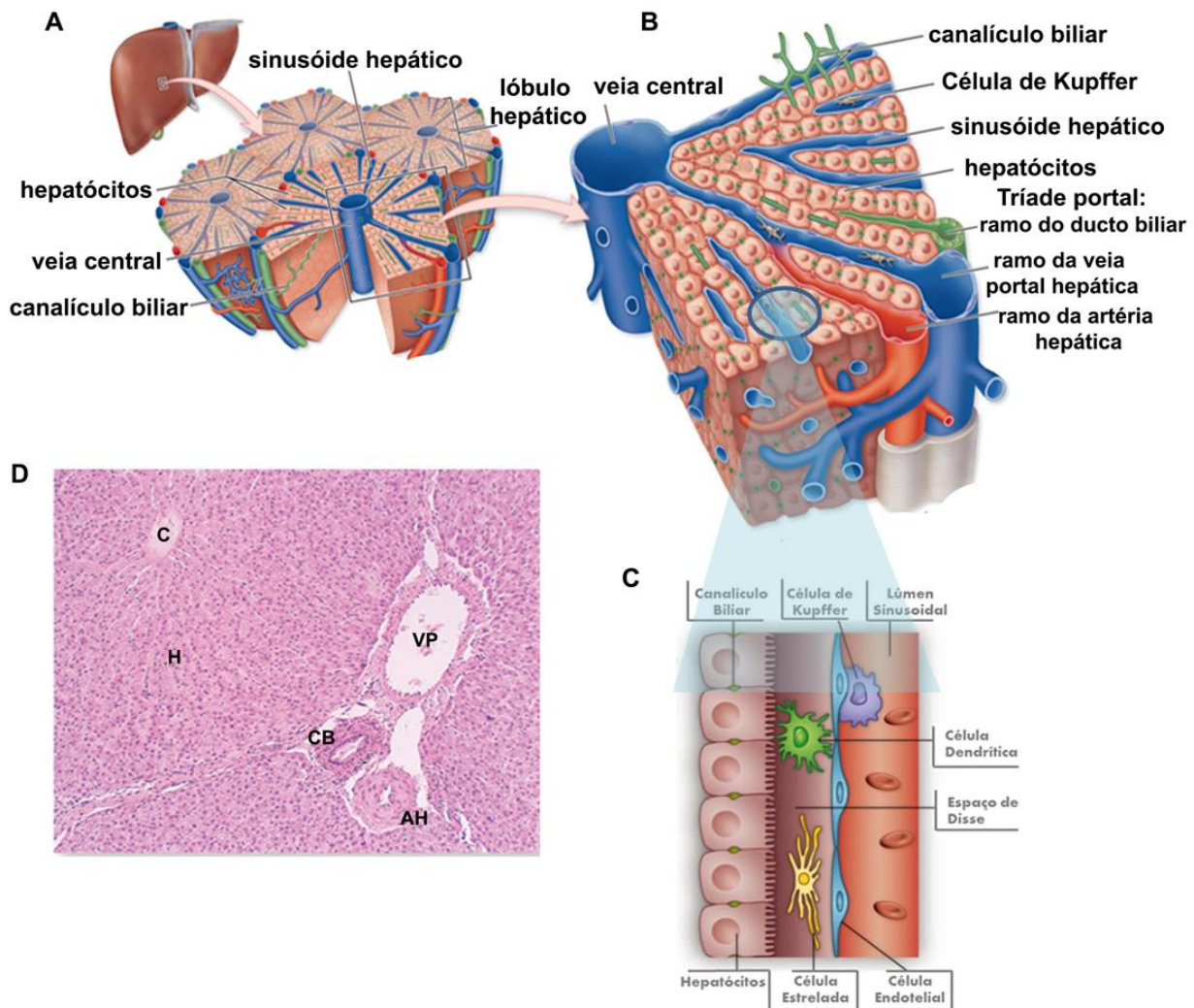


Figura 1.2. Estrutura do fígado. (A,B) O fígado exibe uma estrutura hexagonal que consiste em unidades repetidas de tecidos funcionais, os lóbulos hepáticos. Dentro de um lóbulo, o sangue oxigenado entra através dos ramos da artéria hepática e da veia porta e flui em vasos sinusoidais especializados em direção à veia central. A bile, que é produzida e excretada pelos hepatócitos, flui na direção contrária em direção ao ducto biliar intra-hepático. (B) Os hepatócitos são células polarizadas que interagem com outros tipos de células não parenquimatosas ao longo das extensões sinusoidais do lóbulo do hepático. Coletivamente, todos esses componentes celulares e a estrutura hepática contribuem para a diversidade de papéis funcionais do fígado. (C) em maior aumento, a região que compreende os hepatócitos e o lúmen sinusoidal, ilustrando os outros tipos celulares encontrados nos sinusóides e no espaço de disse. Ao lado, na letra D, um corte histológico corado em HE ilustrando a veia

central (**C**), rodeada pelos cordões de hepatócitos (**H**) e a tríade portal, representada pela veia porta hepática (**VP**), pelo canalículo biliar (**CB**) e pela artéria hepática (**AH**). Figura criada com imagens disponíveis na internet.

Em 1954, Rappaport e colaboradores descreveram as unidades funcionais do parênquima hepático como ácinos hepáticos (os lóbulos hepáticos), regiões ricas em hepatócitos. Os ácinos são divididos em três zonas ou regiões: **zona I** – zona periportal, mais próxima aos ramos portais; **zona II** - zona intermediária; **zona III** – zona próxima à veia central também conhecida como a zona perivenosa, pericentral ou centrilobular (9). Na unidade acinar, a microcirculação hepática é realizada por capilares sanguíneos terminais da veia porta e da artéria hepática, os quais são responsáveis por conduzir o suprimento sanguíneo aos cordões hepatocitários, sinusóides, células estreladas (ou células de ito), linfócitos e células Natural Killer (NK) até a veia centrilobular (9). Na unidade acinar, a microcirculação hepática é realizada por capilares sanguíneos terminais da veia porta e da artéria hepática, os quais são responsáveis por conduzir o suprimento sanguíneo aos cordões hepatocitários, sinusóides, células estreladas (ou células de ito), linfócitos e células Natural Killer (NK) até a veia centrilobular, como representados esquematicamente. A falência na circulação sanguínea intra-hepática está relacionada, de maneira geral, a uma extensa área de lesão tecidual causada por substâncias hepatotóxicas, infecções virais, isquemia e lesão por reperfusão (10, 11).

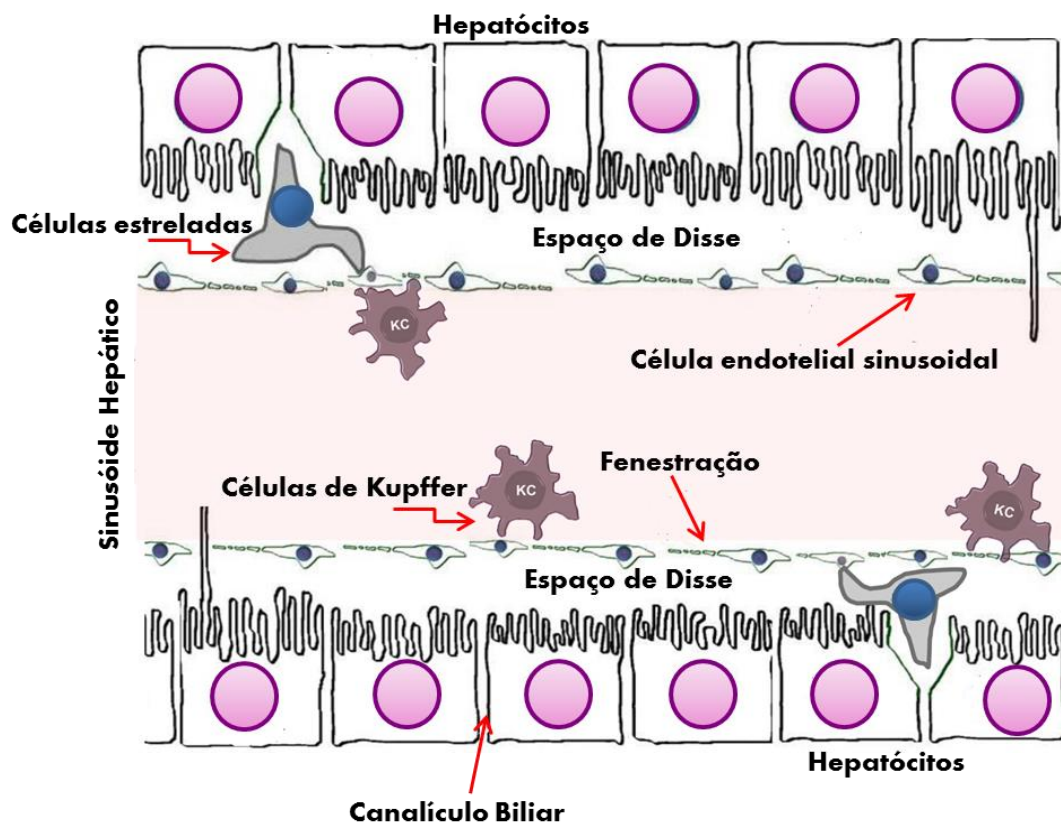


Figura 1.3. Ilustração microanatômica da localização das células do fígado no lóbulo hepático em condição saudável: cordões de hepatócitos; células endoteliais sinusoidais;

células de Kupffer e células estreladas. Além disso, o esquema mostra o espaço de Disse que separa os hepatócitos dos sinusóides do fígado. O endotélio dos sinusóides hepáticos é descontínuo (fenestrado) formado por uma camada de células endoteliais sinusoidais hepáticas. Essas células agem como células de limpeza e formam uma barreira física de filtração entre o sangue sinusoidal e o plasma (12). As células de Kupffer são macrófagos residentes, que estão ligados à camada de células endoteliais sinusoidais. Por fim, as células estreladas hepáticas estão localizadas no espaço subendotelial de do espaço de Disse e desempenham um papel vital na fibrogênese. Modificado de Bogdanos *et al.* 2014.

O fígado apresenta uma grande diversidade celular e o principal tipo de célula hepática responsável pela maioria dessas funções supracitadas é a célula parenquimatosa, ou hepatócito, que constitui aproximadamente 80% das células do fígado. Os outros 20% da população celular compreendem as células não parenquimatosas, que incluem as células endoteliais (LSECs), as células de Kupffer (CKs), os linfócitos residentes e as células estreladas (HSCs ou células de Ito) (figura 1.4) (11).

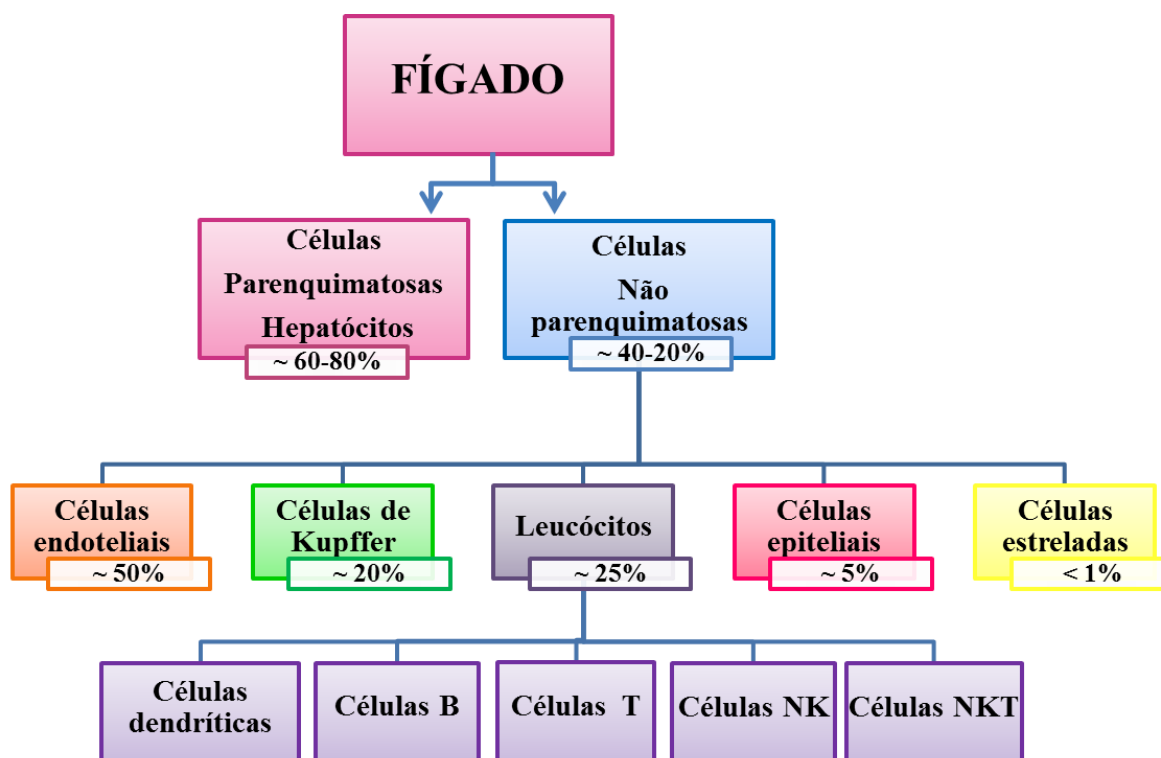


Figura 1.4. Composição celular do fígado. Os números indicam a frequência estimada de cada população em relação ao número total de células parenquimatosas e não parenquimatosas no fígado. O principal tipo de célula que compõe o fígado são as células parenquimatosas ou hepatócitos. Esse tipo celular representa cerca de 80% da população total de células hepáticas. Os outros 20% compreendem as células não parenquimatosas, que incluem células endoteliais, células kupffer, leucócitos e células estreladas (ou células de Ito). Modificado de Bogdanos *et al.* 2013.

As células endoteliais compõem a maioria das células não parenquimais e revestem os vasos circulatórios intra-hepáticos, ou sinusóides, que fornecem uma grande área de superfície para a absorção de nutrientes. LSECs expressam moléculas que podem promover a captação de antígenos, incluindo o receptor de manose e moléculas de apresentação de antígenos, incluindo o Complexo Principal de Histocompatibilidade (HLA) de classe I e II e as moléculas coestimuladoras CD40, CD80 e CD86 (4, 9). As Células de Kupffer, os macrófagos residentes do fígado, desempenham um papel crítico na resposta imune inata, sua localização no sinusóide hepático permite que elas fagocitem eficientemente os patógenos que entram na circulação portal ou arterial. Elas desempenham, dessa forma, um importante papel anti-inflamatório, impedindo que essas substâncias imunorreativas derivadas do intestino atravessem para os sinusóides hepáticos (7). Os linfócitos fazem parte do sistema imunológico que reside no fígado e assim, auxiliam a resistir á infecções. São encontrados espalhados por todo o parênquima, bem como nos tratos portais. Em média, um fígado humano contém uma população de aproximadamente 10^{10} células linfóides, que incluem as subpopulações de células linfóides do sistema imune inato (células NK e NKT) e adaptativo (células T e B). As células estreladas hepáticas têm várias funções, incluindo o armazenamento de vitamina A e produção da matriz extracelular. Em condições normais, controlam o fluxo sanguíneo através do sistema sinusoidal, enquanto em condições patológicas e após a exposição a vários estímulos inflamatórios parecem diferenciar-se em miofibroblastos. Eles então secretam inibidores das metaloproteinases da matriz tecidual, depositam colágeno e geram tecido fibroso levando à fibrose hepática (13, 14). Cabe ressaltar que todos esses tipos celulares, ilustradas na figura 1.5, são ativados por lesão hepática (15).

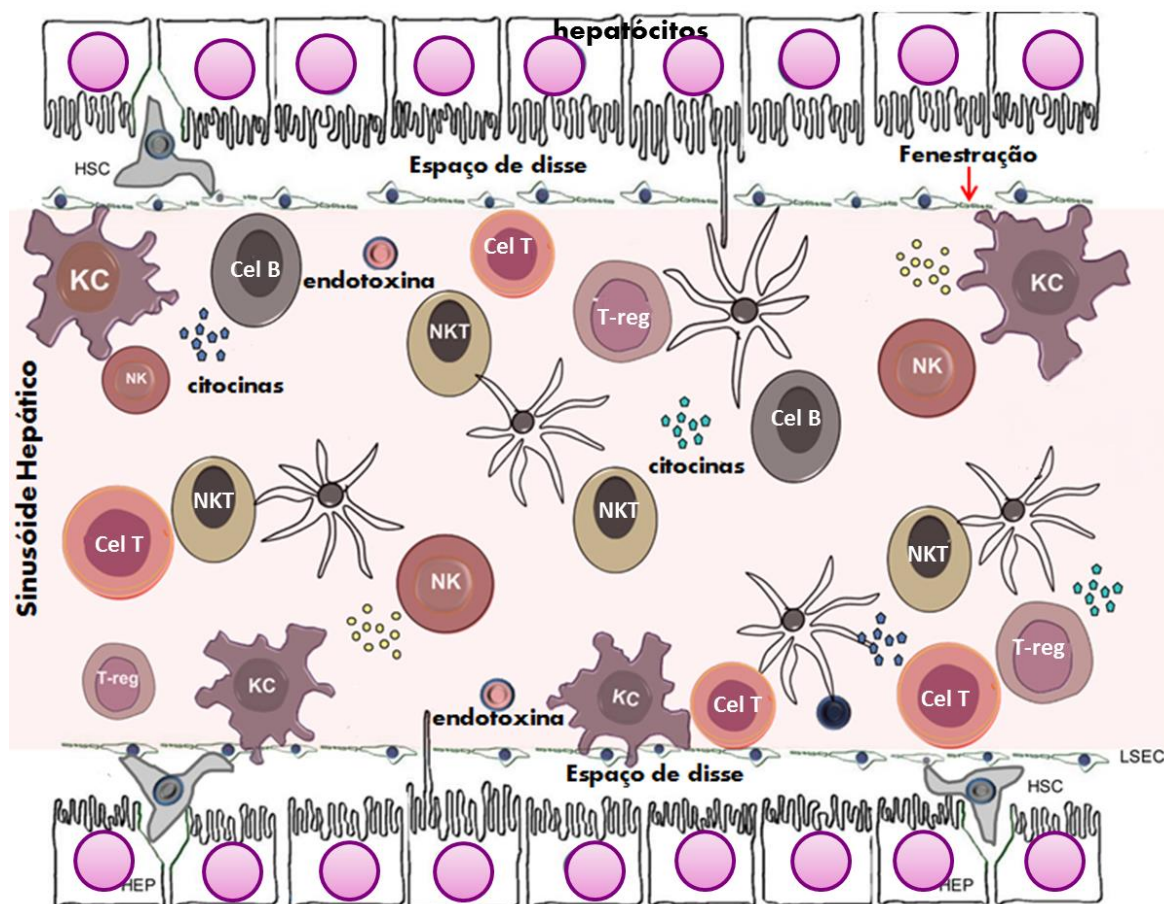


Figura 1.5. Células que compõe o fígado. Incluindo hepatócitos (HEP), células epiteliais sinusoidais hepáticas (LSEC), células de Kupffer (KC), células esteladas hepáticas (HSC) e sub-populações de células linfóides. NK, naturais Killer; NKT, células T naturais Killer; DC, célula dendrítica; Treg, célula T regulatórias.

Essa gama de funções altamente metabólicas desempenhadas pelo fígado bem como sua localização anatômica singular geram um conjunto diversificado de injúrias metabólicas, tóxicas, microbianas, inflamatórias e neoplásicas às células hepáticas e resultam em lesões e doenças no fígado (figura 1.6). Assim, levando à alterações morfológicas e funcionais descaracterizando o tecido hepático e promovendo perda funcional crônica ou aguda. Além disso, uma característica comum dessas lesões é a ativação da morte celular por diversos mecanismos (p.ex. apoptose ou necrose) das células hepáticas, em especial os hepatócitos (16). Recentemente, uma nova forma de necrose “programada” (necroptose) tem sido descrita. Porém, o papel da necroptose no fígado ainda não foi muito explorado. A morte celular por necrose no fígado está geralmente associada à lesão aguda como, por exemplo, lesões por isquemia e reperfusão. A morte maciça por necrose dos hepatócitos leva à perda da função hepática, gerando um quadro de Insuficiência Hepática Aguda (IHA) (2, 16).

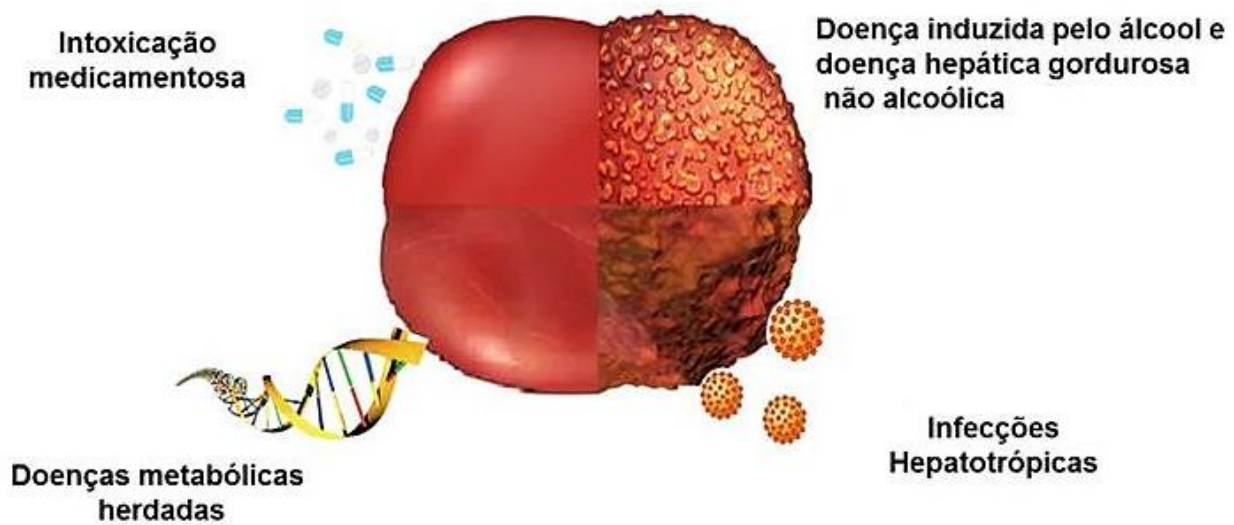


Figura 1.6. Diversos tipos de lesões às células hepáticas. Devido à sua gama de funções, principalmente metabólicas, e localização anatômica singular, o fígado é exposto a uma infinidade de toxinas e xenobióticos, incluindo medicamentos e álcool, bem como a infecção por vírus hepatotrópicos e, portanto, é altamente suscetível a lesões teciduais.

1.1.1. Imunidade e tolerância imunológica no fígado

Órgãos como o timo, linfonodos e baço são órgãos linfóides "clássicos". No entanto, outros órgãos, como o intestino e o fígado, consistem de células cuja função primária pode não ser imunológica, mas ainda assim podem realizar tarefas imunes essenciais (3).

O fígado humano recebe aproximadamente 1,5 litros de sangue a cada minuto do trato gastrointestinal pela veia porta e da circulação sistêmica pela artéria hepática. Esse suprimento de sangue carrega uma carga massiva antigênica proveniente da dieta, aos quais o sistema imune hepático precisa permanecer tolerante. Ao mesmo tempo, o sistema imune hepático precisa ser capaz de responder a uma variedade de vírus, bactérias e parasitas, além de células metastáticas que frequentemente chegam de outros locais do corpo para o fígado (3, 17). A necessidade de regulação da imunidade, ou tolerância, no fígado é fornecida por uma abundância de células imunossupressoras, citocinas e ligantes no fígado, garantindo que produtos patogênicos (como o lipopolissacarídeo bacteriano) e antígenos que são encontrados no fígado não sejam capazes de estimular respostas imunes. A perda da tolerância hepática

conduz a fenômenos autoagressivos que, se não forem controlados por populações linfóides reguladoras, podem levar à indução de doenças hepáticas autoimunes (18, 19). O fígado humano tem uma população de linfócitos normalmente residente no trato portal, mas também espalhados pelo parênquima (20-22).

Esse papel do sistema imune hepático predominantemente tolerogênico foi mostrado pela primeira vez em 1969 por Calne e colaboradores após descobrirem que os aloenxertos de fígado suíno com antígenos incompatíveis com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) foram frequentemente aceitos na ausência de imunossupressão (23). Em camundongos, os aloenxertos hepáticos são aceitos indefinidamente através das barreiras do MHC sem terapia imunossupressora (24). Essa 'tolerância operacional' também ocorre na clínica, em aproximadamente 20% receptores de aloenxerto de fígado humano que tiveram todos os agentes imunossupressores intencionalmente retirados (25-27). Parece que o fígado, por sua vez, adquiriu mecanismos especializados de tolerância imunológica e com isso obteve a capacidade de evitar a superativação da resposta imune inata e adaptativa.

As células hepáticas não parenquimais responsáveis pelas propriedades tolerogênicas do fígado são as células dendríticas residentes (DCs), células endoteliais sinusoidais hepáticas (LSECs), células de Kupffer (CKs), bem como as células estreladas hepáticas (HSCs), também conhecidas como células Ito. Essas células medeiam a imunossupressão pela produção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 (interleucina 10) e TGF-beta (fator de crescimento transformador), bem como pela expressão do co-estimulador negativo para ativação de células T, o PD-L1 (ligante-1 de morte celular programado). Finalmente, os hepatócitos também contribuem para a tolerância no fígado por baixa expressão de moléculas de MHC de classe II, e altos níveis da molécula inibidora PD-L1 (28).

1.2. ANATOMIA E COMPOSIÇÃO DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS

Nesta Tese, trabalhamos com dois modelos experimentais de camundongos para testar a nossa hipótese do transplante hepatocitário. Dessa forma, descreveremos brevemente a anatomia do fígado de camundongo.

Os pesos dos fígados de roedores variam de acordo com a espécie e a linhagem, mas tipicamente estão na faixa de 2 a 3 g (3 a 5% do peso corporal) em camundongos e 4 a 5g (2 a 3% do peso corporal) em ratos. Em relação à porcentagem da massa corporal total, o fígado de camundongos é mais proeminente do que o de ratos ou humanos. Assim, a maior proporção do volume da cavidade abdominal em camundongos é ocupada pelo fígado. Em roedores, o fígado abrange a maior parte ou toda a região subdiafragmática como ilustrado na figura 1.7 A em camundongos, enquanto que, em humanos, é restrito ao quadrante abdominal superior direito, como demonstrado anteriormente na figura 1.1 A. O fígado do camundongo compreende quatro lobos: lobo direito, lobo esquerdo, lobo mediano e lobo caudado (figura 1.7 B). A literatura mais antiga designa lobos direito e esquerdo como lateral direito e lateral esquerdo, mas essas nomenclaturas redundantes são omitidas nas classificações mais recentes. Em roedores, o lobo direito tem um septo transversal que quase o divide, levando à subclassificação por alguns dos lobos direito (anterior) e caudal direito (posterior). O lobo mediano encontra-se mais ventralmente e é o primeiro encontrado quando a cavidade abdominal é visualizada a partir do aspecto ventral usual. No camundongo, tem duas asas piriformes simétricas conectadas por um estreito istmo central abaixo, que se projeta para o saco ventral cego da vesícula biliar (Fig. 1.7 B). O lobo esquerdo é o maior e é um local frequente de amostragem para histologia e outras análises. O lobo caudado é pequeno e tem dois segmentos distintos em forma de orelha (29).

Para manter sua posição anatômica como em humanos, o fígado de camundongo também apresenta ligamentos. Entretanto, os ligamentos abdominais que atravessam e distintamente delineiam os lobos do fígado humano não são tão evidentes em roedores (29). Na superfície dorsal, o lobo mediano esquerdo e o lobo esquerdo são fixados no diafragma pelo ligamento coronário e pelo ligamento triangular, respectivamente. De acordo com a literatura, os camundongos não apresentam ligamentos para estabilizar o lobo mediano e

lateral direito. Entretanto, permanecem bem fixados e estabilizados pelos ligamentos existentes. No lado direito, apenas o processo caudado é fixado no rim direito pelo ligamento hepatorenal ventralmente, possuem o ligamento falciforme e o ligamento redondo (ligamento teres) também encontrados em humanos (30).

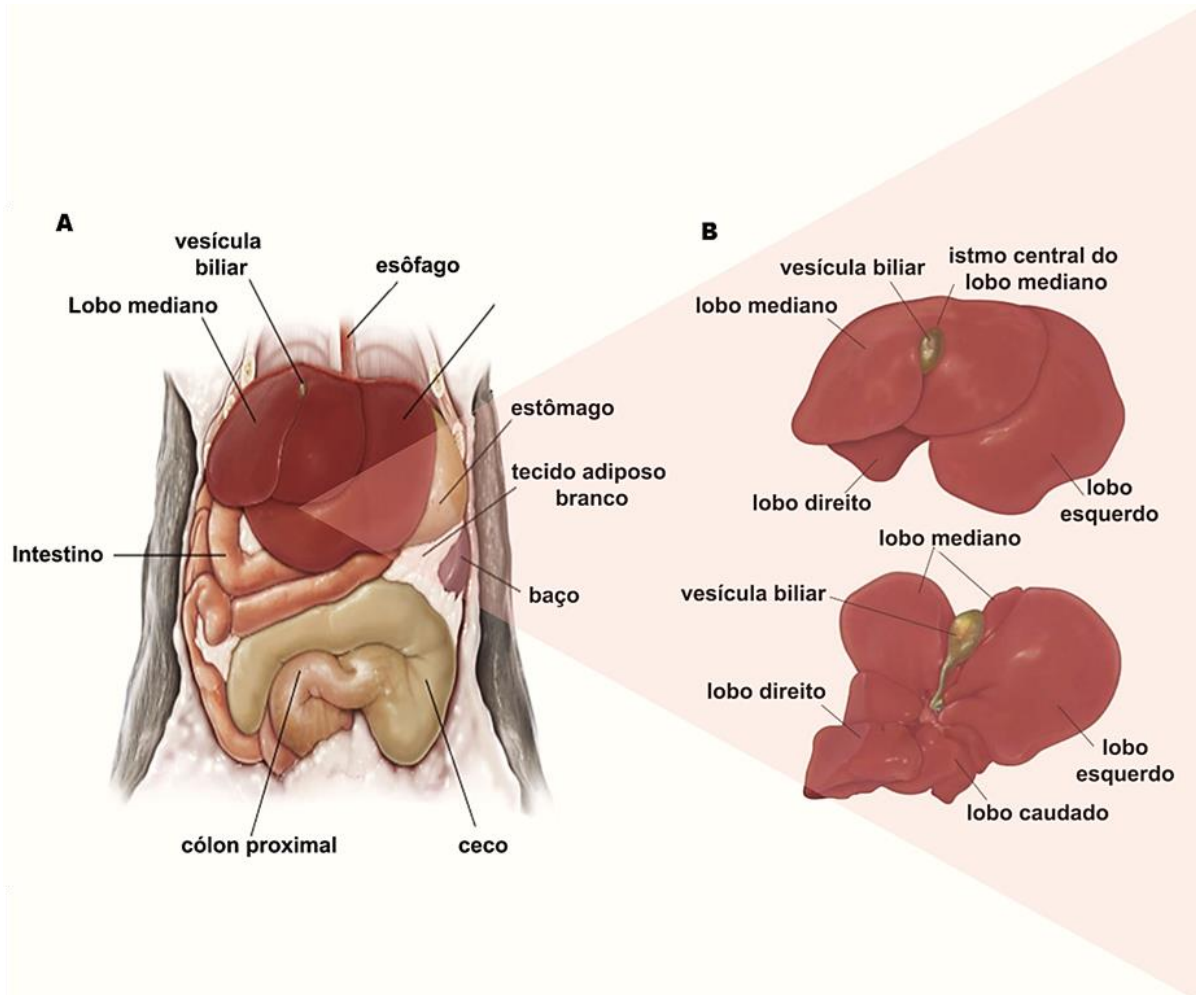


Figura 1.7. Posição anatômica e anatomia do fígado de camundongo. (A) O fígado de camundongo abrange todo o espaço subdiafragmático do abdome e não possui ligamentos superficiais proeminentes. (B) visão anterior e posterior do fígado em camundongos, ilustrando os quatro lobos hepáticos (esquerdo, direito, mediano e caudado), a vesícula biliar e o istmo central do lobo mediano. Imagem modificada de Arlin B. Rogers, Renee Z. Dintzis 2018.

Estudos utilizando microscopias de luz e eletrônica e de técnicas de imunocitoquímica quantitativa demonstraram que a organização histológica geral do fígado de camundongos é semelhante ao fígado de outras espécies de mamíferos, incluindo o homem (31). A arquitetura hepática desses animais é bem definida, com a presença de tríades portais (espaços porta) e veias centro

lobulares, fornecendo evidências da estrutura lobular em camundongos, no qual as células hepáticas estão dispostas em placas ou cordões e podem ser vistas irradiando das regiões das veias centrais e estendendo-se para as áreas portais (figuras 1.8 A e B). Os cordões de hepatócitos são separados por capilares sinusoidais, que por sua vez, se estendem até as veias centrais. A formação e organização dos canálculos biliares adjacentes aos hepatócitos são semelhantes a outros mamíferos, incluindo o homem, os quais se ramificam por todo parênquima hepático, constituindo as zonas portais (31).

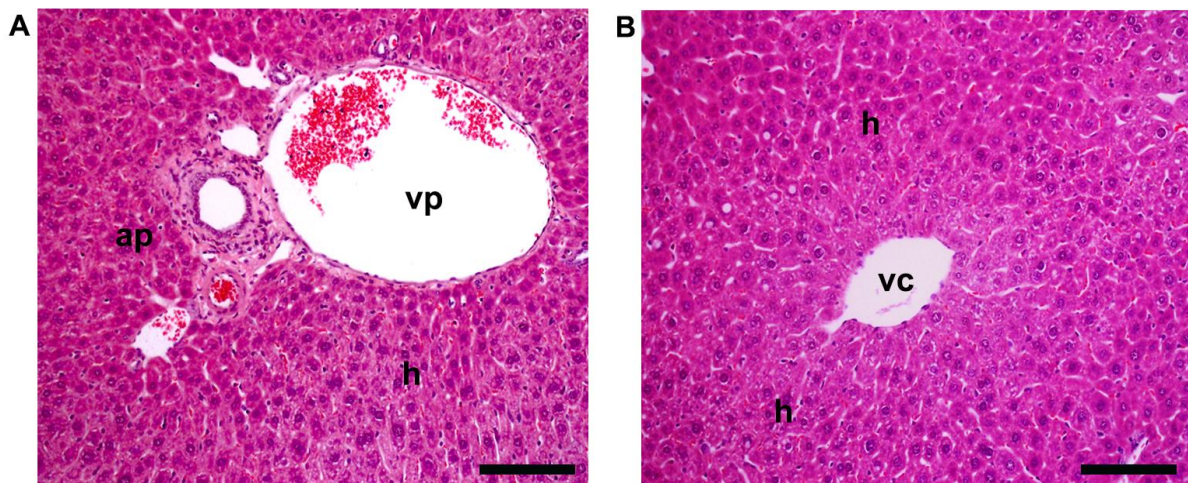


Figura 1.8. Cortes histológicos da organização celular do fígado de camundongos. A imagem representa fotomicrografias de tecido de fígado de camundongo destacando sua semelhança com outras espécies de mamíferos, incluindo o homem. A: Imagem de campo claro de uma secção corada com H&E mostrando a arquitetura normal do fígado e componentes dos lóbulos hepáticos, com área portal (AP), destacando a veia porta hepática (vp) rodeada pelos cordões de hepatócitos (h). B: Outra secção corada com H&E ilustrando a veia central (vc) e os cordões de hepatócitos (h). Essas fotos foram obtidas de fígados de camundongos controle deste trabalho e corroboram com as imagens publicadas no trabalho de Janie L. Baratta e colaboradores em 2009 intitulado: “*Cellular Organization of Normal Mouse Liver: A Histological, Quantitative Immunocytochemical, and Fine Structural Analysis*”. Barra 100 μ M

Em camundongos, a população celular também é semelhante a outras espécies de mamíferos, composta por células parenquimatosas e não parenquimatosas. Entretanto, com diferenças significativas no número percentual de células encontradas no parênquima hepático (31). A composição celular do fígado murino segue as seguintes proporções: aproximadamente 52% de células parenquimatosas representadas pelos hepatócitos e o total de células não parenquimatosas compreendem aproximadamente 18% de células de Kuffer; 22% de células endoteliais e 8% de células Ito ou células estreladas (30, 31). A artéria

hepática nos murinos surge a partir da aorta abdominal antes da artéria mesentérica. A veia porta drena o sangue a partir do trato gastrointestinal e do baço para o fígado, dividindo-se em ramo direito, que fornece o suprimento sanguíneo ao lobo caudado, e lobo lateral direito. O ramo esquerdo da veia porta irriga os lobos mediano e lateral esquerdo (30). Dessa forma, a semelhança na organização e na composição celular do fígado de camundongos à de outras espécies de mamíferos, ratificam a utilização do modelo murinho em estudos laboratoriais de estrutura e função hepática (31).

1.3. INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA (IHA)

A Insuficiência Hepática Aguda (IHA) é uma síndrome clínica, grave e complexa potencialmente fatal, resultante da perda funcional súbita dos hepatócitos, em pacientes sem doença hepática pré-existente. Essa rápida perda funcional é resultado da morte maciça dos hepatócitos e está associada com encefalopatia hepática (EH) (qualquer grau de alteração mental), coagulopatia e icterícia (32). Tipicamente, o intervalo entre o início dos sintomas e o início da encefalopatia é de 1 a 2 semanas, mas alguns casos evoluem mais lentamente, até 6 meses, podendo ainda ser incluídos na definição. Com uma incidência de menos de 10 casos por milhão de pessoas por ano no mundo desenvolvido, a IHA é mais comum em adultos saudáveis por volta dos 30 anos e apresenta desafios no manejo clínico com óbito ocorrendo em até a metade dos casos (33).

A IHA está relacionada com uma taxa de mortalidade extremamente alta, muitas vezes superior a 80% em alguns casos. Dessa forma, é importante identificar sua causa, pois algumas formas podem ser tratadas ou resolvidas espontaneamente, como por exemplo, intoxicação por acetaminofeno. As causas mais comuns de morte são a falência de múltipla de órgãos, hemorragia, infecção e edema cerebral, sendo este último uma característica praticamente exclusiva para IHA (34, 35). Clinicamente, os achados predominantes são o aparecimento de fadiga e icterícia, aumento transitório das concentrações séricas de ALT (alanina aminotransferase), ou TGP (transaminase glutâmico pirúvica) e AST (aspartato aminotransferase), também chamada de TGO (Transaminase glutâmico-oxalacética), seguido de progressivo aumento da bilirrubina sérica,

distúrbios da coagulação e alteração de consciência (encefalopatia hepática), levando ao coma e edema cerebral. Histologicamente, a arquitetura do fígado está intacta, exceto pela perda ou necrose dos hepatócitos. Além disso, a IHA é uma síndrome na qual, além do fígado, outros órgãos podem ser acometidos, como o cérebro, os rins, os pulmões, a medula, o sistema circulatório e o sistema imunológico como demonstrado no esquema 1.9. (33, 35).

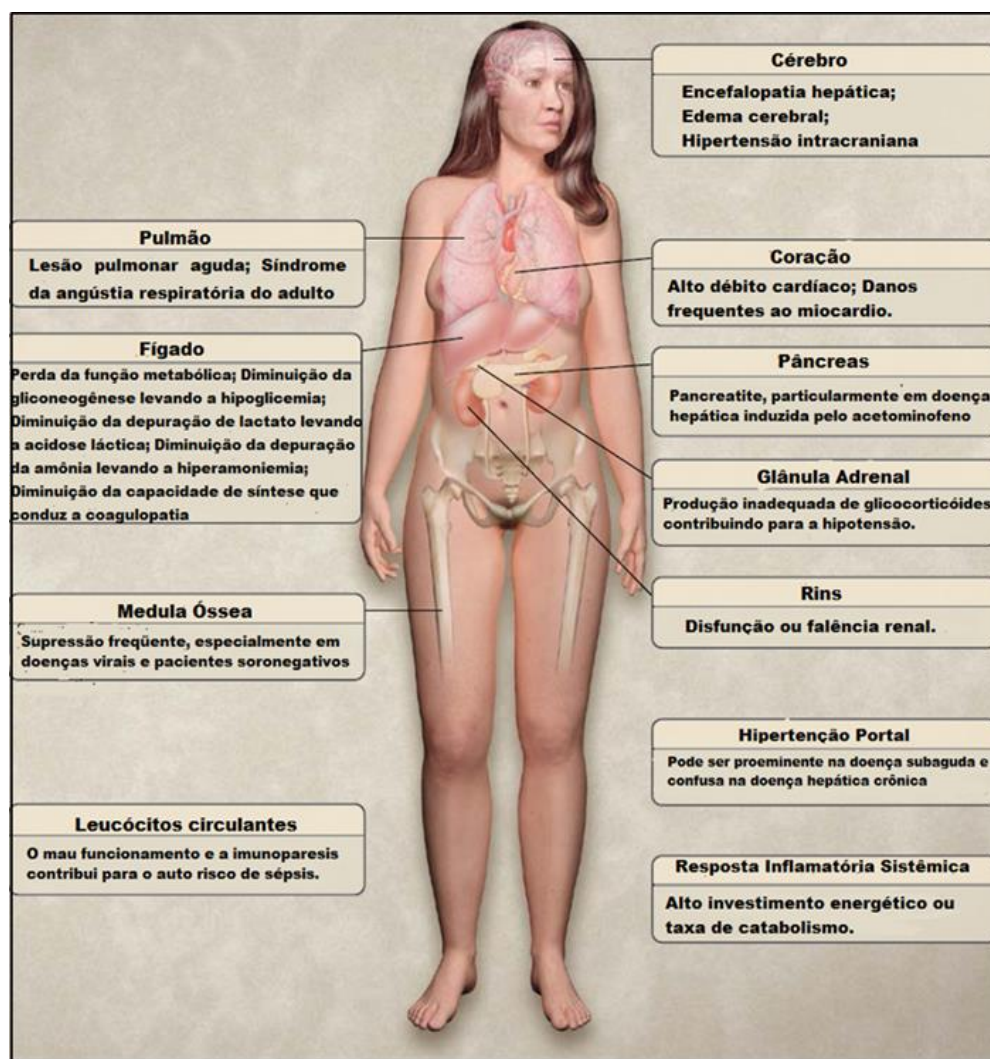


Figura 1.9. Características clínicas da IHA em diversos órgãos.
Adaptado de Bernal *et al*, 2014.

Atualmente, existem algumas definições clássicas para a IHA. O termo original “insuficiência hepática fulminante”, definido como “lesão hepática grave”, potencialmente reversível e com o início da encefalopatia hepática em 8 semanas após o aparecimento dos primeiros sintomas na ausência de doença hepática pré-existente”, permanece relevante até hoje (36). Definições mais modernas

reconhecem fenótipos distintos da doença e quantificam o intervalo entre o início da icterícia e o desenvolvimento da encefalopatia, como ilustrado na figura 1.10. Esse intervalo fornece indícios para a causa da doença, prováveis complicações, e prognóstico apenas com assistência médica de suporte (37-39). Em casos hiperagudos, esse intervalo é de uma semana ou menos, e a causa é geralmente toxicidade por acetaminofeno ou infecção viral. Casos de evolução mais lenta, aguda ou subaguda, podem ser confundidos com doença hepática crônica e muitas vezes resultam de lesão hepática induzida por reações idiossincráticas a fármacos ou causas indeterminadas. Pacientes com causas subagudas e agudas, apesar de ter coagulopatia e encefalopatia menos acentuadas, têm um resultado consistentemente pior apenas com cuidados médicos do que aqueles em quem a doença tem um início mais rápido (33). Dentre as classificações apresentadas, a classificação mais utilizada atualmente foi a descrita por hepatologistas do King's College Hospital em 1993. A vantagem dessa classificação está relacionada à sua associação com a incidência de edema cerebral e ao prognóstico sem o transplante hepático (tabela 1.1) (38).

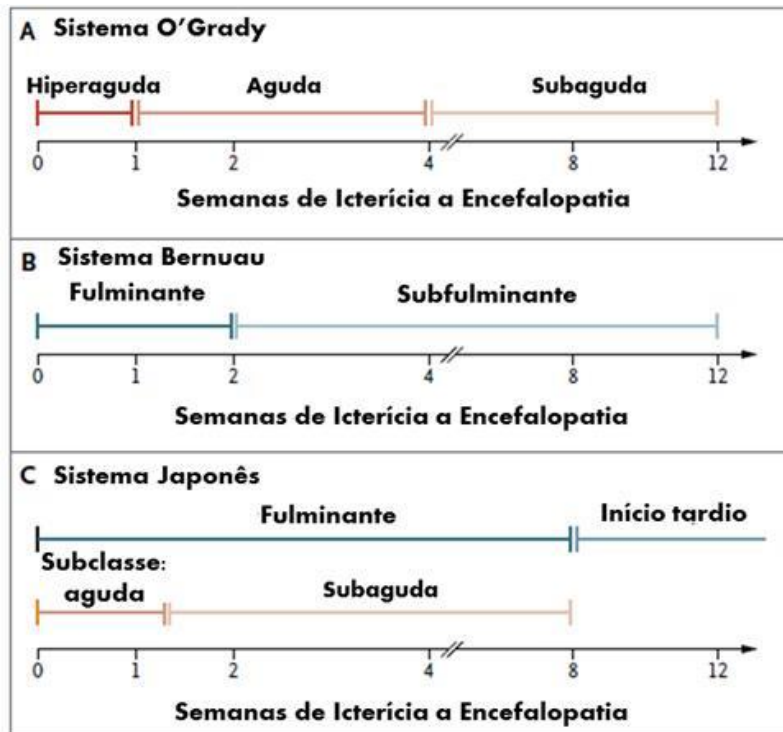


Figura 1.10. Sistemas de Classificação para Insuficiência Hepática Aguda. Os dados são de O'Grady *et al.*, (38) Bernuau *et al.* (40) e Mochida *et al.* (39). Sistema japonês, o período de início tardio é de 8 a 24 semanas.

Tabela 1.1 Relação da incidência de edema cerebral nos pacientes com IHA e do prognóstico (sem transplante hepático) desses pacientes de acordo com a classificação do King's College Hospital (38).

	Hiperaguda	Aguda	Subaguda
Edema Cerebral	comum	comum	raro
Prognóstico	moderado	ruim	ruim

Diversas são as etiologias relaciona à IHA, que diferem de acordo com a região geográfica. A IHA é muito menos comum no mundo desenvolvido do que nos países em desenvolvimento, onde as infecções virais (hepatite A, B e E) são as causas predominantes com taxas de mortalidade acima de 50% nos países em desenvolvimento (41, 42). Medidas de saúde pública (por exemplo, vacinação e melhores condições de saneamento) estão entre os fatores que resultam na redução da incidência dessas infecções nos Estados Unidos e grande parte da Europa Ocidental, onde a lesão hepática induzida por drogas é a causa mais comum de IHA (33). Nos Estados Unidos e no Reino Unido, as overdoses por APAP (acetaminofeno) são atualmente de 45% a 60% dos casos de IHA. A ingestão de doses excedentes a 8 g/dia de acetaminofeno apresenta uma relação direta com a indução de IHA. Entretanto, doses terapêuticas de 3-4 g/dia têm sido relacionadas com hepatotoxicidade e são capazes de induzir lesões hepáticas graves. Esse quadro pode dar origem a aumentos assintomáticos nas concentrações das transaminases hepáticas no sangue depois de mais de 4 dias de consumo (43). Ainda em países desenvolvidos, a hepatite viral e reações a drogas idiossincráticas representam de 10% a 12% dos casos (44, 45). Por outro lado, os países do Pacífico Asiático têm uma incidência maior de IHA devido aos vírus da hepatite, especificamente o vírus da hepatite E (HEV) na Índia e Paquistão, e o vírus da hepatite B (HBV) no Japão, Hong Kong, Tailândia, bem como Austrália, com menos casos de overdose de APAP observados. A causa mais comum no Brasil é a hepatite viral, seguida pela hepatite medicamentosa e intoxicação exógena (34, 46).

Dentre outras etiologias estão reações idiossincráticas de drogas, ingestão de toxinas e distúrbios metabólicos. Além dessas etiologias conhecidas, as causas indeterminadas da falência hepática são responsáveis por uma grande proporção de casos de IHA apesar da triagem sistemática para detectar vírus

raros, insuficiência hepática induzida por drogas ou toxinas, e outras causas menos comuns, como a doença de Wilson, hepatite isquêmica, Síndrome de Budd-Chiari, síndrome de Reye e malignidade. Estabelecer a causa da falência hepática é importante por três razões: (1) iniciar o tratamento específico rapidamente, (2) descartar e/ou abordar as contraindicações ao transplante hepático e (3) para determinar o prognóstico (44, 46).

A avaliação prognóstica precoce da IHA é difícil; porém, de extrema importância na determinação da terapia, especialmente para selecionar os pacientes com maior probabilidade de se beneficiarem no momento em que o transplante de fígado ainda é viável (47). Nos últimos anos, modelos de prognósticos como "Model for End-Stage Liver Disease" (MELD) e King's College Hospital (KCH), têm sido utilizados como ferramenta clínica para determinar a necessidade de encaminhar pacientes com IHA para a fila de transplantes e centros especializados (48). O prognóstico é pautado no quadro clínico, nos resultados de exames de sangue (tempo de protombina, PH sanguíneo, creatinina, dentre outros), idade (<10 ou >40), estado nutricional, distúrbios imunológicos, neurológicos e na identificação da etiologia (48). A identificação de sinais clínicos de encefalopatia hepática em diferentes graus é crucial, pois está diretamente correlacionada com as taxas de morbidade e mortalidade (49).

Independentemente da causa, o caminho final mais comum é notavelmente semelhante: o agravamento do coma associado à propensão ao sangramento, infecção e insuficiência renal levam a uma baixa sobrevida global sem o transplante (50).

O critério inglês ou do King's College, classifica os pacientes em IHA por paracetamol e IHA de outras etiologias (51). Como a intoxicação por paracetamol é uma etiologia muito rara no Brasil, citaremos em seguida, apenas os critérios utilizados para pacientes de outras etiologias. Quando a coagulopatia avaliada laboratorialmente pela atividade de protrombina exibe um valor de INR (razão normalizada internacional) acima de 6, o paciente já apresenta indicação de transplante, desde que apresente encefalopatia e a doença hepática aguda. Além disso, os pacientes que apresentam pelo menos 3 dos critérios abaixo também recebem indicação de transplante de urgência: idade menor que 11 e maior que 40 anos; etiologia desfavorável (não- HBA e não-HBV); bilirrubina acima de

17mg/dL; INR maior que 3,5; intervalo entre surgimento de icterícia e encefalopatia acima de 7 dias (51).

O escore MELD, que pode ser traduzido como modelo para doença hepática terminal, foi criado com objetivo de tentar prever o prognóstico de pacientes que seriam submetidos à colocação de um *shunt* porto-sistêmico intra-hepático por via transjugular (*Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt-TIPS*) (52), mas posteriormente foi validado para estabelecer o prognóstico dos pacientes com insuficiência hepática crônica em lista de espera de transplante de fígado e o resultado da mortalidade pós-transplante nesses pacientes (53). Uma modificação do MELD foi desenvolvida para atender as necessidades dos candidatos pediátricos ao transplante fígado (o sistema de pontuação pediátrica em estágio final da doença hepática), incorporando albumina sérica e falha no crescimento. O escore MELD é calculado a partir da fórmula abaixo (quadro 1.1) e se baseia em 3 resultados de exames laboratoriais simples: a creatinina sérica, a bilirrubina e a atividade de protrombina (INR).

Quadro 1.1. Fórmula para calcular o índice MELD

$$\text{MELD} = 9.57 \log_e \text{ creatinina (mg/dL)} + 3.78 \log_e \text{ bilirrubina (mg/dL)} + 11.20 \log_e \text{ INR} + 6.42$$

Uma vez que se indica o transplante hepático de urgência, o paciente tem prioridade sobre os outros pacientes da lista de transplante, mas devido à escassez de doadores com morte encefálica, o paciente pode permanecer esperando pelo enxerto por vários dias. Não é raro, que o paciente já esteja muito grave clinicamente no momento que o enxerto torna-se disponível e, nesses casos, a chance de sucesso do transplante é muito pequena (53, 54).

Embora existam terapias modernas de suporte à vida disponíveis nos centros de terapia intensiva, algumas ainda em fase experimental, pacientes que desenvolvem IHA permanecem sem um tratamento terapêutico eficaz, sendo o transplante do órgão a terapia usual em estágios não reversíveis da doença (54). O que motiva cada vez mais a busca por estudos voltados para alternativas terapêuticas que possam atuar paralelamente ao transplante de fígado.

1.4. O TRANSPLANTE HEPÁTICO

O primeiro transplante de fígado humano (TF) foi realizado por Thomas Starzl em 1963 (Denver-EUA) (55) e desde então continua a ser a única terapia realizada com sucesso para recuperação da função hepática. Após esse período, muitas estratégias foram desenvolvidas em todo o mundo, como técnicas cirúrgicas, agentes imunossupressores, alocação de órgãos, seleção de doadores, indicações e contraindicações, profilaxia de infecções e prevenção de doenças recorrentes (56). Como resultado, a sobrevivência após a TF aumentou significativamente nos últimos anos. Atualmente, a sobrevida média é de cerca de 90% no primeiro ano pós-transplante, 60% aos 10 anos pós-transplante (57, 58). O principal problema em relação ao TF é o número reduzido de enxertos disponíveis. Por este motivo, esta opção não pode ser oferecida para a maioria dos pacientes com distúrbios hepáticos agudos. Conseqüentemente, um grande número de pacientes permanece em filas de espera e não realizam o procedimento cirúrgico. Essa escassez de órgãos para o transplante hepático tem sido associada a muitos fatores, dentre eles estão o alto custo e a limitação de equipes com o treinamento adequado para realizar o procedimento (54, 59, 60). O cuidado crítico aos pacientes com doenças hepáticas terminais é fundamental para sua sobrevivência e as decisões devem ser tomadas de forma decisiva, às vezes, com informações inadequadas tendo em vista o difícil prognóstico e a ausência de terapias de suporte. Com isso, a experiência é útil, mas as equipes clínicas experientes são ainda mais raras do que a doença: poucos hepatologistas ou especialistas têm experiência adequada para pacientes com IHA (34, 50). Além disso, tem sido relatado na literatura que a distância entre o órgão e o receptor também atua diretamente na disponibilidade de alocação de fígados transplantáveis. Isso ocorre devido ao curto período de tempo em que um órgão pode permanecer viável fora do corpo vivo. Dessa forma, não somente a compatibilidade de fatores médicos, mas a questão da localização geográfica influencia de forma significativa para a escassez de órgãos contribuindo para a alta mortalidade em casos de falência hepática aguda (61).

Ainda que o Brasil ocupe o segundo lugar no ranking mundial de transplantes de fígado, ficando abaixo apenas dos Estados Unidos da América (EUA), de acordo com dados da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos

(ABTO - 2017), cerca de 60% dos pacientes que necessitam realizar o procedimento cirúrgico permanecem nas filas de espera como ilustrado na figura 1.11. Essa estatística também não é muito diferente nos EUA, estima-se que cerca de 16.000 pessoas estão na lista de espera para o transplante de fígado e apenas 38% deles realizarão o transplante hepático (62). Dessa forma, a ausência de órgãos para o transplante é um problema de questão mundial. Fator esse que reforça a grande necessidade de investimento ao desenvolvimento de novas terapias que possam atuar paralelamente ao transplante do órgão e salvar vidas.

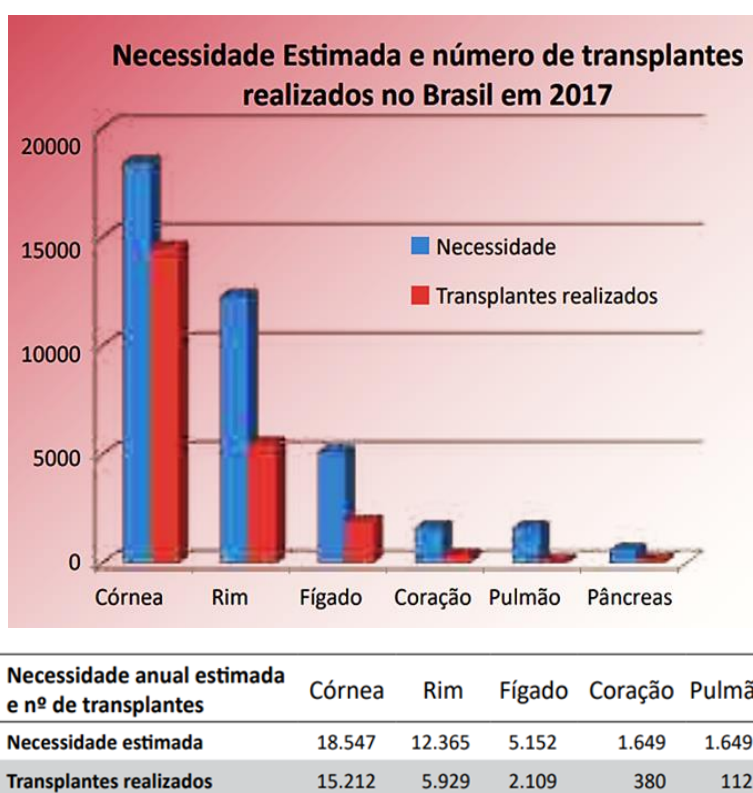


Figura 1.11. O gráfico ilustra o número de pacientes que necessitam realizar o transplante de fígado, em azul, e o número de transplantes que foram realizados, em vermelho. Abaixo podemos observar os números relativos dessa demanda. Os dados publicados pela Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO-2017) estimam que cerca de 60% dos pacientes que necessitam realizar o transplante hepático permanecem nas filas de espera contribuindo assim, para o aumento da mortalidade em casos de perda da função hepática. Consulta pelo site <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2017/rbt-imprensa-leitura-compressed.pdf> em 29/01/2019.

Muitas estratégias cirúrgicas foram sendo desenvolvidas visando aumentar a disponibilidade de órgãos para TF (63, 64). Tais estratégias envolvem o transplante hepático de doador vivo - THDV (*Living Donor Liver Transplant LDLT*), transplante hepático dividido - THD (*Split Liver Transplant - SLT*), transplante de fígado dominó - TFD (*Domino Liver Transplantation - DLT*) e o transplante de fígado auxiliar - TFA (*Auxiliary Liver Transplantation – ALT*) (56, 65-69). Entretanto, os números de pacientes nas filas de espera que não recebem o transplante ainda são insatisfatórios.

1.4.1. Estratégias cirúrgicas ao transplante de fígado

Uma das principais características do fígado é a sua notável capacidade de regeneração após a remoção de parte do seu parênquima ou lesão de até 70% da sua massa total (5). Essa capacidade natural regenerativa das células do parênquima hepático é significativa; cerca de 30% do fígado residual são suficientes para regeneração dentro de algumas semanas em roedores e alguns meses em humanos (3). Embora comumente utilizado, o termo regeneração é biologicamente incorreto, uma vez que a resposta induzida pela perda de tecido hepático não é verdadeiramente regenerativa. Ao contrário da regeneração anatômica verdadeira, o fígado em expansão não recupera sua estrutura anatômica macroscópica. Assim, esse processo é mais corretamente definido como um processo de hiperplasia compensatória, visto que o tecido hepático remanescente se expande para atender as necessidades metabólicas do organismo (70). Contrariamente ao verdadeiro processo de regeneração, no caso de hepatectomia parcial e algumas lesões hepáticas induzidas quimicamente, a reposição da massa hepática ocorre pela replicação dos hepatócitos existentes sem ativação das células progenitoras (71). Essa notável capacidade regenerativa do fígado permitiu a idealização de técnicas cirúrgicas que pudessem utilizar doadores vivos, como por exemplo, o transplante intervivos.

O transplante hepático intervivos ou transplante de fígado de doador vivo (TFDV), utilizando como enxertos fragmentos hepáticos de doadores vivos saudáveis, surgiu como uma opção de grande importância para muitos pacientes, em especial para pacientes pediátricos e pacientes adultos que são

desfavorecidos pelo atual sistema de alocação de doadores falecidos (72, 73). Desde os primeiros transplantes de fígado de doadores vivos, no final da década de 1980, essa técnica de transplante vem sendo utilizada como uma ferramenta bem estabelecida dentro da medicina moderna de transplantes. Enxertos de fígado para beneficiários adultos são principalmente o lobo lateral direito e para receptores pediátricos, principalmente utilizado o lobo lateral esquerdo do fígado do doador (72, 74, 75).

A primeira tentativa do transplante intervivos foi realizada no Brasil, por Raia e colaboradores em 1989 (76), cujo principal objetivo foi tentar diminuir a discrepância entre o número de pacientes esperando por um transplante hepático e o número de doadores falecidos disponíveis para transplante (76). O primeiro transplante de fígado intervivos bem sucedido foi realizado em 1990, na Austrália, por Strong e colaboradores, utilizando como enxerto segmentos do lobo lateral esquerdo (72, 74).

Órgãos de doadores vivos oferecem muitas vantagens importantes sobre órgãos de doadores com morte cerebral. A principal vantagem é que há otimização do momento do transplante e os pacientes com doenças hepáticas graves saem das listas de espera. Além disso, o procedimento de transplante pode ser programado de forma eletiva, em tempo hábil, antes do candidato desenvolver as complicações da fase final da doença hepática, que aumentam o risco de vida. O tempo de preservação externa do órgão é mínimo em transplantes de doadores vivos, com isso, o dano isquêmico ao órgão é significativamente menor. Além disso, o transplante de doador vivo aumenta a oferta de órgãos para transplantes, permitindo que mais pessoas sejam beneficiadas (65, 72, 75).

A grande desvantagem para a realização de um transplante com doadores vivos é o risco de mortalidade e morbidade para esses doadores. Com isso, doadores voluntários perfeitamente saudáveis são expostos a possíveis danos relacionados ao procedimento cirúrgico. A morbidade desses procedimentos é significativa e correlaciona-se diretamente com a extensão da ressecção. Assim, tanto em termos de morbidade quanto de mortalidade, a lobectomia direita é mais arriscada do que lobectomia esquerda (72).

Cabe ressaltar que esse procedimento é consideravelmente mais caro e que as possibilidades de desenvolver complicações cirúrgicas são maiores do que

para o transplante do órgão inteiro. São necessárias duas equipes altamente experientes. Uma para executar o procedimento no doador e a outra para realizar o procedimento no paciente receptor (74, 77). Contudo, nos últimos anos, a maior parte dos problemas relacionados aos procedimentos técnicos, principalmente em adultos, vem sendo elucidados. Como consequência, tem sido demonstrado uma diminuição da morbidade e da mortalidade associadas a erros técnicos durante os procedimentos para esse tipo de transplante (77).

Outras estratégias cirúrgicas ao transplante de fígado envolvem: **(1)** o Transplante de Fígado *Split* - TFS (*Split Liver Transplant* - SLT), medida em que torna possível realizar o transplante de fígado através da obtenção de dois enxertos a partir de um único doador falecido (66, 78). A bipartição de um fígado inteiro também apresenta extrema importância, principalmente para os pacientes pediátricos, mais uma vez diminuindo a incidência de mortalidade em listas de espera neste grupo (66). Geralmente, o fígado é dividido para um adulto e uma criança e a utilização de enxertos para a divisão entre dois pacientes adultos é incomum (66, 78); **(2)** o Transplante de Fígado Auxiliar (TFA), (*Auxiliary Liver Transplantation* – ALT), foi desenvolvido porque uma minoria significativa, cerca de 25%, dos pacientes com IHA que atendem aos critérios de transplante podem ter uma recuperação morfológica e funcional completa do fígado (51, 79). Esse tipo de transplante consiste em implantar um enxerto de fígado saudável deixando todo ou apenas uma parte do fígado nativo no paciente. O princípio para a realização desse procedimento parte do potencial de regeneração compensatória do fígado nativo e conseqüentemente a retirada gradual da imunossupressão (80-82). Teoricamente, há dois métodos para realizar o TFA. Um deles é o transplante parcial heterotópico de fígado auxiliar (APHLT – *Auxiliary Partial Heterotopic Liver Transplantation*), em que o enxerto (geralmente parcial) é colocado abaixo do fígado nativo não ressecionado (83). O outro método é o transplante parcial ortotópico de fígado auxiliar (APOLT - *Auxiliary Partial Orthotopic Liver Transplantation*), em que o lobo lateral esquerdo ou parte do lobo lateral direito é ressecado e substituído por um enxerto de fígado parcial (80); e **(3)** o Transplante de Fígado Dominó (TFD) - (*Domino Liver Transplantation* - DLT), esse tipo de transplante foi originalmente proposto para suprir a limitada oferta de órgãos utilizando como fonte doadora pacientes com Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) e é responsável por mais de 16% dos transplantes de fígado realizados

em Portugal (68) e atualmente, é realizado com mais frequência em Portugal, Suécia e Japão, áreas em que a incidência da doença é maior (84, 85). A PAF é uma doença sistêmica autossômica dominante, caracterizada por progressiva neuropatia motora sensorial associada com disfunção vegetativa e cardiomiopatia relacionada à mutação do gene da transtirretina (TTR), e ocorre geralmente em adultos durante a terceira década de vida. Mutantes de TTR são responsáveis por desestabilizar a estrutura tetramérica TTR nativa levando à deposição extracelular de fibras amilóides tóxicas, especialmente no sistema nervoso periférico (68, 84). O fígado produz cerca 90% da TTR; entretanto, apesar de ter sofrido uma alteração genética o fígado de pacientes com PAF mantém as funções hepáticas e morfologias normais, exceto para a produção TTR mutante. Nesse caso, a ideia de usar tais enxertos é que se acreditava que levariam de 20-30 anos até que os primeiros sintomas PAF pudessem aparecer nos pacientes receptores do transplante dominó. Assim, essa abordagem deve ser realizada apenas em pacientes idosos com idade aproximada de 60 anos (68, 86, 87). O TFD pode beneficiar mais de um receptor com doença hepática em estágio terminal. Nesse tipo de transplante sequencial fígados de pacientes com PAF ou doenças metabólicas não são viáveis para esses indivíduos; no entanto, eles podem ser transplantados em um ou mais pacientes com doença hepática aguda em listas de espera para transplante ortotópico. Os pacientes com PAF são ao mesmo tempo doadores e receptores porque dependem de transplantes hepáticos de um doador falecido conforme esquematizado na figura 1.11. Embora o TFD seja mais frequentemente realizado em pacientes doadores com PAF, alguns trabalhos sugerem o uso de enxertos de pacientes com uma variedade de distúrbios metabólicos (88-90). Atualmente, o DLT é indicado para doenças metabólicas hereditárias, como hipercolesterolemia familiar, hiperoxalúria primária, doença da urina do xarope de bordô e porfiria aguda intermitente (67, 84, 91). Em casos raros, o TFD pode ser realizado, transplantando os órgãos de pacientes com vários distúrbios metabólicos em receptores idosos cuja sobrevida projetada impede a espera prolongada na lista de transplantes (88). O grande problema para realização clínica desse tipo de transplante, é que embora com uma incidência baixa, cerca de 3%, as manifestações precoces da doença do fígado doador têm sido relatadas (56) (2-3 anos após o transplante, nos casos de PAF). Dessa forma, é preciso ter cautela na utilização de enxertos de fígado dominó. No

entanto, esses enxertos são uma boa opção para alguns receptores que, de outra forma, poderiam experimentar longos períodos de espera para o transplante de fígado, como os receptores de carcinoma hepatocelular (92).

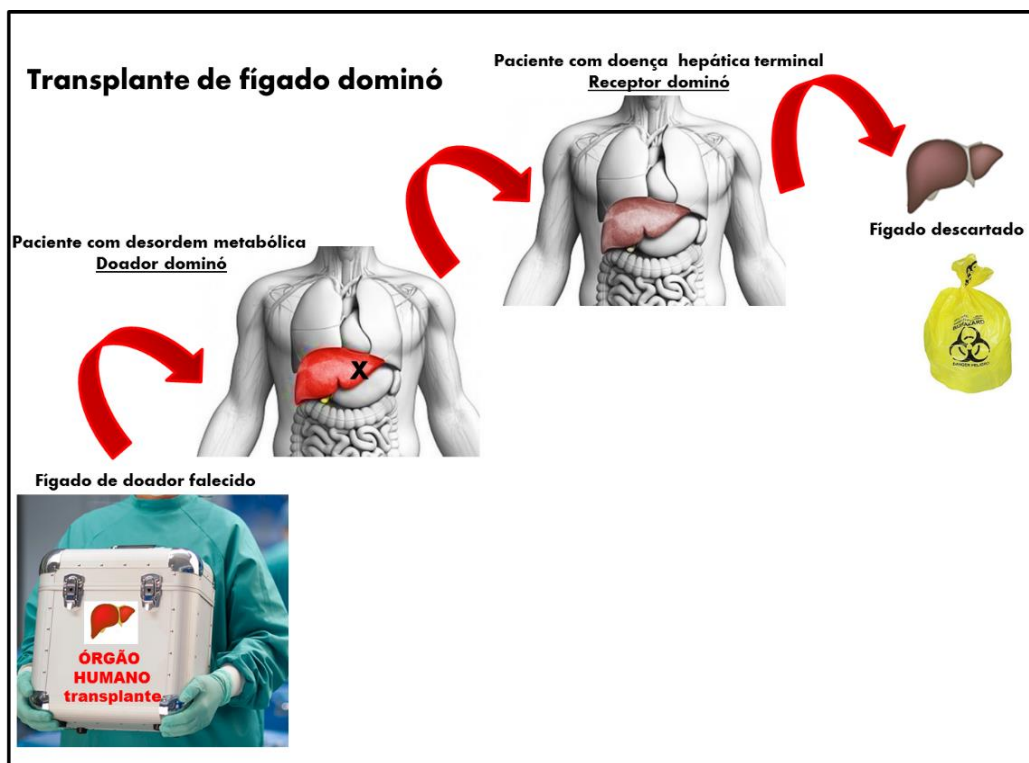


Figura 1.12. Transplante de fígado dominó (TFD). Esse tipo de transplante sequencial foi idealizado com o intuito de minimizar a escassez de órgãos para o transplante. Contribuindo assim, para a diminuição de pacientes que aguardam nas filas de espera pelo transplante de fígado. A idéia central desse tipo de transplante é que pacientes com doenças metabólicas, que obrigatoriamente, dependem do transplante de fígado de um doador falecido, possam ser ao mesmo tempo doadores para pacientes em estágio agudo de doenças hepáticas.

1.4.2 Estratégias terapêuticas experimentais de suporte ao transplante hepático.

As estratégias terapêuticas mais antigas utilizadas no tratamento da IHA são a transfusão sanguínea (93, 94) e a hemodiálise (95), na tentativa de remover as toxinas presentes no sangue. No entanto, essas terapias não se mostraram eficazes quando realizadas diversas vezes, por períodos prolongados, favorecendo a ocorrência de infecções secundárias, hemorragias e culminando no óbito do paciente em poucos dias (96-98). Os avanços tecnológicos permitiram o

desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para IHA, classificadas como dispositivos extracorpóreos de suporte ao fígado, com a finalidade de mimetizar as principais funções do órgão (99). Desse modo, poderia ser possível prolongar o tempo de espera dos pacientes até o transplante ou até mesmo permitir uma recuperação espontânea da lesão hepática sem a necessidade do transplante.

Os dispositivos hepáticos extracorpóreos destinam-se principalmente a fornecer apoio temporário a pacientes com IHA. As primeiras tentativas de desenvolver tecnologias de suportes extracorpóreos basearam-se em mecanismos não biológicos, como hemodiálise, hemoperfusão, hemodiabsorção, e plasmaférese (98). Configurações mais recentes de sistemas de suporte artificiais e não biológicos focaram-se na eliminação de toxinas ligadas a albumina utilizando um método denominado diálise com albumina. Esses dispositivos, como o Sistema Recirculante de Adsorção Molecular (MARS; Gambro, Suécia) e a plataforma Prometheus (Fresenius Medical Care, Alemanha) mostraram-se eficazes para a redução da bilirrubina plasmática, ácidos biliares e outras moléculas ligadas à albumina (100, 101). Embora alguns relatos apontem para a utilidade dessas abordagens, como tratamentos aos pacientes que aguardam o transplante (102, 103), e benefícios sobre a função de alguns órgãos, não foram comprovadas melhorias no quadro geral dos pacientes associadas ao aumento da sobrevida livres de transplante (104, 105). Consequentemente, sugerindo que testes adicionais com ensaios clínicos controlados são necessários para avaliar completamente sua eficácia.

Tendo em vista a ampla gama de funções executadas pelo fígado bem como as limitações dos dispositivos exclusivamente artificiais, grande parte dos estudos em torno de terapias de suporte à perda da função hepática gravitou em direção a alternativas utilizando células, em vez de unicamente baseadas em dispositivos sem a inclusão de um componente biológico (2). Por conseguinte, para proporcionar um conjunto mais completo de funções sintéticas e bioquímicas, que não existem em sistemas de suporte estritamente artificiais, esforços consideráveis têm sido feitos no desenvolvimento de dispositivos de fígado bioartificial (BAL) contendo células hepáticas. Após os estudos iniciais, como o trabalho de Matsumura et al. em 1987 (106) uma ampla gama de projetos de dispositivos de BAL foram relatados e destacaram a importância de vários critérios no desenvolvimento de um dispositivo eficaz. Esses incluem questões de

obtenção de células, manutenção da viabilidade celular e das funções hepáticas, transporte de massa bidirecional suficiente e escalabilidade para níveis terapêuticos. Entretanto, o fornecimento de células hepáticas é um desafio fundamental para todas as terapias que utilizam células do fígado. Como resultado, fontes xenogênicas (principalmente suínas) ou linhagens celulares de hepatócitos humanos transformadas/imortalizadas formaram a base para a maioria dos dispositivos de BAL (que incluem aproximadamente 1×10^{10} células) testados na clínica até o momento (107-109). No entanto, a perda funcional dos hepatócitos em linhagens celulares transformadas (110) e nas células criopreservadas, bem como o risco potencial de infecções com os retrovírus endógenos suínos dificultaram as tentativas de demonstrar sua eficácia. Mais recentemente, estudos começaram a incorporar células primárias do fígado, explorando os avanços na criopreservação, aquisição de células fetais e diferenciação de células-tronco (111-113). Cabe ressaltar, que outro fator importante é que esses procedimentos são muito caros e com muitas questões a serem respondidas antes da utilização na prática clínica (114).

Nos cenários clínicos de lesão hepática apresentados acima, há uma variedade de casos em que o transplante de hepatócitos, seja no contexto de um dispositivo extracorpóreo, um enxerto de engenharia tecidual, seja como células individualmente enxertadas, pode oferecer uma alternativa clínica associada ao transplante ortotópico de fígado (2, 115, 116). Algumas estratégias ao transplante de fígado bem como as terapias alternativas de suporte ao transplante hepático estão ilustradas na figura 1.13.

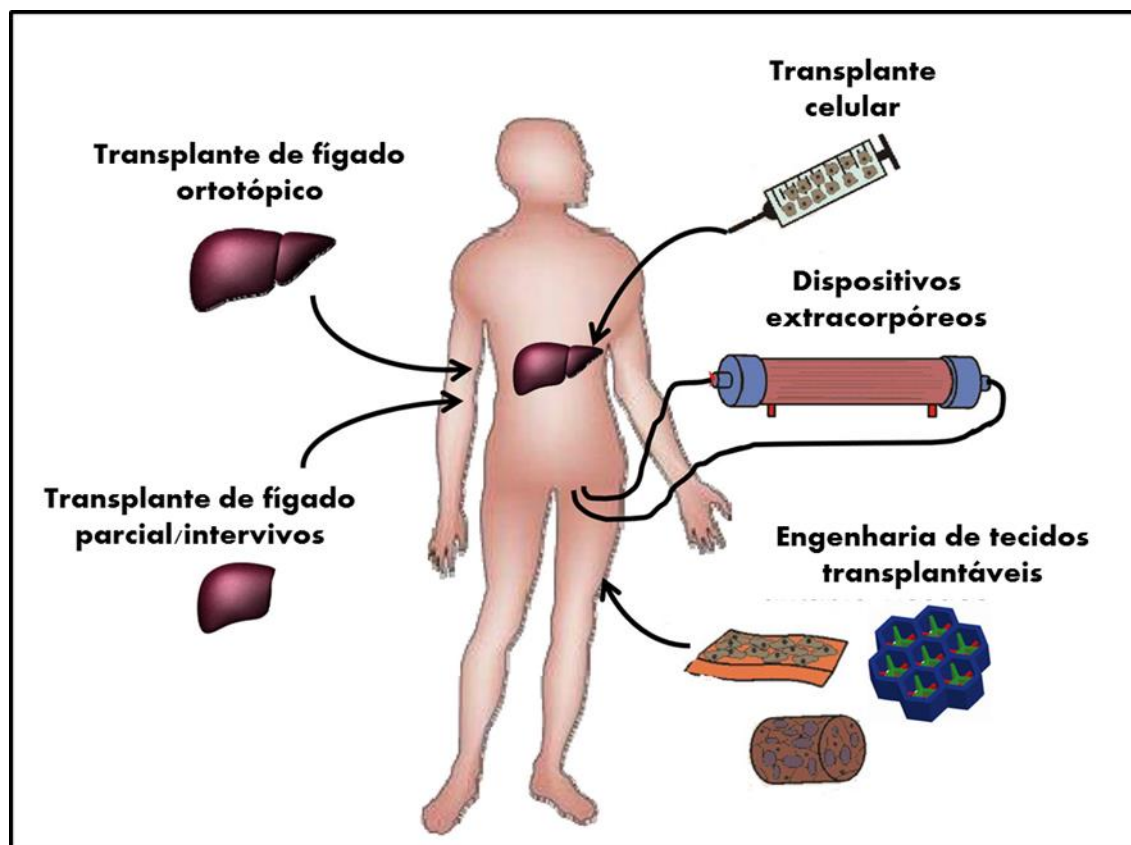


Figura 1.13. Transplante de órgãos e terapias alternativas utilizando células hepáticas. Atualmente, o transplante hepático é a única terapia demonstrada para melhorar a sobrevivência em pacientes com insuficiência hepática. Devido ao número limitado de fígados adequados para o transplante, procedimentos cirúrgicos avançados, incluindo transplantes de fígado parcial e doador parcial, foram realizados clinicamente. Além disso, uma gama diversificada de terapias baseadas em células está atualmente sendo explorada para tratar doenças do fígado e IHA. Estes incluem o transplante de várias populações de células adultas (hepatócitos primários) e derivadas de células-tronco, o desenvolvimento de dispositivos hepáticos bioartificiais extracorpóreos e a implantação de tecidos manipulados. Modificado de Bhatia *et al.* 2014.

1.5. TERAPIA CELULAR – TRANSPLANTE DE HEPATÓCITOS

Os recentes avanços na engenharia de tecidos, no transplante de células e nas tecnologias genéticas, tornam a célula viva uma importante ferramenta terapêutica no cuidado médico clínico (117). Se bem-sucedida, a longo prazo, o armazenamento de células vivas pode ser um fator crucial para o sucesso dessas abordagens emergentes. Tendo em vista as limitações dos dispositivos bioartificiais de suporte à função hepática bem como das fontes celulares alternativas aos hepatócitos primários, o transplante celular com hepatócitos primários humanos parece ser uma alternativa terapêutica promissora no

tratamento em casos de perda da função hepática (118, 119). Alguns estudos voltados para terapia celular em modelos animais de doenças hepáticas destacam a notável capacidade de regeneração dos hepatócitos *in vivo*. Logo, o transplante hepatocitário (TH) estaria desempenhando um papel importante como um mecanismo de inovação terapêutica, atuando diretamente na recuperação tecidual em casos de perda da função hepática. Dessa forma, o transplante de células do fígado seria uma alternativa associada ou, no mínimo, uma ponte para o transplante do órgão. Fato esse, que prolongaria a capacidade de sobrevivência do paciente durante a espera pela doação promovendo um grande avanço com novas perspectivas no tratamento de doenças do fígado, (117, 118, 120, 121).

Desde o desenvolvimento de técnicas para isolamento de hepatócitos individuais por digestão com colagenase (122), pesquisadores vêm investigando se o transplante de hepatócitos poderia ser usado para tratar doenças do fígado, primeiro em animais experimentais e depois em pacientes (118, 119, 123). O primeiro transplante de hepatócitos foi realizado em 1976, em modelo animal para a síndrome de Crigler-Najjar tipo I em ratos Gunn com hiperbilirrubinemia (124). As observações pré-clínicas motivaram o primeiro transplante de hepatócitos em 10 pacientes com cirrose hepática em 1992 no Japão, porém com a incerteza de resultados (125). Desde então, foram publicados relatórios de mais de 100 pacientes com doenças do fígado tratadas pelo TH em todo o mundo (126), alguns deles listados na tabela 1.2. e no artigo 1. Com isso, o TH surge como uma opção terapêutica atrativa, particularmente para deficiências metabólicas herdadas, uma vez que nesses casos há a necessidade de substituição de uma única função. Como o transplante de hepatócitos envolve classicamente a infusão simples de células isoladas no fígado através da veia porta, essa forma de terapia é muito menos invasiva do que o transplante hepático ortotópico não envolvendo uma cirurgia complexa e pode ser realizada com segurança em pacientes gravemente enfermos. O TH apresenta ainda, outras vantagens frente ao transplante do órgão inteiro (tabela 1.3): é menos dispendioso; pode ser realizado repetidamente, se necessário; células isoladas de fígados de doadores podem ser criopreservadas estando disponíveis imediatamente quando necessário; o fígado nativo permanece no local servindo como um *back-up* em caso de falha do enxerto celular e permitindo regeneração potencial em pacientes com IHA, bem

como possível alvo para futura terapia gênica em pacientes com distúrbios metabólicos hepáticos (127).

Tabela 1.2. Lista de doenças hepáticas humanas tratadas com transplante de hepatócitos.

Doença	Referências
Doenças metabólicas do fígado	
• Alfa1-antitripsina	(128)
• Síndrome de Crigler-Najjar tipo I	(129-131)
• Hipercolesterolemia familiar	(132)
• Deficiência de fator VII	(132-134)
• Doenças de armazenamento de glicogênio	(135, 136)
• Doença de Refsum Infantil	(137)
• Oxalose primária	(138)
• Fenilcetonúria	(139, 140)
• Defeitos no ciclo da uréia	(140-143)
Insuficiência hepática aguda	
• Droga	(119)
• Viral	(119)
• Idiopático	(144)
• Envenenamento por cogumelos	(145)
• Esteatose hepática aguda da gravidez	(146)

Tabela 1.3. Vantagens da terapia celular frente ao transplante de fígado

Fator	Transplante de células	Transplante de órgão
Custo	Baixo custo	Alto custo
Complexidade	Administração simples via cateteres intravasculares	Cirurgia complexa
Disponibilidade para pacientes	Disponibilidade em larga escala	Disponibilidade limitada
Invasividade	Invasividade mínima	Altamente invasivo (procedimento cirúrgico)
Ocorrência	Sessões repetidas/múltiplos destinatários	Geralmente um paciente

Na presença de uma arquitetura normal do fígado do paciente, parte da fração das células transplantadas deve atravessar o endotélio para integrar com o fígado hospedeiro, proporcionando considerável potencial restaurador (147-149). Como o fígado nativo não é removido, os hepatócitos transplantados precisam apenas substituir a atividade enzimática defeituosa ou a função suficiente para superar a disfunção hepática. Tipicamente, o número de células doadoras que podem ser seguramente transplantadas para o fígado doente a qualquer momento através da veia porta é relativamente pequeno, geralmente menos de 1% da massa hepática (150). O transplante com uma densidade celular maior leva a hipertensão portal grave ou translocação de células do fígado para a circulação sistêmica, levando à embolização de células para os pulmões. Outros locais de transplante também foram explorados em modelos animais, incluindo o mesentério, o baço, a cápsula renal e por via intraperitoneal, que permitem um volume maior de células (151). O baço, em particular, tem sido utilizado com sucesso em animais (152, 153) e no transplante em humano, podendo ser acessado por injeção direta na artéria esplênica com um cateter inserido através da artéria femoral; no entanto, em vista do número de células imunologicamente ativas localizadas no baço, a rejeição ou a destruição das células não nativas precisam ser consideradas (154). Para driblar o sistema imunológico, trabalhos na literatura têm sugerido o encapsulamento celular utilizando biopolímeros como, por exemplo, o alginato de sódio antes do implante na cavidade abdominal (155). A estrutura das microesferas formadas é porosa permitindo a transferência de substratos e proteção do sistema imunológico (156). Nesse contexto, a sobrevivência e a persistência das células nos locais ectópicos parece depender minimamente da disponibilidade de nutrientes através dos leitos vasculares locais. O esquema 1.14 representa algumas possíveis vias de administração dos hepatócitos para terapia celular.

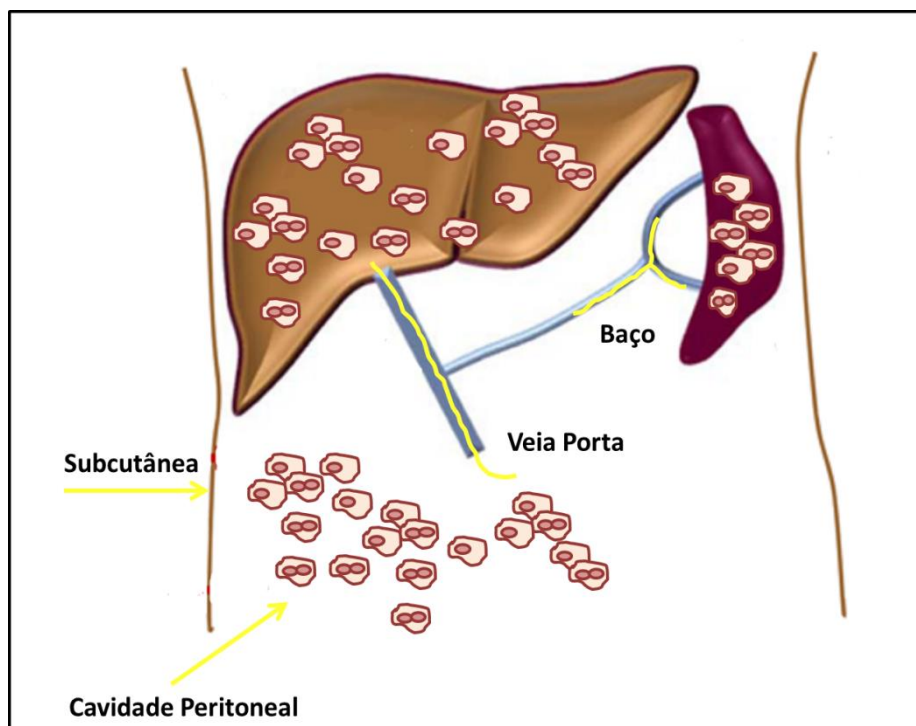


Figura 1.14. Locais para infusão de hepatócitos. Na terapia celular com hepatócitos, estudos definiram os componentes críticos para o repovoamento ótimo por células transplantadas. Tais componentes incluem seu isolamento, caracterização e armazenamento antes ao enxerto no fígado (ou locais extra-hepáticos). Isso requer uma rota ideal de transplante que possa garantir a entrega máxima de células favorecendo melhor o enxerto. Além disso, as células transplantadas devem sobreviver ao longo do tempo para conferir benefício terapêutico sendo portanto, capaz de reverter total ou parcialmente a lesão. Já foram relatados na literatura diversos locais para a infusão de células para tratar doenças do fígado tanto em modelo experimental quanto em humanos, representados em amarelo (157). Modificado de Alwahsh *et al* 2018.

Na IHA, 40% dos pacientes com sintomas avançados se recuperam espontaneamente apenas com tratamento de suporte clínico (2, 158). Como não há meios eficazes para distinguir quais os pacientes conseguirão sobreviver à perda da função hepática sem o transplante daqueles que não sobreviverão, o tratamento com hepatócitos transplantados poderia evitar a necessidade de realizar um transplante de órgão em pacientes que poderiam se recuperar espontaneamente (2).

Numerosos estudos realizados em modelos animais nos últimos 30 anos indicam que o transplante de hepatócitos adultos pode reverter a IHA é capaz de corrigir várias deficiências metabólicas do fígado (150). Embora, ensaios clínicos com transplante de hepatócitos tenham demonstrado total segurança do

procedimento a longo prazo, apenas a correção parcial do distúrbio metabólico foi alcançada. Além disso, o grau em que hepatócitos doadores restauraram a falência hepática não foi adequada para contornar a necessidade da substituição do órgão. A gravidade da disfunção hepática requer que os hepatócitos transplantados funcionem imediatamente, mas a falta de um modelo de doença clinicamente relevante significa que o número de células que precisariam enxertar para reverter imediatamente a função hepática permanece de certa forma desconhecido. Concluindo assim que, o acompanhamento de mais estudos clínicos devem ser realizados (134, 159, 160).

Muitas fontes de células hepáticas têm sido propostas e investigadas como uma alternativa aos hepatócitos humanos isolados, tais como linhagens de células tumorais de origem humana, hepatócitos humanos imortalizadas e células de fígado de porco. Cada uma dessas fontes apresenta problemas e contra indicações relativas ao seu uso clínico, tais como riscos de transmissão ou transformação neoplásica, biossegurança e biocompatibilidade de tecido animal. Idealmente, células primárias de hepatócitos humanos isoladas seriam a melhor fonte de tecido hepático para terapia celular (161, 162). As principais desvantagens são o desenvolvimento de um método padronizado de isolamento de hepatócitos que possa garantir um bom rendimento, viabilidade e funcionalidade, assim como o processo de conservação e a estocagem dessas células (63). Com o objetivo de aumentar as fontes de células primárias humanas, tem sido sugerido na literatura a utilização de órgãos rejeitados para o transplante ortotópico e de frações de órgãos remanescentes de transplantes pediátricos como uma possível solução para a escassez de células para o transplante (63, 123). A cada ano um número substancial de fígados de doadores falecidos é rejeitado para o transplante, tais causas incluem esteatose de alto grau e cirrose não viral. Estes órgãos vêm sendo alvos de estudos e fontes de grande importância para a obtenção de células de fígado para o transplante celular. Baccarani *et al*, demonstraram que hepatócitos isolados de fígados com cirrose não viral, macroesteatose e normais têm funções metabólicas comparáveis quando mantidas em cultura (63). Além disso, a análise microscópica revelou morfologia normal das células e hepatócitos formando agregados. Curiosamente, foram observadas diferenças em termos de rendimento celular, viabilidade e atividade *in vitro* entre os hepatócitos isolados de fígados com esteatose e

segmentos hepáticos normais, sugerindo que modificações no protocolo tradicional devem ser feitas para o isolamento de células a partir de fígados rejeitados. Outros estudos sugerem que células obtidas de fígados com até 40% de esteatose hepática, com tempo de isquemia inferior a 15 horas e de doadores com morte por parada cardíaca, apresentam capacidade metabólica e funcional normais e poderiam ser utilizadas para o transplante celular (163).

Recentemente, nosso grupo publicou uma revisão conceituando o transplante dominó hepatocitário, tema deste trabalho, como uma técnica para o transplante celular utilizando essas fontes que seriam descartadas. Nesse conceito, utilizamos a proposta do transplante de fígado dominó como base para a nossa ideia central. Com isso, sugerimos a utilização de órgãos inviáveis para o transplante de fígado, mas que representam grande importância para o isolamento de células viáveis. Essas células então poderiam ser criopreservadas com qualidade em bancos de células e disponibilizadas para o tratamento de diversos pacientes com doenças hepáticas agudas e metabólicas, conceito esquematizado na figura 1.15 (164).

A criopreservação dos hepatócitos representa, portanto, um passo essencial para o sucesso do transplante celular. Com isso, é possível criar bancos de células hepáticas, disponibilizando-as em grande escala para o tratamento de diversos pacientes com doenças do fígado. Essa técnica ainda enfrenta muitos obstáculos e esforços atualmente se concentram em melhorar a técnica para permitir a validação de seu uso clínico (120). Pesquisas estão em andamento para identificar maneiras de melhorar a viabilidade e a qualidade dos hepatócitos após a criopreservação (165, 166).

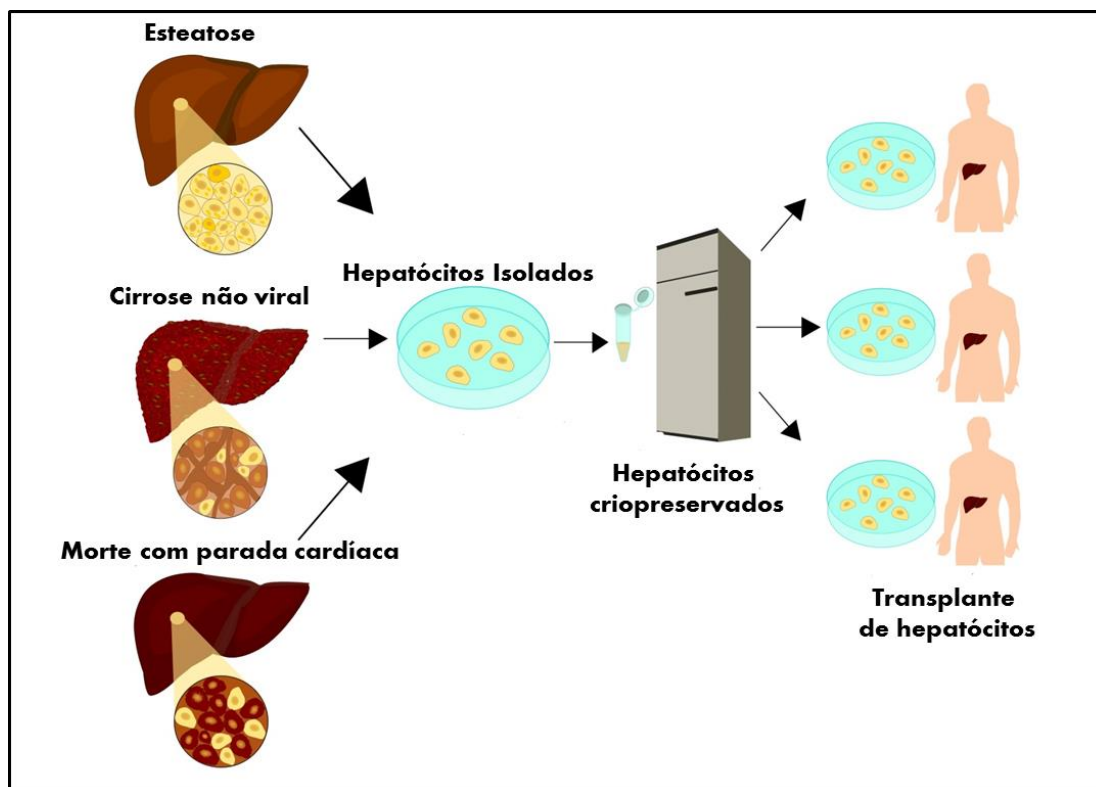


Figura 1.15. Transplante Dominó Hepatocitário (TDH). A cada ano um grande número de fígados de doadores cadavéricos são rejeitados para o transplante. As causas incluem alto grau de esteatose, cirrose não viral e morte por parada cardíaca. Esses órgãos rejeitados para transplante ortotópico são objeto de estudos e fontes de grande importância para a obtenção de células hepáticas para transplante celular. O isolamento de hepatócitos com qualidade destes órgãos associados à otimização da técnica de criopreservação permitirão o desenvolvimento de um banco de células do fígado que estarão disponíveis para tratamento de um grande número de pacientes com ALF e doenças metabólicas do fígado.

1.6. CRIOPRESERVAÇÃO

A única técnica capaz de fornecer quantidade suficiente de células que permita realizar o transplante celular para o tratamento de emergência ou programado é a criopreservação (120, 167). Contudo, a criopreservação tem efeitos prejudiciais sobre a viabilidade e função metabólica dos hepatócitos após o descongelamento o que muitas vezes inviabiliza sua utilização para uso clínico (168, 169). A criopreservação é um processo que preserva organelas, células, tecidos ou quaisquer outros materiais biológicos vivos resfriando as amostras a temperaturas muito baixas por um longo período de tempo. Esse processo consiste na capacidade de preservação do metabolismo celular, uma vez que submetidas ao armazenamento a baixas temperaturas ocorre a indução da parada da atividade enzimática, do metabolismo e da respiração celular (170).

Uma contribuição importante da criopreservação é possibilitar a conservação de materiais biológicos, permitindo a criação de bancos de células e de tecidos congelados, que possam ter ampla aplicação em estudos científicos, além de aplicações clínicas (120, 171). Diversas células de mamíferos, incluindo camundongos, bovinos, suínos e humanos, não podem ser armazenadas simplesmente por resfriamento ou congelamento por um longo período sem um componente que possa minimizar os efeitos deletérios do congelamento e descongelamento (172). Isso porque a formação de cristais de gelo, choque osmótico e danos na membrana durante o congelamento e descongelamento levam à morte celular. O maior obstáculo para as células superarem as baixas temperaturas é a transição de fase água-gelo (170, 173). Durante o processo de criopreservação, a temperatura vai de 37°C a -196°C. Em temperaturas inferiores a -0.6°C, a água biológica, sob condições isotônicas, torna-se termodinamicamente instável, favorecendo o estado cristalino. Devido à grande concentração de água nos sistemas biológicos, cerca de 80%, a fase de transição água-gelo em biomateriais é um fenômeno de importância crítica na criopreservação (170, 174). Durante o congelamento, as células podem perder até 95% de água e a concentração de eletrólitos dentro e fora da célula pode aumentar em muitas ordens de grandeza em relação às condições isotônicas (174).

Todas as células apresentam limites para a sua estabilidade em meios anisotônicos. A exposição excessiva a um meio hiperosmótico pode causar alterações na permeabilidade, na integridade e na função da membrana. Em alguns casos, pode resultar na extrusão de componentes da membrana. Provavelmente, a forma mais comum de danos hiperosmóticos resulta da difusão através da membrana celular de solutos conhecidos como não penetrantes. Da mesma forma, cada tipo celular também apresenta um limite distinto de inchaço quando exposto a uma suspensão hiposmótica, seja por ruptura física, seja pela perda de solutos intracelulares. Além das características do meio, a temperatura da suspensão celular também é importante, podendo retardar ou acelerar a movimentação de água e eletrólitos entre a célula e o meio que a envolve (175). Dessa forma, a taxa de velocidade do congelamento também é de grande importância no processo de criopreservação e pode levar à perda da viabilidade e consequentemente a morte celular. Durante o congelamento, a temperatura

declina e a água do meio se cristaliza, promovendo o aumento da concentração de solutos extracelulares como consequência das alterações osmóticas. Dessa forma, quando a velocidade de congelamento é lenta, a célula sofre desidratação. Porém, quando essa velocidade é rápida, a célula não perde água o suficiente, ocorrendo formação de gelo intracelular, que promove danos mecânicos, podendo determinar a morte celular, como ilustrado na figura 1.16 (175, 176).

Como resultado dos danos causados pelos efeitos da solução, as células de mamíferos, independente do grau de desidratação, não sobrevivem a resfriamentos abaixo de -20°C , a não ser que se utilize um agente crioprotetor (ACP) (177). De acordo com Mazur *et al* 1970, ao adicionar um agente crioprotetor ao meio de congelamento, para temperaturas em torno de -5°C , tanto as células como o meio circundante permanecem descongelados. Esse efeito é causado pelo super-resfriamento decorrente da redução do ponto de congelamento da solução provocado pela adição de substâncias crioprotetoras à suspensão celular (173). Os ACPs promovem a diminuição do ponto de congelamento do meio, conferindo um período maior para remoção da água intracelular durante o resfriamento prévio ao congelamento da água, auxiliando no equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, no processo de nucleação e crescimento de cristais de gelo, bem como a proteção à membrana plasmática quando expostas a baixas temperaturas (178). E com isso, evitar as reações físico-químicas e biofísicas que alteram a taxa de sobrevivência das células durante a criopreservação (176). Entretanto, além das criolesões que ocorrem durante o processo de congelamento, a citotoxicidade tempo-dependente do ACP contribui para os danos celulares durante e após a criopreservação. Após o descongelamento, a remoção do crioprotetor do interior da célula deve ser realizada de forma lenta, através de sua diluição. Uma vez que a reentrada brusca de água no meio intracelular, também leva à lise das membranas (179). Alguns desses ACPs estão listados na tabela 1.4. bem como sua aplicação (172).

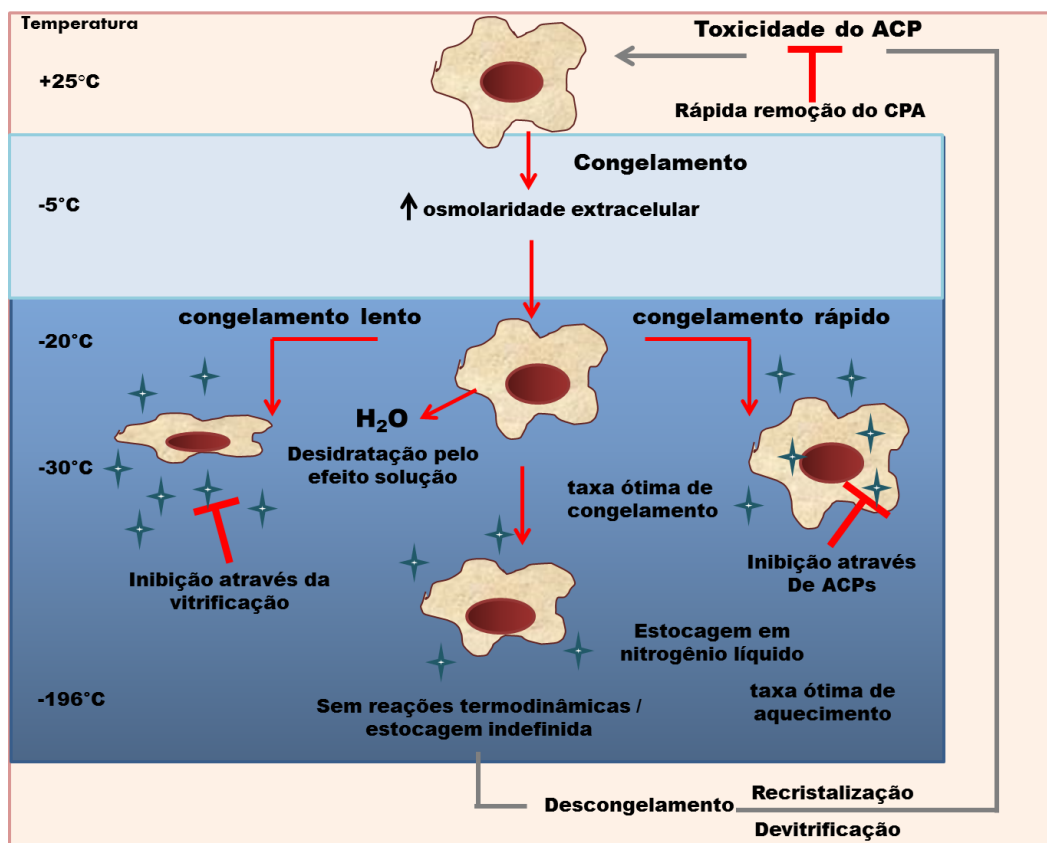


Figura 1.16. Etapas de criopreservação celular. Quando as células são criopreservadas por congelamento, o gelo se forma inicialmente no meio extracelular e as células podem sofrer desidratação intracelular dependente da taxa de resfriamento devido à desidratação osmótica. Quanto mais lenta a taxa de resfriamento, a água intracelular tende a sair da célula por osmose devido à crescente osmolaridade do ambiente extracelular, fenômeno que podemos chamar de “efeito solução”. Quando o congelamento ocorre de forma rápida, a célula não perde água suficiente para o meio externo. Dessa forma, cristais intracelulares são formados gerando lesão mecânica à membrana celular, a formação de gelo intracelular geralmente leva à morte celular ao reaquecer. A viabilidade celular máxima é geralmente obtida com taxa de resfriamento intermediário que equilibra a desidratação osmótica e o risco de formação de gelo intracelular. Os efeitos deletérios da criopreservação podem ser evitados ao se adicionar um agente crioprotetor ao meio de criopreservação. O descongelamento da suspensão celular deve ser realizado de forma rápida para evitar a exposição das células à toxicidade dos crioprotetores.

Em 1949, Polge e colaboradores reportaram, pela primeira vez, a utilização de um ACP, utilizando o glicerol para a preservação de espermatozóides de aves (180). Um ano depois, Smith *et al*, ampliaram o sucesso do uso do glicerol como agente crioprotetor em hemácias (176). A partir de então ficou claro a necessidade de utilizar um ACP como mecanismo para minimizar os efeitos do congelamento. O glicerol também se mostrou eficaz para a criopreservação de plaquetas, sendo este um desafio particular devido à sua limitada tolerância ao estresse osmótico. Essa substância não apresenta toxicidade para a maioria das

células, e mesmo em concentrações muito elevadas, apresenta grande vantagem como ACP. Além disso, essa molécula é capaz de diminuir a desnaturação das proteínas expostas a baixas temperaturas. Contudo, a sua capacidade de penetração nas células ocorre lentamente, o que constitui uma limitação para sua utilização na criopreservação de diversos tipos celulares. Dessa forma, em alguns casos, pode ser impraticável como crioprotetor (175).

Dez anos após o relato das propriedades crioprotetoras do glicerol, Lovelock e Bishop demonstraram que a substância dimetilsulfóxido (DMSO) era eficaz na criopreservação de esperma bovino e atualmente é o crioprotetor mais usado no processo de congelamento de diversos tipos celulares (178, 181, 182). O DMSO é um composto higroscópico polar desenvolvido originalmente como solvente para produtos químicos. Trata-se de uma substância de baixo peso molecular, composta por um grupo sulfóxido, que é hidrofílico, e dois grupos metila, que são hidrofóbicos. O DMSO é convertido em dimetilsulfona e dimetilsulfeto, eliminados por via renal e exalado pelos pulmões, respectivamente. Sua meia-vida é de aproximadamente 20 horas. A dimetilsulfona tem meia-vida de 72 horas e o dimetilsulfeto é expirado em aproximadamente 24 horas, o que confere odor característico ao hálito de pacientes após a infusão de células hematopóéticas progenitoreas criopreservadas em DMSO (183). A função desse agente parece ser essencialmente coligativa, ou seja, de “captura” das moléculas de água livre, o que leva à redução da formação de gelo, à diminuição da temperatura do ponto de congelamento e ao aumento do ponto de vitrificação. Essa substância penetra em tecidos e células numa velocidade maior que a do glicerol à temperatura ambiente, o que constitui vantagem significativa. No entanto, o DMSO apresenta certa toxicidade quando a essa temperatura (174, 175, 183). Classicamente, a concentração final em soluções de criopreservação pode variar de 10 % a 20% de DMSO e níveis mais altos são potencialmente tóxicos (120).

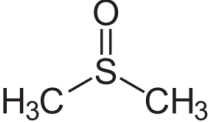
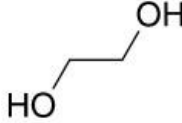
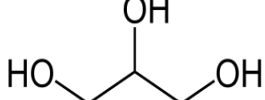
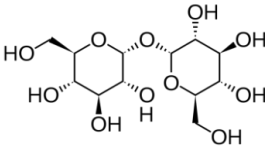
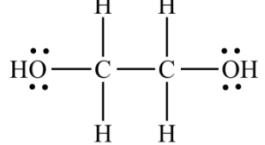
As características fundamentais para um ACP eficiente são o baixo peso molecular, a alta capacidade de atravessar a membrana celular e uma baixa toxicidade. Em geral, agentes com rápida capacidade de penetração são mais favoráveis, porque o tempo de exposição ao crioprotetor antes do rápido resfriamento é curto, prevenindo assim, os danos (174). Os ACP são divididos em duas categorias: (A) intracelulares, que são solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento e o aquecimento.

Essas correspondem a pequenas moléculas que penetram pela membrana celular, formam pontes de hidrogênio com moléculas de água intracelulares e diminuem a temperatura de congelamento, prevenindo a formação de cristais de gelo. Os mais utilizados são o etilenoglicol, o DMSO, o glicerol, o propilenoglicol, o etanol, entre outros (184); (B) extracelulares, que são as macromoléculas e os açúcares cuja função é reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular. Os mais utilizados são a lactose, a glicose, a sacarose, a polivinilpirrolidona (PVP), o manitol, a trealose, entre outros (176, 185).

Cabe ressaltar que para alcançar a melhor taxa de sobrevivência de células e tecidos após o descongelamento, o volume da amostra, a taxa de resfriamento, a taxa de aquecimento e as concentrações de ACP devem ser otimizadas, dependendo dos diferentes tipos de células e dos tecidos (186).

Uma alternativa ao resfriamento convencional já citado anteriormente (lento ou rápido) é a vitrificação. Os métodos de vitrificação incorporam crioprotetores em concentrações suficientemente altas para evitar a cristalização do gelo. Esse método de congelamento forma um sistema vítreo definido pela alta viscosidade da solução, evitando assim os efeitos prejudiciais causados pelo resfriamento convencional (170). No entanto, a vitrificação também pode impor consequências prejudiciais às células, uma vez que as concentrações de crioprotetores necessárias para vitrificar as células com taxas de resfriamento mais baixas são potencialmente altas. Isso é necessário para que o crioprotetor possa ter acesso a todas as partes do sistema. Embora essas concentrações possam ser reduzidas a níveis não-tóxicos, se as células forem resfriadas com ultra-rapidez, o sistema metaestável resultante pode levar a danos por desvitrificação e crescimento de gelo durante o armazenamento subsequente e o reaquecimento se não for manuseado apropriadamente (187).

Tabela 1.4. Alguns exemplos de ACP comumente usados e suas aplicações.

AGENTE CRIOPROTETOR	PERMEAVEL À MEMBRANA	ESTRUTURA QUÍMICA	ALGUMAS APLICAÇÕES NA CRIOPRESERVAÇÃO
			Tecido Adiposo (188) Líquido amniótico e cordão umbilical (188)
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sim		Medula óssea (188) Embriões (combinado com EG ou propilenoglicol) (189) Células-tronco embrionárias (isoladas ou combinadas com o EG) (184, 188) Hepatócitos (166) Microorganismos (190) Oócitos (combinado com EG) (184) Plaquetas (191)
Etilenoglicol (EG)	Sim		Líquido amniótico (188) Polpa dentária (188)
Glicerol	Sim		Flúido amniótico (188) Microorganismos (190) Glóbulos vermelhos (184, 192) Espermatozoides (193)
Trealose	Não		Embriões (184) Células-tronco (194) Tecido ovariano (192) Glóbulos vermelhos (192) Espermatozoides (193) Células-tronco (combinadas com propilenoglicol) (184) Hepatócitos (166)
Propilenoglicol (1,2-propanodiol)	Sim		Embriões (195, 196) Hepatócitos (197)

1.6.1. Animais tolerantes ao congelamento

Embora muitos tipos de células isoladas de mamíferos e de pequenos agregados de células possam ser congelados, seguindo protocolos já publicados e obtendo resultados reprodutíveis, este procedimento ainda é objeto de uma investigação aprofundada que tem como base nossa atual compreensão da química, física, biologia celular e toxicologia da criobiologia (170, 172, 174, 178, 198). Entretanto, um episódio extremamente importante e semelhante ao processo de criopreservação ocorre em diversos animais na natureza e desperta

atualmente um grande interesse de aplicação ao processo de congelamento celular e até mesmo para a preservação de órgãos (199, 200). Essa estratégia envolve algumas adaptações naturais de tolerância ao congelamento que diversos organismos desenvolvem quando submetidos a temperaturas extremamente baixas. Tais indivíduos, como alguns artrópodes, peixes, anfíbios, répteis e insetos apresentam mecanismos de sobrevivência em condições ambientais extremas (201-204) como demonstrado na tabela 1.5. No geral, a tolerância natural ao congelamento refere-se à capacidade de suportar o congelamento do fluido extracelular e poder “reviver” após dias ou semanas com aproximadamente 65% da água corporal em forma de gelo. Valores superiores a esse parecem exercer um estresse de desidratação muito grande nas células, promovendo danos irreparáveis às bicamadas lipídicas nas membranas e organelas celulares (205). A formação de gelo intracelular é tão maciçamente destrutiva para a organização celular que é letal para todos os animais (206, 207). Assim, a tolerância ao congelamento envolve a regulação da formação de gelo extracelular acoplado a mecanismos que protegem e estabilizam o ambiente intracelular contra o estresse da desidratação e da isquemia que acompanham o congelamento (207).

Tais adaptações podem incluir uma alta concentração de polióis (particularmente glicerol e glicose), dissacarídeos (particularmente trealose e sacarose) e compostos anticongelantes em órgãos centrais e no sangue (208, 209). Existem vários tipos de anticongelantes biológicos na natureza. As proteínas anticongelantes (PACs) inibem a cristalização em animais e evitam o congelamento e são agrupados em duas categorias distintas de substâncias: proteínas anticongelantes (PACs) e glicoproteínas anticongelantes (GPACs). Quando os primeiros cristais de gelo começam a se formar dentro de alguns animais, essas proteínas rapidamente se ligam aos primeiros cristais, impedindo a adição de mais moléculas de água ao cristal de gelo em formação. Muitos artrópodes terrestres, incluindo aranhas e insetos, possuem proteínas anticongelantes potentes o suficiente para impedir a formação de cristais de gelo em temperaturas abaixo de -15°C (207).

As adaptações que preservam a vida a temperaturas abaixo de zero, para esses animais, ilustram os princípios da criopreservação de órgãos de vertebrados e podem ter aplicações importantes no desenvolvimento de

tecnologia para o congelamento de células e de órgãos humanos transplantáveis. A tabela 1.6, ilustra alguns exemplos de animais que desenvolvem essa estratégia adaptativa quando submetidos à baixas temperaturas. Diversos trabalhos na área de criobiologia vêm adicionando esses compostos nos meios de criopreservação de células e tecidos visando minimizar a perda metabólica, funcional e da viabilidade pós-descongelamento. Dessa forma, cabe investigar a participação dos açúcares envolvidos no mecanismo de tolerância ao congelamento em animais no processo de criopreservação de hepatócitos isolados de órgãos rejeitados para o transplante, visto a sua sensibilidade ao congelamento.

Tabela 1.5. : Estratégia de tolerância ao congelamento desenvolvida por algumas espécies de animais.

Grupo de Animais	Estratégia Química	Referências
Artrópodes	Glicerol, Sorbitol, Trealose Glicose, Sacarose	(208, 210-212)
Anfíbios	Glicose, Glicerol Glicerol+ glucose, Polietilenoglicol	(206, 211)
Peixes	Trealose e Glicose	(203, 213)
Répteis	Sacarose, Glicose e lactato	(214, 215)











	Clássico	Novas abordagens							Clássico	
	Hipotermia	preservação abaixo de zero				Vitrificação			Vitrificação	Criopreservação
	estocagem a frio	super-resfriamento	congelamento parcial	equilíbrio sem congelamento	resfriamento isocórico	vitrificação isocórica	vitrificação e nano aquecimento	nanotecnologia	Vitrificação tradicional	criopreservação clássica (congelamento)
Inspiração na natureza	 LÊMURE (vertebrado e invertebrado)	 JACARÉ (vertebrado e invertebrado)	 SAPO (vertebrado e invertebrado)	 ESQUILO	 GOLFINHO (e animais marinhos abissais)	 GASES DE LUAS GIGANTES (animais marinhos abissais)	 ELETRO-MAGNÉTICO	 SANGUE	 BESOURO (larva de besouro do Alasca)	 SANGUESSUGA
Descrição	estocagem estática e perfusão em solução fria	armazenamento abaixo do ponto de congelamento, s/ formação de gelo	armazenamento abaixo do ponto de congelamento, controle do gelo	armazenamento acima do ponto de congelamento, s/ formação de gelo	pressão em volume constante evita a formação de gelo	volume constante previne a formação de gelo por congelamento vítrio	rápido aquecimento c/ nanopartículas biocompatíveis p/ prevenir a formação de gelo	controle da viscosidade previne a formação de gelo	congelamento rápido formação de um estado vítrio	armazenamento abaixo do ponto de congelamento; formação de gelo
Variação de temperatura	+4°C a 8 °C	-4°C a -6 °C	-5°C a -20°C	-5°C a -20°C	-5°C a -30°C	-80°C a -196°C	-120°C a -196°C		-120°C a -196°C	
Estado termodinâmico	equilíbrio	sem equilíbrio	equilíbrio			equilíbrio	sem equilíbrio	pseudo equilíbrio	sem equilíbrio	equilíbrio
Tempo de estocagem	horas	dias	dias, semanas e meses			anos e décadas			anos e décadas	
Principais vantagens	métodos simples, estabelecimento clínico, baixo custo	sem danos causados pelo gelo; armazenamento prolongado	CPA menos tóxicos e armazenamento prolongado	sem danos causados pelo gelo; armazenamento prolongado	baixo custo, praticidade redução da toxicidade do CPA	CPA menos tóxicos e estocagem indefinida	CPA menos tóxicos e estocagem indefinida	CPA menos tóxicos e estocagem indefinida	sem danos causados pelo gelo, estocagem indefinida	simples, baixa concentração de CPA estocagem indefinida
Principais desvantagens	duração limitada de armazenamento	potencialmente instável	suscetível a danos pela formação de gelo	dificuldade técnica	questões técnicas não definidas	questões técnicas não definidas	dificuldade técnica	dificuldade técnica	toxicidade do CPA instabilidade devitrificação e formação de gelo	estresse térmico danos pela formação de gelo e recristalização

Tabela 1.6. Novas abordagens inspiradas na natureza e de bioengenharia para a criopreservação em comparação com os métodos clássicos. Figura modificada de Michael J. Taylor e colaboradores 2019.

1.6.2. Obtenção e Criopreservação de Hepatócitos

Células hepáticas isoladas (principalmente hepatócitos) encontraram importantes aplicações na ciência e na medicina nos últimos 40 anos em uma ampla gama de áreas, incluindo estudos fisiológicos, investigações sobre o metabolismo do fígado, preservação de órgãos, desintoxicação de drogas e transplantes celulares experimentais e clínicos (197). A maior limitação para a aplicação clínica do transplante de hepatócitos é a disponibilidade em quantidade e qualidade dos hepatócitos isolados. Essa limitação envolve desde fatores técnicos de obtenção das células a partir de fontes hepáticas até a consequente preservação e estocagem em grande escala. A obtenção dos hepatócitos a partir de fígados humanos rejeitados para o transplante pode representar perda na qualidade e viabilidade celular, densidade e funcionalidade das células após o isolamento (127, 216). Dessa forma, o estado inicial dos hepatócitos isolados pode desempenhar um papel significativo em suas respostas às etapas de criopreservação (197). O isolamento de hepatócitos a partir do tecido hepático é

realizado por digestão enzimática utilizando colagenase, enzimas recombinantes ou tripsina para dissociação celular que irá desintegrar a matriz extracelular (fibronectina, laminina e colágeno), seguido por digestão mecânica, filtração e centrifugação a baixa velocidade. Esse conjunto de etapas por si só pode influenciar diretamente na qualidade das células isoladas para o transplante que podem ter um impacto negativo sobre a viabilidade e função celular (127, 217). Para minimizar os danos pós-isolamento celular, alguns trabalhos sugerem um curto período de pré-incubação dos hepatócitos, com meios de cultura suplementados, antes da criopreservação. Essa etapa adicional poderia oferecer às células tempo para se recuperar do “trauma” celular causado pelo procedimento de isolamento (218). Darr and Hubel, investigaram se a pré-cultura dos hepatócitos antes da criopreservação poderia melhorar a viabilidade de hepatócitos de porco após o descongelamento. Nesse trabalho, os autores relataram que 24 horas de pré-cultura a 37°C proporcionou maior produção de albumina após a criopreservação em comparação às células sem ou após 48 horas de pré-cultura (219). Além disso, outros estudos descrevem a importância de adicionar alguns compostos, tais como antioxidantes, glicose e frutose, ao meio de pré-cultura, visando garantir maior viabilidade e funcionalidade dos hepatócitos (220, 221).

Algumas medidas para melhorar viabilidade e funcionalidade das células obtidas de fígados esteatóticos já são realizadas. A adição do antioxidante N-acetilcisteína à solução de perfusão ao isolar hepatócitos do fígado gorduroso apresentou uma melhoria significativa na viabilidade celular e função metabólica (132). Com isso, esse procedimento agora é usado rotineiramente para o isolamento de hepatócitos para uso clínico. Se considerado seguro, esses hepatócitos poderiam ser uma fonte adicional para transplante de células. Além disso, existem fatores capazes de influenciar a viabilidade celular durante o processo de isolamento das células não publicados na literatura. O nosso grupo vem trabalhando na linha de pesquisa com modelos experimentais de terapia celular para doenças do fígado e essa experiência nos permitiu observar fatores técnicos importantes durante o isolamento de hepatócitos, fatores esses capazes de influenciar diretamente na viabilidade e qualidade das células após o isolamento. Tais fatores incluem: a composição do material plástico da borracha de perfusão; a velocidade de perfusão das soluções; a pressão exercida pelo

fluxo das soluções; o tempo de perfusão; e não somente a espécie animal como também o tamanho do fígado a ser perfundido e a concentração da enzima.

O próximo passo de suma importância após a obtenção das células isoladas é a capacidade de armazenamento e estocagem dos hepatócitos seja para períodos curtos ou longos (197). Fator esse que permitiria o acesso dos pacientes à terapia de emergência ou programada, podendo ser realizada repetidas vezes. Com isso, problemas com a disponibilidade limitada de hepatócitos humanos para o transplante celular poderiam ser superados utilizando-se técnicas eficientes de criopreservação. Dessa forma, permitindo o desenvolvimento de bancos de células hepáticas capazes de fornecer células de qualidade após o descongelamento. Nesse contexto, essas duas etapas se executadas com sucesso, podem garantir os avanços na prática clínica do transplante de hepatócitos e assim, salvar vidas. Entretanto, diversos grupos no mundo vêm trabalhando para desenvolver mecanismos que possam melhorar significativamente as tecnologias de obtenção e estocagem dos hepatócitos isolados. Embora o progresso tenha sido relatado, os dados ainda são controversos e insatisfatórios deixando, claro a grande necessidade de melhorar os processos e desenvolver um protocolo de criopreservação de hepatócitos universalmente aceito (63, 118, 123, 159, 163).

O trabalho inicial com criopreservação de hepatócitos isolados foi relatado por Le Cam e colaboradores em meados da década de 1970 (222) utilizando fígado de rato como a fonte celular mais facilmente disponível. Esse trabalho utilizou como ACP, o DMSO e concentrações de até 1,5 M foram testadas. Desde então, foram reconhecidos problemas com a toxicidade do crioprotetor dependente da concentração e da exposição a temperaturas acima de 4°C. O autor também avaliou a taxa de resfriamento ideal para hepatócitos de rato antes da transferência e estocagem em nitrogênio líquido (-196°C). As taxas de resfriamento variaram entre 2°C/min e -100°C/min, até atingir a temperatura de -100°C e o descongelamento foi realizado de forma rápida em banho-maria a 37°C. As melhores taxas de recuperação celular foram observadas quando as taxas de resfriamento estavam na faixa de -2°C a -7°C/min, com viabilidade por exclusão do azul de trypan em torno de 80%. No entanto, a função celular, avaliada pelos mecanismos da gliconeogênese foi comprometida em torno de 50% (222). Estudos posteriores, utilizando DMSO relataram que esse ACP

apresenta um potencial crioprotetor superior quando comparado ao glicerol ou metanol após a criopreservação de hepatócitos de rato (197, 223, 224). Nesse caso, utilizando o congelamento lento e taxas de resfriamento ideais descritas entre -1°C e $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, onde também foram observadas quedas nas taxas metabólicas. Entretanto, essa perda no metabolismo não foi observada após a adição de um segundo crioprotetor não penetrante, nesse caso glicose, quando adicionado ao meio de congelamento (225).

Paralelamente aos estudos sobre hepatócitos de roedores, métodos que pudessem permitir uma boa recuperação na viabilidade e na função celular de hepatócitos de espécies animais maiores e de fígados humanos foram investigados. Igualmente aos achados anteriores, o DMSO mostrou um desempenho superior a outros crioprotetores, incluindo glicerol, após resfriamento lento e descongelamento rápido (167, 223, 226, 227). Embora, hepatócitos humanos pós-descongelamento tenham apresentado uma boa recuperação da morfologia ultraestrutural, diversos trabalhos descrevem quedas na viabilidade de até 40% e perdas metabólicas significativas quando comparadas às células recém-isoladas (163, 169). Atualmente, sugere-se uma taxa de resfriamento lento ideal para hepatócitos humanos de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até -80°C , utilizando equipamentos de baixo custo à base de isopropanol e em seguida estocagem em nitrogênio líquido por tempo indeterminado (168, 228, 229). Com o advento dos freezers de taxa controlada, protocolos mais específicos de congelamento foram possíveis. A diminuição da temperatura de $-1,9^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingir temperatura entre -4 e -30°C e depois a diminuição de $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ com a variação da temperatura entre -30°C e -150°C são realizados por diversos autores (165, 230-232). Porém, o alto custo desses freezers especializados pode tornar o congelamento um procedimento impraticável em muitos centros de tratamento utilizando células, principalmente para o sistema público (169).

A densidade celular de congelamento também parece refletir sobre a viabilidade dos hepatócitos após o congelamento e tem sido amplamente discutida. Há um consenso de que concentrações até 10^7 células/ml parecem ser ideais e capazes de minimizar os efeitos provocados pelo congelamento. Isso porque trabalhos que testaram densidades superiores a 10^7 células/ml relataram queda na viabilidade de forma densidade dependente sugerindo que provavelmente o contato membrana-membrana entre os hepatócitos durante o

congelamento leva a danos mais sérios (233, 234). Os principais fatores que foram determinados na tentativa de estabelecer um protocolo bem sucedido são: taxa de resfriamento, densidade de hepatócitos, tipo e concentração do crioprotetor e temperatura final de congelamento e descongelamento (155, 229).

Os hepatócitos são altamente sensíveis ao processo de congelamento, apresentando uma redução significativa na viabilidade celular pós-descongelamento. Além disso, são descritos efeitos prejudiciais da criopreservação na estrutura e função metabólica dos hepatócitos, incluindo a adesão celular, que é de suma importância para o repovoamento do enxerto após o transplante hepatocitário (197). Esses fatores permitem dar continuidade a vários trabalhos na área da criopreservação de hepatócitos para terapia celular em busca de condições ótimas de congelamento (120, 168). Alguns estudos descrevem que após a criopreservação de hepatócitos são observados três tipos principais de danos. O primeiro, a ruptura física da célula, resultante da formação de cristais de gelo intracelular (173, 181, 235); em segundo, necrose, decorrente do inchaço celular, perda de integridade de membrana e fragmentação aleatória do DNA por endonucleases celulares e liberação de citocinas (236); e por último, apoptose, que foi identificada como uma das principais causas de morte celular induzida pela criopreservação em hepatócitos (237). Tal mecanismo foi observado após danos às mitocôndrias, incluindo perda de integridade da membrana mitocondrial com consequente liberação de citocromo c, e é sabido que este tipo de dano está relacionado com os eventos iniciais da apoptose (238). Entretanto, tanto a apoptose quanto a necrose parecem ser eventos responsáveis pela diminuição da viabilidade e da funcionalidade de hepatócitos criopreservados (168, 239).

A maioria dos protocolos de criopreservação de células hepáticas baseia-se na combinação do crioprotetor DMSO em diferentes concentrações de 5 a 20%, suplementados com soro fetal bovino (SFB), variando de 0 a 90% (226). As funções do DMSO na solução de criopreservação são para proteger as células da desidratação excessiva durante o processo de congelamento e para inibir a formação de gelo intracelular, como já descrito anteriormente (181). Presumivelmente, o SFB protege as células de lesões induzidas pela geração de radicais livres de oxigênio durante o ciclo de congelamento (240). O meio de suspensão celular parece ter menor influência sobre a viabilidade dos hepatócitos

durante a criopreservação (226). Diversos meios de suspensão em diferentes concentrações variando até 95% são utilizados para criopreservar essas células, dentre eles estão: Meio William's; Meio Opti-MEM I; Meio 199; Meio Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM); Meio RPMi; Solução Histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) e Solução da Universidade de Wisconsin (UW). Essa última solução, uma solução do tipo "intracelular", inicialmente desenvolvida para o armazenamento de órgãos para o transplante, contém um componente impermeável, o ânion lactobionato (100 mM) e o sacarídeo impermeável rafinose (30 mM) e é considerada por alguns autores como o "padrão ouro" para criopreservação de hepatócitos (241). Entretanto, a utilização da solução de UW é limitada pelo custo extremamente alto. Porém, outros trabalhos descrevem que não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações e os tipos de meio utilizados após a criopreservação dos hepatócitos isolados (166, 226, 242-246).

Com o objetivo de desenvolver um protocolo padronizado de criopreservação de hepatócitos, a estratégia de tolerância ao congelamento observada em animais vem sendo amplamente utilizada. Com isso, tem sido relatado a adição de diferentes sacarídeos e dissacarídeos, especialmente trealose, aos meios de congelamento. Logo, de acordo com a literatura, essa estratégia tem sido capaz de melhorar a taxa de adesão celular, o metabolismo e aumentar a viabilidade dos hepatócitos de rato e humano através da estabilização das membranas celulares e proteínas durante os procedimentos de congelamento em combinação com o DMSO (247, 248). O maior objetivo ao adicionar esses ACPs, considerados naturais, é a possibilidade de redução da concentração de crioprotetores considerados tóxicos, particularmente o DMSO, à solução de criopreservação. Isso porque embora o DMSO pareça ser um ACP essencial à manutenção da viabilidade, não somente para hepatócitos, mas também para outros tipos celulares, sua toxicidade à temperatura ambiente, sendo a 25 °C para hepatócito de ratos, bem como seus efeitos colaterais em humanos já são descritos. Alguns trabalhos utilizando a infusão de células tronco hematopoéticas criopreservadas em DMSO descrevem diversos efeitos colaterais associados a esse crioprotetor, após os pacientes serem submetidos ao transplante celular. Tais efeitos envolvem sedação, vômito, hipertensão, bradicardia, hemólise intravascular, choque anafilático e hiperosmolalidade. Além disso, sabe-se que

esses efeitos são mais evidentes em crianças, devido ao baixo peso corporal associado ao potencial tóxico dose dependente (182, 249).

Dentre os açúcares utilizados em combinação com uma solução padrão de DMSO a 10%, o dissacarídeo trealose, vem demonstrando efeitos positivos na qualidade não apenas de hepatócitos (166), mas também em vários tipos de células, como espermatozóides (250), oócitos humanos (185) e eritrócitos (251). Para hepatócitos humanos ficou claro que a combinação desses dois ACP, proporcionaram um aumento significativo na viabilidade, produção de albumina e ureia, bem como o metabolismo de xenobióticos dependente do citocromo P 450 (CYP) e eficiência de adesão celular após o descongelamento (251, 252).

Apesar do grande número de artigos dedicados a esse assunto, a tarefa de manter os altos níveis da capacidade funcional e metabólica bem como a viabilidade em hepatócitos criopreservados ainda é uma questão indefinida. O que reforça a necessidade de manter e ampliar os estudos na área de criobiologia de hepatócitos. Uma abordagem alternativa ou complementar bastante interessante que vem sendo utilizada atualmente associada á diversas áreas da saúde, e poderia auxiliar nos avanços dos estudos de protocolos de congelamento celular, é a utilização da inteligência artificial. Com isso, seria possível testar diversos protocolos com variações na concentração de cada ACP, temperaturas de congelamento entre outras variáveis que podem afetar diretamente a viabilidade celular. Assim, economizar tempo e recursos gastos em experimentos e ser capaz de desenvolver e otimizar protocolos de criopreservação e testá-los na bancada. Esse procedimento se torna uma inovação tecnológica importante na área e é fundamental para a aplicação clínica e criação de bancos de células do fígado que possam ser usadas com segurança no tratamento ao paciente com doenças hepáticas agudas.

1.7. INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL: *MACHINE LEARNING*, *DEEP LEARNING* E SUAS APLICAÇÕES NA ÁREA DA SAÚDE

A inteligência Artificial (IA) tem sido parte da nossa imaginação há muitos anos já que está presente em muitas obras de ficção científica, porém, parecia muito distante da nossa realidade. Entretanto, ficou visível que o interesse pela IA

explodiu na última década e vemos uma interação cada vez maior das aplicações de computador com os seres humanos. Sistemas de recomendação, marcação em fotos de redes sociais, assistentes pessoais ativados por voz, carros autônomos, smartphones com reconhecimento facial e muito mais. Com isso, a IA associada á outras tecnologias vem sendo considerada um grande marco da quarta Revolução industrial (253).

A inteligência artificial (do inglês, *Artificial intelligence* - AI) pode ser definida como parte da ciência da computação capaz de executar, normalmente, tarefas que são atribuídas à inteligência humana. Tais tarefas incluem executar funções cognitivas, como a resolução de problemas, a percepção visual, o reconhecimento da fala, a tomada de decisões e a tradução de linguagem (254). Ainda, podemos entender de forma simples que a inteligência artificial é um termo amplo que engloba a capacidade de um programa de computador ou de uma máquina de pensar e aprender. Sendo assim, um campo de estudo que tenta fazer computadores "Inteligentes". E "inteligência" pode ser desde escolher uma melhor rota (como o Google Maps faz) até dirigir um carro autônomo nessa rota (como a Tesla faz, carros fornecidos de fábrica com hardware avançado capaz de fornecer recursos de piloto automático (255). Ou seja, qualquer sistema que consiga tomar uma decisão. Em alguns casos, esses "computadores inteligentes" foram capazes de superar o potencial humano de aprendizado. Podemos destacar o algoritmo AlphaZero, que sem nenhum conhecimento de domínio, exceto as regras do jogo, obteve um desempenho sobre humano ao derrotar de forma convincente o campeão mundial nos jogos de xadrez e shogi (xadrez japonês), além do Go (256).

Grandes avanços na ciência da computação, como melhorias na velocidade e potência de processamento, funcionaram como um catalisador para permitir as tecnologias básicas necessárias para o advento da IA (257). Dentro da inteligência artificial existem diversas técnicas diferentes que modelam essa "inteligência". Uma delas é a implementação através de algoritmos de aprendizagem de máquinas, do inglês, *machine learning* (ML). O campo da aprendizagem de máquinas visa desenvolver algoritmos de computador que melhoram com a experiência, permitindo que os computadores possam auxiliar os seres humanos a analisar conjuntos grandes e complexos de dados (258). Um algoritmo de aprendizagem de máquinas é um método computacional baseado

em estatísticas, implementado em software, capaz de descobrir padrões ocultos, incompletos ou imprecisos em um conjunto de dados e, além disso, fazer previsões estatísticas confiáveis sobre os novos dados gerados (259, 260). Ou seja, os algoritmos de aprendizagem de máquinas necessitam de uma base de dados para extrair características e aprendizado que podem ser utilizados na tomada de decisões futuras.

Um algoritmo simples de aprendizado de máquinas chamado regressão logística pode determinar a recomendação ou não do parto cesáreo (261). Outro algoritmo simples chamado *naive Bayes* pode separar e-mails legítimos dos e-mails de spam (262). O desempenho desses algoritmos simples de ML depende muito da apresentação dos dados fornecidos. Por exemplo, quando a regressão logística é usada para recomendar a cesariana, o sistema de IA não examina o paciente diretamente. Em vez disso, o médico indica ao sistema várias informações relevantes, como a presença ou ausência de uma cicatriz uterina. Cada peça de informação incluída na representação do paciente é conhecida como característica. A regressão logística prevê matematicamente como cada um desses recursos do paciente se correlaciona com vários resultados. No entanto, não pode influenciar de qualquer maneira como os recursos são definidos (263).

Podemos então, entender como *machine learning* o ato de programar os computadores para que eles consigam aprender a executar uma tarefa. Por meio de algoritmos, eles copiam os dados, aprendem com eles atribuindo significado às informações e conseguem gerar percepções e realizar previsões sobre basicamente qualquer assunto no mundo.

Estimulados pelos avanços no poder computacional de processamento, placas gráficas capazes de fazer processamento paralelo (GPU), armazenamento e uma riqueza infinita de novos dados, os computadores estão sendo solicitados a lidar com tarefas de aprendizado de máquinas cada vez mais complexas. Esses avanços impulsionaram o desenvolvimento de algoritmos capazes superar muitas abordagens clássicas de ML (264). Como, por exemplo, o aprendizado profundo ou *deep learning* (DL). A *deep learning* é um subgrupo específico das técnicas de *machine learning* (figura 1.17), que são direcionadas para extensos conjuntos de dados. Em parte, devido à capacidade de rodar em hardware de computação especializado (GPUs) e melhorar a capacidade de previsão à medida que mais dados são adicionados (264, 265). Os cuidados com a saúde e diversas áreas da

medicina podem se beneficiar imensamente da aprendizagem profunda devido ao grande volume dos dados que estão sendo gerados a cada ano, bem como a crescente proliferação de dispositivos médicos e sistemas de registro digital. Em 2013, foram gerados, apenas nos EUA, 153 exabytes (um exabyte = um bilhão gigabytes) de dados voltados para a área da saúde. E estima-se que no ano de 2020 sejam gerados 2.314 exabytes, traduzindo-se em um aumento numa taxa global de pelo menos 48% ao ano (266).

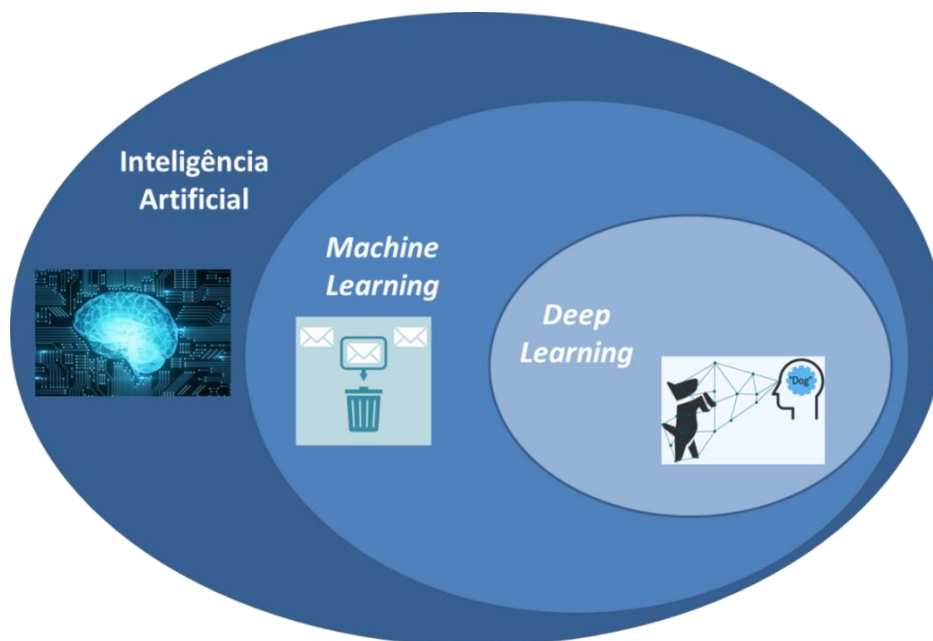


Figura 1.17. Esquema representativo das diferentes subáreas da Inteligência Artificial. A inteligência artificial é uma ciência da computação voltada para o desenvolvimento de máquinas “inteligentes”, capazes de desempenhar atividades cognitivas atribuídas à inteligência humana. A IA, é implementada através de algoritmos de *machine learning*. Entretanto, o crescimento em larga escala dos dados disponíveis, bem como os avanços no poder computacional de processamento, memória, e armazenamento impulsionaram o desenvolvimento de algoritmos capazes superar muitas abordagens clássicas de ML. Uma dessas abordagens é a utilização de redes neurais artificiais, através da técnica de *deep learning*.

O aprendizado profundo baseia-se na criação de uma rede neuronal artificial que permite à máquina uma semelhança cognitiva com o cérebro humano a fim de interligar e interpretar dados, como por exemplo, o reconhecimento facial e a tradução em tempo real. Podemos definir então como redes neurais artificiais técnicas computacionais que apresentam um modelo matemático inspirado na estrutura neural de organismos inteligentes e que adquirem conhecimento através

da experiência (267). Essa experiência é transmitida por meio de exemplos obtidos do mundo real, definidos como um conjunto de características que levam a uma determinada situação. Se a situação gerada pela combinação de características for informada a rede, a aprendizagem é dita ser supervisionada não supervisionada caso contrário (268).

Uma breve revisão da estrutura de um neurônio é necessária para entender os princípios da aprendizagem profunda compatível com o cérebro humano. O neurônio é a unidade básica do cérebro humano, ou seja, uma célula especializada na transmissão de informações, pois nelas estão introduzidas propriedades de excitabilidade e condução de mensagens nervosas (269). O neurônio é constituído por três partes principais: o corpo celular, do qual emanam algumas ramificações denominadas de dendritos; os dendritos recebem sinais de outros neurônios e os passam para o corpo celular; e por outra ramificação descendente do corpo celular, porém mais extensa chamada de axônio (figura 1.18). O axônio transmite o potencial de ação do corpo celular e os leva através de sinapses para os dendritos dos neurônios vizinhos. Nas extremidades estão os nervos terminais (axônios), pelos quais é realizada a transmissão das informações para outros neurônios. Essa região de contato entre um neurônio e outro é conhecida como sinapse (269). Um impulso, na forma de um sinal elétrico viaja dentro dos dendritos através do corpo celular em direção à membrana pré-sináptica da sinapse. Ao chegar à membrana, um neurotransmissor (químico) é liberado das vesículas em quantidades proporcional à força do sinal recebido. O neurotransmissor difunde-se dentro do espaço sináptico em direção à membrana pós-sináptica e, eventualmente, nos dendritos dos neurônios vizinhos, forçando-os assim a gerar um novo sinal elétrico. O sinal gerado passa para o segundo neurônio (s) de uma maneira idêntica à descrita. A quantidade de sinal que passa através de um neurônio receptor depende da intensidade do sinal que emana de cada um dos neurônios de alimentação, de suas forças sinápticas e do limiar do neurônio receptor. Como um neurônio possui um grande número de dendritos/sinapses, ele pode receber e transferir muitos sinais simultaneamente. Esses sinais podem ajudar (excitar) ou inibir a atividade do neurônio. Esse mecanismo simplificado de transferência de sinal constituiu a etapa fundamental do desenvolvimento inicial da neurocomputação (270).

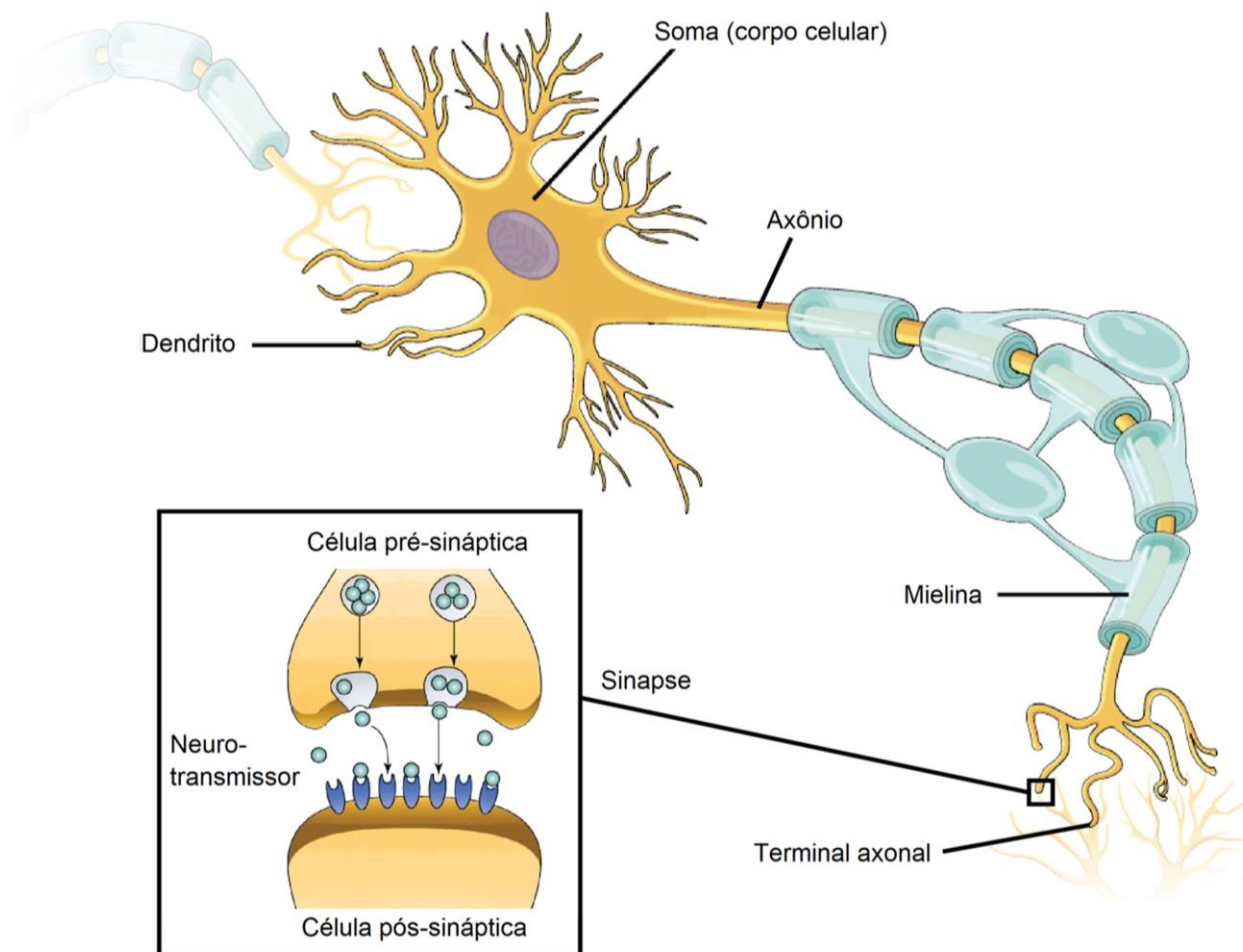


Figura 1.18. Estrutura de um neurônio biológico e a transmissão da informação através das sinapses. Figura modificada do site: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/human-biology/neuron-nervous-system/a/overview-of-neuron-structure-and-function>

A partir dessa estrutura e funcionamento do neurônio biológico, pesquisadores tentaram simular esse sistema em computador. O modelo mais simples foi desenvolvido nas décadas de 1950 e 1960 pelo cientista Frank Rosenblatt (271), inspirado em trabalhos anteriores de Warren McCulloch e Walter Pitts. Embora, atualmente, outros modelos de neurônios artificiais sejam mais utilizados, o Perceptron permite uma compreensão clara de como funciona uma rede neural em termos matemáticos. Nesse modelo, os impulsos elétricos provenientes de outros neurônios são representados pelos chamados sinais de entrada, (x_j) , dentre os vários estímulos recebidos. Esses sinais nada mais são do que os dados que alimentam o modelo de rede neural artificial. Alguns estímulos podem excitar ou inibir o neurônio receptor, essa medida de quão excitatório é o

estímulo, é representada no modelo de McCulloch e Pitts através dos pesos sinápticos. Esses pesos são números reais que expressam a importância das respectivas entradas para a saída. Quanto maior o valor do peso, mais excitatório é o estímulo. Os pesos sinápticos são representados por W_{kj} , onde, k representa o índice do neurônio em questão e j se refere ao terminal de entrada da sinapse a qual o peso sináptico se refere. O processo de ajuste dos pesos sinápticos é realizado pelo algoritmo de aprendizagem, responsável em armazenar na rede o conhecimento do mundo real obtido através de exemplos (270). O corpo da célula é representado por uma composição de dois módulos, o primeiro é uma junção aditiva, o somatório dos estímulos (sinais de entrada) multiplicado pelo seu fator excitatório ou inibitório (pesos sinápticos), e posteriormente uma função de ativação, que definirá com base nas entradas e pesos sinápticos, qual será a saída do neurônio. O axônio é aqui representado pela saída (y_k) obtida pela aplicação da função de ativação. Assim como no modelo biológico, o estímulo pode ser excitatório ou inibitório, representado pelo peso sináptico positivo ou negativo respectivamente. Um modelo simples da arquitetura de uma rede neuronal do tipo Perceptron, de camada única, está ilustrado na figura 1.19 (272).

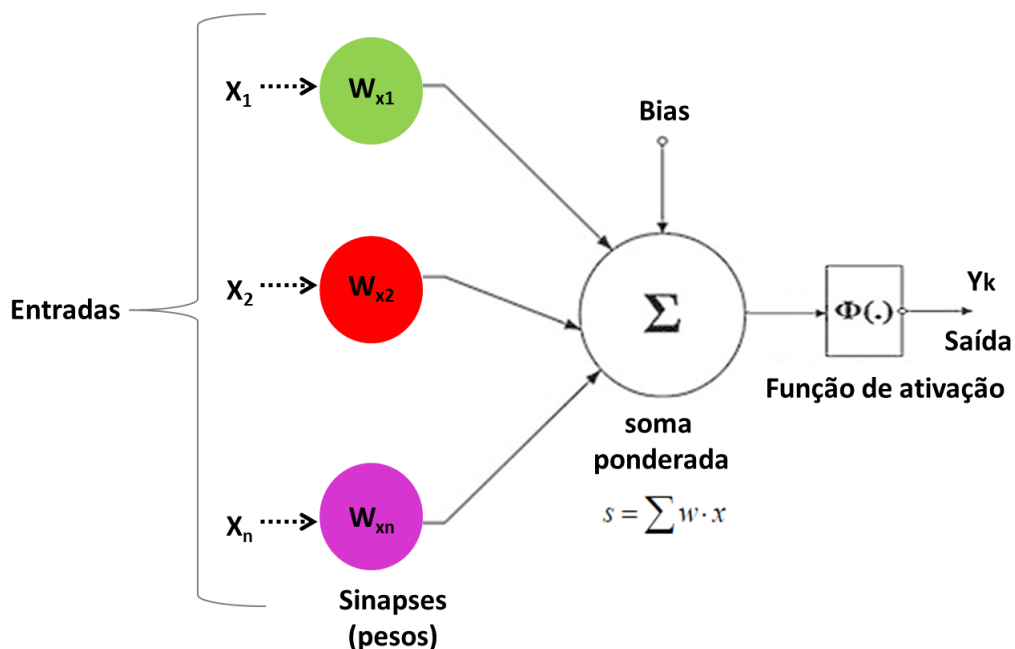


Figura 1.19. Representação Simplificada do Neurônio Matemático. Os sinais de entrada $\{x_1, x_2, x_n\}$ são ponderados/multiplicados por $\{w_1, w_2, w_n\}$. A função de somatório, $\{\Sigma\}$, recebe todos os sinais e realiza a soma dos produtos dos sinais; em seguida, a função de ativação é aplicada para deixar o sinal passar gerando uma saída ou não. **Figura modificada do site:** <https://www.monolitonimbus.com.br/perceptron-redes-neurais/>

Nesse contexto, a disponibilidade de dados eletrônicos de saúde, juntamente com o uso de IA implementada por técnicas de aprendizado de máquina, em particular, sugere o potencial uso significativo desses dados para melhorar a qualidade do atendimento ao paciente e reduzir tempo e principalmente custos. Portanto, as técnicas de ML são uma grande ajuda para o desenvolvimento de várias questões ligadas à saúde pública.

No estágio inicial de estudos de design de drogas, várias abordagens de algoritmo ML foram aplicadas para orientar experimentos tradicionais, que são caros e demorados. Dessa forma, é possível permitir que as ferramentas de aprendizado de máquina possam identificar potenciais moléculas biológicas ativas de milhões de compostos candidatos rapidamente e com baixo custo (273). Existem vários medicamentos no mercado e/ou em ensaios clínicos que foram projetados por aprendizado de máquina ou outros métodos computacionais (274-277). Na medicina, o Projeto Hanover da Microsoft em Oregon analisou a pesquisa médica para adaptar a opção de tratamento personalizado do câncer. O Serviço Nacional de Saúde (SNS) do Reino Unido usou a plataforma *DeepMind* da Google para detectar riscos à saúde, analisando dados de aplicativos móveis e imagens médicas coletadas de pacientes do SNS (278). Incluídos nas aplicações virtuais de algoritmos ML estão registros médicos eletrônicos onde eles são usados para identificar indivíduos com uma história familiar de uma doença hereditária ou um risco aumentado de uma doença crônica. O ML é usado para melhorar o desempenho organizacional, permitindo que os indivíduos capturem, compartilhem e apliquem seu conhecimento coletivo para tomar “decisões ótimas em tempo real”. De fato, são necessários grandes esforços da academia e da indústria de tecnologia da informação para alcançar a eficácia desejada e minimizar o custo (279).

Nesse contexto, tendo em vista a vasta literatura sobre a criopreservação de hepatócitos e a ausência de um protocolo único que possa reunir as condições ótimas de congelamento para essas células, a utilização da IA como ferramenta para prever condições ideais de congelamento pode representar um grande avanço na área da criobiologia de células do fígado e outros tipos celulares. Com isso, torna-se possível a otimização do tempo, com a capacidade de reunir

diversos dados da literatura para selecionar e prever protocolos ideais que possam ser testado no congelamento de hepatócitos de diferentes espécies.

CAPÍTULO II

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver todos os parâmetros ideais para realizar o transplante dominó hepatocitário (TDH) em modelo murino de IHA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um modelo químico de Insuficiência Hepática Aguda;
2. Desenvolver um modelo murino de macroesteatose hepática;
3. Caracterizar o isolamento e a separação de hepatócitos de camundongos a partir de fígados com macroesteatose com viabilidade superior a 80%;
4. Avaliar a viabilidade e funcionalidade dos hepatócitos em cultura após o isolamento de fígado gorduroso;
5. Investigar a capacidade de prever um congelamento específico para hepatócitos murino utilizando Inteligência artificial e aprimorar as atuais condições de criopreservação desses hepatócitos;
6. Realizar terapia celular com transplante hepatocitário, em modelo murino de IHA induzido quimicamente por acetaminofeno, avaliar a recuperação da função hepática e a sobrevida destes animais após terapia celular;

CAPÍTULO III

3.RESULTADOS

3. Resultados

Os resultados desta Tese estão contidos nos trabalhos desenvolvidos ao longo desses quatro anos, os quais serão apresentados a seguir:

- ✓ Domino Hepatocyte Transplantation: A Therapeutic Alternative for the Treatment of Acute Liver Failure;
- ✓ Domino Hepatocyte Transplantation as a therapeutic alternative for the treatment of acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse;
- ✓ Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy;
- ✓ Machine learning predictions to improve translational research in rat hepatocytes cryopreservation;

3.1. Artigo 1

✓ **Título:** Domino Hepatocyte Transplantation: A Therapeutic Alternative for the Treatment of Acute Liver Failure;

✓ **Referência Bibliográfica:** Cardoso L, Moreira LFP, Pinto MA, Henriques-Pons A, Alves LA. Domino Hepatocyte Transplantation: A Therapeutic Alternative for the Treatment of Acute Liver Failure. Can J Gastroenterol Hepatol. 2018;2018:2593745. Epub 2018/08/02.

✓ **Situação:** Publicado

✓ **Descrição:** Nesse artigo de revisão, caracterizamos o conceito de Transplante dominó hepatocitário como uma alternativa terapêutica ao tratamento da Insuficiência hepática aguda. Nosso objetivo foi caracterizar esse conceito, título desta Tese, a fim deixar claro qual a idéia central da nossa proposta relativa á ausência de terapias de suporte aos pacientes com doenças hepáticas terminais, antes de testar a nossa hipótese. Além disso, descrevemos uma breve revisão sobre as alternativas cirúrgicas atuais que são realizadas com o objetivo de atender o máximo de pacientes que necessitam realizar o transplante de fígado. E focamos na necessidade de estudos voltados para a terapia com transplante de hepatócitos utilizando células obtidas de fígados rejeitados para o transplante. Isso porque, a ausência de órgãos para a obtenção de hepatócitos limita o acesso às células para realizar essa terapia alternativa. Assim, o uso da técnica de dominó pode no futuro ser uma alternativa atraente para aumentar o número de pacientes tratados.

Review Article

Domino Hepatocyte Transplantation: A Therapeutic Alternative for the Treatment of Acute Liver Failure

Liana Monteiro da Fonseca Cardoso,¹ Lucio Filgueiras Pacheco Moreira,²
Marcelo Alves Pinto,³ Andrea Henriques-Pons,⁴ and Luiz Anastácio Alves¹ 

¹Laboratório de Comunicação Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Centro Estadual de Transplantes, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence should be addressed to Luiz Anastácio Alves; alveslaa@gmail.com

Received 28 March 2018; Revised 25 May 2018; Accepted 31 May 2018; Published 2 July 2018

Academic Editor: Stefano Gitto

Copyright © 2018 Liana Monteiro da Fonseca Cardoso et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background and Aims. Acute liver failure (ALF) is a severe syndrome with an elevated mortality rate, ranging from 40 to 80%. Currently, liver transplantation is the only definitive treatment for these patients and new therapies aiming to treat ALF include artificial organs implant and stem cells therapy, for example. However, a major limitation of liver donors exists. Living donor liver transplantation (LDLİžET), split liver transplantation (SLT), and domino liver transplantation (DLT) are some of the available alternatives to treat ALF patients, but these do not reduce the number of patients on waiting lists. Herein, we discuss domino hepatocyte transplantation (DHT) using livers that would not meet transplantation criteria. **Methods.** We conducted a literature search on PubMed/Medline using acute liver failure, liver transplantation, hepatocyte transplantation, and domino liver transplantation as key words. **Results.** New sources of biochemically functional hepatocytes and therapeutic treatments, in parallel to organ transplantation, may improve liver injury recovery and decrease mortality rates. Moreover, the literature reports hepatocyte transplantation as a therapeutic alternative for organ shortage. However, a major challenge remains for a wide clinical application of hepatocytes therapy, i.e., the availability of sufficient amounts of cells for transplantation. Ideally, hepatocytes isolated from livers rejected for transplantation may be a promising alternative for this problem. **Conclusion.** Our review suggests that DHT may be an excellent strategy to increase cell supplies for hepatocyte transplantation.

1. Acute Liver Failure

Acute liver failure (ALF) is a complex clinical syndrome with rapid deterioration of liver function, generally without preexisting diseases [1]. This condition presents a high mortality rate, of up to 80% in some reports [2], and is usually associated with coagulation disorders and hepatic encephalopathy. ALF can affect other organs, such as brain, kidneys, lungs, bone marrow and the circulatory system, and immune system [3, 4]. Therefore, metabolic acidosis, coagulation disorders, and hepatic encephalopathy are quickly established. Intracranial hypertension, the major cause of mortality in ALF patients, is secondary to cerebral edema, which is the center of the process responsible for hepatic encephalopathy. Many etiologies are involved, including viral

hepatitis (hepatitis viruses A, B, and E), drug-induced hepatitis, exogenous intoxication, vascular, ischemic or Budd-Chiari syndrome neoplastic infiltration (lymphoma), and fulminant septicemia [5–7].

Although life-support new therapies are available in Intensive Therapy Centers, mortality remains high. Thus, ALF patients remain largely with no effective therapeutic treatments, including organ transplantation, which is the standard therapy for acute stages of liver disease and the only procedure for hepatic function substitution. Therefore, new sources of biochemically functional hepatocytes and therapeutic treatments that may improve liver injury recovery, in parallel to organ transplant indication, can decrease mortality rates [8, 9].

2. Transplantation

The first human liver transplant (LT) was performed by Thomas Starzl in 1963 (Denver- USA) [10] and, since then, this remains the only efficient therapy for liver function recovery. Since then many strategies have been developed worldwide, such as surgical techniques, immunosuppressive agents, organ allocation, donor selection, infection prophylaxis, and the prevention of recurrent diseases [11]. As a result, survival after LT has increased significantly in recent years. Currently, the average survival is of about 90% in the first year after transplantation and 60% at 10 years [12]. The major problem regarding LT is the reduced number of available grafts. Because of this, organ transplant cannot be offered to most patients presenting acute disorders. Consequently, a high number of patients remain on waiting lists and do not undergo surgical procedures, contributing to the high mortality rates described previously [8, 13, 14].

Many strategies are currently being developed aiming to increase organ availability for LT [39, 40]. Such strategies involve living donor liver transplantation (LDLT), split liver transplantation (SLT), and domino liver transplantation (DLT) [11, 41–45].

3. Alternatives to Maximize the Number of Available Grafts

3.1. Living Donor Liver Transplantation. The first attempt at LDLT was performed in Brazil, by Raia and colleagues in 1989 [46]. This transplant was performed in a child, who did not survive the surgery. The attempt, however, established the technical viability of the procedure [11, 47]. The first successfully performed LDLT was conducted in 1990 in Australia by Strong and colleagues, using segments of the left lateral lobe as grafts [48, 49]. LDLT using liver fragment grafts from healthy living donors has emerged as a very important option for many patients, especially pediatric patients [47, 48]. Since the first liver transplants from living donors in the late 1980s, this transplantation technique has been used as a well-established tool in modern medicine transplants. Most liver transplants are performed from living donors, especially in Asian religious grounds. Liver grafts for adult patients consist mainly of the right lateral lobe and, for pediatric recipients, mainly the left lateral lobe of the liver donor [48, 49].

Strategies for conducting LDLT in children have evolved and the increasing success rate of this surgical procedure has led to a significant decrease in pediatric patient mortality on transplant waiting lists [41]. With the success of liver transplantation from living donors using the left lateral lobe as small grafts for pediatric patients, surgeons have extended this procedure for adult recipients. This method, previously limited by the graft size, became possible after performing the first LDLT using the right lateral lobe. The first LDLT for adult recipients was performed in Japan, in 1996 and, since then, liver grafting using the right lateral lobe has become the main type of LDLT graft [11, 49].

Living organ donors are better than brain-dead organ donors in many ways. The main advantage of living donation

is that it optimizes the time for transplantation and patients with severe liver diseases are removed from waiting lists. In addition, the transplant procedure can be electively programmed, before the development of end-stage liver disease in transplant candidates, which would increase mortality risks. Preservation time is minimal in LDLT and, therefore, ischemic liver damage is significantly reduced. Living donors in general terms are healthy and the quality of the organ is usually higher. However, the most important fact is that living donor transplant increases the supply of organs for transplantation, allowing more people to be benefited [11, 41, 48].

The major disadvantage of LDLT is the risk of donor mortality and morbidity. Thus, perfectly healthy volunteer donors are exposed to possible damage related to the surgical procedure. The risk of death of a donor of a segment on the left side, or left lobe, is of approximately 0.1%, while the risk of a donor of a right lobe segment is estimated at approximately 0.4 to 0.5%. The morbidity of these procedures is significant and correlates directly with the extent of resection [48].

An LDLT is technically more complex than a whole organ transplant from a deceased donor. In the case of partial transplant grafts, there is an increase in biliary complications, as well as the incidence of small-for-size syndrome, in which the recipient does not get enough functional liver mass [50]. Many questions regarding the impact of liver regeneration and risks for the recipient are still unanswered. Liver regeneration, for example, may favor viral replication (particularly hepatitis C or tumor growth) [48, 49]. It is noteworthy that this procedure is considerably more expensive and the possibilities of surgical complications are greater than those of whole organ transplantation. It takes two highly experienced surgeon staffs, one to perform the donor procedure and the other, the recipient [49, 50]. However, in recent years, most of the problems related to the technical LDLT procedures, especially in adults, have been elucidated. As a result, morbidity and mortality associated with technical errors during this type of transplant have decreased [50].

3.2. Split Liver Transplant. Split liver transplant (SLT) was also developed as a strategy to increase liver graft supplies, by obtaining two grafts from a single deceased donor. This strategy is of great importance, especially for pediatric patients, also reducing mortality on waiting lists [42].

Pichlmayr and collaborators in Hannover-Germany first described this type of transplant in 1988. The first SLT procedures were unsuccessful, especially in adult recipients and this technique was abandoned in the 1990s [11]. However, with a better understanding of intrahepatic anatomy, adequate criteria for donor and recipient selection, and the introduction of the technical division of the organ *in situ*, SLT became more useful. This was possible probably due to the decreased time lapse that leads to ischemia and biliary complication among children and adult recipients. Thus, from the mid-1990s, many transplant centers around the world have began executing SLT programs [42, 51].

Usually, the liver is divided for an adult and a child and the use of grafts for the division between two adults is uncommon. The split procedure of the organ is usually as

follows: the left lateral lobe of the segment is used as a graft for the pediatric patient and the right lateral lobe for the adult recipient [42].

SLT can be safely used with acceptable morbidity and mortality rates. Neshet et al., in 2011, evaluated 2,301 SLTs performed from January 1995 to December 2008. Patient survival rates at 1 and 5 years after SLT were 84% and 70%, respectively. Early or late mortality of this type of transplant for these patients was not related to expected technical problems due to the liver split, but caused by sepsis, cerebral edema, and acute and chronic rejection [51].

3.3. Domino Transplantation. Domino liver transplantation (DLT) is considered for patients presenting certain genetic or biochemical disorders that are currently treated by liver transplantation. Thus, patients with liver metabolic diseases receive a transplant; the explanted ill liver sometimes can be transplanted to another patient in situations whose livers remain structurally normal with preserved function and in which liver transplantation is expected to be curative [52]. DLT was originally proposed to compensate the limited availability of organs, using patients with Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP) as donors. Hence, this procedure is currently responsible for over 16% of liver transplants performed in Portugal [44]. A DLT conducted using the liver of a FAP patient was first performed in October 1995 in Portugal, by Furtado et al., and is carried out most frequently in Portugal, Sweden, and Japan, where the disease incidence is higher [53, 54]. FAP is an autosomal dominant systemic disease characterized by a progressive sensory motor neuropathy. It is associated with vegetative dysfunction and cardiomyopathy with a transthyretin (TTR) mutation of the TTR gene and usually occurs in adults during the third decade of life. TTR mutants are responsible for destabilizing the native tetrameric structure of TTR, leading to toxic extracellular deposition of amyloid fibrils, especially in the peripheral nervous system [44, 54]. The liver produces about 90% of TTR in the body. However, although these patients suffer a genetic alteration, liver function and normal morphology are maintained, except for mutant TTR production. In this case, the basic idea behind such grafts is the fact that it takes 20-30 years for the first symptoms to appear in patients receiving FAP liver grafts by domino transplantation [44, 55, 56]. Therefore, DLT recipients may benefit more from a donor with end-stage liver disease. In this type of sequential transplantation, FAP patient livers are not feasible for these patients; however, these livers may be transplanted into one or more patients with acute liver disease on waiting lists for orthotopic transplantation. FAP patients are both donor and recipient, since they depend on liver transplants from a deceased donor [44]. Although DLT is most frequently performed in donors presenting FAP, some studies have suggested the use of grafts from patients with a range of other metabolic disorders [57–59]. In some cases, DLT can be performed by transplanting the liver from patients with various metabolic disorders into elderly recipients, whose projected survival precludes prolonged waiting on the transplant list [57]. Golbus et al. in 2017 reported a DLT case using the liver of a 14-year-old

boy with homozygous familial hypercholesterolemia (FH) transplanted into a 65-year-old man with primary sclerosing cholangitis and cirrhosis [57]. Another paper reported a first case of double domino liver transplantation in a 32-year-old woman who was diagnosed with FAP and liver dysfunction [58]. In this case, auxiliary DLT was conducted using a double domino graft from patients presenting different liver metabolic diseases. Moreover, domino liver grafts from patients with other liver metabolic disorders, such as maple syrup urine disease, are possible. In this disease, an autosomal recessive deficiency of branch chain α -ketoacid dehydrogenase (BCKAD) is observed in all tissues, an enzyme that metabolizes branch chain amino acids (valine, leucine, and isoleucine). In normal individuals, other tissues possess this enzyme. In these circumstances, a patient may receive a normal liver or normal hepatocytes, thus being cured. Diseases (or hepatocytes isolated from this organ) could be transplanted to another patient who will normally metabolize branch chain amino acids in other tissues presenting normal BCKAD activity. Other examples are methylmalonic acidemia [62], which can be used to supply the absence of cadaveric grafts. For rare metabolic liver diseases such as Acute Intermittent Porphyria (AIP), further reports and studies are required to establish DLT indication [54].

This procedure raises ethical and surgical issues. The most important ethical principle is the need to emphasize that the recipient can develop a genetic disease from the domino donor. At first, indicated recipients were those suffering from primary carcinoma, especially hepatocellular (HCC) and rare cholangiocarcinoma or secondary hepatic malignancies. Currently, these liver grafts are also transferred to patients with alcohol-related liver cirrhosis and viruses. It is noteworthy that this therapeutic procedure should be performed in patients with a shorter life expectancy than the time required to develop the symptoms of the domino donor disease (55-60 years) [54].

The main DLT drawback is the risk of metabolic liver disease transmission. Although with a low incidence, of about 3%, early manifestations of diseases were reported in DLT recipients [11]. Nevertheless, domino liver grafts are an adequate option for some recipients who might otherwise experience long wait times for liver transplantation, such as recipients with hepatocellular carcinoma [43].

3.4. Hepatocyte Transplantation. Alternatives to liver transplantation include blood purification therapies such as plasmapheresis, hemodiafiltration, and bioartificial livers [63]. However, these methods are still unsatisfactory, for numerous reasons, such as high cost, development of anaphylactic reactions, and formation and deposition of immunocomplexes [63–68]. With the advent of cell therapy and tissue engineering, the treatment of several tissue injuries in degenerative pathologies and previously untreatable processes became possible (Risbud *et al.*, 2004). Thus, the concept of hepatocyte transplantation (HT) emerged, which may lead to recovery of spontaneous patient recovery, increasing patient survival rate while awaiting donation. This would be very important, in view of the limitations of artificial liver function support methods currently applied. Studies

approaching cellular therapies for liver diseases using animal models highlight the notable regenerative capacity of hepatocytes *in vivo*. Therefore, the transplantation of these cells plays an important role as a therapeutic innovation, leading to major advances regarding new perspectives in the treatment of liver diseases [9, 69, 70]. Cell transplantation may be advantageous compared to surgical procedures, since this is a less invasive procedure and can be repeated in sequential transplantations, with no need for chronic immunosuppression, and transplants can be performed in more than one recipient from a single donor [24, 39, 70, 71]. Published data reported the successful application of allogeneic hepatocytes transplants for inherited metabolic liver disease (Table 1) and ALF (Table 2). The main indications for hepatocyte transplantation treatment are (1) inherited metabolic diseases, such as Crigler-Najjar disease (CND); Glycogen storage disease 1a and 1b (GSD); ornithine transcarbamylase deficiency (OTD); familial hypercholesterolemia; progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) and (2) ALF [72, 73].

The aim of hepatocyte transplantation in patients presenting metabolic disorders is to restore hepatic functions without replacing the entire organ. However, the number of cells necessary for correcting a deficit is unknown. For example, in patients suffering from Crigler-Najjar syndrome, approximately 12% of the liver mass is necessary [74]. However, fewer cells can produce an effect on other congenital disorders, such as OTD or GSD1a [75]. To be successfully performed, a minimal number of cells must be used for tissue engineering by hepatocyte transplantation. As the liver corresponds to approximately 2.8% of the total body weight, the organ from a 70-kg individual weighs about 1.5 kg. The minimum liver mass required for patient survival has been asserted as about 10–30% of the total organ or 200–600 g. Considering 120 million human hepatocytes/gram of tissue, a minimum of 2.5–7.5 billion cells would be required for a clinical therapeutic treatment [75]. Nevertheless, major challenges for the wide clinical application of hepatocyte therapy include availability, metabolic integrity, and sufficient amount of cells for transplantation [33, 39, 70, 71, 73].

Many hepatocytes animal sources have been proposed and investigated as alternatives to human hepatocytes, including human tumor cell lines, immortalized hepatocytes from pig livers, and hepatocytes from transgenic pigs [75]. Each of these sources presents disadvantages for clinical use, such as the risk of disease transmission, neoplastic transformation, and animal sample biocompatibility. Ideally, primary hepatocytes isolated from human livers would be the best source of liver tissue for cell therapy, given the limitations of the cell sources mentioned above. However, the development of a standardized hepatocyte isolation to ensure adequate performance, viability, and functionality is necessary, as well as adequate conservation and storage of these cells after isolation [39]. Transplanted cells are generally no longer observed after 6–9 months and it is not clear if this is due to rejection, apoptosis, or other causes. The single most important obstacle for hepatocytes transplantations is the limited availability of hepatocytes, which has encouraged more investigations on alternative cell sources [72].

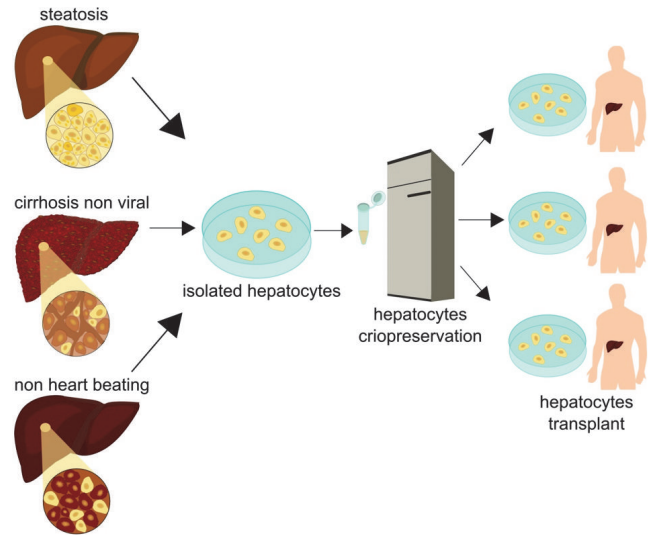


FIGURE 1: Each year a large number of livers from cadaverous donors are rejected for transplantation. The causes include a high degree of steatosis, no heart beating, and nonviral cirrhosis. These organs rejected for orthotopic transplantation have been object of studies and sources of great importance for obtaining liver cells for cell transplantation. The hepatocyte isolation with quality from these organs associated with cryopreservation technique will allow the development of a bank of liver cells that are available for the treatment of a large number of patients with ALF.

3.5. Systemizing a New Concept: Domino Hepatocyte Transplantation (DHT). Domino transplantation is one of the strategies currently performed to supply LT grafts, mainly using unviable organs for certain individuals, such as FAP patients. In this sequential transplantation process, positive FAP grafts are functionally and morphologically normal, which enables their use as explants for patients with IHA and inherited metabolic liver diseases [44, 55, 61, 76]. This additional source of cells and strategic approach, associated with the suitable results of human hepatocyte transplantation, are considered a complementary therapeutic strategy to organ transplantation [37, 77], the domino hepatocyte transplantation (DHT) (Figure 1). Thus, unviable organs for transplantation would become sources of viable hepatocytes for transplantation. These hepatocytes could be transplanted into more than one patient presenting IHA or hepatic congenital metabolic disorders. Each year, a large number of cadaverous donor livers for transplantation are rejected. The reasons include high-grade steatosis, nonviral cirrhosis, and death due to heart failure [72, 78]. Moreover, patients with many types of metabolic liver diseases have morphologically and biochemically normal livers, except for the mutation that characterizes the metabolic disease [40, 72]. Baccarani *et al.* demonstrated that hepatocytes isolated from livers with nonviral cirrhosis, macrosteatosis, and normal livers have comparable metabolic functions when maintained in culture. Furthermore, microscopic analyses revealed normal cell morphology. In another study published by Gramignoli *et al.*, 2013, hepatocytes were isolated from explants of normal livers and livers presenting various types of inherited

TABLE 1: Human hepatocyte transplantation: clinical studies in patients with metabolic liver disease.

Disease	Patient Age	Number of viable cells transplanted	Type of cell transplanted	Outcome	Study/Ref
	8 years	7.5x10 ⁹	F/C	40% decrease bilirubin up to 6 months; OLT at 20 months	[15]
	9 years	7.5x10 ⁹	F	32% decrease in bilirubin for a few weeks; OLT after 5 months	[16]
	18 months	4.3x10 ⁹	C	40% decrease in bilirubin to 7 months; OLT at 8 months	[17]
	8 years	1.4x10 ⁹	F	30% decrease in bilirubin; OLT after 11 months	[18]
	1 year	2.6x10 ⁹	F/C	25% decrease in bilirubin at 4 months; OLT after 4 months	[19]
	9 years	6.1x10 ⁹	F/C	35% decrease in bilirubin at 6 months; OLT waiting list	
Glycogen storage disease type I (GSD)	18 years	6.0x10 ⁹	F/C	Improvement in glucose control, normal enzyme levels on biopsy	[20]
	47 years	2.0x10 ⁹	F	Better fasting time, decrease in triglycerides up to 18 months	[21]
Infantile Refsum's disease	4 years	2.0x10 ⁹	F/C	40% decrease pipecholic acid after 18 months	[22]
Familial hypercholesterolemia	Five patients between 7 and 41 years	1.1x10 ⁹	F	20% decrease in cholesterol, LDL, ApoB to 28 month;	[23]
		1.3x10 ⁹		No effect;	
		1.0x10 ⁹		6% decrease in cholesterol, LDL, ApoB to 19 months;	
		3.2x10 ⁹		Minor effect	
		1.5x10 ⁹		20% decrease in cholesterol up to 7 months	
Urea cycle defects					
OTC	5 years	1.0x10 ⁹	F	Decreased ammonia initially; Died 42 days later	[24]
OTC	10 hours	9.0x10 ⁹	F/C	Decrease ammonia; increased protein tolerance for a short period; OLT at 6 months	[25]
OTC	2 dias	1.9x10 ⁹	F/C	Decreased ammonia; auxiliary transplant at 6 months	[26]
OTC	14 months	2.4x10 ⁹	C	Decreased ammonia; increased urea; psychomotor improvement; OLT after 6 months	[27]
OTC	1 day	1.6x10 ⁹	F/C	Decreased ammonia; increased urea under normal diet; partial orthotopic liver transplantation (apolt) at 7 months	[28]
OTC	10 weeks 3 years	3.0x10 ⁹	F	Some stabilization	[29]
OTC	6 hours	0.6x10 ⁹ *	C	Decreased ammonia; increased urea; normal urinary orotic acid excretion. Death at 4 months	[30]
	9 days			Decreased ammonia; increased protein intake, urinary orotic acid normal at 6 months. OLT waiting list	

TABLE 1: Continued.

Disease	Patient Age	Number of viable cells transplanted	Type of cell transplanted	Outcome	Study/Ref
Citrullinemia	36 months	1.5x10 ^{9*}	C	Normal ammonia; 40% increase in urea	[30]
Factor VII deficiency	3 months	1.1x10 ⁹	C	70% decrease in recombinant factor VII for 6 months; OLT after 7 months	[31]
	35 months	2.2x10 ⁹	F/C		
Phenylketonuria	6 years	Two infusions for a total of 630 × 10 ⁶ cells	F	blood phenylalanine levels returned within the therapeutic target while the phenylalanine half-life assessed by loading tests decreased from 43 to 19 h.	[32]

TABLE 2: Human hepatocyte transplantation for patients with acute liver failure.

Indication	Patient Age	Number of viable cells transplanted	Outcome	Study/Ref
Drug-induced acute liver failure	27 years	2.8x10 ⁷	OLT after 10 days	[24]
	26 years	2.8x10 ⁷	OLT after 2 days	[33]
	32 years	1.3x10 ⁹	Death on day 14	[34]
	35 years	1.0x10 ¹⁰	Death on day 20	
	55 years	3.9x10 ¹⁰	Death in 6 hours	[35]
	27 years	3.0x10 ⁷	OLT on day 10	
	26 years	1.2x10 ⁹	OLT on day 2	
	21 years	9.4x10 ⁸	Death on day 1	
	35 years	5.4x10 ⁹	Death on day 18	
	35 years	3.7x10 ⁹	Full recovered after OLT	
51 years	3.9x10 ⁹	OLT on day 3		
Viral-induced acute liver failure	28 years	1.9x10 ⁷	OLT on day 3	[24]
	28 years	1.7x10 ⁸	OLT on day 3	[33]
	37 years	1.2x10 ⁸	Death on day 5	
	43 years	7.3x10 ⁸	OLT on day 1	[36]
	37 years	8.8x10 ⁸	Full recovered no OLT	
	29 years	1.0x10 ¹⁰	Death in 18 hours	[34]
	65 years	3.0x10 ¹⁰	Death on day 52	[35]
	4 years	3.4x10 ⁹	Death on day 2	
54 years	6.6x10 ⁹	Death on day 7		
Idiopathic acute liver failure	3.5 months	1.8x10 ¹⁰	OLT on day 1	[35]
Retransplantation	42 years	2,209 × 10 ⁶ hepatocytes given in 4 infusions	death on day 10 alive, liver retransplantation on day 6	[37]
	49 years			
Acute-on-chronic liver failure	7 patients with mean age, 35.7 years	(4.2 - 6.0) x 10 ⁶	3 patients fully recovered from liver failure, 1 survived and subsequently underwent OLT, and the remaining 3 patients died between 2.5 and 12 months hepatocyte transplantation	[38]

metabolic diseases. This group demonstrated, by using liver function assays, such as drug and ammonia metabolism and conjugation, that the cells from most metabolic diseases cases were able to perform these functions as well as, or better than, cells from normal donors. Thus, hepatocytes from a Crigler-Najjar explant could be expected to metabolize ammonia normally if transplanted to an OTD patient, for example, [40].

Hepatocyte transplantation is performed with the purpose of repopulating or replacing only a small portion of the total liver mass. Thus, the domino hepatocyte transplant could present significant advantages against the domino transplant of the whole organ. Since only a small percentage of transplanted cells present a mutation of a certain metabolic disease, this small population might not be enough for the development of the congenital disease in the recipient subject. If positive PAF receptor grafts and other inherited metabolic diseases take about 20-30 years until the onset of symptoms of the disease [44], DHT could represent an increment of this timeframe, or even the possibility of maintaining asymptomatic patients. Nevertheless, it is still too early to know the true proportion of domino recipients who will develop the disease, but a relatively large number of patients are soon to reach to develop the symptoms, 7 to 9 years after domino transplantation [43].

Cell therapy success is directly associated with the development of an efficient cryopreservation technique, capable of supplying a sufficient amount of viable and metabolically functional cells to hepatocyte cell banks for emergency transplantations or programmed transplantations for a high number of patients with diseases liver [9, 19, 27]. According to the hepatocyte infusion data displayed in Tables 1 and 2, about 10^9 cells are required for cell therapy. Since the data are promising, especially in cases of metabolic diseases, and cryopreservation is essential for establishing cell transplant techniques, organs rejected for transplants can save the lives of patients who currently die on liver transplantation waiting lists. Such an organ cell pool may be stored in liver cell banks available for emergency or programmed DHT.

Abbreviations

ALF: Acute liver failure
 ASL: Arginine succinyl lyase deficiency
 CND: Crigler-Najjar disease
 DHT: Domino hepatocyte transplantation
 DLT: Domino liver transplantation
 FAP: Familial amyloid polyneuropathy
 GSD: Glycogen storage disease
 HCC: Hepatocellular
 HT: Hepatocyte transplantation
 DLT: Living donor liver transplantation
 LT: Liver transplant
 SLT: Split liver transplantation
 OLT: Orthotopic liver transplantation
 OTD: Ornithine transcarbamylase deficiency
 PFIC: Progressive familial intrahepatic cholestasis
 TTR: Transthyretin.

Conflicts of Interest

The authors declare no financial and nonfinancial conflicts of interest.

Authors' Contributions

Dr. Pacheco-Moreira contributed with ideas and aided in writing the final version, **Dr. Pinto** wrote about ALF and contributed with papers from personal files, **Msc. Monteiro** conceived the study, drafted the paper, and wrote the final version, **Dr. Henriques-Pons** contributed with ideas and wrote the final version, **Dr. Alves** conceived the study and wrote the final version, and all authors approved the final version of the manuscript.

References

- [1] T. R. Scott, V. T. Kronsten, R. D. Hughes, and D. L. Shawcross, "Pathophysiology of cerebral oedema in acute liver failure," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 19, no. 48, pp. 9240–9255, 2013.
- [2] A. Aleem Khan, "Journey from hepatocyte transplantation to hepatic stem cells: a novel treatment strategy for liver diseases," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 123, no. 5, pp. 601–614, 2006.
- [3] W. Bernal, G. Auzinger, A. Dhawan, and J. Wendon, "Acute liver failure," *The Lancet*, vol. 376, no. 9736, pp. 190–201, 2010.
- [4] W. Bernal and J. Wendon, "Acute Liver Failure," *The New England Journal of Medicine*, vol. 370, no. 12, pp. 1170–1171, 2014.
- [5] J. P. Donovan, D. F. Schafer, B. W. Shaw Jr., and M. F. Sorrell, "Cerebral oedema and increased intracranial pressure in chronic liver disease," *The Lancet*, vol. 351, no. 9104, pp. 719–721, 1998.
- [6] D. Häussinger, G. Kircheis, R. Fischer, F. Schliess, and S. V. Dahl, "Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: A clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema?" *Journal of Hepatology*, vol. 32, no. 6, pp. 1035–1038, 2000.
- [7] J. Vaquero, C. Chung, M. E. Cahill, and A. T. Blei, "Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure," *Seminars in Liver Disease*, vol. 23, no. 3, pp. 259–269, 2003.
- [8] P. M. Lopez and P. Martin, "Update on liver transplantation: Indications, organ allocation, and long-term care," *Mount Sinai Journal of Medicine*, vol. 73, no. 8, pp. 1056–1066, 2006.
- [9] X. Stephenne, M. Najimi, and E. M. Sokal, "Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy?" *World Journal of Gastroenterology*, vol. 16, no. 1, 2010.
- [10] T. E. Starzl, T. L. Marchioro, K. N. Von Kaulla, and G. Hermann, "Homotransplantation of the Liver in Humans," *Surg Gynecol Obstet*, pp. 659–676, 1963.
- [11] A. T. W. Song, V. I. Avelino-Silva, R. A. A. Pecora, V. Pugliese, L. A. C. D'Albuquerque, and E. Abdala, "Liver transplantation: Fifty years of experience," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 18, pp. 5363–5374, 2014.
- [12] A. Rubín, C. Sánchez-Montes, V. Aguilera, Juan F. S., I. Ferrer, and A. Moya, "Long-term outcome of long-term liver transplant survivors," *Transplant International*, vol. 26, no. 7, pp. 740–750, 2013.
- [13] M. Sagmeister, B. Mullhaupt, Z. Kadry, G. A. Kullak-Ublick, P. A. Clavien, and E. L. Renner, "Cost-effectiveness of cadaveric

- and living-donor liver transplantation," *Transplantation*, vol. 73, no. 4, pp. 616–622, 2002.
- [14] J. F. Trotter, S. Mackenzie, M. Wachs et al., "Comprehensive cost comparison of adult-adult right hepatic lobe living-donor liver transplantation with cadaveric transplantation," *Transplantation*, vol. 75, no. 4, pp. 473–476, 2003.
- [15] A. A. Darwish, E. Sokal, X. Stephenne, M. Najimi, J. de Ville de Goyet, and R. Reding, "Permanent access to the portal system for cellular transplantation using an implantable port device," *Liver Transplantation*, vol. 10, no. 9, pp. 1213–1215, 2004.
- [16] G. Ambrosino, S. Varotto, S. C. Strom et al., "Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1," *Cell Transplantation*, vol. 14, no. 2-3, pp. 151–157, 2005.
- [17] A. Dhawan, R. R. Mitry, and R. D. Hughes, "Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders," *Journal of Inherited Metabolic Disease*, vol. 29, no. 2-3, pp. 431–435, 2006.
- [18] K. J. Allen, N. A. Mifsud, R. Williamson, P. Bertolino, and W. Hardikar, "Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation," *Liver Transplantation*, vol. 14, no. 5, pp. 688–694, 2008.
- [19] P. A. Lysy, M. Najimi, X. Stéphenne, A. Bourgois, F. Smets, and E. M. Sokal, "Liver cell transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I: Update and perspectives," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 22, pp. 3464–3470, 2008.
- [20] K.-W. Lee, J.-H. Lee, W. S. Sung et al., "Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib," *Cell Transplantation*, vol. 16, no. 6, pp. 629–637, 2007.
- [21] M. Muraca, G. Gerunda, D. Neri et al., "Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type Ia," *The Lancet*, vol. 359, no. 9303, pp. 317–318, 2002.
- [22] E. M. Sokal, F. Smets, A. Bourgois et al., "Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: Technique, safety, and metabolic follow-up," *Transplantation*, vol. 76, no. 4, pp. 735–738, 2003.
- [23] M. Grossman, D. J. Rader, D. W. M. Muller et al., "A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia," *Nature Medicine*, vol. 1, no. 11, pp. 1148–1154, 1995.
- [24] S. C. Strom, R. A. Fisher, M. T. Thompson et al., "Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure," *Transplantation*, vol. 63, no. 4, pp. 559–569, 1997.
- [25] S. P. Horslen, T. C. McCowan, T. C. Goertzen et al., "Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder," *Pediatrics*, vol. 111, no. 6 I, pp. 1262–1267, 2003.
- [26] R. R. Mitry, A. Dhawan, R. D. Hughes et al., "One liver, three recipients: Segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation," *Transplantation*, vol. 77, no. 10, pp. 1614–1616, 2004.
- [27] X. Stéphenne, M. Najimi, F. Smets, R. Reding, J. De Ville De Goyet, and E. M. Sokal, "Cryopreserved liver cell transplantation controls ornithine transcarbamylase deficient patient while awaiting liver transplantation," *American Journal of Transplantation*, vol. 5, no. 8, pp. 2058–2061, 2005.
- [28] J. Puppi, N. Tan, R. R. Mitry et al., "Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation - A novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency," *American Journal of Transplantation*, vol. 8, no. 2, pp. 452–457, 2008.
- [29] J. Meyburg, F. Hoerster, J. Weitz, G. F. Hoffmann, and J. Schmidt, "Use of the Middle Colic Vein for Liver Cell Transplantation in Infants and Small Children," *Transplantation Proceedings*, vol. 40, no. 4, pp. 936–937, 2008.
- [30] J. Meyburg, A. M. Das, F. Hoerster et al., "One liver for four children: First clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects," *Transplantation*, vol. 87, no. 5, pp. 636–641, 2009.
- [31] A. Dhawan, R. R. Mitry, R. D. Hughes et al., "Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency," *Transplantation*, vol. 78, no. 12, pp. 1812–1814, 2004.
- [32] X. Stéphenne, F. G. Debray, F. Smets et al., "Hepatocyte transplantation using the domino concept in a child with tetrabiopterin nonresponsive phenylketonuria," *Cell Transplantation*, vol. 21, no. 12, pp. 2765–2770, 2012.
- [33] S. C. Strom, J. R. Chowdhury, and I. J. Fox, "Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease," *Seminars in Liver Disease*, vol. 19, no. 1, pp. 39–48, 1999.
- [34] B. M. Bilir, D. Guinette, F. Karrer et al., "Hepatocyte transplantation in acute liver failure," *Liver Transplantation*, vol. 6, no. 1, pp. 32–40, 2000.
- [35] R. A. Fisher and S. C. Strom, "Human hepatocyte transplantation: Worldwide results," *Transplantation*, vol. 82, no. 4, pp. 441–449, 2006.
- [36] R. A. Fisher, D. Bu, M. Thompson et al., "Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion," *Transplantation*, vol. 69, no. 2, pp. 303–307, 2000.
- [37] E. Pareja, M. J. Gomez-Lechon, M. Cortes, A. Bonora-Centelles, J. V. Castell, and J. Mir, "Human hepatocyte transplantation in patients with hepatic failure awaiting a graft," *European Surgical Research*, vol. 50, no. 3-4, pp. 273–281, 2013.
- [38] F. Wang, L. Zhou, X. Ma et al., "Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: A prospective five-year follow-up study," *Transplantation Proceedings*, vol. 46, no. 1, pp. 192–198, 2014.
- [39] U. Baccarani, A. Sanna, A. Cariani et al., "Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: Results of a 2-year experience," *Liver Transplantation*, vol. 9, no. 5, pp. 506–512, 2003.
- [40] R. Gramignoli, V. Tahan, K. Dorko et al., "New potential cell source for hepatocyte transplantation: Discarded livers from metabolic disease liver transplants," *Stem Cell Research*, vol. 11, no. 1, pp. 563–573, 2013.
- [41] S. Emre, "Living donor liver transplantation: A critical review," *Transplantation Proceedings*, vol. 33, no. 7-8, pp. 3456–3457, 2001.
- [42] S. Emre and V. Umman, "Split liver transplantation: An overview," *Transplantation Proceedings*, vol. 43, no. 3, pp. 884–887, 2011.
- [43] W. H. Kitchens, "Domino liver transplantation: Indications, techniques, and outcomes," *Transplantation Reviews*, vol. 25, no. 4, pp. 167–177, 2011.
- [44] T. M. Antonini, P. Lozeron, C. Lacroix et al., "Reversibility of acquired amyloid polyneuropathy after liver retransplantation," *American Journal of Transplantation*, vol. 13, no. 10, pp. 2734–2738, 2013.
- [45] R. Rai, "Liver Transplantation- an Overview," *Indian Journal of Surgery*, vol. 75, no. 3, pp. 185–191, 2013.
- [46] S. Raia, J. R. Nery, and S. Mies, "Liver transplantation from live donors," *The Lancet*, vol. 334, no. 8661, p. 497, 1989.
- [47] F. Rauchfuss, A. Bauschke, E. Bärthel, and H. Scheuerlein, "Living Donor Liver Transplantation - Past and Present," *Zentralbl Chir*, 2013.
- [48] S. Florman and C. M. Miller, "Live donor liver transplantation," *Liver Transplantation*, vol. 12, no. 4, pp. 499–510, 2006.

- [49] R. S. Brown Jr., "Live donors in liver transplantation," *Gastroenterology*, vol. 134, no. 6, pp. 1802–1813, 2008.
- [50] S.-G. Lee, "A complete treatment of adult living donor liver transplantation: A review of surgical technique and current challenges to expand indication of patients," *American Journal of Transplantation*, vol. 15, no. 1, pp. 17–38, 2015.
- [51] E. Neshar, E. Island, P. Tryphonopoulos et al., "Split liver transplantation," *Transplantation Proceedings*, vol. 43, no. 5, pp. 1736–1741, 2011.
- [52] H. E. Wilczek, M. Larsson, S. Yamamoto, and B.-G. Ericzon, "Domino liver transplantation," *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, vol. 15, no. 2, pp. 139–148, 2008.
- [53] A. Furtado, L. Tomé, F. J. Oliveira, E. Furtado, J. Viana, and R. Perdigo, "Sequential liver transplantation," *Transplantation Proceedings*, vol. 29, no. 1-2, pp. 467–468, 1997.
- [54] I. Popescu and S. O. Dima, "Domino liver transplantation: How far can we push the paradigm?" *Liver Transplantation*, vol. 18, no. 1, pp. 22–28, 2012.
- [55] G. A. P. Barreiros, P. R. Galle, and G. Otto, "Familial amyloid polyneuropathy," *Digestive Diseases*, vol. 31, no. 1, pp. 170–174, 2013.
- [56] H. Ohdan, "Response: Domino liver transplantation as a valuable option," *Transplant International*, vol. 27, no. 4, pp. e29–e30, 2014.
- [57] J. R. Golbus, L. Farhat, R. J. Fontana, and M. Rubenfire, "Rapidly progressive atherosclerosis after domino liver transplantation from a teenage donor with homozygous familial hypercholesterolemia," *Journal of Clinical Lipidology*, vol. 11, no. 5, pp. 1284–1288, 2017.
- [58] Z.-J. Zhu, L. Wei, W. Qu et al., "First case of cross-auxiliary double domino donor liver transplantation," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 23, no. 44, pp. 7939–7944, 2017.
- [59] A. Schielke, F. Conti, C. Goumard, F. Perdigo, Y. Calmus, and O. Scatton, "Liver transplantation using grafts with rare metabolic disorders," *Digestive and Liver Disease*, vol. 47, no. 4, pp. 261–270, 2015.
- [60] A. Khanna, M. Hart, W. L. Nyhan, T. Hassanein, J. Panyard-Davis, and B. A. Barshop, "Domino liver transplantation in maple syrup urine disease," *Liver Transplantation*, vol. 12, no. 5, pp. 876–882, 2006.
- [61] I. R. Badell, S. I. Hanish, C. B. Hughes et al., "Domino liver transplantation in maple syrup urine disease: A case report and review of the literature," *Transplantation Proceedings*, vol. 45, no. 2, pp. 806–809, 2013.
- [62] A. Khanna, R. Gish, S. C. Winter, W. L. Nyhan, and B. A. Barshop, "Successful Domino Liver Transplantation from a Patient with Methylmalonic Acidemia," in *JIMD Reports*, vol. 25, pp. 87–94, Springer, Berlin, Germany, 2016.
- [63] B. Struecker, N. Raschok, and I. M. Sauer, "Liver support strategies: Cutting-edge technologies," *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 11, no. 3, pp. 166–176, 2014.
- [64] G. M. Abouna, H. G. Boehmig, B. Serrou, H. Amemiya, and G. Martineau, "Long-term hepatic support by intermittent multi-species liver perfusions," *The Lancet*, vol. 296, no. 7669, pp. 391–396, 1970.
- [65] J. Uchino, T. Tsuburaya, F. Kumagai, T. Hase, and T. Hamada, "A hybrid bioartificial liver composed of multiplated hepatocyte monolayers," *ASAIO Trans*, vol. 34, no. 4, pp. 972–977, 1988.
- [66] J. C. Gerlach, J. Encke, O. Hole, C. Müller, C. J. Ryan, and P. Neuhaus, "Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion," *Transplantation*, vol. 58, no. 9, pp. 984–988, 1994.
- [67] K. Naruse, "Artificial liver support: Future aspects," *The International Journal of Artificial Organs*, vol. 8, no. 2, pp. 71–76, 2005.
- [68] P. Krisper and R. E. Stauber, "Technology Insight: artificial extracorporeal liver support—how does Prometheus® compare with MARS?" *Nature Clinical Practice Nephrology*, vol. 3, no. 5, pp. 267–276, 2007.
- [69] A. Eroglu, M. J. Russo, R. Bieganski et al., "Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells," *Nature Biotechnology*, vol. 18, no. 2, pp. 163–167, 2000.
- [70] A. Nussler, S. Konig, M. Ott et al., "Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases," *Journal of Hepatology*, vol. 45, no. 1, pp. 144–159, 2006.
- [71] S. C. Strom, R. A. Fisher, W. S. Rubinstein et al., "Transplantation of human hepatocytes," *Transplantation Proceedings*, vol. 29, no. 4, pp. 2103–2106, 1997.
- [72] E. Fitzpatrick, R. R. Mitry, and A. Dhawan, "Human hepatocyte transplantation: State of the art," *Journal of Internal Medicine*, vol. 266, no. 4, pp. 339–357, 2009.
- [73] A. Dhawan, J. Puppi, R. D. Hughes, and R. R. Mitry, "Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges," *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 7, no. 5, pp. 288–298, 2010.
- [74] K. Asonuma, J. C. Gilbert, J. E. Stein, T. Takeda, and J. P. Vacanti, "Quantitation of transplanted hepatic mass necessary to cure the Gunn rat model of hyperbilirubinemia," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 27, no. 3, pp. 298–301, 1992.
- [75] J. P. Vacanti and K. M. Kulig, "Liver cell therapy and tissue engineering for transplantation," *Seminars in Pediatric Surgery*, vol. 23, no. 3, pp. 150–155, 2014.
- [76] U. Baccarani, A. Sanna, A. Cariani et al., "Cryopreserved human hepatocytes from cell bank: In vitro function and clinical application," *Transplantation Proceedings*, vol. 37, no. 1, pp. 256–259, 2005.
- [77] A. Bonora-Centelles, M. T. Donato, A. Lahoz et al., "Functional characterization of hepatocytes for cell transplantation: Customized cell preparation for each receptor," *Cell Transplantation*, vol. 19, no. 1, pp. 21–28, 2010.
- [78] R. D. Hughes, R. R. Mitry, A. Dhawan et al., "Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation," *Liver Transplantation*, vol. 12, no. 5, pp. 713–717, 2006.

3.2. Artigo 2

✓ **Título:** Hepatocyte Transplantation as a therapeutic alternative for the treatment of acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse

✓ **Referência Bibliográfica:** Cardoso, LMF; Henriques-Pons, A; Pinto, MA; Alves, LA

✓ **Situação:** Artigo finalizado. Em revisão por parte dos autores

✓ **Descrição e justificativa:** No presente trabalho, realizamos o transplante hepatocitário com abordagem no conceito dominó, como uma alternativa terapêutica ao tratamento da insuficiência hepática aguda. A ausência de tecido hepático para a obtenção de hepatócitos é um grande fator limitante que implica na aplicação clínica do transplante celular como uma alternativa ao transplante de fígado. O conceito dominó, originalmente utilizado para o transplante de fígado, “reaproveitando” órgãos de pacientes com doenças metabólicas hepáticas nos remete a probabilidade, também de utilizar fígados que não atendem aos critérios de transplante e serão descartados, como fontes de hepatócitos para terapia celular. A maior causa de rejeição para um órgão ser transplantado é a macroesteatose acima de 60%. A utilização desse tipo de fonte celular já é sugerida pela literatura. Entretanto, nenhum processo de separação das diferentes populações de hepatócitos, com e sem esteatose é descrita. Assim, nosso objetivo foi poder caracterizar o isolamento de hepatócitos de órgãos com macroesteatose e separar as populações de células saudáveis das células com alto grau de esteatose e realizar o transplante hepatocitário. Para isso, desenvolvemos dois modelos murinos capazes de nos fornecer base experimental para testarmos nossa hipótese. Nossos resultados foram promissores quanto à separação e utilização dos hepatócitos obtidos de órgãos com macroesteatose e tendem a ser uma importante fonte celular no tratamento da IHA.

HEPATOCTE TRANSPLANTATION AS A THERAPEUTIC ALTERNATIVE FOR THE TREATMENT OF ACETAMINOPHEN-INDUCED ACUTE LIVER FAILURE IN MICE

Cardoso, LMF¹; Henriques-Pons,A ²; Pinto, MA³; Alves, LA¹

Author listing:

Cardoso, LMF¹ – Liana Monteiro da Fonseca Cardoso lianamfc@gmail.com

Henriques-Pons, A² – Andrea Henriques Pons andrea@ioc.fiocruz.br

Pinto, MA³ – Marcelo Alves Pinto marceloalvespinto@gmail.com

Alves, LA¹ – Luiz Anastácio Alves alveslaa@gmail.com

¹Laboratório de Comunicação Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Address Correspondence to:

Luiz Anastácio Alves
Laboratório de Comunicação Celular
Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Tel: (55) (21) 3865-8116; FAX: (55) (21) 2280-1589
e-mail: alveslaa@ioc.fiocruz.br / alveslaa@gmail.com

ABSTRACT

Acute liver failure (ALF) is a severe syndrome with an elevated mortality rate, ranging from 40 to 80% of patients. Technological approaches, aiming to support and treat ALF patients are in constant development and vary from dialysis systems (biological and non-biological) to xenotransplantation and stem cell transplant. However, orthotopic liver transplantation (OLT) remains the only proven treatment for liver failure or end-stage liver diseases and is also applied for liver-based intractable metabolic disorders. However, the low availability of liver donors is a major limitation for OLT, a factor that contributes to the high mortality observed. Due to organ scarcity, surgery invasiveness, and persistent mortality/morbidity after conventional procedures, other treatments are being explored. Amongst these, hepatocyte transplantation (HT) is an attractive alternative that shows promising results in the treatment of different metabolic disorders. Alternative sources of hepatocytes, including cells derived from rejected livers after transplantation, are being investigated, although the isolation of primary human hepatocytes is also limited. Thus, the concept of Domino Hepatocyte Transplantation (DHT) has emerged. DHT can be beneficial and safe cell therapy, as long as viable and metabolically functional human hepatocytes are used. In this work, we used two experimental models for DHT, which were hepatocytes isolated from macrosteatotic murine livers and hepatocytes transplantation in the ALF model. Our results show that hepatocytes with fat accumulation can be separated by centrifugation to select cells with little or no steatosis. These cells have high cellular viability after isolation, normal albumin secretion, and normal adhesion when maintained in culture. We then suggest that organs with advanced steatosis can also be a source of hepatocytes after the selection of best-suited cells for transplantation. Furthermore, we demonstrate that this cellular allograft can reduce ALF levels in grafted mice due to significant reduction of liver damage.

1. INTRODUCTION

Acute liver failure (ALF) is a potentially fatal and severe clinical syndrome resulting from the abrupt loss of hepatocytes function in patients with no pre-

existing liver disease. This is the result of massive necrosis of hepatocytes and is associated with hepatic encephalopathy (HE), with any degree of mental alteration, coagulopathy, and jaundice (1, 2). ALF is associated with extremely high mortality rates, often more than 80% in developing countries (3, 4). A variety of causes have been identified, including toxic substances, infections, neoplasias, and drug-induced lesions. The first therapeutic strategies used in the treatment of ALF are blood transfusion and hemodialysis (5), in an attempt to remove toxins from the blood. However, these therapies are not effective when performed several times or for prolonged periods, favoring the occurrence of secondary infections, hemorrhages, and death in few days (93-95). The etiologies related to acute liver failure (ALF) differ according to the geographic region and are much more common in developing countries. In this case, viral infections with hepatitis A, B, and E are the predominant cause of mortality, with rates above 50% of ALF patients (6, 7). Governmental public health actions (e.g., vaccination and improved sanitation) are among the factors that reduced the incidence of these infections in the United States and most of Western Europe, where drug-induced liver injury is the most common cause of ALF (8). In the United States and the United Kingdom, APAP (acetaminophen) overdoses currently correspond to 45% to 60% of ALF cases and the intake of doses exceeding 8 g/day of APAP is directly related to the induction of ALF. Although, therapeutic doses of 3-4 g/day have also been linked to hepatotoxicity and are capable of inducing severe hepatic lesions (9).

Currently, orthotopic liver transplantation (OLT) is considered the standard gold treatment for end-stage liver disease, ALF, and liver-based metabolic disorders. Moreover, OLT is the only intervention with proven clinical benefits and long-lasting effects, with survival rates of 80 to 90% in the first

year post-transplantation. However, the number of patients who may benefit from liver transplantation is quite limited because there is a shortage of organ donors for transplantation (10). Therefore, there is a crescent discrepancy between the number of patients on waiting lists and the number of OLTs performed, leading to high mortality (11). This shortage of organs for liver transplantation has been associated with many factors, including the high cost and limitation of medical teams with adequate experience and training for the procedures (10, 12, 13). (4, 14). , it has been reported that the time lapse between the organ collection and the transplant recipients directly affects the surgery success due to the short time in which the organ remains viable(15).

The technological advances allowed the development of new therapeutic strategies for ALF, classified as extracorporeal liver support devices, to mimic the main functions of the organ (16). Extracorporeal liver devices are primarily intended to provide temporary support to ALF patients, as bioartificial liver (BAL) tested using human or non-human hepatocytes (16-20). However, all these alternatives are still considered experimental, despite some reports pointing to their beneficial use (21-24). Therefore, it is important to fully explore and improve these procedures using controlled clinical trials.

Based on the deficiency of effective alternative therapies, the transplantation of human hepatocytes has been studied as a promising alternative for the treatment of ALF and hepatic metabolic diseases (25-27). Studies approaching cell-based therapies in animal models of liver diseases show the remarkable capacity of hepatocytes regeneration in vivo by compensatory regeneration or direct hyperplasia (28-30). Therefore, the transplantation of these cells would play an important role as a therapeutic innovation, acting directly on the tissue recovery in cases of liver dysfunction or damage. Thus, hepatocyte

transplantation can be a valuable procedure to increase patients survival rates while on waiting lists (31-34). Moreover, cell transplantation may have advantages over surgical procedures, as a less invasive procedure, it can be repeatedly performed in programmed sessions, there is no need for chronic immunosuppression, and more than one recipient can benefit from a single donor. However, a major challenge for the wide clinical application of these methods is the availability of hepatocytes suited for engraftment (25, 26, 35, 36). Many liver cells have been proposed and investigated as alternative sources to human hepatocytes, such as: human tumor cell lineages, immortalized human hepatocytes, and pig liver cells for xenogeneic transplant (4, 37-40). However, each of these sources has limitations and contraindications for clinical use, such the risks of tumor transmission and the biosafety and biocompatibility of animal tissue (39, 41). In addition, the degree to which hepatocyte donors restored liver failure was not adequate to circumvent the need for organ replacement, partially because of the requirement for cellular function immediately after the transplant. The lack of clinically relevant disease models for animal transplant studies reverts in unknown aspects of the process, as the number of cells required for immediate reversion of liver disfunction. Moreover, optimized cryopreservation methods are necessary to deliver high numbers of metabolically and functionally viable cells after thawing.

Ideally, isolated human primary hepatocyte cells would be the best source of hepatocytes for cell therapy. Yet, numerous studies using animal models in the last 30 years indicate that adult hepatocyte transplantation can reverse ALF and can correct various metabolic hepatic deficiencies (42). Therefore clinical trials using hepatocytes transplantation can be advantageous when considering

the pros and cons, especially (essa frase contradizia uma frase anterior que falava da limitação em biosegurança e biocompatibilidade)for long-term procedures, only partial correction of the metabolic disorder has been achieved. . Therefore, further clinical and experimental studies should be conducted to establish the parameters for successful transplant procedures (25, 43, 44).

(35, 45).

As an additional source of human primary cells, it has been suggested the use of rejected organs for orthotopic transplantation and fractions of organs remaining from pediatric transplants (35, 45). Each year, a substantial number of livers from deceased donors is rejected for transplantation, the causes include high-grade steatosis and non-viral cirrhosis. These organs have been targeted for studies to obtain liver cells for cellular transplantation. In some transplantation centers, approximately 40% of donor grafts are discarded because of severe liver steatosis (46). Conventionally, steatotic livers with > 60% fat must be discarded. Organs with 30%-60% of fat deposition show poor results, with decreased graft and patient survival (47). In this context, livers rejected for transplantation represent a potentially valuable source of cells for the transplantation of hepatocytes (35, 48, 49).

Recently, our group published a review emphasizing the concept of domino hepatocyte transplantation as a technique for cell transplantation using cellular sources that would be discarded. We suggested the use of non-viable organs for liver transplantation to isolate viable hepatocytes. These high-quality cells could then be cryopreserved in cell banks available for the treatment of several patients with acute and metabolic liver diseases (49).

In this context, the proposal of this work is to perform hepatocyte domino transplantation in a chemically induced ALF model, using hepatocytes from

livers of mice with macrosteatosis. For this, our main goal was to develop a protocol for the isolation, selection, and cryopreservation of viable cells from livers of steatotic mice for transplantation domino in the ALF model.

2. MATERIALS AND METHODS

ANIMALS:

Two mouse lineages obtained from the experimental breeding center of the Oswaldo Cruz Foundation were used. For the development of the ALF model, 4 to 6 month-old Swiss Webster mice (25-30 g) were used and for the hepatic macrosteatosis model, we used 6 to 8 month-old male C57BL/6 mice (25-30 g). For the induction of steatosis, the animals were submitted to a diet deficient in methionine and choline (51) and the other animals were fed using a conventional diet. The experimental procedures were approved by the Institutional Committee on Care and Use of Animals (CEUA-Fiocruz) and conducted in strict accordance with the recommendations of the guide of care and use of laboratory animals of the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL) and the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil).

ACUTE LIVER FAILURE MODEL:

Aiming to developing an ALF chemical model, we used acetaminophen (APAP) as a hepatotoxic agent and tested different doses to identify important characteristics found in ALF patients. Thus, Swiss Webster male mice were randomly divided in three groups: Group 1 untreated mice (control group); Group 2 animals that received a single intraperitoneal dose of saline (vehicle group); Group 3 animals that received a single dose of intraperitoneal APAP, ranging from 350 mg/kg to 750 mg/kg of body weight (APAP group) The APAP solution was prepared following the solubility

coefficient of APAP/kg solvent in saline (17 g/L) under constant stirring and at 30°C (50). After the treatment, all animals were observed for up to 96 hours.

EVALUATION OF HEPATIC ENCEPHALOPATHY:

Neurological signs of encephalopathy were observed in the animals after 96 hours of treatment with APAP. Encephalopathy was categorized as 0 to IV following criteria adapted from O'Grady-2005, according to animal's motor reflexes, activity, ataxia, sonolence, atrial stimulation, and eyelid reflex (Table 1) (51). In addition, the degree of encephalopathy presented by the animals was evaluated later by the open field test. Briefly, this test aims to assess the possible behavioral changes caused by acetaminophen toxicity, contributing to the evaluation of encephalopathy (52).

BIOCHEMICAL EVALUATION:

Blood samples were collected via cardiac puncture and centrifuged at xXXg to obtain the sera. The quantification of serum albumin, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) were using the Labtest commercial kit (Lagoa Santa, MG, Brazil). The reaction was read using a SpectraMax® M5 (Molecular Devices, USA) plate reader at 640 nM for albumin and 340 nM for ALT and AST.

HISTOLOGY:

Liver tissue samples were submitted to standard histological processing in paraffin and stained with hematoxylin&eosin for the analysis of hepatic lesions, disorganization of stromal architecture, steatosis, necrosis, and cellular inflammatory infiltration. Two liver fragments were collected from three animals per group on days indicated in Figure legends and three to four histological

sections were stained per fragment. Then ten random regions were photographed under the magnification of 200x and the analyses were done blindly (53).

INDUCTION OF HEPATIC STEATOSIS IN AN EXPERIMENTAL MODEL:

Male C57BL/6 mice were submitted to a diet deficient in methionine and choline (MCD) (Rhoister, Araçoiaba da Serra-São Paulo, Brazil) for 30 days for the induction of hepatic steatosis (51). Control mice received a commercially available conventional diet.

HEPATIC STEATOSIS:

The level of hepatic steatosis was classified according to a study published by Gerspach and collaborators 2017, with some adaptations for mice, as follows grade 0: hepatocytes with no lipid vacuoles; grade 1: small lipid vacuoles around the centrilobular vein (light level); grade 2: lipid vacuoles varying from 25% - 50% of the microscopic fields (moderate level), and grade 3: lipid vacuoles of various sizes, with occupying more than 50% of the fields (high level).

MOUSE HEPATOCYTE ISOLATION:

Hepatocytes were isolated by enzymatic dissociation using a method adapted from previous reports (55, 57). Male mice were euthanized in a CO₂ chamber and the livers were perfused throughout the hepatic portal vein using a peristaltic pump for a continuous flow with a Ca²⁺-free Hank's buffer (HBSS) in the presence of 0,5mM of EGTA (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). After the first perfusion we used HBSS buffer with Ca²⁺ XXXmM and 800 units of collagenase type I (Gibco) at a rate of 1.5 ml/min. Then the livers were carefully removed from the abdominal cavity and transferred to a petri dish containing approximately 40 mL of Williams' E medium

(Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (Gibco). The Gilson's capsule was carefully removed to obtain a cellular suspension that was filtered through a 45 micrometers strainer. For hepatocytes isolation, we performed low spin centrifugation of 50 xg at 4°C for 5 min and the pellet was resuspended in Williams' E medium with 10% FBS.

PURIFICATION BY PERCOLL GRADIENT:

To enrich the samples in hepatocytes, we centrifuged the cells using a 48% Percoll gradient at 50 xg at 4°C for 10 minutes. The concentration of the hepatocytes suspension was adjusted to 5 to 10×10^6 cells/mL in William's E medium and 25 mL of hepatocytes suspension were overlaid on 24 mL of Percoll solution (54) and centrifuged at 50 xg for 10 min at 4°C. After centrifugation, viable hepatocytes were resuspended in 25 ml of William's E medium supplemented with 10% FBS. The cells were washed twice by centrifugation at 50 xg for 2 min and donor hepatocytes were used when viability exceeded 90%.

DETERMINATION OF HEPATOCYTE VIABILITY:

Cell viability after isolation and purification was determined by Trypan blue dye exclusion using a 0.2% solution (Sigma – Aldrich, USA) MTT. (55). In this case, 5×10^4 fresh viable hepatocytes were plated and incubated in the presence of Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (Sigma – Aldrich, USA) for 3 hours at 37° C. Then, the MTT reagent was removed and the reactions were interrupted using DMSO and the concentration of formazan was assayed using a spectrophotometric plate reader EzRead 400 (Biochrom, Cambridge, UK) at 570 nm.

CULTURE OF HEPATOCYTES:

After Percoll gradient purification, freshly isolated hepatocytes were cultured at 37 °C for up to ten days in 24-well plates in William's E medium supplemented with 4% (vol/vol) FBS plus 2 mM GlutaMAX (Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA), 1X ITS supplement (insulin, transferrin and selenium) (Gibco® by Life Technologies), 100nM dexamethasone (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Gibco® by Life Technologies) at a density of 1×10^5 cells/mL in a 5% of CO₂ incubator (56, 57). After four to six hours of incubation, the media were replaced while the hepatocytes were firmly attached . The media were completely changed at every 48 hours.

LIPID STAINING IN PRIMARY HEPATOCYTES:

The presence of lipids in primary hepatocytes was detected using the BODIPY™ probe (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene) (Molecular Probes, Eugene-Oregon, USA) according to manufacturer's orientation (58).

DOSE DETERMINATION FOR IMMUNOSUPPRESSION IN MICE:

To prevent the rejection by the recipient's immune system to transplanted cells, the animals were immunosuppressed using Tacrolimo® (Libbs – Pharmaceutical LTDA, SP). We tested different doses to chose the concentration that would lead to immunosuppression with no renal or especially liver damage, since Tacrolimo® is metabolised via cytochrome P450, any damage to the liver parenchyma could

directly interfere with cell therapy. With that, we tested the doses 0.1; 0.15 and 0.2 mg/kg of body weight per day of Tacrolimo® intraperitoneally in Swiss Webster mice prior to initiating immunosuppression for cell therapy. The experiments were performed in triplicate.

CELL THERAPY:

Two days before hepatocyte domino transplantation, Swiss mice received intraperitoneally 0.1 mg/kg of body weight of Tacrolimus® immunosuppressant per day and done once a day even after hepatocytes allograft. Next, Swiss mice received a single intraperitoneal dose of 400 mg/kg of body weight of APAP for ALF induction. Four hours after established ALF, the animals received 1×10^6 hepatocytes in 200 μ L of saline injected intraperitoneally or vehicle.

For this experiment, the animals were randomly separated in 3 groups: group I - animals with no ALF that received immunosuppressive therapy only (n = 15); group II –ALF animals that received no hepatocytes, only the vehicle (n = 30); and group III - ALF animals that received 1×10^6 freshly isolated hepatocytes (n = 30). For cell therapy experiments in Swiss mice, a total of 75 animals were used three independent experiments. The determination of the number of animals required for the study was statistically established using the G * Power 3.1 Software produced by the University of Dusseldorf (<http://www.gpower.hhu.de/>) (59). This type of analysis is recommended by the National Center for Animal Replacement, Refinement and Reduction (NC3Rs).

STATISTICAL ANALYSIS:

All variables were expressed as mean \pm standard deviation. The survival data of the animals was analyzed by constructing Kaplan-Meier survival curves with log-rank test. Relative risks were obtained with proportional Cox risk models. For the

other results, before we started the statistical inference tests, we verified if the samples followed a normal distribution. For this, we use the D'Agostino and Pearson test. When the data followed a normal distribution, we used a suitable parametric test, for two groups the T test (paired or unpaired) and for more than two groups we used the ANOVA with post-test Bonferroni. When the results followed no normal distribution, we used non-parametric tests for two Wilcoxon (equivalent to paired test), Mann-Whitney (equivalent to unpaired test) and for more than two groups we used Kruskal-Wallis, Dunn posttest. The level of significance was alpha of 5% ($P < 0.05$) for all bicaudal tests. Graphs and tests were done using GraphPad PRISM 7 program (San Diego, California, USA).

3. RESULTS

Development of the chemical model of Acute Liver Failure (ALF)

To test if transplanted hepatocytes would recover liver function in mice with ALF, we developed an experimental model capable of reproducing important features found in patients. For this, Swiss mice were treated with APAP in different doses (Figure 1) and the ideal dose was chosen according to the development of hepatic encephalopathy; increased blood levels of AST, ALT, and albumin; and morphological and histopathological changes. Moreover, the survival curve was evaluated and we found that the mortality was low in mice treated with 350 mg/kg (Figure 1A) and, after the treatment with 400 mg/kg, about 30% of the mice survived after twenty hours (Figure 1B). Considering all parameters evaluated, this dose was used in the next experiments, as the other treatments led to very high mortality within only ten hours (Figure 1C-H). Liver samples were collected from mice treated with 400

mg/kg to evaluate morphological and histopathological alterations induced by APAP treatment. We analyzed parenchymal structure and centrilobular organization, hepatocytes morphology, hemorrhagic areas, necrotic areas, and cellular inflammatory infiltration (Figure 2) and observed no alterations in mice treated with vehicle (Figure 2A, C, and E), with normal hepatocytes architecture, organized in cords around the centrilobular vein. However, after the treatment, morphological alterations were already found after 3 hours (Figure 2B), with extensive hemorrhagic areas (arrows) cellular and structural disorganization, and few hepatocytes apparently undergoing cell death, with cytoplasmic eosinophilia (Figure 2B). These alterations increased after 6 hours of treatment (Figure 2D) and evidences of hepatocyte necrosis were observed after 24 hours after the treatment (Figure 2F). We also observed inflammatory foci, and these pathological signs of ALF progressively increased until 96 hours after the treatment, while vehicle-treated mice remained normal (Figure 3).

The development of hepatic encephalopathy was classified according to the criteria of O'Grady-2005 and the onset of neurological changes was quantified by the open field test, observing the decrease or absence of reflexes and motor activity. According to the pre-established criteria, the animals developed hepatic encephalopathy of varying degrees (I to IV) as seen in Table 2 and showed alterations of motor and behavioral functions induced by the APAP toxicity. Our results indicate that the animals present the first symptoms related to the neurological alterations after 3 hours of treatment, with higher intensity around 6 hours. As seen in Figures 4A and 4B, there is a significant reduction of the vertical and horizontal displacements of the treated animals when compared with control animals. This result indicates that after APAP administration, the animals decrease their capacity of locomotion and

ambient exploration and this condition remains until the first 24 hours after ALF induction.

Liver damage was assessed by the release of liver transaminases to the blood and, as observed in Figure 4C and 4D, there was a significant increase in serum ALT (120.1 ± 11.83 U/L vs. 48.98 ± 8.15 U/L) and AST levels (97.69 ± 8.4 U/L vs. 66.71 ± 7.1 U/L) after 3 hours of treatment, when compared with vehicle-treated mice. Liver metabolic capacity was also compromised after APAP treatment, as ascertained by the decreased serum albumin (Figure 4E).

Murine model of MCD diet macrosteatosis

To start the tests for cellular therapy using isolated hepatocytes from steatotic livers an experimental model of high-grade steatosis was performed. The animals that received the diet, presented a significant weight loss when compared with control animals (not submitted to the MCD diet). The initial weight of the animals was similar between the groups, but the animals that received the MCD diet presented significant loss of weight at the end of the 30th day. Concerning the macroscopic aspect of the livers, all animals fed with the conventional diet had normal appearance and color. However, animals that received the MCD diet had reduced liver size and yellowish fat deposition. The development of steatosis was classified according to published work but with some adaptations for mice (Gerspach, Imhasly et al. al. 2017). Histologically, all animals fed with the conventional diet showed steatosis grade 0, normal hepatic parenchyma architecture, no alterations in cellular morphology, and no cytoplasmic lipid vacuoles (Figure 5A). However, animals treated with the MCD diet developed high-grade steatosis (grades 2 and 3), with variable-sized lipid vacuoles in hepatocyte cytoplasm. We observed that these fat macrovesicles displaced the nucleus of the cells to the periphery, occupying much of the intracellular content as seen in Figure 5B.

Hepatocytes isolation from steatotic mice

Our next step was the optimization of steatotic hepatocytes isolation for cellular transplant, a difficult protocol when isolating it very difficult cells from animals submitted to MCD diet (steatosis around 60%, data not shown). In Figure 6A, we identified morphologically different populations of hepatocytes, with or without intracellular fat deposition according to Bodipy labeling (Figure 6B) immediately after isolation and low centrifugation. Although at low density, we observed that hepatocytes with this degree of steatosis (represented by the arrows in Figures 6A and B) are susceptible to the process of high centrifugation, with apparent plasma membrane rupture and release of intracellular content. On the other hand, cells with little or no lipid deposition remain intact and with high viability after separation, as illustrated in the Figure 6C and D. According to Trypan blue exclusion, we observed that these cells remain viable after high centrifugation (figure 6 E). Thus, we believe that the low density is the result of cell death during hepatocytes processing. As a result, a large percentage of cells are lost during the early stages of perfusion, collagenase action, and mechanical digestion.

After isolation we evaluated the viability by the trypan blue exclusion technique. Cell viability before the Percoll gradient obtained from macrosteatosis livers was to $40,62 \pm 3,71$ %, and density around 1.25×10^6 cells per gram of tissue. In control animals, not exposed to diet, the viability before the gradient was $71,27 \pm 5,2\%$, and density around 10.0×10^6 cells per gram of tissue (Figure 7A). After the Percoll gradient the viability was $89,99 \pm 2,61\%$ for the steatosis group and $96,53 \pm 3,73\%$ for the control group (Figure 7B). In Figure 7 C and D, we present a representative image of cells isolated from macrosteatosis and normal organs after Percoll gradient, respectively.

To remove residues of percoll from the cell suspensions, we performed high-centrifugation sequences and observed that after successive centrifugation steps, cells with a high degree of steatosis were lost, not visualized under fluorescence microscopy after staining the cells with Bodipy. Thus, it was possible to select the ideal population for allogeneic hepatocyte transplantation. After isolation and separation, the hepatocytes were kept in culture for up to 10 days, the supernatants were collected for albumin analysis and the cellular viability was evaluated by MTT (Figure 7E and 7F). Moreover, the cells retained high adhesion capacity to the substrate, especially until the fifth day (Figure 8).

Effect of immunosuppressant treatment

To prevent or decrease rejection of transplanted cells from by the recipient's immune system, the animals were immunosuppressed with Tacrolimo®. (60). Tacrolimo® is used to prevent graft rejection of liver, kidney, heart, and small bowel and is widely applied in experimental transplantation studies (61, 62). We observed that, after 10 days, vehicle-treated animals showed no behavioral alterations or weight loss (data not shown). In addition, after histological analysis, the kidneys and liver showed normal morphology, as illustrated in figure 9A and 9B, respectively. Tacrolimus treatment did not induce renal injury, as illustrated in figures 9C and E, and no behavioral alterations that could suggest mental confusion or neurological dysfunction at any dose tested. Administration of 0,1 mg/kg body weight for 10 days did not induce liver damage either (Figure 9D) or weight loss in the treated animals. However, at the highest doses, 0,15 and 0,20 mg/kg body weight, we observed morphological changes in the hepatic parenchyma, with the presence of

necrosis and vascular ectasia (a trauma that promotes a dilated blood vessels) from the fifth consecutive day, figuras 9F and 9H. These animals also had about 28% loss of weight in five days. Therefore, we opted for the lowest dose of tacrolimus 0.1 mg/kg body weight, once daily, so that the immunosuppressant did not induce liver injury and could interfere with our ALF model.

Cell Therapy

Our main objective was to describe a method of separating cells with a high degree of steatosis from “healthy” cells and to use them in allogeneic hepatocyte transplantation. Thus, after obtaining the cells, we performed the necessary steps to perform the hepatocyte transplant with approach in the domino concept.

In this work, we used two mouse strains, a fully MHC-mismatched: Swiss Webster mouse (ALF model and recipient animal) and C57BL/6 mouse (macrosteatosis model and cell donor animals). Thus, to prevent possible damage and immune rejection of the recipient animal to the transplanted cells, we initiated immunosuppression therapy in the recipient mice two days prior to the induction of ALF and cell transplantation. Animals received an intraperitoneal dose of 0.1 mg/kg body weight Tacrolimo® per day even after cell transplantation.

Following immunosuppression therapy the mice underwent ALF induction as previously described. Cell therapy with 1×10^6 freshly isolated and separated hepatocytes from liver with macrosteatosis was performed 4 hours after established ALF. As shown in Figure 10A, we observed a small decrease in the percentage of mortality after 24 hours (70,37% to 61,90%). However, this difference was not significant between the groups ($p = 0.9762$). In addition, a

slight increase in survival to 48 hours that animals receiving cell therapy compared to animals receiving only the vehicle as a treatment. In addition, a significant increase in albumin secretion after 48 hours $3,41 \pm 0,17$ vs. $2,54 \pm 0,19$ mg/dL, respectively ($X \pm SD$, $p = 0,0029$) and a decrease in liver enzymes ALT ($129,9 \pm 2,56$ vs. $181 \pm 8,7$ U/L, $p < 0,0001$) and AST ($124,4 \pm 4,39$ vs. $99,72 \pm 2,43$ U/L, $p=0,0004$) 24 hours after cell therapy were observed compared to animals receiving the vehicle alone, (Figures 10B, 10C and 10D, respectively). Thus, indicating the improvement of the clinical condition of the animals after cell therapy. Although, liver enzyme levels and albumin levels have not been fully recovered, significant improvement can be seen when compared to animals that have not undergone hepatocyte therapy. According to the neurological evaluation data, the animals that received the cell transplantation showed the beginning of the recovery of behavioral habits after 24 hours, suggesting a possible reversal of encephalopathy. However, vertical and horizontal displacement movements are fully recovered only after 72 hours (Figures 10E and 10F). Although the survival increase has been small, we may suggest that hepatocyte domino transplantation seems to be a promising therapy in the treatment of liver injury. In addition to biochemical analyzes, we histologically evaluated the morphological changes in the hepatic parenchyma of ALF animals that received only the vehicle and animals that received cell therapy. According to the survival curve and biochemical analysis of liver enzymes AST and ALT, the first benefits of cell therapy were seen from 24 hours after hepatocyte infusion. Thus, the first histological analyzes were performed from 24 hours. According to HE-stained liver tissue samples 24 hours after cell therapy, animals receiving the vehicle alone developed moderate centrilobular necrosis throughout the liver parenchyma with some

hemorrhagic areas (figure 11 A). Animals receiving hepatocyte cell therapy had an initial degenerative cell change that will tend to evolve to necrosis in some regions of the hepatic parenchyma, being classified as mild necrosis (figure 11 B). In liver samples collected from animals after 48 hours that received only the vehicle, areas of severe necrosis were observed throughout the lobe covering both the centrilobular region and the portal area (figure 11 C). While in animals receiving cell therapy, necrosis remained isolated in some regions of the parenchyma, classified from mild to moderate (figure 11 D). After 72 and 96 hours, there were also differences in the degree of necrosis and presence of inflammatory infiltrate between the group receiving the vehicle only and the group receiving the cell therapy treatment. Cell therapy seems to decrease the extent of the lesion with a moderate degree of necrosis when compared to animals that did not undergo cell transplantation, the group not receiving cell treatment developed severe necrosis after 72 hours (figures 11 E and F). . Analyzes after 96 also showed necrosis to different degrees between the two groups (figures 11 G and H). The group without cell therapy with moderate to severe degree of necrosis and the group therapy with small regions with necrosis, characterizing mild level. According to histopathological analysis, animals that survived 7 days after hepatocyte cell therapy did not show any moderate or severe injury only slight disruption of the liver parenchyma (figure 12 B). Indicating a possible reversal of injury or tissue recovery, characteristic of a chemical model. Although the APAP model induces acute hepatotoxicity, it is described that the onset of the regeneration process occurs within 24-72 hours after induction of toxicity (63). Probably due to the restoration of glutathione (GSH) levels that promote acetaminophen metabolism and re-establish toxic metabolite elimination. Unless there is continuous administration and for GSH

depletion. However, the samples analyzed from animals that received only the vehicle, although surviving after 7 days, we could still observe the presence of necrosis (figure 12 A).

6. DISCUSSION

The development of appropriate ALF models is of paramount importance for understanding the pathogenesis and progression of this syndrome, as well as studying the potential benefits of hepatocyte transplantation. Over the years, many attempts have been made to develop *in vivo* models suitable for these purposes, based on surgical procedures, chemical exposure or viral infection (64, 65). However, a model that accurately reproduces all the characteristics of human ALF has not yet been established. However, given the obvious ethical constraints of patient research, animal models have a key role to play in future studies. The most used experimental model in relation to ALF is the APAP model (66). This model is often selected because of the epidemiological relevance in humans. In addition, the pathophysiology in mice reflects very closely to what is observed in humans, including the formation of reactive metabolites (67), mitochondrial damage with oxidative stress (68, 69) as well as in the presence of DNA fragmentation (68, 70) necrosis.

In overdose the commonly used analgesic/antipyretic acetaminophen (APAP, paracetamol) produces centrilobular hepatic necrosis. Studies in experimental animals have revealed that the toxicity is mediated by cytochrome P450 metabolism to N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI). Following low doses of acetaminophen the metabolite is efficiently detoxified by glutathione (GSH); however, following large doses hepatic GSH is depleted and NAPQI covalently binds to proteins as acetaminophen-cysteine adducts (71). A dose of 200 mg/kg for fasted mouse or

400 mg/kg for fed mice is sufficient to achieve significant liver toxicity within 6 to 24 h (72, 73). In contrast, rats are much less susceptible to APAP and develop only minor liver injury even at high doses of 1 g/kg (74). As such, the rat model thus has very limited relevance for humans. Although mice are generally better models for human APAP toxicity, strain differences need to be considered (75). In addition, female mice are generally less susceptible to APAP-triggered liver insults than male mice due to accelerated recovery of hepatic glutathione (GSH) levels (76).

Currently, there is no consensus in the literature related to the specific dose of acetaminophen capable of inducing acute hepatotoxicity in mice with all clinical aspects associated with human IHA. Several studies have been published, however, the doses may change from 100 to 900 mg/kg body weight (49, 72, 77, 78). Whereas acetaminophen toxicity depends on several factors such as species, age, gender and weight among other associated factors, this diversity of protocols may be justified. Thus, we standardized an IHA model according to the prerequisites established by Terblanche and Hickman (1991) capable of reproducing important characteristics developed in humans during IHA. This classic study describes six prerequisites of an experimental IHA model, applicable up to the present day as: reversibility, reproducibility, death due to hepatic failure, therapeutic window, appropriate physiology and metabolism and minimal risk to the people involved in the research.

According to the results presented, the dose of 400 mg/kg of body weight was able to reflect fundamental characteristics obligatory in an ALF model. These characteristics involve hepatic encephalopathy of varying degrees of I, II, III to IV, representing the neurological impairment of these animals; metabolic changes represented by elevation of liver enzymes ALT and AST in addition to albumin

decrease; high mortality rate (approximately 50%) and therapeutic window that will allow to evaluate the effect of hepatocyte transplantation on the survival of these animals. These responses were not observed in the other doses studied. Histopathological analyzes showed the development of areas of necrosis that varied from mild to severe and intense inflammatory infiltrate in the studied times, indicating the massive death of the hepatocytes. Therefore, the standardized model in this study, using a dose of 400 mg/kg body weight, fulfils many of the requirements previously established by several researchers to adequately address the pathophysiology of IHA and to test new therapeutic strategies.

Liver transplantation remains the definitive therapy in cases of liver failure. However, patients with end-stage liver disease die while waiting on the waiting list due to the limited number of organs available for transplantation. Thus, hepatocyte transplantation has been proposed as a very important alternative therapy in the recovery of liver function. Advantages of hepatocyte transplantation include maintaining the native liver in place which allows the possibility of native liver regeneration and the native liver serves as a back-up for transplanted cells, also the procedure is less invasive and the cryopreserved cells would be immediately available after cryopreservation in emergency situation (31, 45, 79). The optimization of the techniques that approach this procedure is of paramount importance for the establishment and the accomplishment clinic of this procedure. Thus, studies aimed at the isolation and mechanisms of preservation and storage of liver cells are crucial targets for the implementation of this therapeutic approach. However, the shortage of cell sources for this therapy is still a major limitation to be overcome. Some studies in the literature have suggested the use of organ rejection for orthotopic transplantation as a cellular source alternative (35, 48, 80, 81). Organs of patients with metabolic diseases who need to transplant from a cadaveric donor

are also discarded. However, approaching the concept of domino transplantation, some studies have suggested the use of these organs as a tissue source to obtain transplantable hepatocytes. Furthermore they describe that cells from metabolic diseased livers rapidly and efficiently repopulated a mouse liver upon transplantation (82, 83).

Steatosis livers are the leading cause of organ rejection for transplantation. Traditionally, steatotic livers > 60% fat are discarded. Livers with <30% fat are viable for liver transplantation and guarantee good graft function after transplantation. Livers showing steatosis between 30% and 60% fat have poor results, with reduced graft and patient survival. However, inclusion criteria for the use of these cells in the hepatocyte transplantation process were not established. The main objective of this work is to describe a process of separation and purification of hepatic cells (hepatocytes) from livers with macrosteatosis and to suggest the use of "normal" cells obtained from rejected organs in hepatocyte transplantation. For this purpose, we used a model of animal steatosis for the study of isolation, separation, cryopreservation, functional characterization and its use in cell therapy. For this, C57BL/6 mice received a diet deficient in methionine and choline (MCD) for 30 days. These essential amino acids play a key role in the synthesis of apoproteins, which are specialized proteins in the transport of lipids in the plasma, favoring, in their absence, the accumulation of these lipids in the liver (84). In addition, with the MCD diet, the mitochondrial lipid oxidation is reduced, contributing to the occurrence of steatosis. The mechanism of the production of this model also relies on the fact that methionine and choline are essential precursors for the hepatic synthesis of phosphatidylcholine which, together with cholesterol, make up the absolute majority of lipids secreted in bile (85). In this work, with the administration of this diet for 30 days, we obtained the induction of steatosis in 100% of the animals and the

formation of lipid micro and macrovesicles distributed throughout the hepatic parenchyma analyzed histologically.

Our results showed a great variability in cell yield, viability and quality after hepatocytes isolation from livers of steatosis mice. This variability, however, was proportional to the degree of steatosis developed by the animals according to the time the diet was maintained with the MCD diet. Comparison of the quality of the isolations was performed 7, 15, 20 and 30 days after the diet. Although the low cell performance of hepatocytes obtained from steatosis livers above 60% in 30 days of diet, we were able to develop an easy, inexpensive and affordable method for separating high steatosis hepatocytes from cells with low steatosis or no fat bladder using two centrifugation steps. Thus, allowing the selection of hepatocyte populations with minimal morphological and functional alteration. It was also possible to demonstrate that the cells obtained from the high steatosis tissues, separated by centrifugation, showed no significant difference in the viability and secretion of albumin when kept in culture for up to 10 days, period that present high degree of cell death. Moreover, they presented high cell adhesion capacity to the substrate without type I collagen coating, a functional ability of great importance for graft survival and repopulation.

After obtaining liver hepatocytes with macrosteatosis, we performed the hepatocyte transplantation, with approach in the domino concept, in mouse with ALF. For this, we used as a basis for experimental design including cell density and infusion route works already described in the literature, according to some examples from table 4. Allogeneic immune rejection in the cell transplant setting is also seen as one of the major problems for graft success. Thus, in order to minimize rejection and possible damage to transplanted cells, we initiated immunosuppression therapy in mice two days before performing cell therapy. The protocols used in experimental

animals are based on basic protocols already performed in humans and the doses are adjusted to body weight (296). The literature describes different doses of Tacrolimo® capable of inducing immunosuppression in experimental animals. Thus, we evaluated three different doses in mice (0.1, 0.15 and 0.2 mg/kg). It is already known of the toxic effects of Tacrolimo® on some organs such as the liver and kidneys. However, these effects depend on several factors such as: species; time and dose to be administered; age, weight and type of associated liver disease (298). According to our results, although Tacrolimo® doses of 0.15 and 0.20 mg/kg did not cause renal injury, it was able to induce liver injury after 5 days of intraperitoneal administration and weight loss. Thus, we used the lowest dose of Tacrolimo® in order not to generate liver damage. According to the work of Jeong, J. H et al., 2016 when evaluating doses of 0.1 to 2.0 mg/kg body weight of Tacrolimo® following pancreatic islet transplantation in mice, it was observed that islet survival time in mice receiving a daily dose of 0.1 and 0.5 mg/kg Tacrolimo®, was significantly better than in the group not receiving the immunosuppressant injection. In addition, graft survival time in mice injected daily with 2.0 mg/kg did not exhibit prolonged time. In conclusion, a low dose of Tacrolimo® between 0.1 - 0.5 mg/kg was highly effective in inhibiting the activation of immune cells (86). Other published work suggests immunosuppression in rats at a dose of 0.2 mg/kg Tacrolimo® daily. In this protocol, no clinically significant adverse effects of immunosuppression with Tacrolimo® administered intramuscularly were observed. Therefore, low doses of Tacrolimo® confer immunosuppression and are not induced lesions that compromise animal survival (87). However, studies with non-human primates report that the use of this drug after kidney transplantation was not able to affect relevant biochemical parameters such as potassium, calcium, urea and creatinine, and without causing

histopathological changes in the liver, kidney and brain after doses up to 10 times higher (2.0 mg/kg) than that indicated for humans (88).

According to the results obtained, immunized mice that received 1×10^6 hepatocyte cell infusion with viability above 90% 4 hours after the induction of ALF showed a slight increase in 24-hour survival. In addition, there was an improvement in the biochemical condition of the animals, especially after 48 hours and absence of signs of encephalopathy 72 hours after hepatocyte therapy. According to several studies already published in the literature, some factors already described may directly influence the success of cell transplantation. Among these factors is the inability to transplant an adequate cell mass capable of supplying lost liver function and being able to monitor the function of transplanted cells (42, 89). The absence of this follow-up could justify the slight increase in survival and the non-full recovery of albumin secretion levels and fall to baseline liver enzymes associated with liver disease. Thus, it would be possible to determine or predict the ideal cell mass capable of fully recovering liver damage and significantly increasing the survival of animals. In addition, to suggest more relentlessly the minimum cell density capable of assisting the loss of liver function as well as the need to perform repeated cell transplantation sessions. However, it was clear that the use of isolated and selected hepatocytes from livers with macrosteatosis presents a favorable therapeutic potential for the recovery of liver function after chemical induction by APAP in an experimental model. The separation of hepatocytes from organs with macrosteatosis are essential to ensure higher quality of cells for transplantation. It is known that the process developed fatty liver requires an extent of signaling and activation of pro-inflammatory cells. Thus, the attempt to recover liver damage by transplanting the total cell population of a macrosteatosis organ could represent greater damage to the recipient's already established liver injury.

Conclusion

Hepatocyte transplantation may represent a major advance in the treatment of liver disease, which could improve the quality of life of patients awaiting liver transplantation or even spontaneous recovery of the patient. In this paper, we approach the domino concept to expand the sources of viable hepatocytes for cell transplantation. We developed two experimental mouse models for cell transplantation. A 400 mg / kg bodyweight dose of acetaminophen is an ideal model for studying the mechanisms of ALF as well as therapeutic alternatives. The 30 day DMC dietary macrosteatosis model induced the formation of microvesicular steatosis with approximately 60% hepatic parenchyma steatosis. Thus, it was possible to optimize the isolation protocol and especially the separation of the different populations obtained. We suggest that after isolation, two stages of high centrifugation are essential to obtain hepatocytes without steatosis or with basal fat levels. In order to ensure the quality of cells for transplantation. In addition, it was clear that transplantation of these hepatocytes tends to recover from liver damage after transplantation in mice with ALF. It is noteworthy that the evaluation of some variables and optimization in the cell therapy protocol could develop a significant improvement of ALF in mice. Such variables include: assessing different cell densities for transplantation; develop cell therapy with repeated sessions; evaluate cell density survival after infusion and develop another method of cell separation by cell sorting.

Acknowledgments

This work was supported by grants from IOC/FIOCRUZ, FAPERJ and CNPq.

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Survival curve of animals treated with different doses of acetaminophen I.P. The graphs represent the survival curve of the animals over time after treatment with APAP. The first dotted line in black represents the group of animals that were not subjected to any manipulation. The second line, blue dotted, shows the group of animals that received an I.P dose of the vehicle. In red, continuous line, represents the different mortality rates in the doses tested. The reduction in survival of animals occurs from the administration of a single I.P dose of 400 mg/kg body weight **(B)** from 3 hours and remains elevated after treatment with higher doses **(C to H)**. Survival data were analyzed by Kaplan-Meier method and log-rank test.

Figure 2. Morphological and histopathological comparison between the control animals with vehicle and treated with 400 mg/kg body weight of acetaminophen after 3, 6 and 24 hours. The animals receiving only vehicle **(A, C and E)** had normal, hexagonal, multicellular hepatic lobe architecture, formed by hepatocytes and sinusoids (represented by arrow head). No degree of necrosis or inflammatory infiltrate was observed. **(B)** 3 hours and **(D)** 6 hours of treatment with acetaminophen representing intense hemorrhagic area (wide arrows), eosinophilia, hepatic cord disorganization and zero grade necrosis. In **F**, 24 hours after treatment indicated hepatocytes with signs of cell death, necrosis area with mild degree **(NA - selected region)** and little inflammatory infiltrate **(II - arrows)**. Slides stained with hematoxylin-eosin. Calibration bar 20µm.

Figure 3. Morphological and histopathological comparison between the control animals with vehicle and treated with 400 mg/kg of acetaminofen after 48, 72 and 96 hours. The animals that received only the vehicle **(A, C and E)** had normal hepatic lobe architecture, hexagonal multicellular, formed by strings of organized hepatocytes (represented by arrow head). No degree of necrosis or inflammatory infiltrate was observed. **(B)** 48 hours after treatment identified areas of necrosis **(NA)** ranging from mild to moderate and moderate, disintegration of hepatic cords and mild inflammatory infiltrate **(II - arrows)**. In **D**, 72 hours of treatment with acetaminophen representing intense necrosis area **(NA - selected region)** with moderate and severe degrees, hypereosinophilia, hepatic cord disorganization and intense inflammatory infiltrate **(II - arrows)**. **(F)** 96 hours after treatment indicating hepatocyte areas with moderate necrosis **(NA)** and inflammatory infiltrate arrows **(II)**. Slides stained with hematoxylin-eosin. Calibration bar 20µm.

Figure 4. Open field test and biochemical analysis of liver enzymes. (A) Analysis of the vertical displacement and **(B)** horizontal movements performed during 5 minutes by the animals treated with single dose I.P of 400 mg/kg body weight of APAP. The control group and control with vehicle group did not present significant differences between them. However, animals treated with 400 mg/kg of APAP presented significant differences when compared to control groups for both vertical and horizontal displacement (n= 10). The graph represents mean and standard deviation of 10 independent experiments. According to the biochemical analyzes a significant increase of the serum levels of ALT **(C)** and AST **(D)** in the treated animals was observed when compared to the animals that only received the vehicle. In **E** the decrease in albumin levels in the animal's blood after treatment with 400 mg/kg body weight of APAP compared to the control groups can be seen. Results are presented as mean \pm SD of 6 independent experiments performed in triplicates (n = 18). Values were considered significant when ****p <0.0001; ***p<0.001; **p <0.005 and *p<0.05; to represent non-significant differences #.

Figure 5. Comparison between samples of normal hepatic tissue and macrosteatosis in C57BL/6 mice by histology and staining in HE. (A) histological section of the liver of control animals not submitted to the MCD diet. Grade 0 steatosis representing the absence of lipid vacuoles in the hepatocytes that compose the hepatic lobe. **(B)** Liver histology of animals submitted to the MCD diet representing the development of macrosteatosis after 30 days of consumption. The development of grade 2 and 3 steatosis was observed due to the presence of lipid vacuoles of varying sizes distributed throughout the hepatic lobe. Representative images of 4 histological sections obtained from liver fragments of 3 animals from each group. Calibration bar 100 μ m.

Figure 6. Separation of different hepatocyte populations isolated from livers with macrosteatosis. In **A**, light microscopy, brightfield, illustrating the total population of cells obtained immediately after isolation. Representative image **(B)** of Bodipy stained hepatocytes. The arrows indicate the presence of lipid vesicles inside the cells. Figures **C** and **D** illustrate the lipid vesicles released from the cells to the extracellular medium (arrows) after two steps of high centrifugation and consequent rupture of the cell membrane. In Figure **D**, fluorescence microscopy illustrates DAPI-stained blue cell nuclei. In green, the lipid vesicles after membrane rupture (**arrows**). In Figure **E**, representative image of cell viability by trypan blue exclusion after cell population separation. In **F** we can identify that intact cells do not present lipid vesicles in the cytoplasm. We also identified some vesicles released in the middle. Calibration bar 100 μ m.

Figure 7. Viability and cellular function of isolated hepatocytes. Viability by trypan blue exclusion before **(A)** and after Percoll gradient **(B)** of cells isolated from both normal and steatotic livers. Image **C** represents the hepatocyte population obtained from livers with steatosis after percoll gradient and high centrifugation. In **D**, representative image of hepatocytes isolated from normal

livers. After isolation and separation, hepatocytes were kept in culture for up to 10 days. Cell function, albumin secretion (**E**) and viability with MTT assay (**F**) were evaluated. Results are presented as mean \pm SD of 6 independent experiments performed in triplicates (n = 18). Values were considered significant when ****p < 0.0001; ***p < 0.001; **p < 0.005 and *p < 0.05.

Figure 8. Hepatocyte culture isolated from livers of mouse with or without macrosteatosis. After isolation and separation /exclusion of cells with a high degree of steatosis, cells were maintained in culture with supplemented medium for up to 10 days. We compared the viability, albumin secretion and cell adhesion capacity of these cells with cells isolated from normal livers.

Figure 9. Tacrolimo® dose optimization for immunosuppression previous to cell therapy. To check the immunosuppressive dose that was not capable of inducing renal and/or hepatic lesions, 3 doses were tested. The figures illustrate light microscopic photomicrography of HE-stained histological sections of the kidney (first column) and liver (second column) of mouse treated for up to 10 days. Results were compared with liver samples from animals that received only the vehicle as a control, shown in figures **A** (kidney) and **B** (liver). According to the results, no dose was able to induce renal injury after 10 days with Tacrolimo® infusion at 0.1 (Figure **C**), 0.15 (Figure **E**) and 0.2 mg / kg (Figure **G**). The renal parenchyma, composed of glomerulus (indicated by arrows) and tubules (indicated by *) remained unchanged at all doses. However, account to liver damage, only the 0.1 mg / kg dose did not induce any alteration to the hepatic parenchyma, preserving the lobular structure and hepatocytes without lesions or signs of cell death until the tenth day (figure **D**). However, the highest doses of 0.15 and 0.2 mg / kg induced severe liver damage from the fifth day. In Figure **F**, the dose of 0.15 mg / kg was observed loss of normal hepatic parenchymal morphology with the presence of hemorrhagic areas (**HA**) and areas of moderate necrosis (**NA**). At the dose of 0.2 mg / kg, figure **H**, an extensive area of moderate to severe necrosis (**NA**) was observed, in addition to the presence of vascular ectasia (**VE**), ie, vessel dilation caused by intense hemorrhage, the area represented by the head arrow and at higher magnification in the upper left corner. Calibration 100 μ M.

Figure 10. Analysis of liver recovery after hepatocyte transplantation. (A) survival curve comparing control animals without any manipulation (black dotted line); animals receiving immunosuppression therapy only (red dotted line); animals after ALF receiving vehicle only (continuous blue line) and animals with ALF receiving infusion I.P. of hepatocytes (continuous green line). At 24 hours there was an increase in survival of approximately 11% of animals receiving hepatocyte transplantation compared to animals receiving only the vehicle (mortality rate from 70.37% to 61.90%, respectively). According to the statistical analysis, this result is not statistically significant, p=0,9762. In **B**, **C** and **D** we demonstrated the difference in albumin secretion, liver enzyme release ALT and AST, respectively present in the serum of animals of different groups. Results are presented as mean \pm SD of 6 independent experiments performed in triplicate (n=18). Figures **E** and **F** illustrate the behavioral assessment of animals performed by the open field test of the vertical and horizontal

displacement. Results are presented as mean \pm SD of 10 animals observed by observation time (n=10). Values were considered significant when ****p <0.0001; ***p<0.001; **p <0.005 and *p<0.05; to represent non-significant differences #.

Figure 11. Morphological and histopathological comparison after infusion of 1×10^6 hepatocytes. After separation and isolation 1×10^6 hepatocytes were infused intraperitoneally 4 hours after the establishment of ALF. The figures represent photomicrographs of histological sections of the ALF mouse liver from 24 hours after receiving vehicle administration (**first column**) or treatment with cell therapy (**second column**). In figure **A**, the presence of extensive area of moderate necrosis with focus of hemorrhage (**arrows**) present in the liver of the animal that received the vehicle only. Figure **B** represents the animal receiving cell therapy also after 24 hours. Mild necrosis and cytoplasmic changes have been observed in some hepatocytes (*). In Figures **C** and **D**, the 48h comparison between the two groups, indicating the difference in the degree of necrosis between the animals not receiving and those receiving the cell therapy. In **C**, presence of severe necrosis throughout the hepatic parenchyma including both the centoloblar and portal region e infiltrado inflamatório. In **D**, necrosis was found in some regions of the hepatic parenchyma ranging from mild to moderate. Within 72 hours it is also possible to observe the difference between necrosis levels and presence of inflammatory infiltrate between the two groups. After 96 hours, the group receiving cell therapy (figure **H**) appears to initiate a process of liver tissue injury repair prior to the other group receiving vehicle alone (**G**). The vehicle group also presents intense areas of necrosis. Calibration 100 μ M. (**NA**) necrosis area; (**II**) inflammatory infiltrate.

Figure 12. The histology of animals that survived 7 days after receiving the vehicle or cell therapy. After this period, there seems to have been a reversal of liver damage after chemical induction by APAP in both groups. However, animals that received only the vehicle presented mild necrosis and presence of inflammatory infiltrate figure **A**. Opposite to that, animals that received only the vehicle did not observe the presence of necrosis and only some slight lesions in hepatocytes (arrows), figure **B**. Calibration 100 μ M. (**NA**) necrosis area; (**II**) inflammatory infiltrate.

TABLE LEGENDS

Table 1. Encephalopathy degree score

Table 2. Grade of hepatic encephalopathy 7 hours after treatment with 400 mg/kg of acetaminophen.

REFERENCES

1. Scott TR, Kronsten VT, Hughes RD, Shawcross DL. Pathophysiology of cerebral oedema in acute liver failure. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(48):9240-55. Epub 2014/01/11.
2. Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *The New England journal of medicine*. 2014;370(12):1170-1. Epub 2014/03/22.
3. Lee WM. Acute liver failure. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2012;33(1):36-45. Epub 2012/03/27.
4. Mai G, Huy NT, Morel P, Mei J, Bosco D, Berney T, et al. Treatment of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated primary or immortalized xenogeneic hepatocytes. *Transplantation proceedings*. 2005;37(1):527-9. Epub 2005/04/06.
5. Denis J, Opolon P, Nusinovici V, Granger A, Darnis F. Treatment of encephalopathy during fulminant hepatic failure by haemodialysis with high permeability membrane. *Gut*. 1978;19(9):787-93. Epub 1978/09/01.
6. Sagias FG, Mitry RR, Hughes RD, Lehec SC, Patel AG, Rela M, et al. N-acetylcysteine improves the viability of human hepatocytes isolated from severely steatotic donor liver tissue. *Cell transplantation*. 2010;19(11):1487-92. Epub 2010/07/01.
7. Cardoso L, Moreira LFP, Pinto MA, Henriques-Pons A, Alves LA. Domino Hepatocyte Transplantation: A Therapeutic Alternative for the Treatment of Acute Liver Failure. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018:2593745. Epub 2018/08/02.
8. Marsman WA, Wiesner RH, Rodriguez L, Batts KP, Porayko MK, Hay JE, et al. Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival. *Transplantation*. 1996;62(9):1246-51. Epub 1996/11/15.
9. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet*. 2010;376(9736):190-201. Epub 2010/07/20.
10. Lopez PM, Martin P. Update on liver transplantation: indications, organ allocation, and long-term care. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. 2006;73(8):1056-66. Epub 2007/02/08.
11. Iansante V, Mitry RR, Filippi C, Fitzpatrick E, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation for liver disease: current status and future perspectives. *Pediatr Res*. 2018;83(1-2):232-40. Epub 2017/11/18.
12. Sagmeister M, Mullhaupt B, Kadry Z, Kullak-Ublick GA, Clavien PA, Renner EL. Cost-effectiveness of cadaveric and living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2002;73(4):616-22. Epub 2002/03/13.
13. Trotter JF, Mackenzie S, Wachs M, Bak T, Steinberg T, Polsky P, et al. Comprehensive cost comparison of adult-adult right hepatic lobe living-donor liver transplantation with cadaveric transplantation. *Transplantation*. 2003;75(4):473-6. Epub 2003/02/28.
14. Lee WM. Recent developments in acute liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(1):3-16. Epub 2012/04/10.
15. Alam A, Chun Suen K, Ma D. Acute-on-chronic liver failure: recent update. *J Biomed Res*. 2017;31(4):283-300. Epub 2017/08/16.
16. Ozdemir FN, Tural E, Sezer S, Gur G, Bilgic A, Haberal M. Effect of supportive extracorporeal treatment in liver transplantation recipients and advanced liver failure patients. *Hemodial Int*. 2006;10 Suppl 2:S28-32. Epub 2006/10/07.
17. Millis JM, Cronin DC, Johnson R, Conjeevaram H, Conlin C, Trevino S, et al. Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminant hepatic failure: system modifications and clinical impact. *Transplantation*. 2002;74(12):1735-46. Epub 2002/12/25.

18. van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A, et al. Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs*. 2002;25(10):950-9. Epub 2002/11/29.
19. Nyberg SL, Rimmel RP, Mann HJ, Peshwa MV, Hu WS, Cerra FB. Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver. *Ann Surg*. 1994;220(1):59-67. Epub 1994/07/01.
20. Stange J, Ramlow W, Mitzner S, Schmidt R, Klinkmann H. Dialysis against a recycled albumin solution enables the removal of albumin-bound toxins. *Artif Organs*. 1993;17(9):809-13. Epub 1993/09/01.
21. Evenepoel P, Laleman W, Wilmer A, Claes K, Kuypers D, Bammens B, et al. Prometheus versus molecular adsorbents recirculating system: comparison of efficiency in two different liver detoxification devices. *Artif Organs*. 2006;30(4):276-84. Epub 2006/04/29.
22. Skwarek A, Grodzicki M, Nyckowski P, Kotulski M, Zieniewicz K, Michalowicz B, et al. The use Prometheus FPSA system in the treatment of acute liver failure: preliminary results. *Transplantation proceedings*. 2006;38(1):209-11. Epub 2006/03/01.
23. Wauters J, Wilmer A. Albumin dialysis: current practice and future options. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2011;31 Suppl 3:9-12. Epub 2011/08/17.
24. Banares R, Nevens F, Larsen FS, Jalan R, Albillos A, Dollinger M, et al. Extracorporeal albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system in acute-on-chronic liver failure: the RELIEF trial. *Hepatology*. 2013;57(3):1153-62. Epub 2012/12/06.
25. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2010;7(5):288-98. Epub 2010/04/07.
26. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*. 1997;63(4):559-69. Epub 1997/02/27.
27. Vera MC, Biancardi ME, Bottai H, Lugano MC, Quiroga AD, Pisani GB, et al. First approaches for the transplantation of hepatocytes from Wistar rat preneoplastic livers into healthy recipients. *Rev Esp Enferm Dig*. 2019. Epub 2019/02/16.
28. Duncan AW, Soto-Gutierrez A. Liver repopulation and regeneration: new approaches to old questions. *Current opinion in organ transplantation*. 2013;18(2):197-202. Epub 2013/02/22.
29. Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. Liver regeneration. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2014;163(4):352-62. Epub 2014/02/06.
30. Tannuri AC, Tannuri U, Coelho MC, Santos NA, Mello ES. Experimental models of hepatectomy and liver regeneration using newborn and weaning rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007;62(6):757-62. Epub 2008/01/23.
31. Alexandrova K, Griesel C, Barthold M, Heuft HG, Ott M, Winkler M, et al. Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application. *Cell transplantation*. 2005;14(10):845-53. Epub 2006/02/04.
32. Stephenne X, Najimi M, Sokal EM. Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? *World journal of gastroenterology*. 2010;16(1):1-14. Epub 2009/12/30.
33. Sun K, Xie X, Xie J, Jiao S, Chen X, Zhao X, et al. Cell-based therapy for acute and chronic liver failures: distinct diseases, different choices. *Scientific reports*. 2014;4:6494. Epub 2014/09/30.
34. Vacanti JP, Kulig KM. Liver cell therapy and tissue engineering for transplantation. *Seminars in pediatric surgery*. 2014;23(3):150-5. Epub 2014/07/06.
35. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz-Barriga M, Adani GL, Zambito AM, et al. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2003;9(5):506-12. Epub 2003/05/13.

36. Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, et al. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *Journal of hepatology*. 2006;45(1):144-59. Epub 2006/05/30.
37. Chen Y, Li J, Liu X, Zhao W, Wang Y, Wang X. Transplantation of immortalized human fetal hepatocytes prevents acute liver failure in 90% hepatectomized mice. *Transplantation proceedings*. 2010;42(5):1907-14. Epub 2010/07/14.
38. Nguyen TH, Mai G, Villiger P, Oberholzer J, Salmon P, Morel P, et al. Treatment of acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse with conditionally immortalized human hepatocytes. *Journal of hepatology*. 2005;43(6):1031-7. Epub 2005/09/20.
39. Baquerizo A, Mhoyan A, Kearns-Jonker M, Arnaout WS, Shackleton C, Busuttill RW, et al. Characterization of human xenoreactive antibodies in liver failure patients exposed to pig hepatocytes after bioartificial liver treatment: an ex vivo model of pig to human xenotransplantation. *Transplantation*. 1999;67(1):5-18. Epub 1999/01/28.
40. Denner J. Xenotransplantation and Hepatitis E virus. *Xenotransplantation*. 2015. Epub 2015/02/14.
41. Bonavita AG, Quaresma K, Cotta-de-Almeida V, Pinto MA, Saraiva RM, Alves LA. Hepatocyte xenotransplantation for treating liver disease. *Xenotransplantation*. 2010;17(3):181-7. Epub 2010/07/20.
42. Soltys KA, Soto-Gutierrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, Ito R, et al. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *Journal of hepatology*. 2010;53(4):769-74. Epub 2010/07/30.
43. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation*. 2004;78(12):1812-4. Epub 2004/12/23.
44. Lake JR. Hepatocyte transplantation. *The New England journal of medicine*. 1998;338(20):1463-5. Epub 1998/05/15.
45. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz M, Adani GL, Lorenzin D, et al. Cryopreserved human hepatocytes from cell bank: in vitro function and clinical application. *Transplantation proceedings*. 2005;37(1):256-9. Epub 2005/04/06.
46. Lan X, Zhang H, Li HY, Chen KF, Liu F, Wei YG, et al. Feasibility of using marginal liver grafts in living donor liver transplantation. *World journal of gastroenterology*. 2018;24(23):2441-56. Epub 2018/06/23.
47. Perkins JD. Saying "Yes" to obese living liver donors: short-term intensive treatment for donors with hepatic steatosis in living-donor liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(6):1012-3. Epub 2006/05/25.
48. Baccarani U, Donini A, Sanna A, Risaliti A, Cariani A, Nardo B, et al. First report of cryopreserved human hepatocytes based bioartificial liver successfully used as a bridge to liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004;4(2):286-9. Epub 2004/02/21.
49. Lin Z, Wu F, Lin S, Pan X, Jin L, Lu T, et al. Adiponectin protects against acetaminophen-induced mitochondrial dysfunction and acute liver injury by promoting autophagy in mice. *Journal of hepatology*. 2014;61(4):825-31. Epub 2014/06/03.
50. Granberg RA, Rasmuson ÅC. Solubility of Paracetamol in Pure Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 1999;44(6):1391-5.
51. O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgraduate medical journal*. 2005;81(953):148-54. Epub 2005/03/08.
52. Tatem KS, Quinn JL, Phadke A, Yu Q, Gordish-Dressman H, Nagaraju K. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(91):51785. Epub 2014/10/07.

53. Gerspach C, Imhasly S, Klingler R, Hilbe M, Hartnack S, Ruetten M. Variation in fat content between liver lobes and comparison with histopathological scores in dairy cows with fatty liver. *BMC veterinary research*. 2017;13(1):98. Epub 2017/04/14.
54. Kreamer BL, Staecker JL, Sawada N, Sattler GL, Hsia MT, Pitot HC. Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1986;22(4):201-11. Epub 1986/04/01.
55. Bunel V, Ouedraogo M, Nguyen AT, Stevigny C, Duez P. Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths, and limits. *Planta medica*. 2014;80(14):1210-26. Epub 2014/01/17.
56. Zhang Q, Qu Y, Li Z, Xu M, Cai X, Li F, et al. Isolation and Culture of Single Cell Types from Rat Liver. *Cells, tissues, organs*. 2016;201(4):253-67. Epub 2016/04/08.
57. Aparicio-Vergara M, Tencerova M, Morgantini C, Barreby E, Aouadi M. Isolation of Kupffer Cells and Hepatocytes from a Single Mouse Liver. *Methods Mol Biol*. 2017;1639:161-71. Epub 2017/07/29.
58. Melo RC, D'Avila H, Bozza PT, Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol*. 2011;689:149-61. Epub 2010/12/15.
59. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009;41(4):1149-60. Epub 2009/11/10.
60. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit*. 1995;17(6):584-91. Epub 1995/12/01.
61. Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs*. 2003;63(12):1247-97. Epub 2003/06/07.
62. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet*. 1995;29(6):404-30. Epub 1995/12/01.
63. Jaeschke H, Williams CD, Ramachandran A, Bajt ML. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2012;32(1):8-20. Epub 2011/07/13.
64. Filippini F, Mosca F. Animal models of fulminant hepatic failure: need to test liver support devices. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2001;33(7):607-13. Epub 2002/01/31.
65. Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci*. 1991;36(6):770-4. Epub 1991/06/01.
66. Vinken M, Decrock E, De Vuyst E, Leybaert L, Vanhaecke T, Rogiers V. Biochemical characterisation of an in vitro model of hepatocellular apoptotic cell death. *Altern Lab Anim*. 2009;37(2):209-18. Epub 2009/05/21.
67. McGill MR, Lebofsky M, Norris HR, Slawson MH, Bajt ML, Xie Y, et al. Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: dose-response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;269(3):240-9. Epub 2013/04/11.
68. Bajt ML, Farhood A, Lemasters JJ, Jaeschke H. Mitochondrial bax translocation accelerates DNA fragmentation and cell necrosis in a murine model of acetaminophen hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324(1):8-14. Epub 2007/10/02.
69. Adamson GM, Harman AW. Oxidative stress in cultured hepatocytes exposed to acetaminophen. *Biochem Pharmacol*. 1993;45(11):2289-94. Epub 1993/06/09.
70. Williams CD, Bajt ML, Sharpe MR, McGill MR, Farhood A, Jaeschke H. Neutrophil activation during acetaminophen hepatotoxicity and repair in mice and humans. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;275(2):122-33. Epub 2014/01/21.

71. Cohen SD, Pumford NR, Khairallah EA, Boekelheide K, Pohl LR, Amouzadeh HR, et al. Selective protein covalent binding and target organ toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;143(1):1-12. Epub 1997/03/01.
72. Placke ME, Ginsberg GL, Wyand DS, Cohen SD. Ultrastructural changes during acute acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse: a time and dose study. *Toxicol Pathol.* 1987;15(4):431-8. Epub 1987/01/01.
73. Maes M, Vinken M, Jaeschke H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;290:86-97. Epub 2015/12/04.
74. McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, Taha M, Curry SC, Jaeschke H. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1574-83. Epub 2012/03/02.
75. Harrill AH, Ross PK, Gatti DM, Threadgill DW, Rusyn I. Population-based discovery of toxicogenomics biomarkers for hepatotoxicity using a laboratory strain diversity panel. *Toxicol Sci.* 2009;110(1):235-43. Epub 2009/05/08.
76. Du K, Williams CD, McGill MR, Jaeschke H. Lower susceptibility of female mice to acetaminophen hepatotoxicity: Role of mitochondrial glutathione, oxidant stress and c-jun N-terminal kinase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;281(1):58-66. Epub 2014/09/15.
77. Song E, Fu J, Xia X, Su C, Song Y. Bazhen decoction protects against acetaminophen induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice. *PLoS One.* 2014;9(9):e107405. Epub 2014/09/16.
78. De Leon-Nava MA, Alvarez-Delgado C, Donis-Maturano L, Hernandez-Ruiz J, Manjarrez-Reyna AN, Cruz-Aviles E, et al. A non-hepatotropic parasite infection increases mortality in the acetaminophen-induced acute liver failure murine model: possible roles for IL-5 and IL-6. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(12):757-64. Epub 2016/11/05.
79. Bonora-Centelles A, Donato MT, Lahoz A, Pareja E, Mir J, Castell JV, et al. Functional characterization of hepatocytes for cell transplantation: customized cell preparation for each receptor. *Cell transplantation.* 2010;19(1):21-8. Epub 2009/10/03.
80. Fisher RA, Bu D, Thompson M, Tisnado J, Prasad U, Sterling R, et al. Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion. *Transplantation.* 2000;69(2):303-7. Epub 2000/02/12.
81. Bhogal RH, Hodson J, Bartlett DC, Weston CJ, Curbishley SM, Haughton E, et al. Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS One.* 2011;6(3):e18222. Epub 2011/04/12.
82. Gramignoli R, Tahan V, Dorko K, Skvorak KJ, Hansel MC, Zhao W, et al. New potential cell source for hepatocyte transplantation: discarded livers from metabolic disease liver transplants. *Stem cell research.* 2013;11(1):563-73. Epub 2013/05/07.
83. Stephenne X, Debray FG, Smets F, Jazouli N, Sana G, Tondreau T, et al. Hepatocyte transplantation using the domino concept in a child with tetrabioprotein nonresponsive phenylketonuria. *Cell transplantation.* 2012;21(12):2765-70. Epub 2012/08/15.
84. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res.* 2008;49(5):1068-76. Epub 2008/01/30.
85. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 2001;21(1):15-23. Epub 2001/02/17.
86. Jee-Heon Jeong[†], Simmyung Yook^{†,2,3}, and Youngro Byun^{*,2,4}. Dose Optimization of Tacrolimus for Improving Survival Time of PEGylated Islets in a Rat-to-Mouse Xenograft Model. *Macromolecular Research.* 2016;24(12):1047-55.
87. Spunda R, Hruby J, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. *PLoS One.* 2018;13(8):e0201984. Epub 2018/08/10.

88. Kinugasa F, Nagatomi I, Ishikawa H, Nakanishi T, Maeda M, Hirose J, et al. Efficacy of oral treatment with tacrolimus in the renal transplant model in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Sci.* 2008;108(4):529-34. Epub 2008/12/23.

89. Soltys KA, Setoyama K, Tafaleng EN, Soto Gutierrez A, Fong J, Fukumitsu K, et al. Host conditioning and rejection monitoring in hepatocyte transplantation in humans. *Journal of hepatology.* 2017;66(5):987-1000. Epub 2016/12/29.

Figure 1.

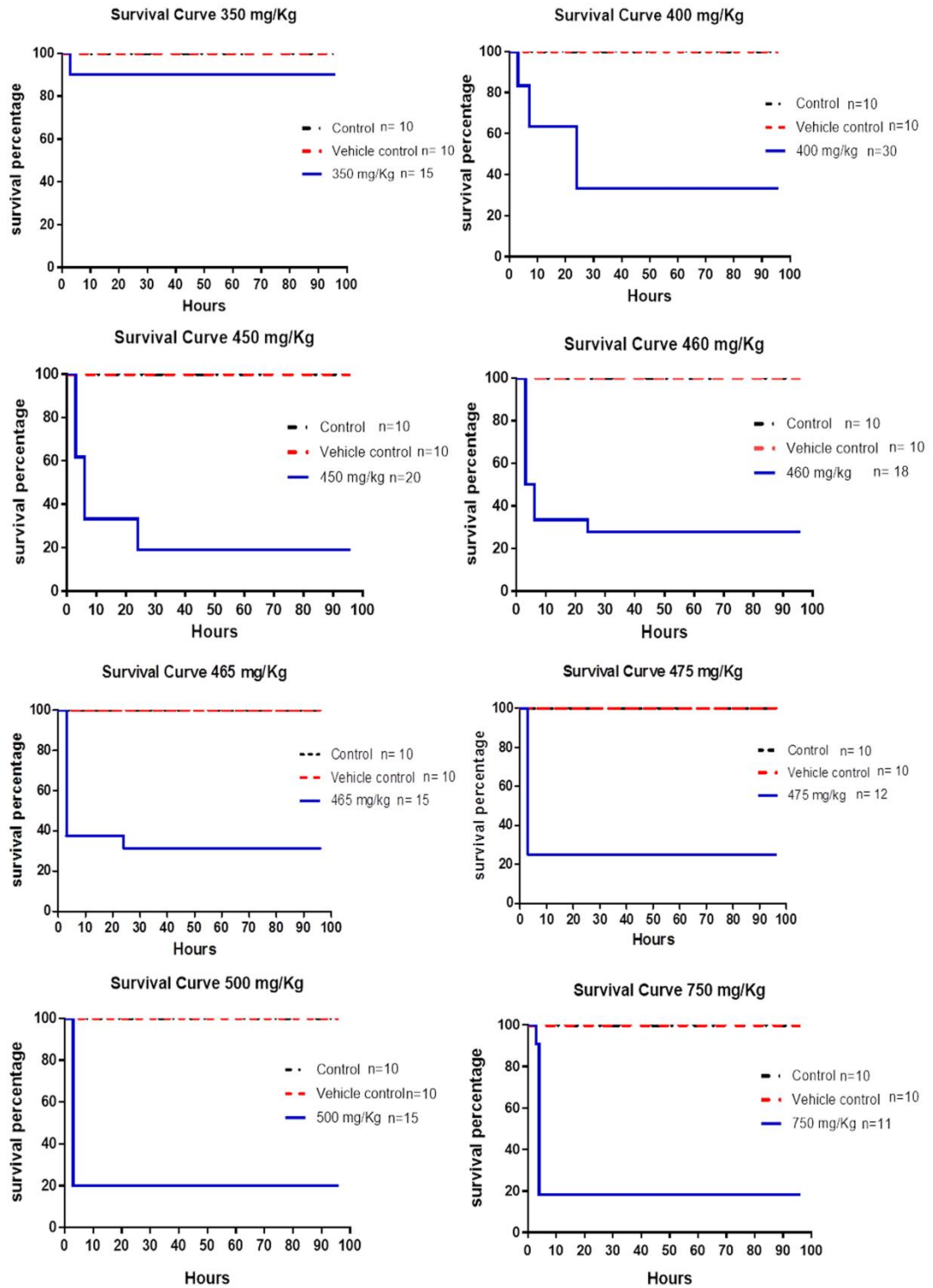


Figure 2.

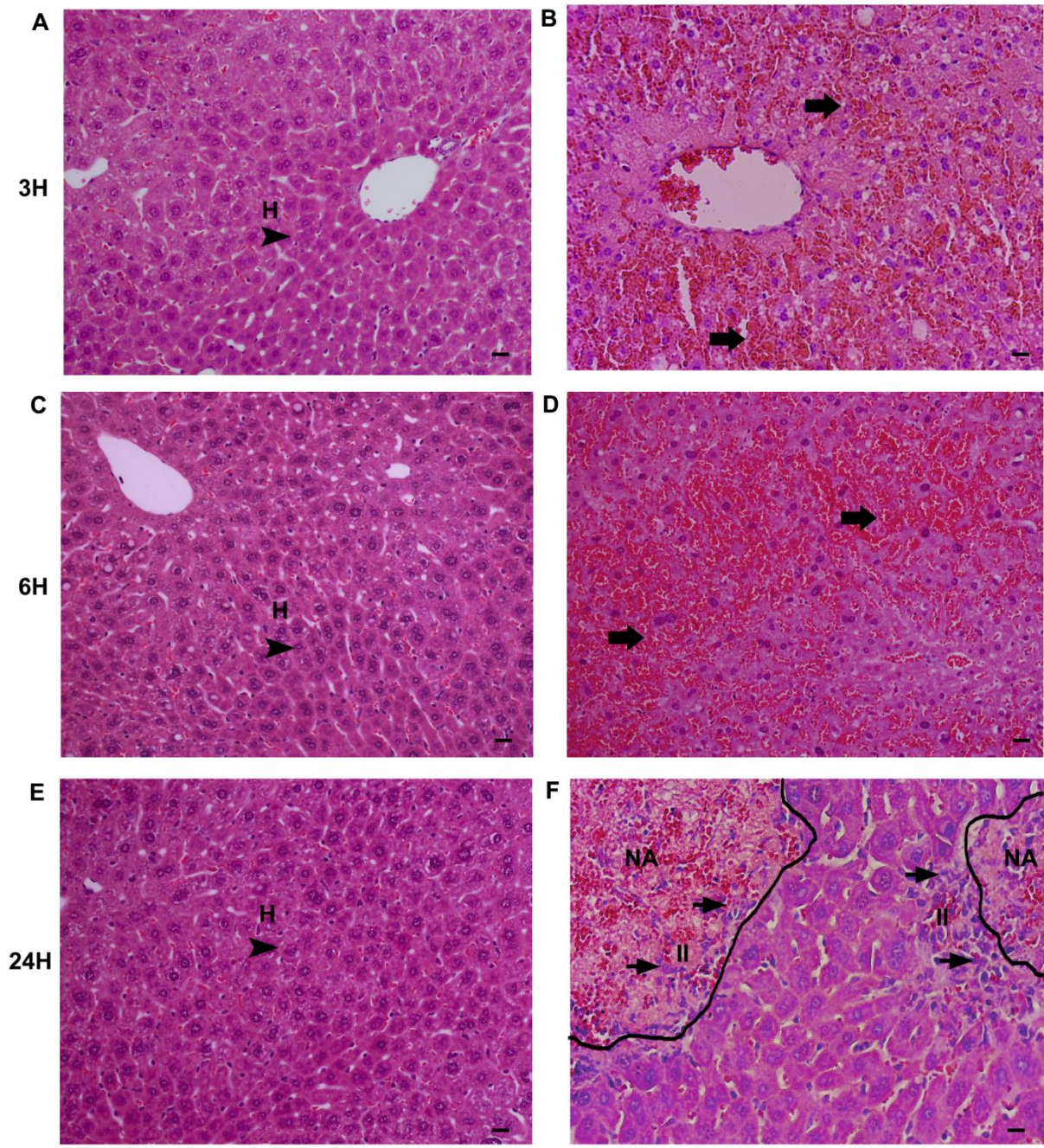


Figure 3

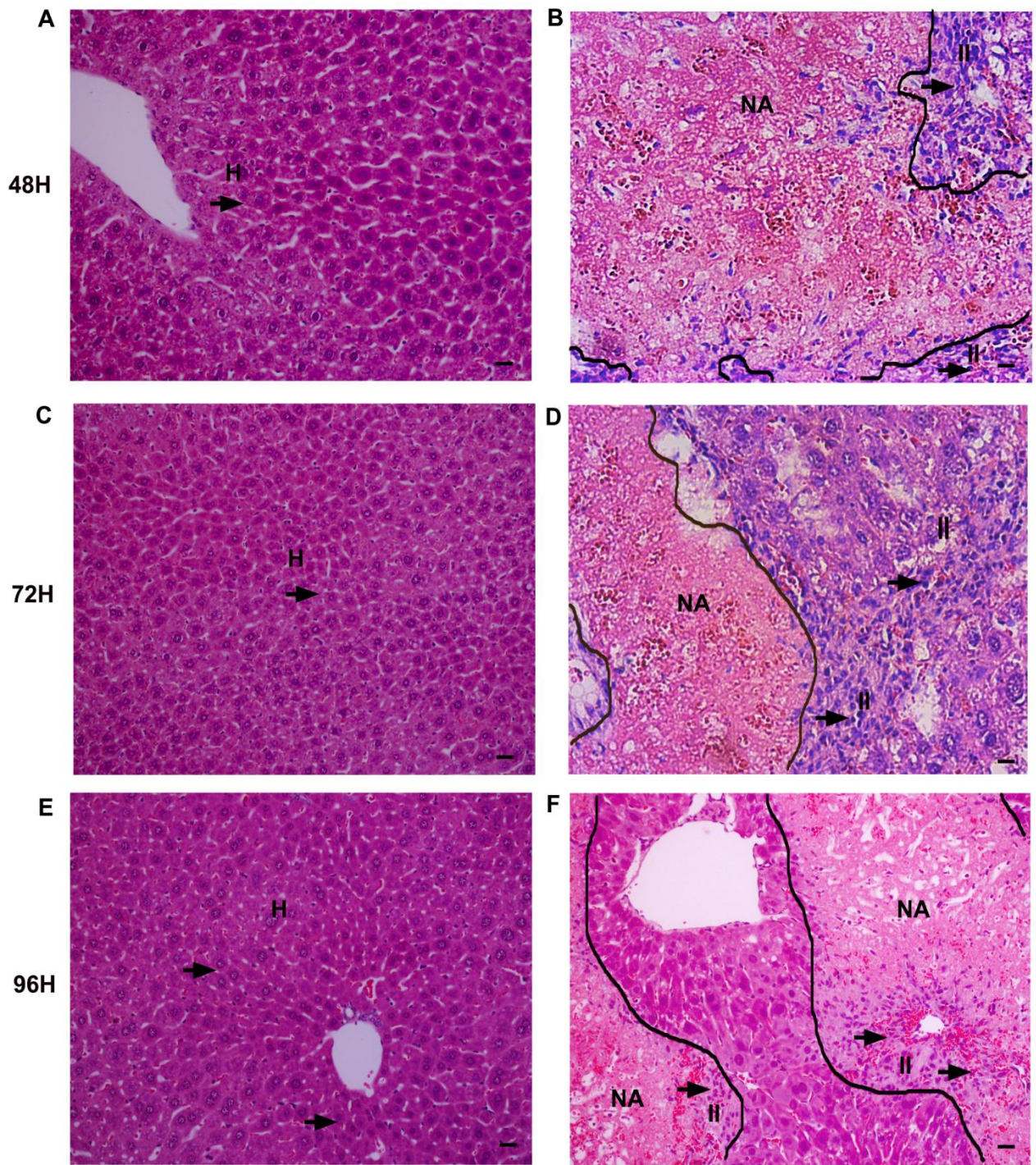


Figure 4.

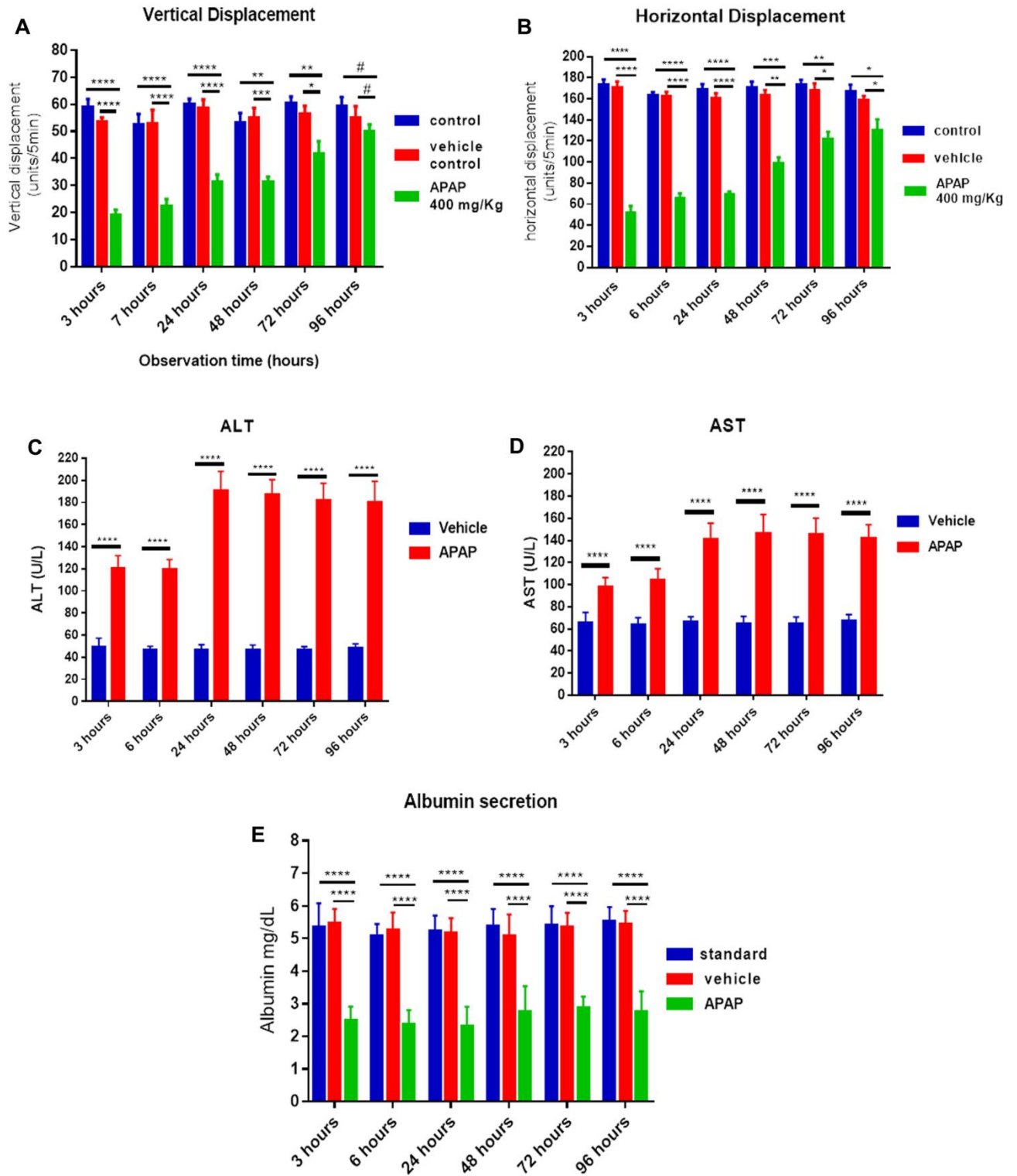


Figure 5.

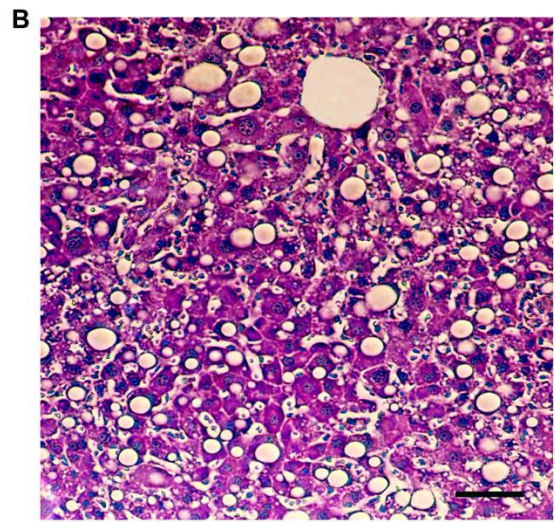
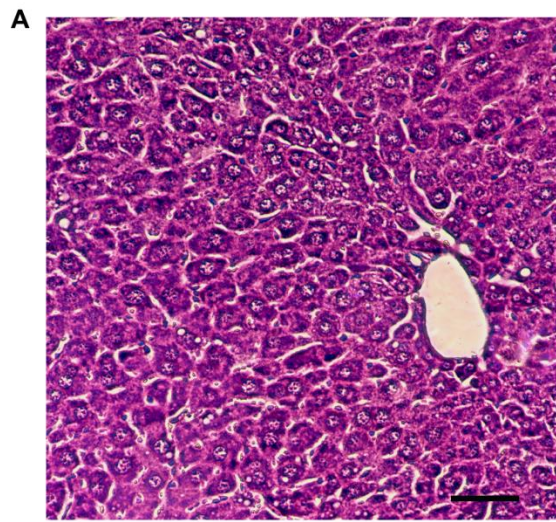


Figure 6.

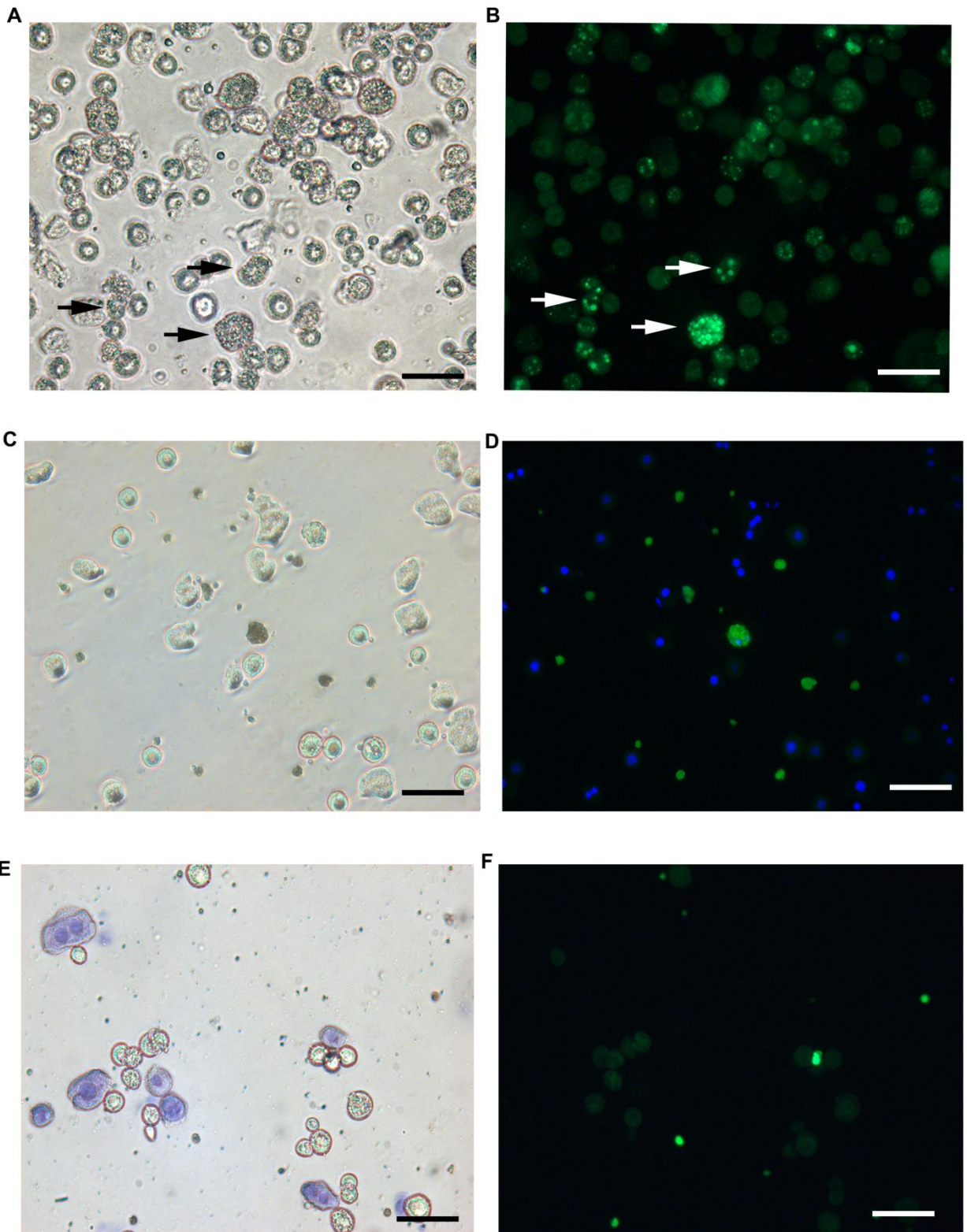


Figure 7.

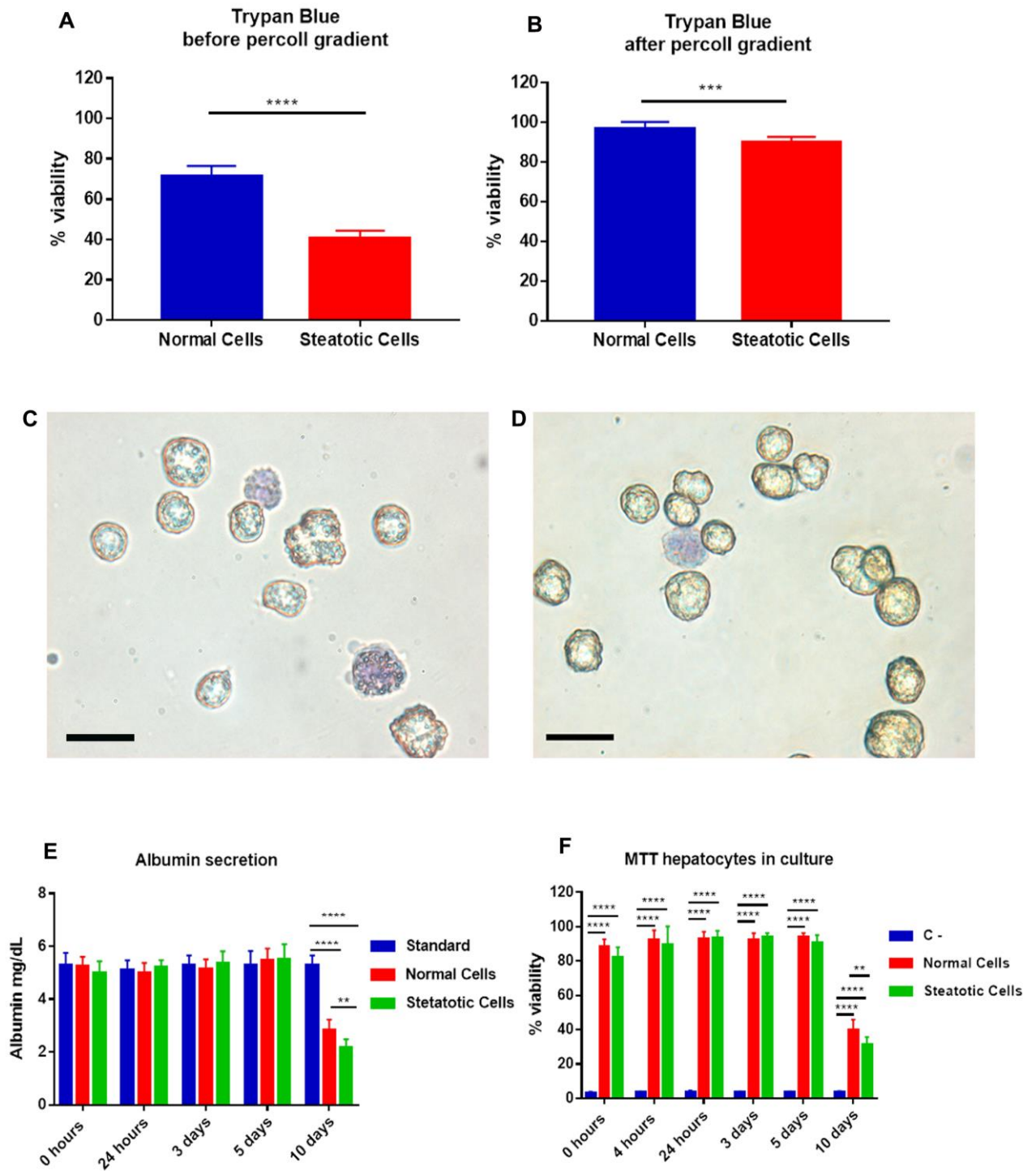


Figure 8.

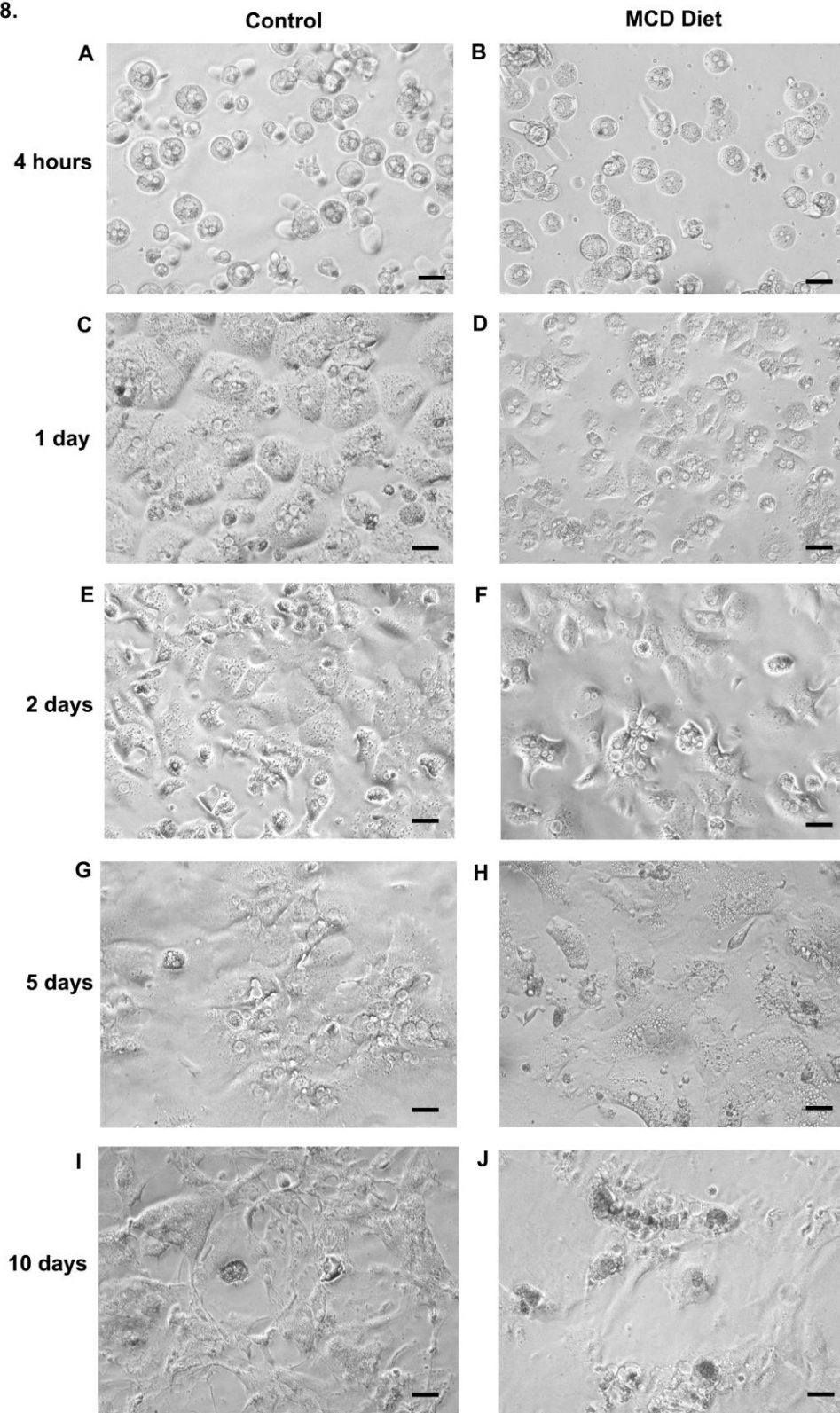


Figure 9.

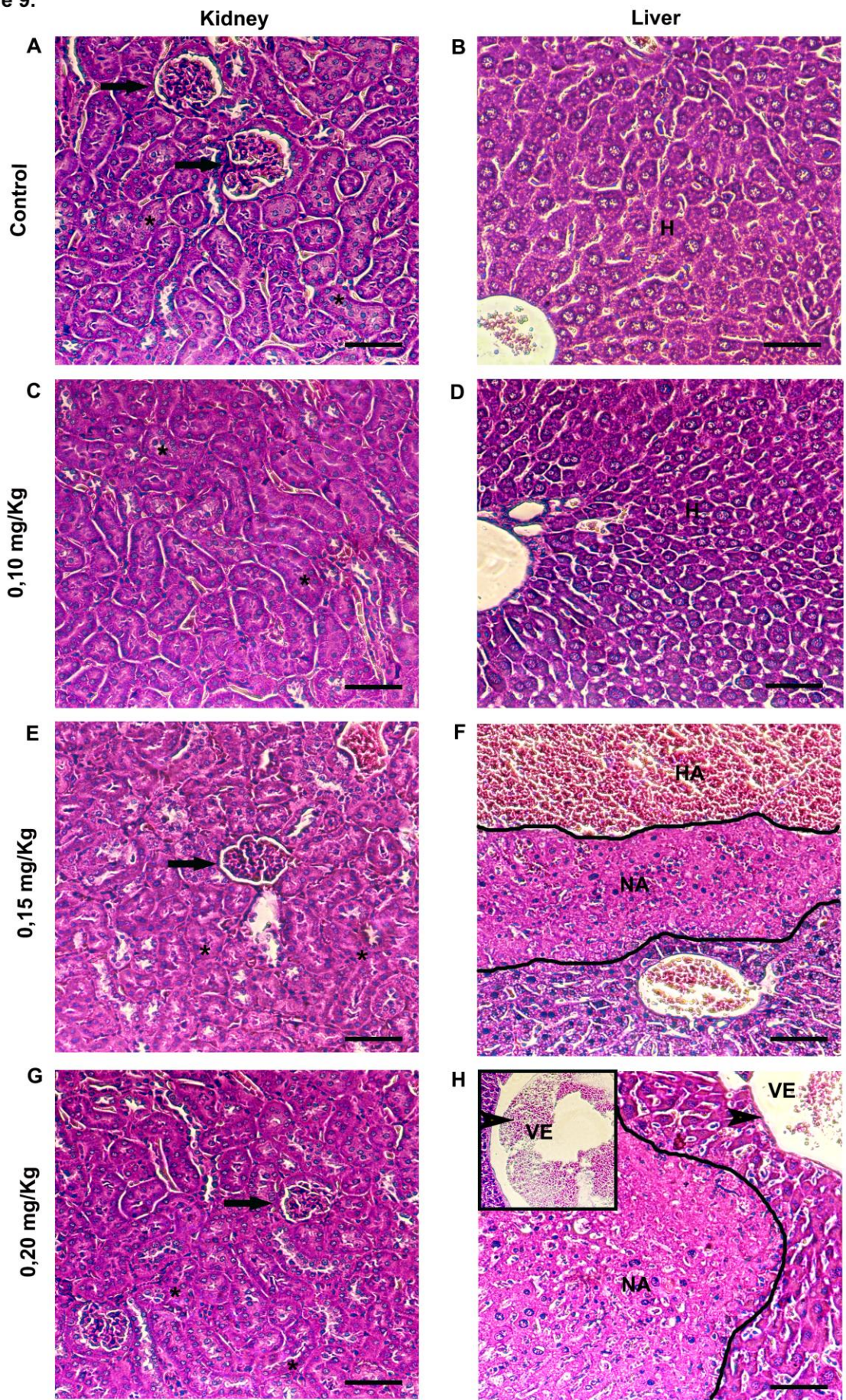


Figure 10

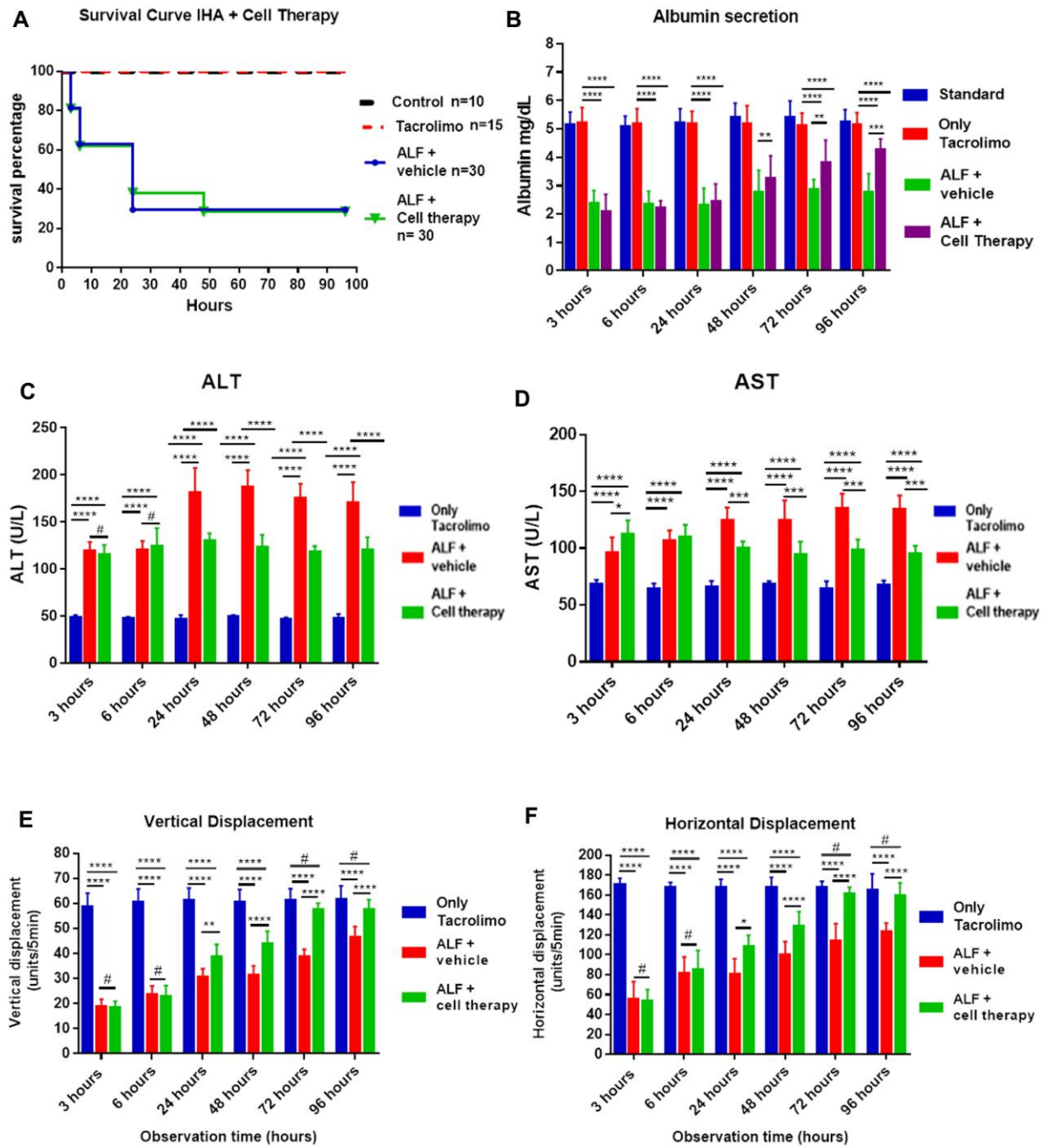


Figure 11.

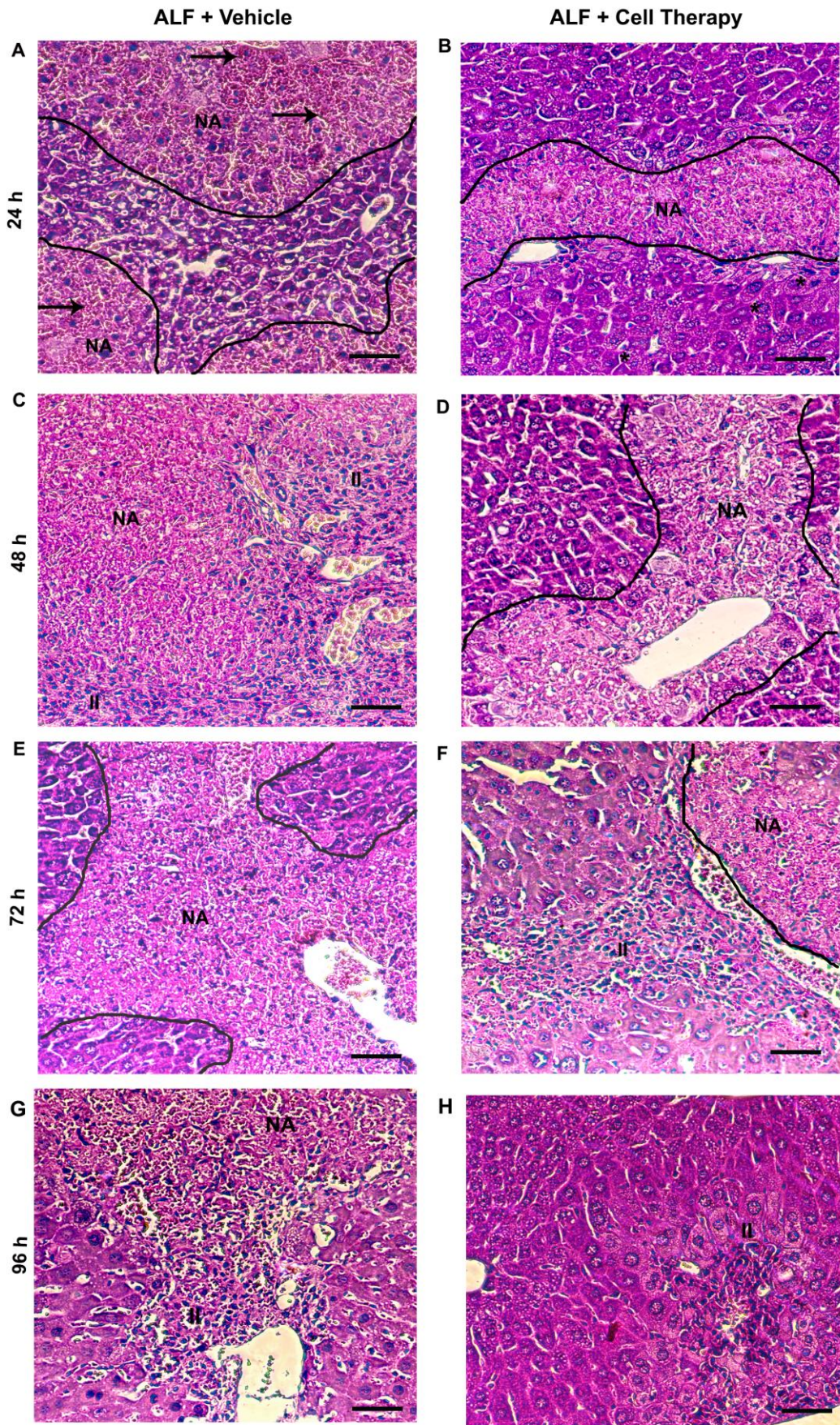


Figure 12.

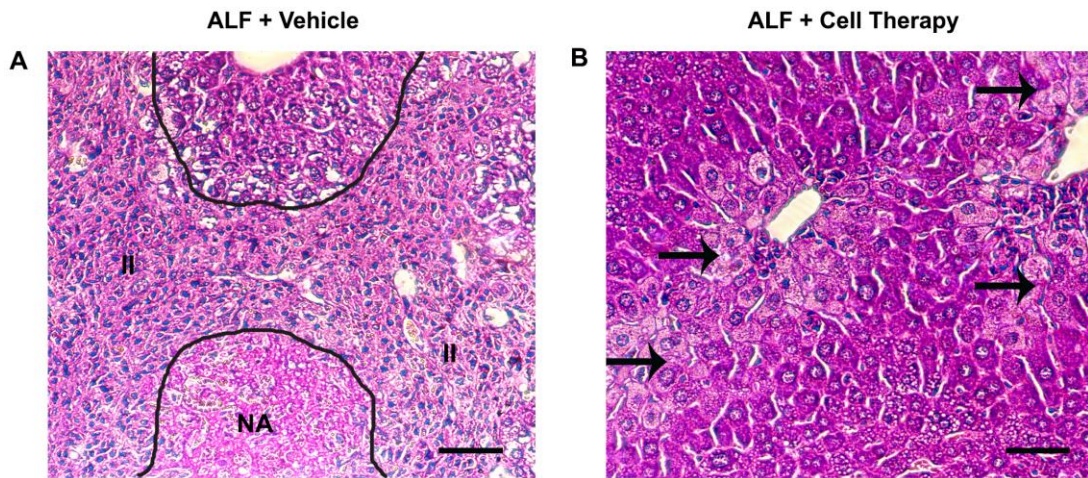


Table 1.

Degree of encephalopathy	Eyelid reflex	Touch response	Ataxia	Response to atrial stimulus	Piloerection	Motor activity	Physiological Excretions
0	++++	++++	-	++++	-	++++	++++
I	++++	++++	-	+++	-	+++	++++
II	+++	++	++	++	++	++	+++
III	++	+	++++	+	+++	++	++
IV	-	-	++++	-	++++	+	+

(+ + + +) The analyzed parameters are present

(+ + +) The analyzed parameters showed little reduction

(+ +) The parameters analyzed are noticeably reduced - with behavioral change

(+) The analyzed parameters are intensely reduced - with behavioral change

(-) The analyzed parameters are absent

Table 2.

	Degree of encephalopathy	0	I	II/III	III/IV	IV
groups evaluated	Vehicle Control	10 (100%)	0	0	0	0
	APAP treatment	3 (10%)	2 (6,6%)	7 (23,3%)	13 (43,3%)	5 (16,6%)

3.3. Artigo 3

✓ **Título:** Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy;

✓ **Referência Bibliográfica:** Cardoso L, Pinto MA, Henriques Pons A, Alves LA. Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy. Cryobiology. 2017;78:15-21. Epub 2017/08/08.

✓ **Situação:** Publicado

✓ **Descrição:** O presente artigo foi desenvolvido parcialmente durante o meu Mestrado, porém, a sua conclusão só foi realizada ao longo do Doutorado, uma vez que foram necessárias algumas alterações experimentais exigidas pelos revisores da revista. Nesse trabalho descrevemos a utilização de um agente crioprotetor, a trealose, na ausência do DMSO como potencial agente capaz de garantir viabilidade superior às demais soluções de congelamento testadas. Foram testados outros açúcares sozinhos ou em combinação com o DMSO, porém, nenhum foi capaz de superar o potencial crioprotetor de trealose 0,2M na ausência do DMSO. Esses dados apresentam grande importância para trabalhos voltados para terapia celular, uma vez que os efeitos colaterais do DMSO em diversos pacientes submetidos à infusão de células criopreservadas com essa substância já são conhecidos. Contudo, contribuem de forma significativa para a otimização do congelamento de hepatócitos obtidos de fígados rejeitados para o transplante (etapa descrita no item 5 dos objetivos gerais desta Tese). Além disso, os resultados gerados nesse artigo foram incluídos na base de dados para publicação do quarto artigo relacionado a esta Tese.



Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy



Liana Monteiro da Fonseca Cardoso ^a, Marcelo Alves Pinto ^b, Andrea Henriques Pons ^c, Luiz Anastácio Alves ^{a,*}

^a Laboratório de Comunicação Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^c Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2017

Received in revised form

30 June 2017

Accepted 29 July 2017

Available online 4 August 2017

Keywords:

Hepatocyte

Cryopreservation

Cell therapy

Disaccharides

Thehalose

ABSTRACT

Cryopreservation of hepatocytes is a crucial step in the implementation of cell therapy for treating certain liver diseases. In the present study we investigated the effect of the some disaccharides on the cryopreservation of rat hepatocytes. Liver cells were frozen in media in the presence or absence of low concentrations of Me₂SO (5% Me₂SO) supplemented with varying concentrations of disaccharides (sucrose, glucose and trehalose). After 7 days of cryopreservation, the hepatocytes were thawed and viability was measured by exclusion of trypan blue and by the MTT technique, as well as by determining albumin production. Among the investigated disaccharides and concentrations, 0.2 M trehalose showed the best overall outcome. Compared to the use of Me₂SO alone, significant improvement in post-thaw cell viability was observed. The new solution may reduce Me₂SO side effects on patients and improve the viability and quality of cryopreserved hepatocytes.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

With the advent of cell therapy and tissue engineering, the treatment of several tissue injuries in degenerative pathologies and previously untreatable processes became possible [46]. Cell therapy using live cells has been receiving a major prominence in the treatment of various diseases in recent years. In particular, hepatocyte (HT) transplantation is being evaluated as a promising alternative therapy for liver transplantation (LT). Several studies have already highlighted the success of this type of treatment for a variety of indications, including acute liver failure (ALF) and mainly

metabolic liver disease [31,43]. Thus, the concept of Hepatocyte Transplantation (HT) emerged, which may recover liver function until liver transplantation or lead to spontaneously patient recovery, increasing patient survival rate while awaiting donation [5,26,42]. Studies regarding cell therapy for liver diseases in animal models highlight the notable regenerative capacity of *in vivo* hepatocytes. Thus, the transplantation of these cells has an important role as a therapeutic innovation, leading to major advances regarding new perspectives in the treatment of liver diseases [25,42,55]. However, a major challenge for a wide-range clinical application of this method is high availability of quality hepatocytes with high viability [8,42,59]. One major obstacle, however, is the preservation and storage of the living cells, as well as the maintenance of large stocks in order to ensure a steady supply for cell therapy [32].

Cryopreservation is an approach based on the principle that chemical, biological and physical processes are effectively ‘suspended’ at cryogenic temperatures, below $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and typically below $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ [10,32]. Currently, this technique is widely applied for the preservation of cells and tissues used in the treatment of several diseases. In particular, hematopoietic SCs, human mesenchymal stem cells (hMSCs), human embryonic stem cells (hESCs) and umbilical cord SCs are being utilized in the treatment of various

Abbreviations: Me₂SO, dimethyl sulfoxide; MTT, thiazoly blue tetrazolium bromide; LT, liver transplantation; ALF, acute liver failure; HT, hepatocyte transplantation; hMSCs, human mesenchymal stem cells; hESCs, human embryonic stem cells; CPA, cryoprotective agent; FBS, fetal bovin serum; LDH, lactate dehydrogenase; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; GSH, restore glutathione.

* Corresponding author. Laboratório de Comunicação Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, 21045-900, Brazil.

E-mail addresses: lianamfc@gmail.com (L.M.F. Cardoso), marceloalvespinto@gmail.com (M.A. Pinto), andrea@ioc.fiocruz.br (A. Henriques Pons), alveslaa@gmail.com (L.A. Alves).

diseases such as diabetes, immune-modulatory disease, cardiovascular diseases and cancer [29,38,56]. Many freezing protocols have resulted in low recovery rates, with non-viable cells. Even in well characterized freezing protocols successfully applied to many types of cells, significant death (30–70%) is often observed within 24–48 h post-thaw [12].

Hepatocytes are highly affected by cryopreservation processes, showing a significant decrease in viability after thawing, of up to 40% [3,9,21,61]. Several studies have been described based on the cryopreservation of hepatocytes, however the results obtained after the thawing are still unsatisfactory when compared to newly isolated cells [9,55]. In the future, human hepatocytes may be cryogenically stored in cell banks and made available for patients with liver disease.

Dimethylsulfoxide (Me_2SO) is the most widely used cryoprotectant in freezing cells and tissues. Me_2SO has been well documented to be toxic to certain cells and causes protein denaturalization by interacting with ion groups of proteins. Other side effects upon Me_2SO infusion into patients include sedation, headache, nausea, vomiting, hypertension, bradycardia, hypotension or anaphylactic shock [6,24,50,67]. Effects of Me_2SO on blood include intravascular hemolysis, hyperosmolality, and increased serum transaminase levels after IV administration in humans [48,49,66]. Thus, it will be beneficial to find an alternative solution for cryopreservation of liver cells with low Me_2SO concentrations or in the complete absence of this cryoprotectant.

A similar cryopreservation process happens in nature. Many organisms and animals are able to tolerate low temperatures or dehydration stress and can survive in extreme temperature conditions for extended periods. Some specimens can survive in a desiccated state with up to 99% water loss, in a phenomenon known as anhydrobiosis. These events occur in reptiles, insects, amphibians, yeast, plant seeds, cysts of certain crustaceans and bacteria through the ability to accumulate and store large amounts of disaccharides such as glucose, glycerol, sucrose and trehalose [15,23,60].

Disaccharides, such as sucrose, glucose and trehalose, have been widely used as natural cryoprotectants for different types of cells and act as secondary cryoprotectants in conjunction with other cryoprotectants [13,20,40], including hematopoietic cells [36], cord blood cells [68], pancreatic islets [13] and hepatocytes [33,65]. The accumulation of sugars in animals appears to be related to two cell protection mechanisms. The first proposed mechanism is the capability of stabilizing biological membranes and proteins by direct interaction of sugars with polar residues through hydrogen bonding. The second proposed mechanism is due to their ability to form a stable glass (vitrification) upon loss of water [22].

Optimization of cryopreservation protocols to maintain the quality of hepatocytes after freezing and thawing it is an important task for cell banks aiming at cell therapy for patients with liver diseases. Thus, the present study aims to evaluate the cryopreservation of rat hepatocytes with different natural cryoprotectant additives (glucose, sucrose, and trehalose) at low Me_2SO concentrations or in the absence of Me_2SO concentration (5%).

2. Materials and methods

2.1. Animals and ethical aspects

Male Wistar rats were obtained from a breeding colony from the Biomodel Institute of Science and Technology (ICTB), at the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil. Animals were kept in polypropylene cages in a climate-controlled room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$ temperature and $55 \pm 5\%$ humidity) with a 12 h light/dark cycle and fed with commercial rodent diet. Water was

provided *ad libitum*. The study protocol (LW-43/11 (P-63/11)) was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA-Fiocruz), and conducted in strict accordance with the recommendations from the Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL) and the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil).

2.2. Rat hepatocytes isolation

Hepatocytes were isolated by enzymatic dissociation using an infusion pump according to a method adapted from previous reports in the literature [14,44,51] and a new method developed by Henriques-Pons and coworkers 2014.

Briefly, Wistar rats were euthanized in a CO_2 chamber and underwent abdominal laparotomy. In order to visualize the blood vessels and expose the hepatic portal vein, the viscera were carefully removed and placed outside the abdominal cavity to the right a 22G pediatric catheter was inserted into the hepatic portal vein. After cannulation, the organ was perfused with a continuous flow at 05 mL/min, with 250 mL of Williams' medium E (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) at pH 7.4 and 37°C . The liver blanches instantly and a cut of the inferior vena cava to allow efflux was then performed. Subsequently, the liver was aseptically removed from the abdominal cavity and the enzymatic digestion process of the liver parenchyma was immediately started, perfusing the liver with 20 mL of recombinant trypsin (TrypLE™ Express 1×, Gibco, Denmark) into the hepatic portal vein cannulation. Hepatic lobes were submitted to mechanical dissociation, lightly shaken for about 5 min and then resuspended in 5 mL of William's medium. The isolated hepatocytes were collected and filtered through a 100 μm filter and subjected to two washing steps in William's medium with 10% fetal bovine serum (FBS - Cutilab) followed by centrifugation cycles at $50 \times g$ for 5 min at 4°C .

2.3. Fetal bovine purification

Immediately following the isolation procedure, a density gradient was performed to purify the freshly isolated liver cells: 5 mL of the cell suspensions were placed on 10 mL of the 100% fetal bovine serum solution (Cutlab, Brazil) for 30 min. The cell pellets were collected and resuspended in 3 mL of William's medium.

2.4. Preparation of cryoprotectant solutions

All solutions were prepared fresh prior to use. Sugars (glucose, sucrose, trehalose) were used at concentrations of 0.2–0.4 M. These additives were either combined with 5% Me_2SO or used alone, and then compared to the standard 5% Me_2SO method with no additional additives. Fetal bovine serum was also added to the solutions. Cells were added to the cryoprotectant solutions to attain a final suspension volume of 1 mL.

2.5. Hepatocyte cryopreservation and thawing procedures

Isolated hepatocytes were cryopreserved in different cryopreservation solutions in the presence or absence of Me_2SO . 1×10^6 cells/mL were resuspended in cryopreservation media with the different cryoprotectants listed in Table 1 and FBS in cryotubes (Corning Incorporated, Mexico) to a final volume of 1.0 mL. The freezing program was performed according to a method adapted from previous reports in the literature [28,37,54]. Briefly, cryotubes were immediately placed on ice (4°C) for 5 min, then maintained at -20°C for 3 h. They were then, maintained on dry ice (-78°C) for 24 h and finally stored in liquid nitrogen (-196°C). Seven days

Table 1
Osmolality of the solutions added to the cryopreservation medium.

Solution	DMSO (%v/v)	Sucrose (Mol/L)	Glucose (Mol/L)	Trehalose (Mol/L)	Osmolarity	Temperature
1	0	0	0	0	0310 mOsm/Kg	0575 m °C
2	5	0	0	0	1246 mOsm/Kg	2315 m °C
3	10	0	0	0	2362 mOsm/Kg	4386 m °C
4	0	0,2	0	0	0512 mOsm/Kg	951 m °C
5	0	0,3	0	0	0621 mOsm/Kg	1153 m °C
6	0	0,4	0	0	0753 mOsm/Kg	1399 m °C
7	0	0	0,2	0	0513 mOsm/Kg	953 m °C
8	0	0	0,3	0	0646 mOsm/Kg	1200 m °C
9	0	0	0,4	0	0725 mOsm/Kg	1347 m °C
10	0	0	0	0,2	0504 mOsm/Kg	936 m °C
11	0	0	0	0,3	0621 mOsm/Kg	1269 m °C
12	0	0	0	0,4	0753 mOsm/Kg	1532 m °C

* The osmolarity was observed in our laboratory according to the freezing point of solutions of sucrose, glucose and trehalose added to cryopreservation solution (FBS in the absence or presence of 5% DMSO).

after the freezing period the frozen hepatocytes were thawed in a water bath at 37 °C and the cryo-medium was removed by dilution with 5 mL of William's medium and centrifugation at $50 \times g$ at 4 °C for 5 min.

2.6. Trypan blue exclusion assay

The viability of both isolated hepatocytes and cryopreserved/thawed hepatocytes was determined by the Trypan Blue dye exclusion test. Ten microliter hepatocyte suspensions were diluted in 90 μ L of 0.2% Trypan Blue solution (Sigma – Aldrich, USA) and counted in a Neubauer chamber [58].

2.7. Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide assay (MTT)

Tetrazolium salts act as redox sensors that can be reduced by metabolically active cells into formazan derivatives, which can in turn be dissolved in Me₂SO for spectrophotometrical assessment [19].

5×10^4 fresh viable hepatocytes were plated and incubated with 25 μ L of the MTT reagent at 5 mg/mL (Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide - Sigma – Aldrich, USA) for 3 h at 37° C. At the end of the incubation, the MTT reagent was removed and the reactions were interrupted with 100 μ L of Me₂SO to dissolve all crystallized formazan. Formazan concentrations were then assayed by determining the absorption values of the Me₂SO solutions on a EzRead 400 spectrophotometric plate reader (Biochrom, Cambridge, UK) at 570 nm.

2.8. Lactate Dehydrogenase (LDH) release by primary hepatocytes

This assay is a colorimetric system for the determination of lactate dehydrogenase in. The detection occurs by using a lactate to pyruvate reaction with simultaneous quantitative determination of the NADH formed in the enzymatic reaction. Twenty-five microliters of supernatants were collected and NADH was determined by determining the absorptions on a EzRead 400 spectrophotometric plate reader (Biochrom, Cambridge, UK) at 510 nm. Data were analyzed according to the instructions included in the LDH detection kit, purchased from Doles (Goiania, GO, Brazil) [45].

2.9. Hepatocyte albumin assay

To evaluate the liver function of freshly isolated and cryopreserved hepatocytes, a biochemical test for albumin production was performed using the Labtest kit (Lagoa Santa, MG, Brazil). The protocol was standardized in our laboratory for rat hepatocytes, adapted from Ref. [62]. Briefly, 5×10^5 cells/well experiments were

placed in a 96-well plate and the supernatant was collected after a 1-h incubation in medium William's at 37 °C. Sample absorbances were measured using a SpectraMax[®] M5 spectrophotometer (Molecular Devices, USA) at 610 nm.

2.10. Statistical analyses

D'Agostino & Pearson's pre-test was used to verify data normality, followed by an ANOVA with Tukey post-test for multiple comparisons for normally distributed data. For non-parametric distributions, the Kruskal-Wallis test followed by Dunns post-test were applied. P-values <0.05 were considered significant.

3. Results

Cell viability of the fresh hepatocyte isolation was of $88.22 \pm 1.78\%$ measured by the trypan blue exclusion assay. The mean cell yield obtained after the hepatocytes isolation was $2,5 \times 10^6$ cells/g of tissue.

Me₂SO is the most widely used cryoprotector in freezing protocols for various cell types. However is known that this CPA is toxic to cells at room temperature in a dose-dependent pattern. Most liver cell cryopreservation protocols use Me₂SO at different concentrations, ranging from 10% to 30%, diluted in fetal bovine serum (FBS). Our results indicate that a 5% Me₂SO solution confers a higher cryoprotector role compared to higher 10% Me₂SO, of $83.3\% \pm 2$ and $77 \pm 1.8\%$, respectively, by trypan blue exclusion, and $85 \pm 3.5\%$ vs. $77 \pm 3.6\%$, respectively, by the MTT technique in the HepG2 cell line ($X \pm SD$, $p < 0,001$). This data is displayed in Fig. 1.

The viability of rat hepatocytes isolated by Tryple Express 1× and cryopreserved in different freezing medium solutions was evaluated by trypan blue exclusion and MTT assay, and the group with the cryoprotective potential higher than 5% Me₂SO was also evaluated regarding LDH release into the extracellular medium. Cryopreservation solutions at 0.2 M, 0.3 M or 0.4 M sucrose, glucose or trehalose in the absence or in the presence of 5% Me₂SO were evaluated. Data indicated that 0.2 M trehalose showed higher cryoprotective potential compared to the other solutions ($X \pm SD$, $p < 0,001$). The Trypan blue and MTT assays indicated higher values in the 0.2 M trehalose group when compared to the control standard freezing with 5% Me₂SO or any other investigated. These results are displayed in Fig. 2.

A functional analysis of the cells was conducted through an albumin production assay, as illustrated in Fig. 3. The standard production of albumin is 3.75 ± 0.09 g/dL and isolated hepatocytes exhibited a normal production of albumin of 3.12 ± 0.06 g/dL. Cryopreserved hepatocytes showed decreased production of albumin, of 1.96 ± 0.15 g/dL and 2.19 ± 0.05 for cells cryopreserved with

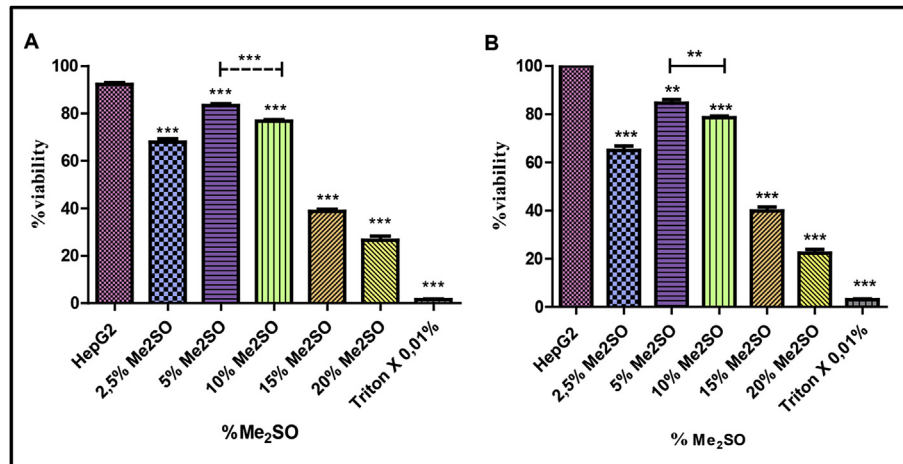


Fig. 1. Analysis of cell viability by the trypan blue exclusion (A) and MTT (B) assay in HepG2 cells after cryopreservation with Me₂SO. 1×10^6 cells were cryopreserved for 7 days in liquid nitrogen at different DMSO concentrations for analysis of the potential toxicity of the cryoprotector Me₂SO in HepG2 cells. The graphs represent 3 independent experiments and a pool of 3 samples performed in triplicate (mean and standard deviation). P values < 0.05 are significantly different ***p < 0.0001; **p < 0.001 (Statistics performed using the One-Way ANOVA and Tukey's post-test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

5% Me₂SO and 0.2 M trehalose in the absence of Me₂SO, respectively. According to these results, hepatocytes cryopreserved in 0.2 M trehalose in the absence of Me₂SO showed better functional capacity than cells cryopreserved with 5% Me₂SO.

4. Discussion

The development of effective cryopreservation techniques for creating liver cell banks is critical to the implementation and expansion of therapeutic procedures such as hepatocyte transplantation. Although, cryopreservation is the best mechanism of preservation and long-term storage for hepatocytes, this technique promotes significant loss in viability and morphological changes [30,55,61]. Thus, it is necessary to improve cryopreservation protocols in order to minimize such effects.

Usually, a freezing solution containing Me₂SO as cryoprotectant is used. The concentration of this cryoprotectant is crucial. A final concentration of 10% Me₂SO is described in many protocols for the cryopreservation of hepatocytes from different species [7,9,30,41,52,53,64]. However, several studies in the literature have reported its toxic effects in patients after cellular infusion with Me₂SO cryopreserved cells. Efforts to reduce toxicity include the removal of DMSO prior to transfusion or decreasing the amounts used in the freezing process [6,24,48,67]. In addition, it has been demonstrated that at 25 °C or 30 °C Me₂SO is toxic to rat hepatocytes [11,61]. With the aim of reducing these effects, a search for lower Me₂SO or other molecule concentrations in the literature was conducted, that is capable to act as a potentially suitable cryoprotector. Herein, the possibility of using a 5% Me₂SO solution in the freezing medium of primary hepatocytes and in the Me₂SO cell line was demonstrated. The latter is the concentration specified for HepG2 in ATCC (71). Thus, the aim was to reduce or eliminate Me₂SO concentrations from the freezing medium.

In nature, certain unicellular and multicellular organisms exhibit an extraordinary stress-tolerance capacity when exposed to extreme temperature situations [4]. Such organisms accumulate osmolytes and protective sugars, especially trehalose. This mechanism may be of fundamental importance in cellular cryopreservation. Trehalose is a non-reducing disaccharide with unique chemical properties that accumulates in some organisms that survive freezing and desiccation in nature [23].

Several hepatocyte cryopreservation protocols are currently described in the literature. However, there is still no consensus for a

well-established protocol [2,3,7,65]. Hepatocytes are very susceptible to damage from freezing and thawing, and their function is often compromised or lost during cryopreservation [35]. Thus, the presence of this sugar during freezing might aid in hepatocyte membrane and protein protection during the cryopreservation process [23].

Several mechanisms are responsible for damage to hepatocytes during the freezing and thawing process, such as oxidative stress, mechanical injury due to the formation of ice crystals, osmotic damage and activation of caspase-3 during apoptosis [13,68]. To minimize these problems, several alternatives have been proposed. These strategies involve the addition of disaccharides, caspase inhibitors and antioxidants in the cryopreservation medium in order to reduce the effects of cryo-injury [1,3,10,34,39]. According to the cryoprotectant properties of some disaccharides already described in the literature, some sugars were thus selected and combined with a low Me₂SO concentration to propose a hepatocyte cryopreservation solution for cell therapy with low toxicity.

Rodrigues *et al* (2008) suggests that the addition of disaccharides such as trehalose to cryopreservation solutions enables the decrease of the Me₂SO concentration to a final volume of 2.5% and 5% sucrose in hematopoietic cells [47]. Human hepatocytes cryopreserved in a solution with 10% Me₂SO associated with 0.2 M trehalose showed increased viability of around 15% when compared to the control group without trehalose (62.9 ± 13 vs. $46.9 \pm 11\%$), respectively [33]. Although these studies document that extracellular trehalose enhances post-thaw viability when Me₂SO is used as the primary CPA, there is still the issue of potential Me₂SO-associated toxicity effects. Ekaterina Katenz *et al.* (2007) compared the cryopreservation of primary human hepatocytes to the use of 10% Me₂SO alone in a frozen culture medium supplemented with varying concentrations of trehalose. That study indicated that 0.2 M trehalose showed the best overall outcome among the investigated concentrations, when compared to the use of 10% Me₂SO alone [33]. Stokich *et al.* (2014) demonstrated that HepG2 cells exposed to 24-h pre-incubation with 100 mM trehalose before freezing in 10% Me₂SO show a 400% increase in cell viability after thawing [57]. Furthermore, trehalose appears to have protective effect not only when added to cryopreservation solution, but also a preventive effect against cryo-damage. The present study suggests that the transport of trehalose to the intracellular environment can contribute significantly to mammalian cell protection during the freezing and thawing process. Therefore, studies on the role of

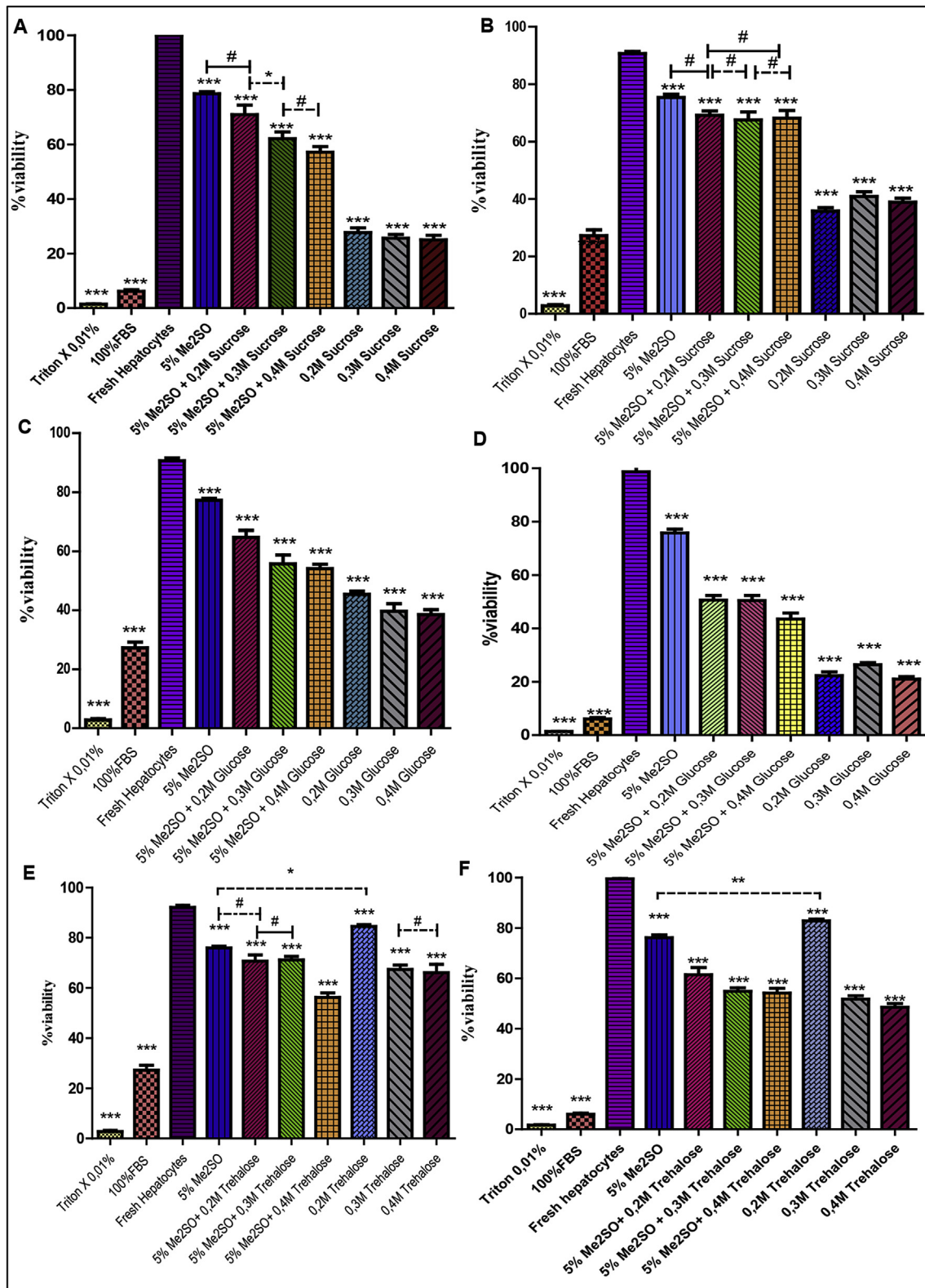


Fig. 2. Analysis of cell viability by the trypan blue exclusion and MTT assays. Cryopreserved hepatocytes with different disaccharides (A, B) Sucrose; (C, D) and Glucose (E, F) Trehalose. The 0.2 M trehalose solution showed higher cryoprotective potential compared to the control standard freezing with 5% Me₂SO or any other evaluated CPA. P values < 0.05 are significantly different ***p < 0.0001; **p < 0.001; *p < 0.01 (Statistics performed using the One-Way ANOVA and Tukey's post-test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

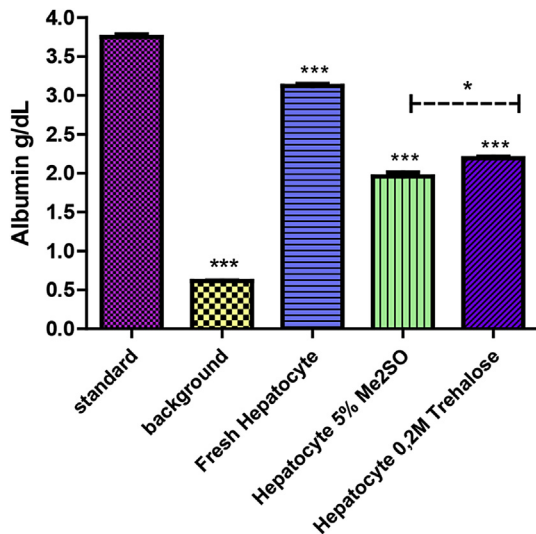


Fig. 3. Functional Assay regarding albumin production in rat hepatocytes after isolation and cryopreservation with TrypLE Express. 5×10^5 cells/well were incubated at 37°C for 1 h in a 96 well plate and then collected for analysis. Hepatocyte supernatants cryopreserved in liquid nitrogen in an FBS solution with 5% Me₂SO and cryopreserved cells in a FBS 0.2 M solution of trehalose in the absence of Me₂SO for 7 days were also analyzed. The data were compared to the standard production of the kit. The graphs represent 2 independent experiments performed in triplicate (mean and standard deviation). P values < 0.05 are significantly different. *p < 0.01 ***p < 0.0001. (Statistics performed using One-Way ANOVA and Tukey's post-test).

trehalose in stress-tolerance suggest that trehalose must be present on both sides of the cell membrane [1].

Thus, Eroglu et al 2000, exhibit that the introduction of low concentrations of intracellular trehalose can greatly improve the survival of mammalian cells during cryopreservation. In addition, low concentrations (0.2 M) of trehalose extracellular in absence of Me₂SO permitted long-term post-thaw survival of more than 80% of 3T3 fibroblasts and 70% of human keratinocytes [25]. The success of trehalose as cryoprotectant alone was also shown after the intracellular incorporation and extracellular addition of this sugar into human hematopoietic stem and progenitor cells when compared to the standard freeze with 10% Me₂SO. Therefore, these studies suggest that low concentrations, in particular 0.2M, intra and extracellular of trehalose can protect hematopoietic progenitors from freezing injury in and support the concept that trehalose may be useful for freezing embryonic stem cells and other primitive stem cells for therapeutic and investigational use [16–18].

Like trehalose, other sugars appear to be involved in this protection process against injuries during cryopreservation. Aghdai et al. (2013) showed favorable data regarding the use of fructose in rat hepatocytes and the HepG2 line cryopreservation medium. The reason, according to the authors, is that fructose can protect cells from apoptosis through the formation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) to restore glutathione (GSH) levels. This event reduces the generation of reactive oxygen species, which is directly reflected in cell viability [3]. The incubation of rat hepatocytes with glucose (100–300 mM), fructose (100–300 mM) or α -lipoic acid before freezing improved viability, fixation efficiency of the cells in culture and decrease of post-thaw LDH [27]. Fructose has also been suggested as a possible additive to enzymatic digestion solutions used during the hepatocyte isolation process as preventive mechanism against lesions generated during the procedure conducted to obtain the cells. Addition of this substrate would allow for energy recovery due to hepatocyte stress by ischemia and reperfusion during cell isolation from tissue samples [8,27].

Herein, sugars with cryoprotective potential involved in the anhydrobiosis process in animals were investigated, such as sucrose, glucose and trehalose. However, among the tested sugar solutions, only a 0.2 M solution of trehalose in the absence of Me₂SO showed a potential higher than the 5% Me₂SO solution. This result is noteworthy, since studies on the infusion of hematopoietic stem cells cryopreserved in Me₂SO describe various effects associated with this cryoprotector in patients submitted to transplantation. These effects are more evident in children, due to low body weight associated with potential toxic doses [40,47]. Thus, the 0.2M trehalose solution in the absence of Me₂SO is an important data for cell therapy with liver cells, considering the side effects already observed due to Me₂SO toxicity. This trehalose concentration has been suggested combined with 10% Me₂SO for the cryopreservation of human hepatocytes [33,63].

5. Conclusion

Herein, the addition of 0.2 M trehalose to the cryopreservation medium in the absence of Me₂SO increased the survival of rat hepatocytes after cooling when compared to the standard 5% Me₂SO solution. The absence of Me₂SO in the cryopreservation medium is of great importance in cell transplantation treatments by allowing the infusion of hepatocytes in patients with liver disease such without exposing patients to the potential toxicity and collateral effects of this substance. Thus, a new rat hepatocyte cryopreservation protocol for cell therapy studies of liver diseases, drug metabolism and xenotransplantation is proposed.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPERJ, CNPq and the Oswaldo Cruz Institute.

References

- [1] A. Abazari, L.G. Meimetis, G. Budin, S.S. Bale, R. Weissleder, M. Toner, Engineered trehalose permeable to mammalian cells, *PLoS One* 10 (2015) e0130323.
- [2] R.M. Adams, M. Wang, A.M. Crane, B. Brown, G.J. Darlington, F.D. Ledley, Effective cryopreservation and long-term storage of primary human hepatocytes with recovery of viability, differentiation, and replicative potential, *Cell Transpl.* 4 (1995) 579–586.
- [3] M.H. Aghdai, A. Jamshidzadeh, M. Nematizadeh, M. Behzadiannia, H. Niknahad, Z. Amirghofran, E. Esfandiari, N. Azarpira, Evaluating the effects of dithiothreitol and fructose on cell viability and function of cryopreserved primary rat hepatocytes and HepG2 cell line, *Hepat. Mon.* 13 (2013) e7824.
- [4] F. Albertorio, V.A. Chapa, X. Chen, A.J. Diaz, P.S. Cremer, The alpha, alpha-(1->1) linkage of trehalose is key to anhydrobiotic preservation, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 10567–10574.
- [5] A. Aleem Khan, N. Parveen, M.A. Habeeb, C.M. Habibullah, Journey from hepatocyte transplantation to hepatic stem cells: a novel treatment strategy for liver diseases, *Indian J. Med. Res.* 123 (2006) 601–614.
- [6] P. Alessandrino, P. Bernasconi, D. Caldera, A. Colombo, M. Bonfichi, L. Malcovati, C. Klersy, G. Martinelli, M. Maiocchi, G. Pagnucco, M. Varettoni, C. Perotti, C. Bernasconi, Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases, *Bone Marrow Transpl.* 23 (1999) 533–537.
- [7] E. Alexandre, C. Viollon-abadie, P. David, A. Gandillet, P. Coassolo, B. Heyd, G. Mantion, P. Wolf, P. Bachelier, D. Jaeck, L. Richert, Cryopreservation of adult human hepatocytes obtained from resected liver biopsies, *Cryobiology* 44 (2002) 103–113.
- [8] U. Baccarani, A. Sanna, A. Cariani, M. Sainz-barriga, G.L. Adani, A.M. Zambito, G. Piccolo, A. Risaliti, A. Nanni-costa, L. Ridolfi, M. Scalomogna, F. Bresadola, A. Donini, Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience, *Liver Transpl.* 9 (2003) 506–512.
- [9] U. Baccarani, A. Sanna, A. Cariani, M. Sainz, G.L. Adani, D. Lorenzin, D. Montanaro, M. Scalomogna, G. Piccolo, A. Risaliti, F. Bresadola, A. Donini, Cryopreserved human hepatocytes from cell bank: in vitro function and clinical application, *Transpl. Proc.* 37 (2005) 256–259.
- [10] J.G. Baust, D. Gao, J.M. Baust, Cryopreservation: an emerging paradigm change, *Organogenesis* 5 (2009) 90–96.
- [11] J.M. Baust, R. Van buskirk, J.G. Baust, Modulation of the cryopreservation cap:

- elevated survival with reduced dimethyl sulfoxide concentration, *Cryobiology* 45 (2002) 97–108.
- [12] J.M. Baust, M.J. Vogel, R. Van buskirk, J.G. Baust, A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival, *Cell Transplant* 10 (2001) 561–571.
- [13] G.M. Beattie, J.H. Crowe, A.D. Lopez, V. Cirulli, C. Ricordi, A. Hayek, trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage, *diabetes* 46 (1997) 519–523.
- [14] M.N. Berry, D.S. Friend, high-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study, *J. Cell Biol.* 43 (1969) 506–520.
- [15] K.G. Brockbank, L.H. Campbell, E.D. Greene, M.C. Brockbank, J.G. Duman, Lessons from nature for preservation of mammalian cells, tissues, and organs, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47 (2011) 210–217.
- [16] S.S. Buchanan, S.A. Gross, J.P. Acker, M. Toner, J.F. Carpenter, D.W. Pyatt, Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line, *Stem Cells Dev.* 13 (2004) 295–305.
- [17] S.S. Buchanan, M.A. Menze, S.C. Hand, D.W. Pyatt, J.F. Carpenter, Cryopreservation of human hematopoietic stem and progenitor cells loaded with trehalose: transient permeabilization via the adenosine triphosphate-dependent p2z receptor channel, *Cell Preserv. Technol.* 3 (2005) 212–222.
- [18] S.S. Buchanan, D.W. Pyatt, J.F. Carpenter, Preservation of differentiation and clonogenic potential of human hematopoietic stem and progenitor cells during lyophilization and ambient storage, *PLoS One* 5 (2010).
- [19] V. Bunel, M. Ouedraogo, A.T. Nguyen, C. Stevigny, P. Duez, Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths, and limits, *Planta Med.* 80 (2014) 1210–1226.
- [20] L.H. Campbell, K.G. Brockbank, Culturing with trehalose produces viable endothelial cells after cryopreservation, *Cryobiology* 64 (2012) 240–244.
- [21] C. Chesne, C. Guyomard, A. Fautrel, M.G. Poullain, B. Fremont, H. De jong, A. Guillouzo, Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation, *Hepatology* 18 (1993) 406–414.
- [22] J.H. Crowe, L.M. Crowe, J.F. Carpenter, A.S. Rudolph, C.A. Wistrom, B.J. Spargo, T.J. Anchordoguy, Interactions of sugars with membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 947 (1988) 367–384.
- [23] J.H. Crowe, F.A. Hoekstra, L.M. Crowe, Anhydrobiosis, *Annu. Rev. Physiol.* 54 (1992) 579–599.
- [24] J. Davis, S.D. Rowley, G.W. Santos, Toxicity of autologous bone marrow graft infusion, *Prog. Clin. Biol. Res.* 333 (1990) 531–540.
- [25] A. Eroglu, M.J. Russo, R. Bieganski, A. Fowler, S. Cheley, H. Bayley, M. Toner, Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 163–167.
- [26] S.J. Forbes, S. Gupta, A. Dhawan, Cell therapy for liver disease: from liver transplantation to cell factory, *J. Hepatol.* 62 (2015) S157–S169.
- [27] H.A. Gonzalez-ponce, M.C. Martinez-saldana, A.R. Rincon-sanchez, M.T. Sumaya-martinez, M. Buist-homan, K.N. Faber, H. Moshage, F. Jaramillo-juarez, Hepatoprotective effect of opuntia robusta and opuntia streptacantha fruits against acetaminophen-induced acute liver damage, *Nutrients* 8 (2016).
- [28] A. Guillouzo, L. Rialland, A. Fautrel, C. Guyomard, Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation, *Chem. Biol. Interact.* 121 (1999) 7–16.
- [29] B.C. Heng, L.L. Kuleshova, S.M. Bested, H. Liu, T. Cao, The cryopreservation of human embryonic stem cells, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 41 (2005) 97–104.
- [30] E.P. Ibars, M. Cortes, L. Tolosa, M.J. Gomez-lechon, S. Lopez, J.V. Castell, J. Mir, Hepatocyte transplantation program: lessons learned and future strategies, *World J. Gastroenterol.* 22 (2016) 874–886.
- [31] C. Jorns, E.C. Ellis, G. Nowak, B. Fischler, A. Nemeth, S.C. Strom, B.G. Ericzon, Hepatocyte transplantation for inherited metabolic diseases of the liver, *J. Intern Med.* 272 (2012) 201–223.
- [32] J.O. Karlsson, M. Toner, long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues, *Biomaterials* 17 (1996) 243–256.
- [33] E. Katenz, F.W. Vondran, R. Schwartzlander, G. Pless, X. Gong, X. Cheng, P. Neuhaus, I.M. Sauer, Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent, *Liver Transpl.* 13 (2007) 38–45.
- [34] S. Kaur, M. Das, Functional foods: an overview, *Food Sci. Biotechnol.* 20 (2011) 861–875.
- [35] A.P. Li, Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development, *Chem. Biol. Interact.* 168 (2007) 16–29.
- [36] L.S. Limaye, V.P. Kale, Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium, *J. Hematother Stem Cell Res.* 10 (2001) 709–718.
- [37] T.D. Lloyd, S. Orr, P. Skett, D.P. Berry, A.R. Dennison, Cryopreservation of hepatocytes: a review of current methods for banking, *Cell Tissue Bank.* 4 (2003) 3–15.
- [38] A. Maligneri, E. Kantzari, M.P. Patrizi, S. Gambardella, Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 3 (2010) 248–269.
- [39] B.V. Martin-murphy, M.P. Holt, C. Ju, The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice, *Toxicol. Lett.* 192 (2010) 387–394.
- [40] J.P. Motta, B.E. Gomes, L.F. Bouzas, F.H. Paraguassu-braga, L.C. Porto, Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide, *Cryobiology* 60 (2010) 301–307.
- [41] S. Naik, H.A. Santangini, D.M. Trenkler, C.J. Mullon, B.A. Solomon, J. Pan, H.O. Jauregui, Functional recovery of porcine hepatocytes after hypothermic or cryogenic preservation for liver support systems, *Cell Transpl.* 6 (1997) 447–454.
- [42] A. Nussler, S. Konig, M. Ott, E. Sokal, B. Christ, W. Thasler, M. Brulport, G. Gabelein, W. Schormann, M. Schulze, E. Ellis, M. Kraemer, F. Nocken, W. Fleig, M. Manns, S.C. Strom, J.G. Hengstler, Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases, *J. Hepatol.* 45 (2006) 144–159.
- [43] E. Pareja, M.J. Gomez-lechon, M. Cortes, A. Bonora-centelles, J.V. Castell, J. Mir, Human hepatocyte transplantation in patients with hepatic failure awaiting a graft, *Eur. Surg. Res.* 50 (2013) 273–281.
- [44] L. Pichard, E. Raulet, G. Fabre, J.B. Ferrini, J.C. Ourlin, P. Maurel, Human hepatocyte culture, *Methods Mol. Biol.* 320 (2006) 283–293.
- [45] C.S. Reusch, L.D. Bunch, Heat stable ladh. Heat stable lactic dehydrogenase in blood serum as a diagnostic method, *J. Kans Med. Soc.* 69 (1968) 245–248.
- [46] M.V. Risbud, I.M. Shapiro, A.R. Vaccaro, T.J. Albert, Stem cell regeneration of the nucleus pulposus, *Spine J.* 4 (2004) 348s–353s.
- [47] J.P. Rodrigues, F.H. Paraguassu-braga, L. Carvalho, E. Abdelhay, L.F. Bouzas, L.C. Porto, Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood, *Cryobiology* 56 (2008) 144–151.
- [48] D.N. Runckel, J.R. Swanson, Effect of dimethyl sulfoxide on serum osmolality, *Clin. Chem.* 26 (1980) 1745–1747.
- [49] M. Samoszuk, M.E. Reid, P.T. Toy, Intravenous dimethylsulfoxide therapy causes severe hemolysis mimicking a hemolytic transfusion reaction, *Transfusion* 23 (1983) 405.
- [50] C. Scheinkonig, S. Kappicht, H.J. Kolb, M. Schleuning, Adoption of long-term cultures to evaluate the cryoprotective potential of trehalose for freezing hematopoietic stem cells, *Bone Marrow Transpl.* 34 (2004) 531–536.
- [51] P.O. Seglen, Preparation of isolated rat liver cells, *Methods Cell Biol.* 13 (1976) 29–83.
- [52] P. Skett, P. Roberts, S. Khan, Maintenance of steroid metabolism and hormone responsiveness in cryopreserved dog, monkey and human hepatocytes, *Chem. Biol. Interact.* 121 (1999) 65–76.
- [53] E. Solanas, C. Sostres, A. Serrablo, A. Garcia-gil, F. Aranguren, P. Jimenez, M.T. Serrano, Incubation with dimethyl sulfoxide prior to cryopreservation improves functionality of thawed human primary hepatocytes, *Biopreserv Biobank* 10 (2012) 446–453.
- [54] J.H. Son, Y.M. Ha, Y.I. Kim, K.M. Kim, J.K. Park, S.K. Kim, Immobilization of cryopreserved primary rat hepatocytes for the development of a bioartificial liver system, *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 51–54.
- [55] X. Stephenne, M. Najimi, E.M. Sokal, Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? *World J. Gastroenterol.* 16 (2010) 1–14.
- [56] M. Stockschrader, H.T. Hassan, C. Krog, W. Kruger, C. Loliger, M. Horstman, M. Altnoder, J. Clausen, J. Grimm, H. Kabisch, A. Zander, long-term follow-up of leukaemia patients after related cryopreserved allogeneic bone marrow transplantation, *Br. J. Haematol.* 96 (1997) 382–386.
- [57] B. Stokich, Q. Osgood, D. Grimm, S. Moorthy, N. Chakraborty, M.A. Menze, Cryopreservation of hepatocyte (hepg2) cell monolayers: impact of trehalose, *Cryobiology* 69 (2014) 281–290.
- [58] W. Strober, Monitoring cell growth, *Curr. Protoc. Immunol. Appendix 3* (2001). Appendix 3a.
- [59] S.C. Strom, R.A. Fisher, M.T. Thompson, A.J. Sanyal, P.E. Cole, J.M. Ham, M.P. Posner, Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure, *Transplantation* 63 (1997) 559–569.
- [60] K.J. Sullivan, K.B. Storey, Environmental stress responsive expression of the gene *li16* in *rana sylvatica*, the freeze tolerant wood frog, *Cryobiology* 64 (2012) 192–200.
- [61] C. Terry, A. Dhawan, R.R. Mitry, R.D. Hughes, Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: state of the art, *Cryobiology* 53 (2006) 149–159.
- [62] S.K. Van Houcke, P. Rustad, H.C. Stepman, G.B. Kristensen, D. Stockl, T.H. Roraas, S. Sandberg, L.M. Thienpont, Calcium, magnesium, albumin, and total protein measurement in serum as assessed with 20 fresh-frozen single-donation sera, *Clin. Chem.* 58 (2012) 1597–1599.
- [63] M. Vinken, V. Rogiers, Protocols in in vitro hepatocyte research, *Pref. Methods Mol. Biol.* 1250 (2015) V–viii.
- [64] L. Wu, J. Sun, L. Wang, C. Wang, K. Woodman, N. Koutalistras, M. Horvat, A.G. Sheil, Cryopreservation of primary porcine hepatocytes for use in bioartificial liver support systems, *Transpl. Proc.* 32 (2000) 2271–2272.
- [65] B. Yang, B.L. Liu, X.L. Zhou, L. Shen, D.H. Huang, Enhanced metabolic function of human hepatocytes cryopreserved with low concentration me2so and polyol additives at -80C, *Cryo Lett.* 34 (2013) 381–387.
- [66] P. Yellowlees, C. Greenfield, N. McIntyre, dimethylsulphoxide-induced toxicity, *Lancet* 2 (1980) 1004–1006.
- [67] A. Zambelli, G. Poggi, G. Da prada, P. Pedrazzoli, A. Cuomo, D. Miotti, C. Perotti, P. Preti, G. Robustelli della cuna, Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion, *Anticancer Res.* 18 (1998) 4705–4708.
- [68] X.B. Zhang, K. Li, K.H. Yau, K.S. Tsang, T.F. Fok, C.K. Li, S.M. Lee, P.M. Yuen, Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of cfus, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-scid repopulating cells, *Transfusion* 43 (2003) 265–272.

3.4. Artigo 4

- ✓ **Título:** Machine learning predictions to improve translational research in hepatocytes cryopreservation;
- ✓ **Referência Bibliográfica:** Cardoso, LMF¹; Maricato, V²; Alberto AVP¹; Barreto, TS¹; and Alves, LA^{1*}
- ✓ **Situação:** Artigo finalizado. Em revisão por parte dos autores.
- ✓ **Descrição e justificativa:** O presente artigo foi realizado com o objetivo de utilizar algoritmos de *machine learning* para criar um método de previsão para melhores condições de criopreservação de hepatócitos. A vasta literatura voltada para os protocolos de criopreservação de hepatócitos, já descritos, continuam insatisfatórios com relação à viabilidade após o descongelamento. No artigo anterior, destacamos o potencial crioprotetor da trealose na criopreservação de hepatócitos de rato. Outros trabalhos na literatura também relatam a participação com sucesso desse crioprotetor com outras concentrações no congelamento de células do fígado. Observamos que vários resultados são obtidos por diferentes grupos utilizando protocolos distintos. Entretanto, seria inviável testar as possíveis combinações dos protocolos descritos e com isso determinar ou até mesmo desenvolver uma nova solução crioprotetora baseada nos dados já publicados que garantam resultados promissores e reproduzíveis.

Embora tenhamos utilizado uma base de dados pequena, conseguimos demonstrar que através de algoritmos de aprendizagem de máquinas, é possível prever condições ideais de criopreservação de hepatócitos tendo como base de aprendizado dados obtidos por diversos grupos. Com isso, conseguimos criar uma página na internet com o nosso modelo de previsão e iremos disponibilizá-lo como uma ferramenta gratuita para os usuários.

TITLE: MACHINE LEARNING PREDICTIONS TO IMPROVE TRANSLATIONAL RESEARCH IN HEPATOCYTES CRYOPRESERVATION

Cardoso, LMF¹; Maricato, V²; Alberto AVP¹; Barreto, TS¹; and Alves, LA^{1*}

Author names and affiliations:

Cardoso, LMF¹ – Liana Monteiro da Fonseca Cardoso lianamfc@gmail.com

Maricato, V² – Victor Maricato maricatovictor@gmail.com

Alberto AVP¹ – Anael Viana Pinto Alberto aanael@gmail.com

Barreto, TS¹ – Tatiane da Silva Barreto tatiane.barreto321@gmail.com

Alves, LA¹ – Luiz Anastácio Alves alveslaa@gmail.com

¹Laboratório de Comunicação Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

²Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence information:

Luiz Anastacio Alves, MD, PhD

Cellular Communication Laboratory

Oswaldo Cruz Institute - Oswaldo Cruz Foundation

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Zip Code: 21045-900 - Rio de Janeiro, Brazil

Email: alveslaa@gmail.com

alveslaa@ioc.fiocruz.br

FAX: (55) (21) 25621816

Tel: +55 21 2562 1841

ABSTRACT

Currently, Machine Learning (ML) algorithms have been successfully applied in various health areas such as: Intelligent computer hospital management systems, intelligent medical diagnostic expert systems, intelligent surgical robots and others. In this context, numerous medical and basic research groups have been using the large-scale knowledge of medical data acquired in cancer screening, diagnosis and treatment. Our group has worked in the area of translational Biophysics, seeking to improve the conditions of rat and mouse hepatocytes cryopreservation using ML algorithms. Recent advances in tissue engineering, cell transplantation and genetic technologies make the living cell an important therapeutic tool in clinical medical care. If successful, long-term storage of living cells can be a crucial factor in the success of these emerging approaches. Thus, the preservation and cryopreservation of cells and tissues is a fundamental technique for large scale clinical development and application. In view of the large shortage of organs for orthotopic liver transplantation, the cellular transplantation with adult hepatocytes has been highlighted as a promising alternative for the treatment of patients who remain on the waiting lists. However, its clinical application depends mainly on the availability in quantity and quality of the hepatocytes after cryopreservation. For this, it is fundamental to create liver cell banks that can offer patients emergency or programmed, treatments. Although there are several protocols described in the literature, the quality of the cells after their thawing is still quite questionable. These studies generated a wide range of published works with different results that could be analysed by ML and thus identify freezing patterns for hepatocytes or mammalian cells capable of generating the least loss in cell quality after cryopreservation. We present ML models for the prediction of hepatocyte cryopreservation with different cryoprotective agent.

1. INTRODUCTION

Cryopreservation is a process that preserves organelles, cells, tissues or any other living biological material by cooling the samples to very low temperatures for a long period of time. This process consists in the preservation capacity of the cellular metabolism, since the low temperature storage occurs the induction of the stop of the enzymatic activity, the metabolism and the cellular respiration (1). However, cryopreservation has prejudicial effects on the viability and metabolic function of cells after thawing, which often makes their use unfeasible for clinical use (2-5). An important contribution of cryopreservation is to enable the conservation of biological materials, allowing the creation of frozen cell and tissue banks, which can be widely applied in scientific studies, as well as clinical applications (1, 5).

Currently, in regenerative medicine, the use of human cryopreserved stem cells in cell therapies is a promising therapeutic approach. In particular, hematopoietic, mesenchymal, embryonic, and umbilical cord stem cells have been used in the treatment of various diseases such as cardiovascular diseases, diabetes, immuno-modulatory diseases and cancer (6-8). Cell transplantation with human primary hepatocytes has been investigated as a promising therapeutic alternative in the treatment of acute liver disease (9, 10). This is because liver transplantation is the only therapy successfully performed capable of reversing organ function in cases of loss of liver function (11). Thereby, many patients who need to perform liver transplantation remain in the waiting row, contributing to high mortality. Therefore, it is of great importance studies that can develop therapies to support liver transplantation acting as a bridge to the surgical procedure and to assist in the health of the patient in acute stages of the

disease. However, success for the clinical performance of cell transplantation depends primarily on efficient cryopreservation techniques for isolated hepatocytes that can ensure cell viability and metabolic function after thawing (5, 12, 13).

Current cell cryopreservation methods involve freezing (slow/rapid) or vitrifying cells in the presence of a cryoprotective agent (CPA) (2, 4). The CPAs promote the reduction of the freezing point of the medium, giving a longer period for removal of the intracellular water during the cooling prior to freezing the water, aiding in the osmotic balance between the intra and extracellular environment (14). These substances also have the ability to interact with cell membranes, aiding against the stress caused during physical changes. Although these methods are clinically utilized, cryoinjury due to ice crystals, osmotic shock, and CPA toxicity cause loss of cell viability and function (1, 4, 15). Two main groups of CPAs are used: (1) intracellular CPAs that penetrate the cell membrane such as dimethylsulfoxide (DMSO or Me₂SO), glycerol, and 1,2-propanediol; and (2) extracellular CPAs that do not penetrate the cell membrane such as large molecular weight polymers and sugars such as polyethylene glycol, sucrose, glucose and particularly trehalose.

Although many cell types isolated from mammals and small cell clusters can be frozen, following published protocols and obtaining reproducible results, this procedure is still the subject of extensive investigation that is based on our current understanding of the chemistry, physics and toxicology of cryobiology (3, 16-19). Our group develops a line of research with cell therapy for liver diseases recently published a work with cryopreservation of hepatocytes (20) and we are investing in the study of the freezing of these cells aiming the evolution of

cryopreservation parameters for creation of liver cell bank. However, it is already known that hepatocytes are highly sensitive to the freezing process, presenting a significant reduction in post-thaw cell viability. In addition, detrimental effects of cryopreservation on the structure and metabolic function of hepatocytes, including cell adhesion, are of paramount importance for graft repopulation after hepatocyte transplantation (14). However, several groups around the world have been working to develop mechanisms that can significantly improve technologies for obtaining and stocking isolated hepatocytes. Although progress has been reported, data are still controversial and unsatisfactory making it clear the great need to improve these processes and develop a universally acceptable cryopreservation protocol for hepatocytes (5, 21-23).

Despite the large number of papers dedicated to this topic, the task of maintaining high levels of functional and metabolic status as well as viability in cryopreserved hepatocytes and other types of mammalian cells is still an indefinite question. This reinforces the need to maintain and expand the studies in the area of cellular cryobiology. In this way, the further development and optimization of cryopreservation protocols are fundamental for the clinical application and creation of cell banks that can be used safely in the treatment of various diseases and to save lives.

Artificial intelligence (AI) has started to revolutionize several medical fields from the design of evidence-based treatment plan to the implementation of the recent scientific innovation and health care management (24). The explosive growth in the amount of data generated in relation to the health of the patient ranging from medical images collected to the various treatment options available in the public domain generated enormous efforts to design, analysis and

application of new learning methodologies (25). In this context, the availability of electronic health data together with the use of AI implemented through Machine Learning (ML) algorithms in particular suggest the potential meaningful use of these data to improve patient healthcare quality and reduce cost. Therefore, ML techniques are a great aid to (25, 26) . In fact the multidisciplinary AI field is considered to be rather interdisciplinary covering numerous number of sciences and professions, including computer science, psychology, linguistics, philosophy and neurosciences.

In the early stage drug design studies various ML algorithm approaches have been applied to guide traditional experiments, which are expensive and time consuming. In this way, it is possible to allow the machine-learning tools can identify potential biological active molecules from millions of candidate compounds quickly and at low cost (27). There are various drugs on the market and/or in clinical trials that have been designed by machine-learning or other computational methods (28-31). In medicine, Microsoft's Hanover Project at Oregon has analysed medical research to tailor personalized cancer treatment option. United Kingdom's National Health Service (NHS) used Google's DeepMind platform for detecting health risks by analysing mobile app data and medical images collected from NHS patients (32). Included in the virtual applications of ML algorithms are electronic medical records where they are used to identify subjects with a family history of a hereditary disease or an augmented risk of a chronic disease. ML is used to improve organizational performance by enabling individuals to capture, share and apply their collective knowledge to make "optimal decisions in real time". Major efforts are required from academia and the information technology industry to achieve desired efficacy and minimize

cost (25). Considering the above, our aim is to use machine learning algorithms to predict the best composition of the cryoprotectants to obtain the highest viability of hepatocytes. So, we analyzed the results of two independent developer applying artificial neural network (ANN) and comparing the output results (predict) to the observed in real experiments.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Data collection and preparation

The data used were obtained from scientific papers published in indexed journals that studied the effect of different cryopreservation solutions on hepatocytes of rats with natural cryoprotectants (saccharides or disaccharides) reported in table 1.

The data were computed in Create-Read-Update-Delete (CRUD) format, in which the cryoprotector concentration values in %v/v. Then, these data were transformed to a percentile, with the objective of maintaining values between 0 and 1 for insertion in the prediction algorithms. The data that were not described in numerical format (such as the media type and the evaluation time) were encoded in a format according to Label Encoder of the sci-kit learn. All data were used, however, at a ratio of 20% for test data, where the remainder was used to train the model.

2.2. Machine Learning Algorithms

To train the Neural Network, the framework *TensorFlow* will be used (<https://www.tensorflow.org/>). TensorFlow has been successfully used for conveying machine learning algorithms and in implementation for applying such

algorithms for its efficiency in large-scale machine learning on heterogeneous distributed systems (33).

2.3. Neural network architecture

The development of the neural network used to predict the reduction in cell viability after freezing was created using the sequential model available in Tensorflow 1.12.0. This architecture consists of an input layer where the number of input neurons is equal to the number of variables, added to another neuron for bias. Subsequently, the neural network flow consists of two hidden layers of 20 neurons, separated by a layer of Dropout = 70%, used to reduce the over fitting of the model. Finally, the output layer consists of a single activation neuron in which, the value corresponds to the percentage of fall of the cellular viability predicted by the model.

2.4. Error evaluation

Training a Neural network is an iterative process thus, the output error was minimized by adjusting the weights of this function properly. The commonly employed error function the root-mean-squared-error (RMSE) used in this work is defined as:

$$RMSE = \sqrt{\sum \frac{(y_{pred} - y_{ref})^2}{N}}$$

Y_{pred} - predicted value calculated for sample;
 Y_{ref} - real value observed during observation;
N - number of observations

2.5. Model Parameters

Artificial neural networks are approximation algorithms inspired from the architecture of biological neurons. Signals are propagated and mathematically fused through a series of non-linear basis calculations and linear sums. There are several variants of Neural Network models: Single Layer Perceptron (SLP), Multilayer Perceptron (MLP), Recurrent Neural Network (RNN), and Convolutional neural network (CNN). For this work we use the model MLP. We used a classical neural networks architecture containing three layers: an input layer, a hidden layer, and an output layer. The input layer represents the independent variables of the model. The output layer represents the dependent variables (values to be predicted) in the model. The hidden layers represent an approximation of the mapping between the input and output layers and enable the network to learn the complex relationships between independent variables and output variables. So in this work we create the input layer contains 6 neurons, hidden layers contains 20 neurons and output layer contains one neuron.

For the neural network, the hyperparameter tuning was performed by defining one-to-one parameter ranges of parameters and in the end were returned the ones that obtained the best result after defining the best random state to be used. In the end, the values used after the tuning, for the neural network, were:

- Learning rate: 0.005;
- Optimizer: Nadam;
- Epochs: 200;
- Steps per epoch: Equals the number of training data per epoch inserted into the neural network.

3. RESULTS

In this paper we propose the use of ANN to determine the best conditions of cryopreservation solution for the rat hepatocytes.

The database used was not large enough to ensure that the neural network could generate prevision with high accuracy. However, there is a vast literature, still inconclusive, on better freezing conditions and preservation for various cell types, including hepatocytes.

Initially, two developers analyzed by linear regression the correlation of freezing agents and viability (Figure 1). The freezing agents tested were DMSO, Trehalose, Glycerol and Sucrose. Our data showed that only DMSO and Trehalose had a positive correlation in relation to the viability after thawing (Figure 1A and 1B), while the others cryoprotectant did not had a similar behavior (Figure 1C and 1D). The correlation is summarized in graph 1E. So, in the next steps we considered only DMSO and Trehalose. In order to improve the conditions from cryopreservation.

Then we applied the data collected in papers to an ANN and evaluate the predicted viability. To do so, both developers constructed an ANN with an input layer with the same number of variables, hidden layers and an output neuron. Moreover, the training was made with 80% of the data and the test with the 20% left, although it is important to mention that both data of training and testing were randomly chosen (Figure 2). The graph 2A shows the prediction of the viability of the 20% of the data with linear regression and the graph 2B shows the prediction of the viability accessing by ANN KERAs. The value of the R^2 and MRSE of the ANN for the developers is shown in table 2.

Finally, we added variables such as DMSO, trehalose and FBS concentration described in Katenz et al (2007) with an observed viability of 45% to the model generated by the ANN, the observed output was 49% of viability. Thus, showing that the model designed can predict with certain accuracy the viability of the cells (Figure 3). The number of epochs, i. e., the number of rounds made to reach a steady stage very close to the real viability (Figure 4).

As a product of our knowledge in artificial intelligence using ANN we constructed a webpage where anyone can add values (in %) of DMSO, trehalose and access the viability at cryohepatopred.pythonanywhere.com.

4. DISCUSSION

The major obstacle to cryopreservation of various mammalian cell types is the ability to associate quality and ensure cell viability after thawing. This question is linked to the challenge of aligning a wide range of protocols described in the literature with the different variables found by several study groups. In this work, we use machine learning's ability to demonstrate that it is possible to predict the best concentrations and components of a cryopreservation solution from an existing data network. Thus, creating algorithms to collect data and make a determination or prediction on these optimal freezing conditions has become our challenge. Although the database we used was not large enough to ensure that the neural network could generate prediction with high accuracy, we demonstrated that it is possible to use artificial neural networks to design better freezing conditions for different types of cells, especially mammals. As mentioned earlier, there is a vast literature, still inconclusive, about better freezing conditions and preservation for various cell types, including hepatocytes. Thus, this

methodology may represent promising advances related to cell freezing success. After this pilot work, our main focus is to improve the database, adding more work and different parameters that can influence the freezing process and increase the accuracy of our results. With this, we aim to create a free access internet interface capable of predicting the final viability of a particular cell type based on the components present in the freezing solution and vice versa.

The visualization of the data used for the training of the models evidences, in particular, three categories of components in the cryopreservation solutions: DMSO, Bovine Fetal Serum and Culture Medium, more frequent and present in practically all evaluated and less frequent solutions, the sugars: trehalose, glycerol and sucrose (Table 1). To determine which components were able to directly influence cell viability after thawing, we performed a linear correlation regression of these components with viability. After the analysis we verified that only two components had a positive correlation with viability. Therefore, capable of directly influencing the final viability. These are: DMSO and Trehalose as illustrated in Figures 1A and 1B. These results may explain the great variability in SFB concentration and culture medium present in the different studies. Since these compounds do not appear to affect viability after freezing. Therefore, DMSO and Trehalose are determinant compounds for the successful freezing of hepatocytes.

Dimethylsulphoxide (DMSO) is a commonly used cryoprotectant which protects the cells from the changes in osmotic pressure by slowing the formation of ice crystals in the extracellular compartment and by preventing the formation of intracellular ice crystals which can disrupt the membrane (34, 35). However, there is evidence to suggest that DMSO may be toxic to cells if added in high

concentrations or for prolonged periods, with reports suggesting that lower concentrations result in higher viable cell recoveries post-thaw (36). Currently, DMSO is used in concentrations ranging from 5% to 20% (v/v); the concentration of 10% (v/v) being the most commonly used for cryopreservation of several cell types (20, 36-38). Thus, used in high concentrations thus one of the major responsible for the decrease of viability.

Trehalose is a non-toxic disaccharide formed by a 1,1 linkage of two d-glucose molecules. The molecular formula and weight are $C_{12}H_{22}O_{11}$ and 342.31, respectively (39). Is a natural sugar secreted by several organisms that show tolerance to low temperatures (40-42) and has been used as an excellent complementary agent in the freezing of several cell types, including hepatocytes (20, 43-45). Thus, according to their properties and work already described, we can suggest that these substances are able to interfere significantly in the quality and cellular viability after thawing.

Another parameter of great importance for cell freezing and capable of influencing the final viability is the cooling rate. Currently, an ideal slow cooling rate for human hepatocytes of $-1\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ is suggested, using low cost equipment based on isopropanol and then storage in liquid nitrogen for an indeterminate time (46, 47) . In addition, a range of more specific freeze protocols using controlled rate freezers have also been used (3, 48-50). This creates a further possibility of evaluation on the consequences caused to the cells after thawing. We could add this factor as a variable in our predictions, but not all the work we use for our database describes the freezing rate used in the protocols.

With this work we could demonstrate that it is possible to use the benefits of artificial intelligence as a tool to optimize cryopreservation protocols and achieve

optimal viability after thawing. Although we have to improve and increase our database in this initial work we highlight two important components in the freezing of rat hepatocytes. After expanding our database we will experimentally test some predicted results as a way to validate our prediction system. It should be added that the creation of prediction algorithms could be expanded to other cell types and different evaluation parameters.

4.0. CONCLUSION

Cryopreservation is a crucial step in the development of therapies using cells and tissues for the treatment of various diseases. Thus, it is possible to create cell banks that can provide large-scale material for the realization of such emerging approaches. Therapeutic alternatives such as hepatocyte transplantation for the treatment of liver diseases depend on the development of an efficient cryopreservation protocol capable of guaranteeing viability and cellular function after thawing. However, there are several protocols for preservation and cryopreservation of cells and tissues and a vast literature suggesting different mechanisms and composition of freezing medium for several cell types. However, in some cases there is still no consensus on the best type of freezing medium.

In this work we suggest the use of artificial intelligence using machine learning as a tool capable of gathering different protocols and predicting the best cryopreservation conditions of rat hepatocytes.

REFERENCES

1. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 2004;48(2):146-56. Epub 2004/04/20.
2. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*. 2007;47(5):935-45. Epub 2007/05/01.
3. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009;5(3):90-6. Epub 2010/01/05.
4. Hunt CJ. Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. *Methods Mol Biol*. 2017;1590:41-77. Epub 2017/03/30.
5. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz M, Adani GL, Lorenzin D, et al. Cryopreserved human hepatocytes from cell bank: in vitro function and clinical application. *Transplantation proceedings*. 2005;37(1):256-9. Epub 2005/04/06.
6. Asghar W, El Assal R, Shafiee H, Anchan RM, Demirci U. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnology journal*. 2014;9(7):895-903. Epub 2014/07/06.
7. Heng BC, Kuleshova LL, Bested SM, Liu H, Cao T. The cryopreservation of human embryonic stem cells. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2005;41(Pt 2):97-104. Epub 2004/12/14.
8. Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2010;3(4):248-69. Epub 2010/11/13.
9. Yu Y, Fisher JE, Lillegard JB, Rodysill B, Amiot B, Nyberg SL. Cell therapies for liver diseases. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2012;18(1):9-21. Epub 2011/12/06.
10. Iansante V, Chandrashekran A, Dhawan A. Cell-based liver therapies: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018;373(1750). Epub 2018/05/23.
11. Lopez PM, Martin P. Update on liver transplantation: indications, organ allocation, and long-term care. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. 2006;73(8):1056-66. Epub 2007/02/08.
12. Stephenne X, Najimi M, Sokal EM. Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? *World journal of gastroenterology*. 2010;16(1):1-14. Epub 2009/12/30.
13. Li AP. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chemico-biological interactions*. 2007;168(1):16-29. Epub 2007/02/03.
14. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006;65(1):236-44. Epub 2005/11/18.
15. Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation research*. 2015;18(5):422-36. Epub 2015/04/01.
16. Pegg DE. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*. 2010;60(3 Suppl):S36-44. Epub 2010/02/18.
17. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996;17(3):243-56. Epub 1996/02/01.
18. Fahy GM, Wowk B, Wu J. Cryopreservation of complex systems: the missing link in the regenerative medicine supply chain. *Rejuvenation research*. 2006;9(2):279-91. Epub 2006/05/19.
19. Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology*. 2004;48(2):157-78. Epub 2004/04/20.
20. Cardoso L, Pinto MA, Henriques Pons A, Alves LA. Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy. *Cryobiology*. 2017;78:15-21. Epub 2017/08/08.

21. Baccarani U, Donini A, Sanna A, Risaliti A, Cariani A, Nardo B, et al. First report of cryopreserved human hepatocytes based bioartificial liver successfully used as a bridge to liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004;4(2):286-9. Epub 2004/02/21.
22. Alexandrova K, Griesel C, Barthold M, Heuft HG, Ott M, Winkler M, et al. Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application. *Cell transplantation*. 2005;14(10):845-53. Epub 2006/02/04.
23. Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, Guariso G, Franchin E, Miotto D, et al. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell transplantation*. 2005;14(2-3):151-7. Epub 2005/05/11.
24. Acampora G, Cook DJ, Rashidi P, Vasilakos AV. A Survey on Ambient Intelligence in Health Care. *Proc IEEE Inst Electr Electron Eng*. 2013;101(12):2470-94. Epub 2014/01/17.
25. Hamet P, Tremblay J. Artificial intelligence in medicine. *Metabolism*. 2017;69S:S36-S40. Epub 2017/01/28.
26. Abbod MF, Catto JW, Linkens DA, Hamdy FC. Application of artificial intelligence to the management of urological cancer. *J Urol*. 2007;178(4 Pt 1):1150-6. Epub 2007/08/19.
27. Lavecchia A. Machine-learning approaches in drug discovery: methods and applications. *Drug Discov Today*. 2015;20(3):318-31. Epub 2014/12/03.
28. Zhang N, Zhang X, Zhu J, Turpoff A, Chen G, Morrill C, et al. Structure-activity relationship (SAR) optimization of 6-(indol-2-yl)pyridine-3-sulfonamides: identification of potent, selective, and orally bioavailable small molecules targeting hepatitis C (HCV) NS4B. *J Med Chem*. 2014;57(5):2121-35. Epub 2013/11/26.
29. Walton MI, Eve PD, Hayes A, Valenti MR, De Haven Brandon AK, Box G, et al. CCT244747 is a novel potent and selective CHK1 inhibitor with oral efficacy alone and in combination with genotoxic anticancer drugs. *Clin Cancer Res*. 2012;18(20):5650-61. Epub 2012/08/30.
30. Ratni H, Karp GM, Weetall M, Naryshkin NA, Paushkin SV, Chen KS, et al. Specific Correction of Alternative Survival Motor Neuron 2 Splicing by Small Molecules: Discovery of a Potential Novel Medicine To Treat Spinal Muscular Atrophy. *J Med Chem*. 2016;59(13):6086-100. Epub 2016/06/15.
31. Sarker D, Ang JE, Baird R, Kristeleit R, Shah K, Moreno V, et al. First-in-human phase I study of pictilisib (GDC-0941), a potent pan-class I phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2015;21(1):77-86. Epub 2014/11/06.
32. Powles J, Hodson H. Google DeepMind and healthcare in an age of algorithms. *Health Technol (Berl)*. 2017;7(4):351-67. Epub 2018/01/09.
33. Rampasek L, Goldenberg A. TensorFlow: Biology's Gateway to Deep Learning? *Cell Syst*. 2016;2(1):12-4.
34. Lovelock JE. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *The Biochemical journal*. 1954;56(2):265-70. Epub 1954/02/01.
35. Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*. 1959;183(4672):1394-5. Epub 1959/05/16.
36. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud O. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion*. 2002;42(12):1573-80. Epub 2002/12/11.
37. Fry LJ, Querol S, Gomez SG, McArdele S, Rees R, Madrigal JA. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox Sang*. 2015;109(2):181-90. Epub 2015/04/23.
38. Hayakawa J, Joyal EG, Gildner JF, Washington KN, Phang OA, Uchida N, et al. 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and pentastarch improves cryopreservation of cord blood cells over 10% DMSO. *Transfusion*. 2010;50(10):2158-66. Epub 2010/05/25.
39. Birch GG. Trehaloses. *Adv Carbohydr Chem*. 1963;18:201-25. Epub 1963/01/01.

40. Crowe JH. Anhydrobiosis: An Unsolved Problem with Applications in Human Welfare. *Subcell Biochem.* 2015;71:263-80. Epub 2015/10/07.
41. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. Anhydrobiosis. *Annual review of physiology.* 1992;54:579-99. Epub 1992/01/01.
42. Woelders H, Matthijs A, Engel B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology.* 1997;35(2):93-105. Epub 1997/09/23.
43. Eroglu A, Bailey SE, Toner M, Toth TL. Successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. *Biol Reprod.* 2009;80(1):70-8. Epub 2008/09/26.
44. Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, Fowler A, Cheley S, Bayley H, et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature biotechnology.* 2000;18(2):163-7. Epub 2000/02/05.
45. Liu J, Tanrikut C, Wright DL, Lee GY, Toner M, Biggers JD, et al. Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant. *Cryobiology.* 2016;73(2):162-7. Epub 2016/08/09.
46. Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A. Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Seminars in cell & developmental biology.* 2002;13(6):463-7. Epub 2002/12/07.
47. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology.* 2006;53(2):149-59. Epub 2006/06/24.
48. de Sousa G, Langouet S, Nicolas F, Lorenzon G, Placidi M, Rahmani R, et al. Increase of cytochrome P-450 1A and glutathione transferase transcripts in cultured hepatocytes from dogs, monkeys, and humans after cryopreservation. *Cell biology and toxicology.* 1996;12(4-6):351-8. Epub 1996/12/01.
49. Dou M, de Sousa G, Lacarelle B, Placidi M, Lechene de la Porte P, Domingo M, et al. Thawed human hepatocytes in primary culture. *Cryobiology.* 1992;29(4):454-69. Epub 1992/08/01.
50. Fuller BJ, Paynter SJ. Cryopreservation of mammalian embryos. *Methods Mol Biol.* 2007;368:325-39. Epub 2007/12/18.
51. Son JH, Ha YM, Kim YI, Kim KM, Park JK, Kim SK. Immobilization of cryopreserved primary rat hepatocytes for the development of a bioartificial liver system. *Biotechnol Lett.* 2006;28(1):51-4. Epub 2005/12/22.
52. Son JH, Kim KH, Nam YK, Park JK, Kim SK. Optimization of cryoprotectants for cryopreservation of rat hepatocyte. *Biotechnol Lett.* 2004;26(10):829-33. Epub 2004/07/23.
53. Lee JH, Park JH, Park HJ, General T, Cho MG, Lee SK. Cryopreservation of immobilized rat hepatocytes for the development of a bioartificial liver system. *Transplantation proceedings.* 2012;44(4):1005-8. Epub 2012/05/09.
54. Jiang L, Shen C, Dai J, Meng Q. Di-rhamnolipids improve effect of trehalose on both hypothermic preservation and cryopreservation of rat hepatocytes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(10):4553-61. Epub 2013/01/19.
55. Loretz LJ, Li AP, Flye MW, Wilson AG. Optimization of cryopreservation procedures for rat and human hepatocytes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems.* 1989;19(5):489-98. Epub 1989/05/01.
56. Miyamoto Y, Suzuki S, Nomura K, Enosawa S. Improvement of hepatocyte viability after cryopreservation by supplementation of long-chain oligosaccharide in the freezing medium in rats and humans. *Cell transplantation.* 2006;15(10):911-9. Epub 2007/02/16.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Correlation of cryoprotectant and viability. In figure 1A and 1B a linear regression of the DMSO and Trehalose against viability showing positive correlation. Figure 1C and D shows a negative correlation of the Glycerol and Sucrose. Figure 1E shows a graph of correlation summarizing the data.

Figure 2. Test against training with the collected data. Figure 2A shows the prediction of viability of the test (20% of the data collected) by linear regression and Figure 2B shown the prediction of the viability with ANN using KERAS.

Figure 3. Prediction of viability. Histogram of the comparing the observed viability as described by Katenz et al compared to the predicted viability by the ANN.

Figure 4. Epochs generated until steady stage. The graph shows the number of epochs generated by the ANN to reach the steady stage.

TABLE LEGENDS

Table 1. Database used for model training. References and data of the scientific articles used.

Table 2. Comparison between the root-mean-squared error (RMSE) of the predictive models tested (neural network, in blue, SVMR, in red). Errors evaluated in the test data (Neural Network Error: 0.0897).

Figure 1.

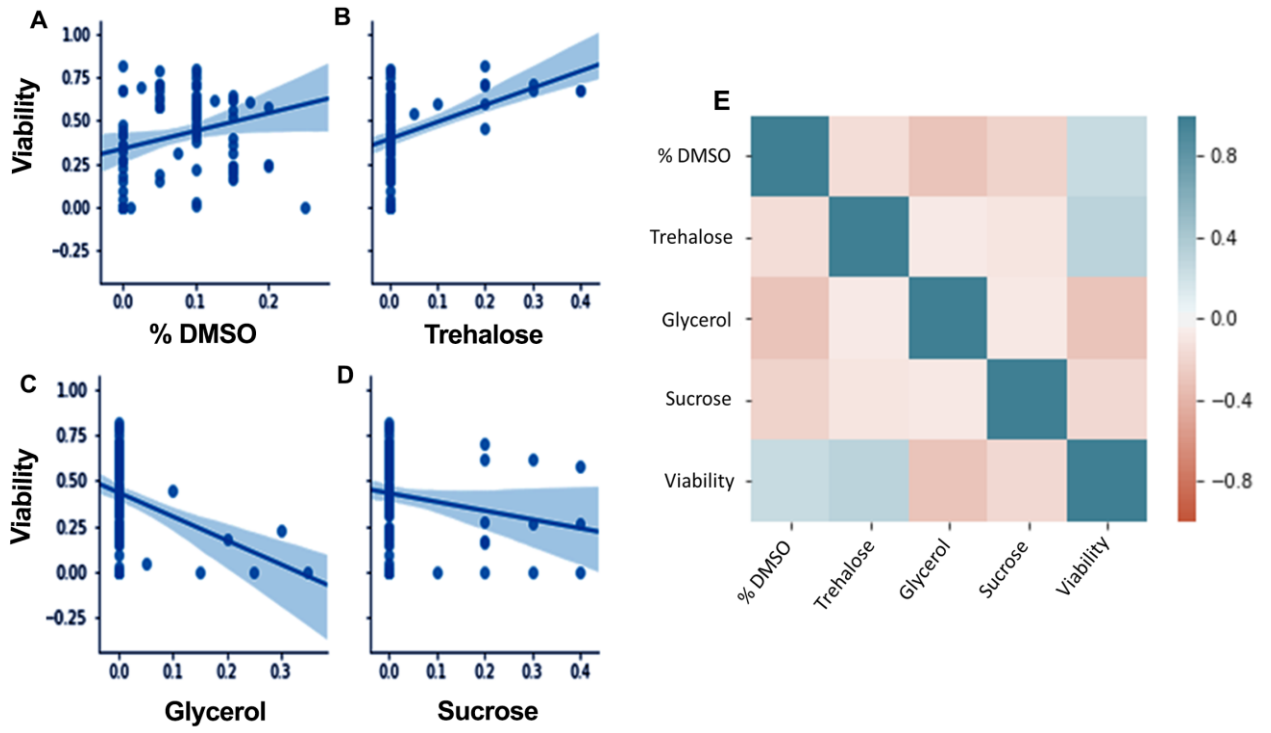


Figure 2.

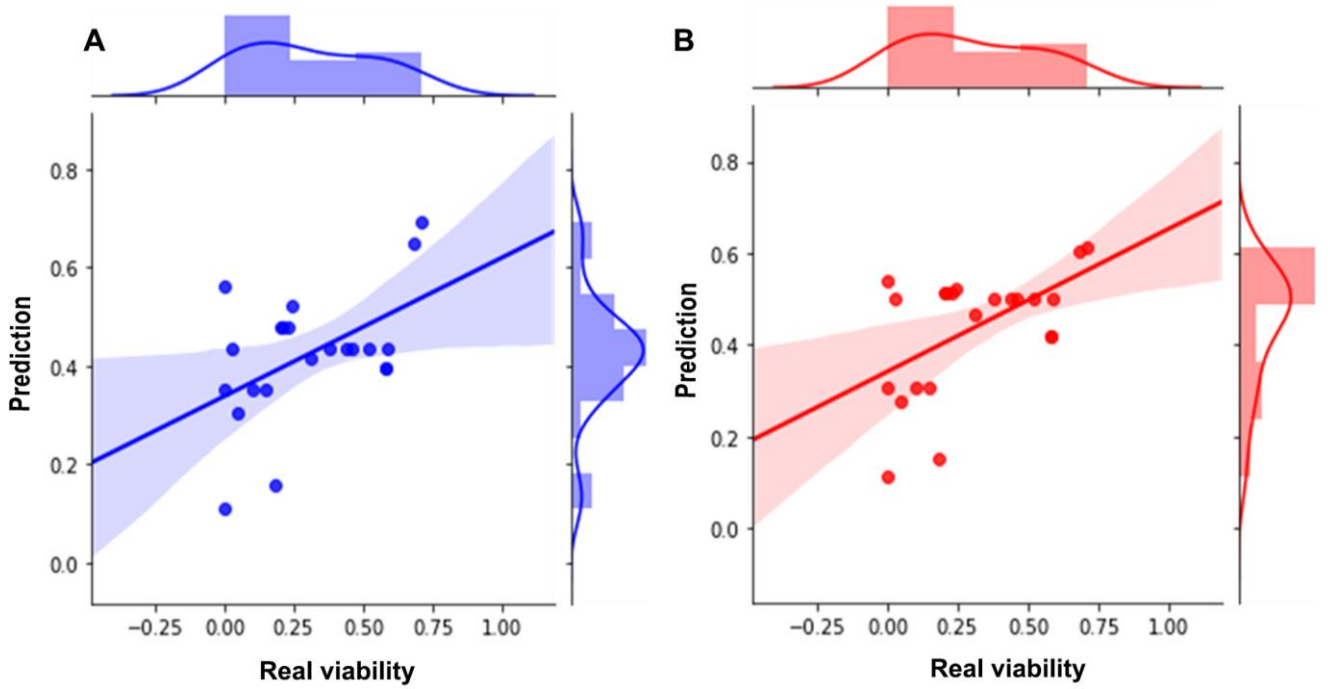


Figure 3.

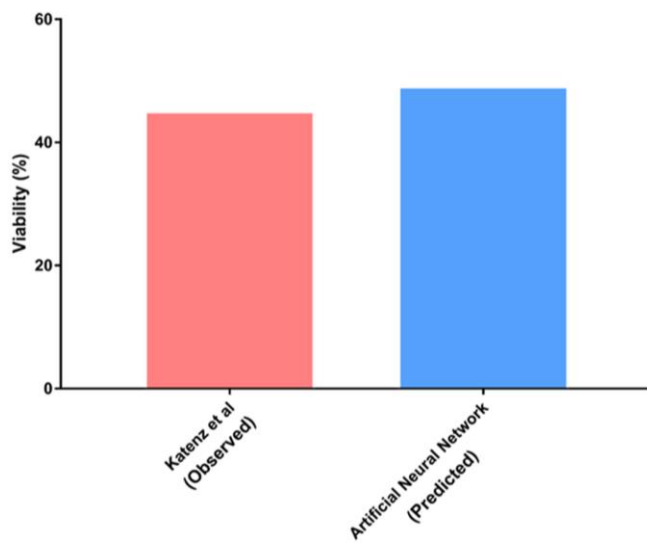


Figure 4.

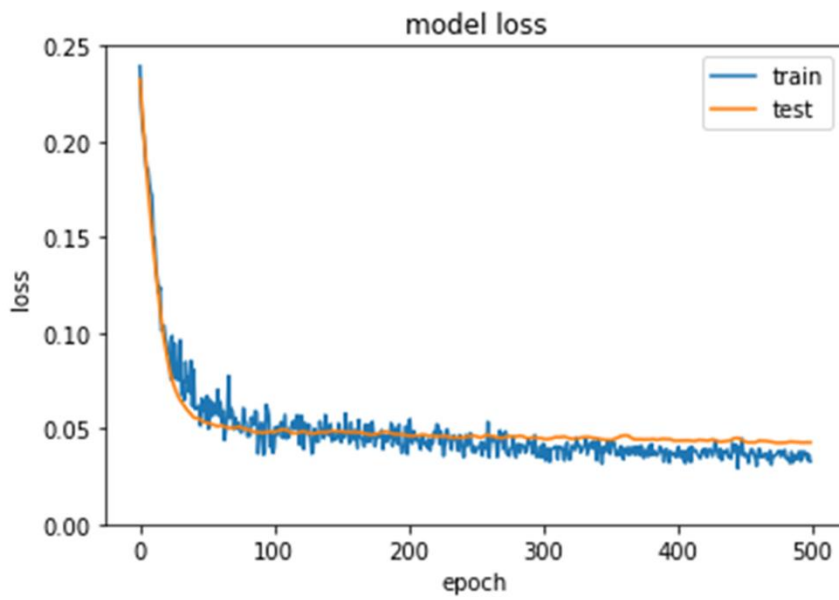


Table 1.

Nº	% DMSO (v/v)	% FBS (v/v)	% (v/v) Culture medium	% Before freezing	% After freezing	% Viability fall	Trehalose	Glycerol	Sucrose	Ref
1	10%	40%	50%	90%	80%	10%	0%	0%	0%	(51)
2	0%	0%	90%	85%	0%	85%	0%	0%	10% p / v	(52)
3	0%	0%	80%	85%	0%	85%	0%	0%	20% p / v	(52)
4	0%	0%	70%	85%	0%	85%	0%	0%	30% p / v	(52)
5	0%	0%	60%	85%	0%	85%	0%	0%	40% p / v	(52)
6	0%	10%	90%	85%	10%	75%	0%	0%	0%	(52)
7	0%	20%	80%	85%	15%	70%	0%	0%	0%	(52)
8	0%	30%	70%	85%	34%	51%	0%	0%	0%	(52)
9	0%	40%	60%	85%	36%	49%	0%	0%	0%	(52)
10	0%	50%	50%	85%	0%	85%	0%	0%	0%	(52)
11	0%	60%	40%	85%	32%	53%	0%	0%	0%	(52)
12	0%	70%	30%	85%	0%	85%	0%	0%	0%	(52)
13	0%	80%	20%	85%	0%	85%	0%	0%	0%	(52)
14	0%	90%	10%	85%	36%	49%	0%	0%	0%	(52)
15	0%	30%	65%	85%	5%	80%	0%	5% v/v	0%	(52)
16	0%	30%	60%	85%	45%	40%	0%	10% v/v	0%	(52)
17	0%	30%	55%	85%	0%	85%	0%	15% v/v	0%	(52)
18	0%	30%	50%	85%	18%	67%	0%	20% v/v	0%	(52)
19	0%	30%	45%	85%	0%	85%	0%	25% v/v	0%	(52)
20	0%	30%	40%	85%	23%	62%	0%	30% v/v	0%	(52)
21	0%	30%	35%	85%	0%	85%	0%	35% v/v	0%	(52)
22	5%	30%	65%	85%	19%	66%	0%	0%	0%	(52)
23	10%	30%	60%	85%	78%	7%	0%	0%	0%	(52)
24	15%	30%	55%	85%	24%	61%	0%	0%	0%	(52)
25	20%	30%	50%	85%	24%	61%	0%	0%	0%	(52)
26	25%	30%	45%	85%	0%	85%	0%	0%	0%	(52)
27	2,50%	10%	88%	88%	69%	19%	0%	0%	0%	(20)
28	5%	10%	85%	88%	79%	9%	0%	0%	0%	(20)

Nº	% DMSO (v/v)	% FBS (v/v)	% (v/v) Culture medium	% Before freezing	% After freezing	% Viability fall	Trehalose	Glycerol	Sucrose	Ref
29	10%	10%	80%	88%	75%	13%	0%	0%	0%	(20)
30	15%	10%	75%	88%	40%	48%	0%	0%	0%	(20)
31	20%	10%	70%	88%	25%	63%	0%	0%	0%	(20)
32	5%	10%	85%	88%	70%	18%	0%	0%	20% p / v	(20)
33	5%	10%	85%	88%	62%	26%	0%	0%	30% p / v	(20)
34	5%	10%	85%	88%	58%	30%	0%	0%	40% p / v	(20)
35	0%	10%	90%	88%	28%	60%	0%	0%	20% p / v	(20)
36	0%	10%	90%	88%	27%	61%	0%	0%	30% p / v	(20)
37	0%	10%	90%	88%	27%	61%	0%	0%	40% p / v	(20)
38	5%	10%	85%	88%	64%	24%	0%	0%	0%	(20)
39	5%	10%	85%	88%	58%	30%	0%	0%	0%	(20)
40	5%	10%	85%	88%	58%	30%	0%	0%	0%	(20)
41	0%	10%	90%	88%	48%	40%	0%	0%	0%	(20)
42	0%	10%	90%	88%	42%	46%	0%	0%	0%	(20)
43	0%	10%	90%	88%	42%	46%	0%	0%	0%	(20)
44	5%	10%	85%	88%	70%	18%	20% p / v	0%	0%	(20)
45	5%	10%	85%	88%	71%	17%	30% p / v	0%	0%	(20)
46	5%	10%	85%	88%	68%	20%	40% p / v	0%	0%	(20)
47	0%	10%	90%	88%	82%	6%	20% p / v	0%	0%	(20)
48	0%	10%	90%	88%	68%	20%	30% p / v	0%	0%	(20)
49	0%	10%	90%	88%	68%	20%	40% p / v	0%	0%	(20)
50	15%	0%	85%	85%	53%	32%	0%	0%	0%	(53)
51	15%	0%	85%	85%	24%	61%	0%	0%	0%	(53)
52	15%	0%	85%	85%	23%	62%	0%	0%	0%	(53)
53	15%	85%	0%	85%	55,90%	29,10%	0%	0%	0%	(53)
54	15%	85%	0%	85%	20%	65%	0%	0%	0%	(53)
55	15%	85%	0%	85%	21%	64%	0%	0%	0%	(53)
56	15%	0%	85%	85%	64,90%	20,10%	0%	0%	0%	(53)
57	15%	0%	85%	85%	31%	54%	0%	0%	0%	(53)
58	15%	0%	85%	85%	36%	49%	0%	0%	0%	(53)

Nº	% DMSO (v/v)	% FBS (v/v)	% (v/v) Culture medium	% Before freezing	% After freezing	% Viability fall	Trehalose	Glycerol	Sucrose	Ref
59	15%	0%	85%	85%	62%	23,10%	0%	0%	20% p / v	(53)
60	15%	0%	85%	85%	16%	69%	0%	0%	20% p / v	(53)
61	15%	0%	85%	85%	17%	68%	0%	0%	20% p / v	(53)
62	10%	20%	70%	86,10%	70,90%	15,20%	20% p / v	0%	0%	(54)
63	10%	20%	70%	79,90%	59,60%	20,30%	20% p / v	0%	0%	(54)
64	0%	20%	80%	70,90%	0%	70,90%	0%	0%	0%	(55)
65	1%	20%	79%	70,90%	0%	70,90%	0%	0%	0%	(55)
66	5%	20%	75%	70,90%	15,33%	55,60%	0%	0%	0%	(55)
67	7,50%	20%	72,50%	70,90%	31,40%	39,50%	0%	0%	0%	(55)
68	10%	20%	70%	70,90%	58%	12,90%	0%	0%	0%	(55)
69	12,50%	20%	67,50%	70,90%	62%	8,90%	0%	0%	0%	(55)
70	15%	20%	65%	70,90%	63%	7,90%	0%	0%	0%	(55)
71	17,50%	20%	62,50%	70,90%	61%	9,90%	0%	0%	0%	(55)
72	20%	20%	60%	70,90%	58%	12,90%	0%	0%	0%	(55)
73	10%	0%	90%	70,90%	62%	8,90%	0%	0%	0%	(55)
74	10%	10%	80%	70,90%	65%	5,90%	0%	0%	0%	(55)
75	10%	20%	70%	70,90%	70%	0,90%	0%	0%	0%	(55)
76	10%	50%	40%	70,90%	70%	0,90%	0%	0%	0%	(55)
77	10%	90%	0%	70,90%	70%	0,90%	0%	0%	0%	(55)
78	10%	10%	80%	81%	38%	43%	0%	0%	0%	(56)
79	10%	10%	80%	81%	44%	37%	0%	0%	0%	(56)
80	10%	10%	80%	81%	52%	29%	0%	0%	0%	(56)
81	10%	10%	80%	81%	57%	24%	0%	0%	0%	(56)
82	10%	10%	80%	81%	46%	35%	0%	0%	0%	(56)
83	10%	10%	80%	81%	58%	23%	0%	0%	0%	(56)
84	10%	10%	80%	81%	41%	40%	0%	0%	0%	(56)
85	10%	10%	80%	81%	54%	27%	5% v/v	0%	0%	(56)
86	10%	10%	80%	81%	60%	21%	10% v/v	0%	0%	(56)
87	10%	10%	80%	81%	46%	35%	20% v/v	0%	0%	(56)
88	10%	10%	80%	81%	54%	27%	0%	0%	0%	(56)

Nº	% DMSO (v/v)	% FBS (v/v)	% (v/v) Culture medium	% Before freezing	% After freezing	% Viability fall	Trehalose	Glycerol	Sucrose	Ref
89	10%	10%	80%	81%	57%	24%	0%	0%	0%	(56)
90	10%	10%	80%	81%	44%	37%	0%	0%	0%	(56)
91	10%	10%	80%	81%	49%	32%	0%	0%	0%	(56)
92	10%	10%	80%	81%	57%	24%	0%	0%	0%	(56)
93	10%	10%	80%	81%	44%	37%	0%	0%	0%	(56)
93	10%	10%	80%	81%	52%	29%	0%	0%	0%	(56)
95	10%	10%	80%	81%	58%	23%	0%	0%	0%	(56)
96	10%	10%	80%	81%	46%	35%	0%	0%	0%	(56)
97	10%	10%	80%	81%	44%	37%	0%	0%	0%	(56)
98	10%	10%	80%	81%	52%	29%	0%	0%	0%	(56)
99	10%	10%	80%	81%	55%	26%	0%	0%	0%	(56)
100	10%	10%	80%	81%	59%	22%	0%	0%	0%	(56)
101	10%	10%	80%	81%	52%	29%	0%	0%	0%	(56)
102	10%	10%	80%	81%	58%	23%	0%	0%	0%	(56)
103	10%	10%	80%	81%	64%	17%	0%	0%	0%	(56)
104	10%	10%	80%	81%	59%	22%	0%	0%	0%	(56)
105	10%	10%	80%	81%	57%	24%	0%	0%	0%	(56)
106	10%	10%	80%	81%	22%	59%	0%	0%	0%	(56)
107	10%	10%	80%	81%	3%	78%	0%	0%	0%	(56)
108	10%	10%	80%	81%	1%	80%	0%	0%	0%	(56)
109	10%	10%	80%	81%	58%	23%	0%	0%	0%	(56)

Table 2.

	Developer 1	Developer 2
R²	0.560959	0.5190
RMSE	0.226536	0.2151

CAPÍTULO IV
4.DISSCUSSÃO

4.1. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de modelos de IHA é de importância crucial para proporcionar uma melhor compreensão dessa síndrome e permitir a identificação de novos alvos para medicamentos, testar a eficácia de novas intervenções terapêuticas e atuar como modelos para avaliar mecanismos de toxicidade apropriados. Ao longo dos anos, têm sido feitas muitas tentativas para desenvolver modelos *in vivo* adequados para esses fins, com base em procedimentos cirúrgicos, exposição química ou infecção viral (280-282). Entretanto, até o momento não foi estabelecido um modelo que reproduza com precisão todas as características da IHA humana. Apesar dessas restrições, modelos animais têm um papel fundamental a desempenhar em estudos futuros. Por outro lado, sistemas *in vitro* ainda são ferramentas valiosas para investigar os eventos celulares relacionados à IHA, mas nem sempre é possível reproduzi-los *in vivo* (283).

A hepatotoxicidade induzida por drogas, do inglês *Drug induced liver injury* – DILI é a principal causa de IHA nos Estados Unidos da América, no Reino Unido e em países europeus, nos quais o acetaminofeno (N-acetil-p-aminofenol, APAP, paracetamol, Tylenol[®]) é responsável por quase 50% de todos os casos nos Estados Unidos (46) e entre 40 e 70% de todos os casos na Grã-Bretanha e na Europa (284). O APAP é um medicamento seguro em doses terapêuticas ≤ 4 g por dia para um adulto. Trabalhos da literatura sugerem que é improvável que mesmo pessoas suscetíveis, como alcoólatras, sofram efeitos adversos de doses terapêuticas de APAP (35, 50). Porém, tentativas de suicídio intencionais são uma causa frequente após a overdose com exposição a doses extremamente altas (doses únicas de 12 a 50 g, correspondente a 24-30 comprimidos de 500mg) (41). Contudo, a overdose cumulativa não intencional é um problema crescente, geralmente envolvem ingestão de 6 a 10 g/dia por vários dias (42). Isso porque o acetaminofeno não está presente apenas em medicamentos específicos para dor, mas também em remédios para dormir, remédios contra o resfriado e numerosos outros medicamentos que não necessitam de prescrição médica. Assim, os pacientes que ingerem vários medicamentos contendo acetaminofeno em sua composição podem inadvertidamente exceder as doses terapêuticas recomendadas (285, 286). Após uma overdose aguda por acetaminofeno, há

saturação das vias do metabolismo da conjugação no fígado, resultando em mais oxidação do medicamento no metabolito tóxico, o N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), pela enzima citocromo P450 (CYP450), CYP2E1 (287). A glutathiona (GSH) se esgota, resultando no acúmulo do metabólito tóxico NAPQI no fígado. O NAPQI causa dano mitocondrial direto (288), e a indução de uma resposta inflamatória (289), que pode resultar em morte celular, necrose predominantemente centrolobular (3) com algumas evidências de apoptose (15).

O uso indiscriminado de várias drogas, produtos químicos e micotoxinas são ameaças potenciais à integridade do fígado. A super dosagem de medicamentos ou mesmo doses terapêuticas podem causar danos hepáticos em indivíduos suscetíveis ou mesmo sem doença hepática pré-existente devido à incapacidade de se adaptar ao estresse celular causado por um determinado medicamento (6, 290). Assim, modelos experimentais de hepatotoxicidade com diferentes fármacos e algumas substâncias químicas são descritos para estudar e auxiliar na compreensão dos mecanismos que induzem a IHA. Entretanto, a alta toxicidade de algumas substâncias como o tetracloreto de carbono (CCl_4), a tioacetamida e o arsênico conferem riscos de manipulação à equipe, o que impõe certa limitação à sua utilização em laboratório. Alguns modelos experimentais de hepatotoxicidade utilizando o tetracloreto de carbono são capazes de induzir cirrose hepática em 100% dos animais e alta mortalidade apenas pelo processo de inalação dessa substância (291, 292). Além disso, os efeitos fisiopatológicos desencadeados após a administração de algumas substâncias em modelo experimental são limitados. Dessa forma, o modelo químico experimental mais utilizado para estudos sobre a IHA é o modelo com acetaminofeno em camundongo (293). Esse modelo é muitas vezes selecionado devido à relevância epidemiológica em seres humanos e por apresentar riscos mínimos à equipe que irá desenvolvê-lo, fatores cruciais para a escolha do modelo de IHA para o nosso trabalho (284, 293). Além disso, a fisiopatologia em camundongo reflete vários aspectos que são observados em humanos, incluindo a formação de metabólitos reativos (294), danos mitocondriais com estresse oxidativo (288, 295, 296), seguido por fragmentação de DNA e necrose (294, 297, 298). Associado a isso, em um trabalho publicado por McGill, M.R. e colaboradores em 2012, ao comparar os danos causados pelo acetaminofeno no fígado de rato e de camundongo, demonstrou que ratos são muito menos suscetíveis a desenvolver lesões

hepáticas do que camundongos. Uma dose de 200 mg/kg em jejum ou 400 mg/kg com alimentação normal para camundongos é suficiente para atingir toxicidade hepática aguda significativa dentro de 6 a 24 horas. Entretanto, ratos desenvolvem apenas uma pequena lesão hepática, mesmo com doses elevadas de 1 g/kg (17). Assim, o modelo de rato tem, portanto, uma relevância muito limitada para os seres humanos. Essas diferenças entre as espécies na suscetibilidade à hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno apóia o uso de camundongos como um modelo animal apropriado e clinicamente relevante.

A terapia e os benefícios da N-acetilcisteína (NAC) no tratamento contra a overdose induzida pelo acetaminofeno, foi baseada nesses mecanismos e na compreensão da toxicidade desse fármaco em camundongo. A NAC é um precursor da síntese de GSH e auxilia no processo de eliminação do metabólito reativo NAPQI durante a fase de metabolismo (7). Contudo, apesar da eficácia da N-acetilcisteína em pacientes que se apresentam precocemente após overdose de APAP (dentro de 8 horas após overdose) (286), ainda é necessário desenvolver estratégias de intervenção para pacientes com apresentação tardia. Atualmente, o desenvolvimento de biomarcadores, ainda em fase experimental, vem sendo explorado como estratégias alternativas para prever se um paciente se recuperará espontaneamente ou precisará de um transplante de fígado para sobreviver (299, 300)

Ao pesquisarmos sobre a dose ideal a ser administrada em camundongo para induzir IHA, observamos que não há um consenso na literatura de uma dose específica para o modelo químico com acetaminofeno. Na tabela 4.1. listamos alguns trabalhos com modelo químico de IHA induzida por acetaminofeno em camundongo. As doses utilizadas variam de 100 a 900 mg/Kg de peso corporal e os efeitos fisiopatológicos são distintos entre as diferentes doses, uma vez que a hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno é dose dependente (6). Dessa forma, padronizamos um modelo de IHA que pudesse ser capaz de reproduzir características importantes desenvolvidas durante a IHA em humanos. Para isso, utilizamos como base para o estabelecimento da dose ideal os pré-requisitos estabelecidos por Terblanche e Hickman (1991), para um modelo de IHA. Esse estudo clássico descreve seis pré-requisitos de um modelo experimental de IHA, aplicáveis até os dias atuais como: reversibilidade, reprodutibilidade, morte por falência hepática, janela terapêutica,

fisiologia e metabolismo apropriados e risco mínimo às pessoas envolvidas na pesquisa (tabela 4.2.)

Tabela 4.1. Doses de acetaminofeno utilizadas na literatura para indução de hepatotoxicidade aguda.

Dose (mg/Kg)	Via	Espécie	Tempo (h) de eutanásia após APAP	Referência
100-800	Oral - dose única	Camundongos machos	24 h	(301)
250	Oral - dose única	Camundongo Suíços macho	12	(302)
300	I.P - dose única	Camundongo C57BL/6N macho	24	(303)
300	Oral - dose única	Camundongo BALB/c macho	12	(248)
350 (jejum 16H)	I.P - dose única	Camundongo C57BL/6J fêmea	3 e 6	(304)
500	I.P - dose única	Camundongo Suíços macho	24	(305)
500	I.P - dose única	Camundongo C57BL/6J macho	3 e 6	(300)
500	I.P - dose única	Camundongo C57BL/6J macho	12	(306)
600	I.P - dose única	Camundongo Suíços macho	2 e 4	(307)
500 e 750	I.P - dose única	Camundongo ADN KO e C57BL/6J macho	2 - 36	(164)
500	I.P - dose única	Camundongo BALB/c macho	12	(11)
900	I.P - dose única	Camundongo macho	12	(308)

Tabela 4.2. Pré-requisitos de um modelo experimental de IHA de acordo com Terblanche e Hickman (1991).

Critério	Explicação
Reversibilidade	Insuficiência hepática deve ser potencialmente reversível para que um tratamento efetivo possa ser realizado
Reprodutibilidade	Aproximadamente todos os animais devem morrer se não tratados
Morte devido à insuficiência hepática	A morte deve ser decorrência da lesão no fígado
Janela terapêutica	Tempo para morte deve ser longo o suficiente para permitir uma avaliação e tratamento
Mínimo risco pessoal	Métodos experimentais devem envolver mínimos riscos para quem utilizá-los
Fisiologia e metabolismo apropriados	As espécies utilizadas devem ter metabolismo e fisiologia similares às humanas

De acordo com os resultados apresentados na figura 1 do artigo 2 desta Tese, a dose de 400 mg/Kg de peso corporal foi capaz de refletir características fundamentais obrigatórias em um modelo de IHA. Tais características envolvem: encefalopatia hepática de graus variados de I, II, III até IV, representando o comprometimento neurológico desses animais; alterações, metabólicas representadas pela elevação das enzimas hepáticas ALT e AST, além da diminuição da secreção de albumina; alta taxa de mortalidade (aproximadamente 50%); e janela terapêutica de 24 horas, que permitirá avaliar o efeito do transplante hepatocitário na sobrevivência dos animais. As análises histopatológicas mostraram o desenvolvimento de áreas de necrose centrolobular em graus variados, de leve a grave, e intenso infiltrado inflamatório nos tempos estudados, indicando a morte maciça dos hepatócitos. Portanto, a dose de 400 mg/Kg de peso corporal, cumprem muitos dos requisitos previamente estabelecidos por vários pesquisadores para abordar adequadamente a fisiopatologia da IHA e testar novas estratégias terapêuticas.

Conforme já descrito anteriormente, o transplante de fígado (TF) é a única terapia definitiva realizada com sucesso para a substituição da função hepática em pacientes com doenças metabólicas congênitas e outras doenças do fígado em estágio terminal (309). Notavelmente, a escassez mundial de órgãos para transplantes contribuem de forma progressiva para o aumento da mortalidade desses pacientes (310). As terapias disponíveis, atualmente, não são capazes de superar os benefícios terapêuticos do transplante de fígado, exceto no diagnóstico precoce de overdose por acetaminofeno, no qual a N-acetilcisteína pode reverter com sucesso os danos causados pela hepatotoxicidade (285, 296). Logo, pacientes que desenvolvem a perda da função hepática permanecem sem um tratamento terapêutico eficaz alternativo ao procedimento cirúrgico. Experimentalmente, o transplante de hepatócitos humanos e não humanos vem sendo estudado como uma alternativa promissora ao transplante de fígado, na qual as células transplantadas poderiam fornecer a função hepática ausente ou comprometida, uma vez enxertadas no fígado do receptor ou em regiões extra hepáticas, desde que sejam capazes de sustentar a funcionalidade do órgão. Hepatócitos maduros são considerados o tipo de célula mais indicado para o transplante celular uma vez que são os principais componentes funcionais do

fígado (127). Contudo, ao contrário da tolerância imunológica já amplamente reconhecida dos aloenxertos ortotópicos de fígado em modelo experimental (13, 36, 38), estudos demonstram que os hepatócitos alogênicos são altamente imunogênicos e estimulam fortes respostas imunes mediadas pelas células T CD4⁺ e CD8⁺, mesmo quando os indivíduos receptores são tratados com agentes imunossupressores. Os hepatócitos alogênicos são rejeitados em 10 dias após o transplante, enquanto os hepatócitos singênicos podem sobreviver indefinidamente (> 20 semanas) (9). Com isso, a sobrevivência das células transplantadas pode ser limitada proporcionando a diminuição da sobrevida do enxerto celular. Dessa forma, estratégias de prevenção contra a rejeição deflagrada pelo sistema imunológico ao transplante de hepatócitos isolados precisam ser estudadas. Dentre elas, o microencapsulamento em membrana de alginato de sódio vem sendo amplamente realizado em trabalhos voltados para o transplante celular alogênico como alternativa terapêutica para algumas doenças como, diabetes (16), câncer (14) e IHA (155, 311). O princípio da técnica de microencapsulamento baseia-se na idéia de incorporar as células em uma estrutura polimerizada semipermeável, cujo objetivo é proteger as células do ataque imunológico do hospedeiro, permitindo a difusão de nutrientes, oxigênio e produtos metabólicos que mantêm a função e sobrevivência celular (70, 312).

Trabalhos publicados por diversos grupos no mundo ao longo de várias décadas vêm buscando estabelecer bases sólidas para os avanços da terapia celular hepática. Embora, ensaios clínicos com transplante alogênico de hepatócitos e células autólogas diferenciadas tenham sido implementadas com a finalidade de promover a regeneração hepática ou a recuperação de funções ocasionadas por distúrbios metabólicos, as evidências claras de benefícios terapêuticos ainda são bastante escassas (313), evidenciando a necessidade de ampliar os estudos e questões envolvidas no transplante celular.

Enquanto o transplante de hepatócitos (TH) pode ser empregado com segurança em humanos, sua aplicabilidade permanece limitada. Embora muito bem estabelecido, o benefício terapêutico tem sido modesto e apenas temporário, até o momento (127). Isso ocorre devido a uma série de questões, algumas das quais incluem: (1) uma escassez limitada de órgãos doadores de hepatócitos para o transplante; (2) enxerto inicial e a longo prazo relativamente pobre de hepatócitos viáveis limitando o tratamento bem sucedido de doenças crônicas,

tais como deficiências metabólicas do fígado; (3) a falta de um modelo animal clinicamente relevante de IHA que possa ser usado para prever com precisão a eficácia de novas terapias com células; (4) ausência de um protocolo universal de criopreservação para hepatócitos que garanta qualidade e quantidade suficiente de células para o transplante hepatocitário programado ou de emergência e por fim; (5) a rejeição alogênica é provavelmente a principal causa do declínio observado da função do enxerto celular dentro de 1 ano após o TH (118, 123, 150, 159, 163, 314).

No entanto, a substituição bem sucedida das funções hepáticas deficientes através do transplante de hepatócitos saudáveis, como por exemplo, pacientes com síndrome de Crigler-Najjar devido à deficiência da enzima UGT1, hipercolesterolemia familiar que é desencadeada por um defeito congênito do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), ou em casos de insuficiência hepática aguda e crônica poderia representar um grande avanço nas perspectivas do tratamento a esses pacientes bem como evitar a indicação ao transplante hepático (131, 137). Com isso, diminuir a lacuna existente entre o número de pacientes que necessitam realizar o procedimento cirúrgico e a oferta de órgãos para o transplante. Assim, o TH tem sido proposto como alternativa atraente na recuperação da função hepática. Logo, a otimização das técnicas que abordam esse procedimento é importante para o sucesso na prática clínica. Com isso, estudos voltados para o isolamento e os mecanismos de preservação e de estocagem de células hepáticas são grandes desafios a serem ultrapassados e, portanto, alvos cruciais para a implementação dessa abordagem terapêutica, figura 4.1.

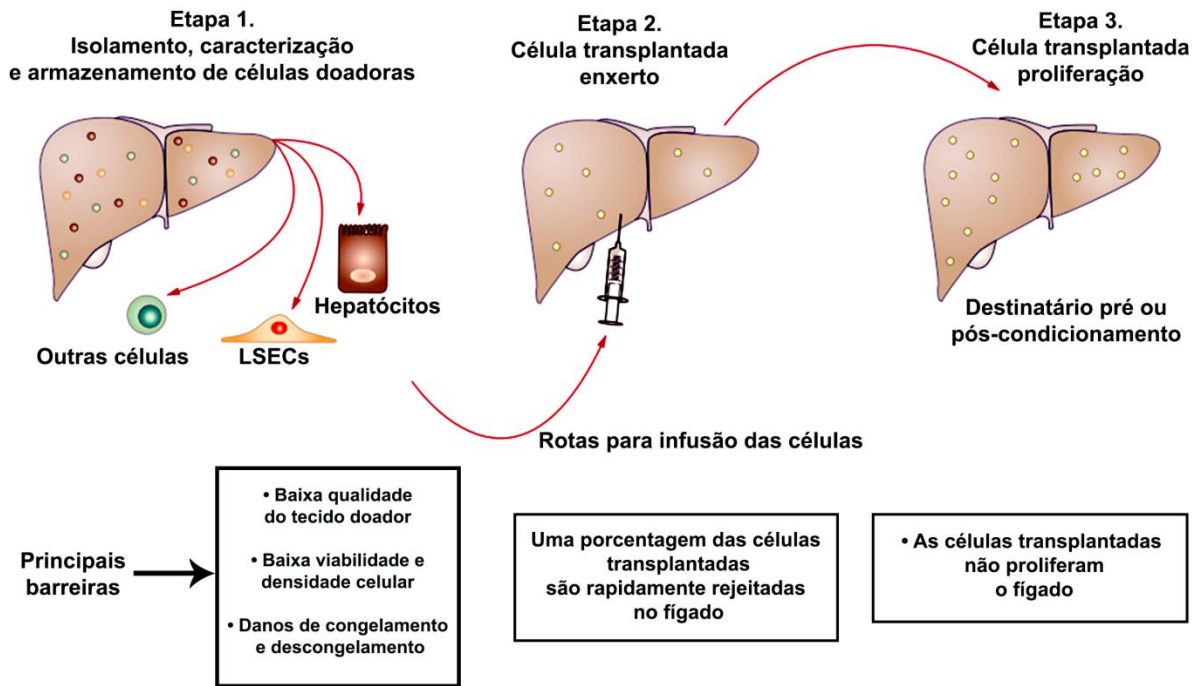


Figura 4.1. Representação de etapas críticas envolvidas na terapia com células do fígado e as barreiras de cada etapa. O primeiro passo na terapia celular requer isolamento, caracterização e armazenamento de células doadoras adequadas. Essas etapas são restritas pela falta de órgãos doadores ou pela sua qualidade inferior. As limitações de procedimento no isolamento de células de alta viabilidade e densidade, bem como dificuldades na criopreservação e descongelamento celular. A segunda etapa crítica diz respeito ao enxerto de células transplantadas no fígado (ou locais extra-hepáticos), a ausência de uma densidade celular necessária para recuperar a lesão hepática bem como, uma rápida rejeição às células pelo receptor são os desafios a serem enfrentados. No terceiro e último passo, as células transplantadas devem ser capazes de sobreviver a longo prazo para repovoar o fígado e conferir benefícios terapêuticos. Além disso, é necessário o desenvolvimento de regimes adequados para controlar a rejeição de aloenxerto. Figura modificada de Stuart J. Forbes e colaboradores 2015.

O isolamento bem sucedido e consistente de hepatócitos humanos primários continua sendo um desafio para terapias com células, transplantes e pesquisas laboratoriais em diferentes abordagens de doenças hepáticas e toxicidade de fármacos (315). Vários centros em todo o mundo têm uma vasta experiência no isolamento de hepatócitos humanos de fígados “não doentes”, normais, obtidos de fragmentos hepáticos excedentes do doador para a necessidade cirúrgica ou de ressecções de tumores hepáticos. Esses fígados são uma fonte importante de hepatócitos, porém extremamente limitada de células devido à escassez de órgãos, potencial de proliferação celular limitado e rejeição imunológica alogênica no cenário de transplante (316). Contudo, várias fontes celulares vêm sendo abordadas como possíveis alternativas aos hepatócitos humanos adultos, dentre

elas, células tronco mesenquimais, células endoteliais sinusoidais (LSECs) e células progenitoras endoteliais, hepatócitos de porcos transgênicos, (317, 318). Porém, questões na diferenciação celular ainda permanecem em aberto. Com isso, a utilização de órgãos que não atendem aos critérios para o transplante de fígado vem sendo cada vez mais abordado como uma fonte de tecido promissora para a obtenção de células hepáticas (63, 315), visto que um número considerável de órgãos destinados ao para o transplante são rejeitados. De acordo com os dados publicados pela Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos para o primeiro trimestre de 2019, a taxa de aproveitamento de fígados para transplante foi de apenas 54,8% do número total de doadores efetivos. Isso representa uma rejeição de 45,2% dos órgãos (www.abto.org.br). Nesse contexto, isolar células do tecido hepático “inutilizável”, também chamados de órgãos “marginais”, aumentaria substancialmente a disponibilidade de células para pesquisa, e futuramente, para a validação de sua utilização no tratamento de doenças do fígado. As causas da rejeição de órgãos para o transplante de fígado incluem: cirrose não viral; morte por parada cardíaca; morte encefálica não confirmada; hepatocarcinoma; e principalmente esteatose de alto grau (39, 63, 169). Fígados retirados de pacientes com alterações metabólicas hepáticas que necessitam realizar o transplante de fígado a partir de um doador falecido, também vêm sendo considerados como possíveis candidatos a doadores de hepatócitos para a terapia celular (64, 139) Esse conceito foi adotado a partir de uma abordagem semelhante usada no chamado transplante hepático “dominó” (37). O transplante de fígado dominó é um método usado para aumentar o número de enxertos de fígado disponíveis para transplante ortotópico de fígado (68). Os relatos indicam que os fígados de pacientes com alguns tipos de doença hepática metabólica podem ser transplantados com segurança para receptores selecionados, se o defeito e as necessidades metabólicas do doador forem cuidadosamente considerados. O fígado de pacientes com muitos tipos de doença metabólica hepática é morfológica e bioquimicamente normal, exceto pela mutação que caracteriza essa doença (86, 87). Outras funções bioquímicas normalmente desempenhadas pelo fígado estão presentes e presumivelmente "normais" nesses hepatócitos (64). Após comparar a viabilidade e a função de hepatócitos isolados de fígados normais e com diferentes doenças metabólicas, os dados descritos por Gramignoli e colaboradores indicam que as

células isoladas de alguns fígados “doentes” tiveram um desempenho tão bom ou melhor do que aquelas isoladas de doadores de órgãos normais em relação à viabilidade, rendimento celular, eficiência de revestimento e em ensaios de função hepática, incluindo metabolismo de drogas, reações de conjugação e metabolismo de amônia. Além disso, as células de fígados com doenças metabólicas apresentaram um repovoamento rápido e eficiente no fígado de camundongo após o transplante (64).

Contudo, não são estabelecidos critérios de inclusão para a utilização dessas células, tanto no processo do transplante de hepatócitos, bem como um consenso da densidade celular necessária para promover a recuperação parcial ou auxiliar na restauração da função hepática. Além disso, o isolamento de hepatócitos a partir desses órgãos pode exigir mudanças no protocolo. Uma vez que, a obtenção das células pode ser dificultada pelo tipo de dano existente no tecido hepático.

Nesse cenário, o nosso objetivo central foi avaliar possíveis benefícios do transplante de hepatócitos utilizando células obtidas de órgãos que não atendem os parâmetros ideais para o transplante de fígado e seriam “jogados fora”. Para isso, buscamos na literatura a principal causa para a exclusão de órgãos para o transplante hepático. Atualmente, em alguns Centros de Transplantes, aproximadamente 40% dos doadores de enxertos são descartados devido à esteatose hepática grave (44, 319). Tradicionalmente, os fígados esteatóticos com >60% de gordura são descartados. Fígados com <30% de gordura são viáveis para o transplante hepático e garantem uma boa função do enxerto após o transplante. Fígados que apresentam esteatose entre 30% e 60% de gordura têm resultados ruins, apresentando diminuição da sobrevida do enxerto e do paciente (320, 321). Com isso, seria possível utilizar esses órgãos para a obtenção de células saudáveis e aumentar a disponibilidade de hepatócitos primários adultos.

Assim, optamos por desenvolver um modelo experimental de macroesteatose (doador de células) com a finalidade de avaliar os mecanismos de isolamento, separação das células “normais” em uma população de células esteatóticas, caracterização funcional e a capacidade dessas células de reverter ou minimizar a lesão hepática aguda após o transplante hepatocitário. Para isso, camundongos C57BL/6 receberam uma dieta deficiente em metionina, um aminoácido essencial, e colina, uma vitamina essencial (DMC) durante 30 dias.

Esses componentes possuem um papel fundamental na síntese das apoproteínas, que são proteínas especializadas no transporte dos lipídios no plasma, favorecendo, na sua ausência, o acúmulo desses lipídios no fígado (322, 323). Além disso, com a dieta DMC, a β -oxidação mitocondrial de lipídios fica reduzida, contribuindo para a ocorrência de esteatose. O mecanismo da produção desse modelo também se vale do fato de que a metionina e a colina são precursores essenciais para a síntese hepática de fosfatidilcolina que, junto com o colesterol, perfaz a maioria absoluta dos lipídios secretados na bile (324). Esse modelo experimental é amplamente utilizado para estudar os mecanismos que decorrem pelo acúmulo excessivo de gorduras (triglicerídeos) no fígado, desencadeando a doença hepática gordurosa não alcoólica - DHGNA (do inglês, *Non-alcoholic fatty liver disease* – *NAFLD*) e que, dependendo do tempo de exposição à dieta, pode ter uma evolução progressiva do dano hepático para esteato hepatite não alcoólica - EHNA (do inglês, *non alcoholic steatohepatitis* - *NASH*) (296, 325, 326). A EHNA está relacionada com o acúmulo de gordura no fígado (esteatose), inflamação e é caracterizada pela presença de lesão e morte das células hepáticas, pelo aumento do risco de fibrose hepática, cirrose e carcinogênese (327). A prevalência de DHGNA está crescendo assustadoramente na população de adultos, crianças e adolescentes, sendo considerada uma epidemia mundial. Estima-se que entre 20 a 30% da população mundial seja portadora da DHGNA (328). A DHNG/EHNA é a terceira principal causa de indicação para transplante de fígado nos EUA e a segunda causa para transplante de fígado relacionado ao carcinoma hepatocelular (329). Fatores que provavelmente contribuem para a alta porcentagem de órgãos com esteatose de alto grau rejeitados para o sistema de transplante, já citados anteriormente.

De acordo com o trabalho de Reid D. T. e colaboradores em 2015, camundongos alimentados com dieta DMC desenvolvem consistentemente esteatose, inflamação e lesão hepatocelular em torno de 21 dias, sendo, portanto um protocolo ideal para estudar a DHGNA e sua progressão para EHNA murino. Além disso, descrevem que os camundongos podem desenvolver fibrose hepática se a dieta com DMC for mantida após três semanas (325). Outro ponto positivo do modelo DMC, é que camundongos submetidos a uma dieta por três semanas foi capaz de apresentar características bastante semelhantes da doença em humanos após a comparação histológica da biópsia de um paciente e uma seção

do fígado de camundongo. Tais características incluem: macroesteatose, hepatócitos em forma de balão e presença de infiltrados inflamatórios (330). Hepatócitos em balão refere-se à alteração morfológica dos hepatócitos devido à presença de vesículas lipídicas, podendo indicar a presença de hepatócitos apoptóticos e danificados. A presença de infiltrado inflamatório em combinação com o alto grau de esteatose está correlacionada com a pior fase da doença hepática (esteatohepatite) (331).

Neste trabalho, com a administração da dieta DMC por 30 dias, obtivemos a indução de macroesteatose (em torno de 50-60%) em 100% dos animais, com a formação de macro e microvesículas lipídicas difusas por todo parênquima hepático, analisadas histologicamente, como visto na figura 5 do artigo 2.

De acordo com estudo realizado por Baccarani 2003 e colaboradores, embora exista a dificuldade de isolar hepatócitos com um parênquima alterado não foram observadas diferenças em termos de rendimento celular, viabilidade e atividade *in vitro* entre os hepatócitos isolados de fígados esteatóticos e segmentos hepáticos normais (63). Porém, esse mesmo autor cita que, para o desenvolvimento de um método de isolamento de hepatócitos humanos, a partir de fígados rejeitados para o transplante, modificações devem ser feitas ao procedimento tradicional. Tais modificações incluem a manutenção do nível energético das células com a adição de substratos, como alanina e frutose, à solução perfusão usada para digerir o fígado; a manutenção da homeostase de sódio e cálcio é de essencial importância para a recuperação da funcionalidade celular e por fim; a manutenção de um pH ligeiramente ácido (aproximadamente 6,5) (63). Entretanto, Ricky H. Bhogal e colaboradores descreveram pela primeira vez que células obtidas de órgãos “não doentes” e “doentes” exibem respostas diferentes quando usadas em estudos funcionais (332). Com isso, os autores destacam a importância da caracterização do isolamento e a necessidade de realizar estudos comparativos em células isoladas a partir de diferentes síndromes e doenças hepáticas. O isolamento de hepatócitos humanos de tecido hepático esteatótico tem sido difícil e, embora protocolos detalhados tenham sido descritos, os resultados globais são muito variáveis em termos de rendimento e qualidade das células (39, 63, 169, 321, 333). No entanto, estabelecer protocolos reprodutíveis para o isolamento e separação das populações de hepatócitos de

fígados com esteatose são um passo importante para o campo de terapias com células hepáticas, visto a grande porcentagem de órgãos inutilizados.

Nossos resultados também apresentaram uma grande variabilidade no rendimento, na viabilidade e na qualidade das células após o isolamento de hepatócitos obtidos do fígado de camundongos com esteatose de alto grau. Esses dados corroboram com as observações descritas previamente por alguns autores ao descrever que o grau da esteatose interfere na viabilidade e no rendimento celular após o isolamento. Os hepatócitos humanos obtidos de fígados com esteatose microvesicular exibem o rendimento e a viabilidade semelhantes às aquelas comparadas às células obtidas de órgãos normais, com um aproveitamento de 70% (315). Contudo, órgãos com esteatose leve ou moderada geralmente não favorecem o isolamento celular bem-sucedido, apresentando um aproveitamento de apenas 20% (118, 315).

Além disso, durante o isolamento do fígado de alguns animais submetidos à dieta DMC, alguns órgãos apresentaram rigidez do parênquima hepático, leve descoloração e aspecto rugoso verificados macroscopicamente, semelhante à fibrose ou cirrose hepática, o que conferiu dificuldade de obtenção dos hepatócitos após 20 dias de dieta. Mesmo respeitando todas as etapas de isolamento celular realizadas para os outros órgãos com esteatose, a mesma concentração da enzima colagenase tipo I, não foi capaz de digerir o tecido hepático e a densidade de células isoladas foi quase nula, resultando em debris e raros hepatócitos positivos para o azul de trypan (dados não mostrados). O que precisamos avaliar é se a concentração da enzima realmente não digeriu o tecido ou se o dano hepático conferiu maior fragilidade aos hepatócitos proporcionando morte celular. Após as análises histológicas de três animais que apresentaram essas mesmas características macroscópicas, foram detectados granulomas espalhados por todo parênquima hepático. Essa prática experimental nos permite sugerir que são necessárias modificações específicas (concentração da enzima, etapas de perfusão, ou adição de suplementos ao meio de perfusão) para o isolamento de hepatócitos para cada tipo lesão hepática, corroborando com trabalhos já citados anteriormente. Embora o baixo rendimento celular dos hepatócitos obtidos de fígados com esteatose acima de 60% ou seja, com 30 dias de dieta, conseguimos desenvolver um método fácil, de baixo custo e acessível para a separação dos hepatócitos com alto grau de esteatose das células com

pouca ou nenhuma vesícula de gordura. A utilização de duas etapas de centrifugação após o gradiente de Percoll permitiu a eficiente seleção das populações de hepatócitos com o mínimo de alterações morfológica e funcional. Nesse contexto, uma das nossas perspectivas é poder separar as diferentes populações celulares pela técnica de citometria de fluxo por *cell sorting*. De acordo com os nossos resultados, os hepatócitos com micro ou macrovesículas lipídicas no citoplasma, parecem conferir maior susceptibilidade das células à danos. Visto que, o processo de isolamento por si só já confere a exposição dos hepatócitos à lesões enzimáticas e mecânicas, as células mais “frágeis” acabam sendo selecionadas e excluídas no processo de centrifugação. Sagias *et al*; 2010, reconheceram a susceptibilidade dos hepatócitos esteatóticos à danos tendo em vista os altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular dessas células e sugeriram a adição de N-acetilcisteína ao meio de perfusão (39).

Foi possível também demonstrar que as células obtidas dos tecidos com alto grau de esteatose, separadas por centrifugação, não apresentaram diferença significativa na viabilidade e na secreção de albumina quando mantidas em cultura por até 10 dias, período após o qual, apresentam alto grau de morte celular. Além disso, apresentaram alta capacidade de adesão celular ao substrato sem o revestimento de colágeno do tipo I, habilidade funcional de grande importância para a sobrevivência e repopulação do enxerto.

A separação das diferentes populações de células obtidas de órgãos com esteatose é fundamental para selecionar os hepatócitos com o mínimo grau de esteatose possível e assim, garantir maior qualidade das células que serão transplantadas. Cabe ressaltar que, o paciente receptor apresenta a função hepática comprometida, portanto, o transplante de hepatócitos com alto grau de esteatose poderia interferir diretamente na recuperação da lesão bem como induzir a progressão da doença hepática. É sabido que os macrófagos residentes, as células Kupffer, têm sido associadas à produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β , e arginase durante o desenvolvimento da esteatose e progressão da esteato hepatite. Além disso, durante na esteato hepatite, monócitos, neutrófilos, bem como células T são recrutadas contribuindo para a progressão da doença (325). Assim, todos esses fatores poderiam ser induzidos pelas células gordurosas no indivíduo receptor após o transplante.

Após a obtenção dos hepatócitos de fígados com macroesteatose, realizamos o transplante hepatocitário em camundongos com IHA. Para avaliar o possível potencial terapêutico das células obtidas e separadas do tecido com macroesteatose. Para isso, utilizamos como base para o desenho experimental, incluindo a densidade celular e a rota de infusão trabalhos já descritos na literatura, de acordo com alguns exemplos da tabela 1 do anexo.

A rejeição imunológica alogênica no cenário do transplante celular também é tida como um dos grandes problemas para o sucesso do enxerto. Dessa forma, como objetivo de minimizar a rejeição e possíveis danos às células transplantadas, iniciamos a terapia de imunossupressão nos camundongos dois dias antes de realizar a terapia celular. Os protocolos de imunossupressão usados em animais experimentais são baseados em protocolos básicos já realizados em humanos e as doses são ajustadas ao peso corporal (334). O Tacrolimo® (FK506) é um potente antibiótico macrolídeo com propriedades farmacocinéticas semelhantes às da CsA (ciclosporina A), mas com potência terapêutica de 10 a 100 vezes maior (335). O Tacrolimo® liga-se a uma imunofilina, a proteína de ligação à FK506 (FKBP). Esse complexo inibe a fosfatase calcineurina e, como consequência, a inibição da ativação do NFAT (Fator Nuclear de Células T), impedindo a proliferação celular. Além disso, inibe os eventos dependentes de cálcio, como a transcrição do gene da interleucina-2, ativação da óxido nítrico sintase, desgranulação celular e apoptose (335). Esse imunossupressor é indicado principalmente no transplante de rim, fígado, coração e intestino delgado. Efeitos colaterais como, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade já são classicamente descritos. Entretanto, esses efeitos dependem de diversos fatores como: espécie; tempo e a dose a ser administrada; idade, peso e tipo de doença hepática associada (336). Contudo, trabalhos com primatas não humanos que avaliaram doses de até 2,0 mg/Kg de peso corporal por até 3 meses, relatam que o uso desse fármaco após transplante de rim não foi capaz de afetar parâmetros bioquímicos relevantes, como potássio, cálcio, ureia e creatinina, e sem causar alterações histopatológicas no fígado, rim e cérebro (337). Porém, a dose oral recomendada para humanos após o transplante é 10 vezes menor do que a avaliada nesse trabalho. Assim, para estipular a dose ideal do imunossupressor que não fosse capaz de promover nenhum tipo de lesão hepática, renal ou alterações comportamentais que indicassem qualquer alteração

neuroológica, testamos três doses do fármaco Tacrolimo® sugerida na literatura para animais experimentais e para imunossupressão oral em humanos após o transplante, conforme ilustrado na tabela 2 do anexo. Testamos durante 10 dias as doses de 0,1; 0,15 e 0,2 mg/Kg de peso corporal administrada 1 vez ao dia. De acordo com os nossos resultados histológicos, a dose de 0,1 mg/Kg de peso corporal não foi capaz de promover nenhum tipo de lesão hepática, renal ou neurológica até 10 dias de administração. Entretanto, os animais que receberam as doses de 0,15 e 0,2 mg/kg de peso corporal por dia I.P do Tacrolimo® apresentaram lesões hepáticas a partir de 5 dias de administração. Porém, nenhuma alteração comportamental ou renal foi observada em ambos os grupos. Dessa forma, a dose escolhida para realizar a imunossupressão dos animais foi a dose de 0,1 mg/Kg de peso corporal por dia até o término da avaliação da terapia celular. Para isso, os camundongos submetidos á terapia celular receberam diariamente uma dose única intraperitoneal de 0,1 mg/Kg de peso corporal do imunossupressor Tacrolimo®.

Conforme os resultados obtidos, camundongos imunossuprimidos que receberam infusão celular de 1×10^6 hepatócitos com viabilidade acima de 90%, 4 horas após a indução da IHA, apresentaram um aumento na sobrevivência de aproximadamente 11% quando comparados aos animais receberam apenas o veículo (taxa de mortalidade de 70,37% e 61,90%, respectivamente) 24 horas após a terapia celular. Embora esse aumento na sobrevivência dos animais não tenha apresentado diferença significativa entre os grupos ($p=0,9762$), houve uma melhora do quadro bioquímico dos animais, principalmente após 48 horas e ausência de sinais de encefalopatia com 72 horas após a terapia com hepatócitos. De acordo com as análises histopatológicas foi possível observar a diminuição do grau de necrose e lesões hepáticas 24 horas após o transplante hepatocitário. Fatores que sugerem uma possível indução da reversão parcial da lesão hepática. De acordo com diversos trabalhos já publicados na literatura, alguns fatores já descritos podem influenciar diretamente o sucesso do transplante celular. Dentre esses fatores estão: a incapacidade de transplantar uma massa celular adequada que possa suprir a função hepática perdida; quando se utilizam métodos de transplante convencionais, isto é, infusão venosa portal, intraperitoneal ou intraesplênica, é difícil controlar a eficiência do enxerto e evitar que ocorra o enxerto inesperado em outros órgãos. Uma vez que, as células

transplantadas podem ser entregues à circulação sanguínea antes de seu enxerto no fígado; e, além disso, conseguir monitorar a função das células transplantadas (140, 150). Fatores que poderiam justificar o aumento discreto na sobrevida da terapia celular após 24 horas. Além disso, nossos resultados poderiam ser mais significativos através da otimização da densidade celular para a infusão ou a realização de sessões alternadas do transplante hepatocitário. Contudo, em um trabalho realizado por Charlotte A. Lee e colaboradores em 2018, ao avaliar o transplante de hepatócitos neonatais microencapsulados frescos ou criopreservados em pacientes, descreveu uma densidade celular de $1,7 \times 10^4$ células/g de peso corporal, ideal para garantir a melhora do quadro bioquímico, bem como aumentar a sobrevida do paciente até a realização do transplante de fígado (18). Visto que, o peso médio dos camundongos era de 30g, uma densidade $0,5 \times 10^6$ células totais poderia ser o suficiente para que resultados significativos na sobrevida pudessem ser alcançados. Em nosso modelo experimental, utilizamos o dobro do número de células (1×10^6 células) calculado para a terapia celular, porém, os dados com relação à sobrevida não foram significativos. Entretanto, diferenças nos protocolos devem ser consideradas. No trabalho citado, os hepatócitos foram microencapsulados em membrana de alginato e a infusão realizada na cavidade intraperitoneal guiada por ultrassom com células obtidas de tecido normal, sem nenhuma alteração funcional. Além disso, em dois dos pacientes avaliados a terapia com hepatócitos foi realizada em duas sessões repetidas. Ressaltando a necessidade de estudarmos outras variáveis em nosso protocolo. Nesse contexto, podemos ainda investigar se o microencapsulamento dos hepatócitos provenientes de órgãos inutilizados poderia representar maior sobrevivência celular após o transplante. Com isso, seria possível determinar ou prever a massa celular ideal capaz de recuperar totalmente a lesão hepática e aumentar significativamente a sobrevida dos animais. Entretanto, ficou claro que a utilização de hepatócitos isolados e selecionados de fígados com macroesteatose apresentam um potencial terapêutico favorável à recuperação da função hepática após indução química por APAP em modelo experimental.

Outro objetivo central desta Tese foi desenvolver estratégias de criopreservação de hepatócitos, que pudessem minimizar os efeitos após o congelamento e garantir maior qualidade e quantidade celular. Em trabalho

desenvolvido durante a minha dissertação de mestrado e parte finalizada durante a tese de doutorado (artigo 1), demonstramos o potencial crioprotetor da trealose na ausência do DMSO durante a criopreservação de hepatócitos de rato (166). Cabe ressaltar, que a ausência do DMSO na solução de congelamento é um dado importante para a terapia com células hepáticas, frente aos efeitos colaterais em pacientes já apresentados e a toxicidade do DMSO. Diversos trabalhos na literatura com o objetivo de aperfeiçoar os protocolos de congelamento de hepatócitos já são descritos. Entretanto, não há um consenso na literatura que possa reproduzir resultados favoráveis com relação à viabilidade e funcionalidade das células após o descongelamento.

O principal obstáculo à criopreservação de vários tipos de células de mamíferos é a capacidade de associar a qualidade e garantir a viabilidade celular após o descongelamento. Essa questão está ligada ao desafio de alinhar uma ampla gama de protocolos descritos na literatura com as diferentes variáveis encontradas por diversos grupos de estudo. Atualmente, acompanhamos um crescente interesse de diversas áreas voltado para as aplicações da inteligência artificial, estimulados pelos avanços no poder de processamento, memória, armazenamento e uma riqueza sem precedentes de dados, os computadores estão sendo solicitados a lidar com tarefas de aprendizado cada vez mais complexas, geralmente com sucesso surpreendente. Isso porque, essa área da ciência da computação vem proporcionando resultados favoráveis na capacidade dos sistemas computacionais em aprender e executar tarefas cognitivas destinadas aos seres humanos de forma mais rápida e muitas vezes até mais precisas do que o cérebro humano (254, 268). A crescente obtenção de dados na área da saúde seja no diagnóstico por imagem de doenças ou os diversos fatores que influenciam na indicação de um paciente a um procedimento cirúrgico, foram beneficiados pela capacidade dos computadores em reunir esses diferentes dados e executá-los. Com isso, a nossa idéia foi conseguir reunir diferentes protocolos de criopreservação de hepatócitos e gerar um banco de dados para que com o auxílio de algoritmos de aprendizagem de máquinas conseguíssemos prever condições ótimas de congelamento de hepatócitos (artigo 4). Nossos resultados demonstraram que o DMSO e a trealose são os crioprotetores capazes de influenciar diretamente na viabilidade dos hepatócitos após a criopreservação. Com o treinamento de redes neurais artificiais conseguimos desenvolver um

sistema de predição das condições ótimas de criopreservação. Embora o banco de dados aplicado aqui não seja grande o suficiente para garantir previsões de redes neurais altamente acuradas, demonstramos que é possível usar redes neurais artificiais para projetar melhores condições de congelamento para diferentes tipos de células, especialmente mamíferos. Com esse trabalho piloto, estamos desenvolvendo uma plataforma gratuita que será disponibilizada na internet (cryohepatopred.pythonanywhere.com). O nosso foco principal é ampliar o banco de dados, adicionando mais trabalhos e diferentes parâmetros que possam influenciar o processo de congelamento e aumentar a precisão de nossos resultados. Com isso, desenvolver protocolos reprodutíveis de criopreservação que possam garantir maior viabilidade e funcionalidade celular após o descongelamento. Dessa forma, contribuindo para a otimização do congelamento de células do fígado visando a diminuição dos danos após a criopreservação, contribuindo para o desenvolvimento de bancos de células hepáticas.

Assim, o isolamento de hepatócitos maduros obtidos de órgãos rejeitados para o transplante combinado às estratégias de preservação podem representar uma alternativa biotecnológica inovadora e viável ao tratamento da insuficiência hepática aguda e doenças metabólicas do fígado. Além do transplante hepatocitário, essas células podem ser fonte para novas abordagens tecnológicas como a bioimpressão e a biofabricação de mini órgãos. O uso dessas tecnologias se baseia no fato de poder auxiliar no tratamento e regeneração de tecidos a partir de arcabouços de células impressos em bioimpressões em 3D(23). Recentemente, foram descritos os progressos da ciência básica e pesquisas voltadas para o problema da escassez de órgãos para o transplante hepático. Tais abordagens envolvem o xenotransplante, perfusão ex vivo, engenharia de órgãos e tecidos e bioimpressão com células hepáticas (19). Dessa forma, trabalhos que visam contribuir para os progressos das tecnologias que podem favorecer a redução da mortalidade e salvar vida de pacientes com doença hepática terminal podem ajudar a transformar o quadro atual do transplante de fígado na próxima década.

CAPÍTULO V
5.CONCLUSÕES

5.1. CONCLUSÕES

Neste trabalho desenvolvemos dois modelos experimentais para realizar a terapia celular com hepatócitos adultos de fígados com macroesteatose.

Descrevemos um método de isolamento e separação de hepatócitos com esteatose por centrifugação, selecionando células “saudáveis” para o transplante celular.

Além disso, após realizarmos o transplante hepatocitário em modelo murino com as células a partir desses órgãos, observamos a melhora do quadro bioquímico dos animais. Embora a curva de sobrevivência não tenha representado diferença estatística entre os grupos, há uma tendência da recuperação da lesão hepática que precisam ser consideradas e investigadas.

Com relação a protocolos de criopreservação destacamos a influência sobre a viabilidade celular de dois agentes crioprotetores: a trealose e o DMSO. Esse resultado foi obtido a partir de estratégias de inteligência artificial, utilizando algoritmos de *machine learning* para determinar condições específicas de acordo com uma base de dados criada com trabalhos já publicados em revistas indexadas.

A figura 5.1 representa as etapas e conclusões obtidas neste trabalho. Bem como a aplicação em humanos.

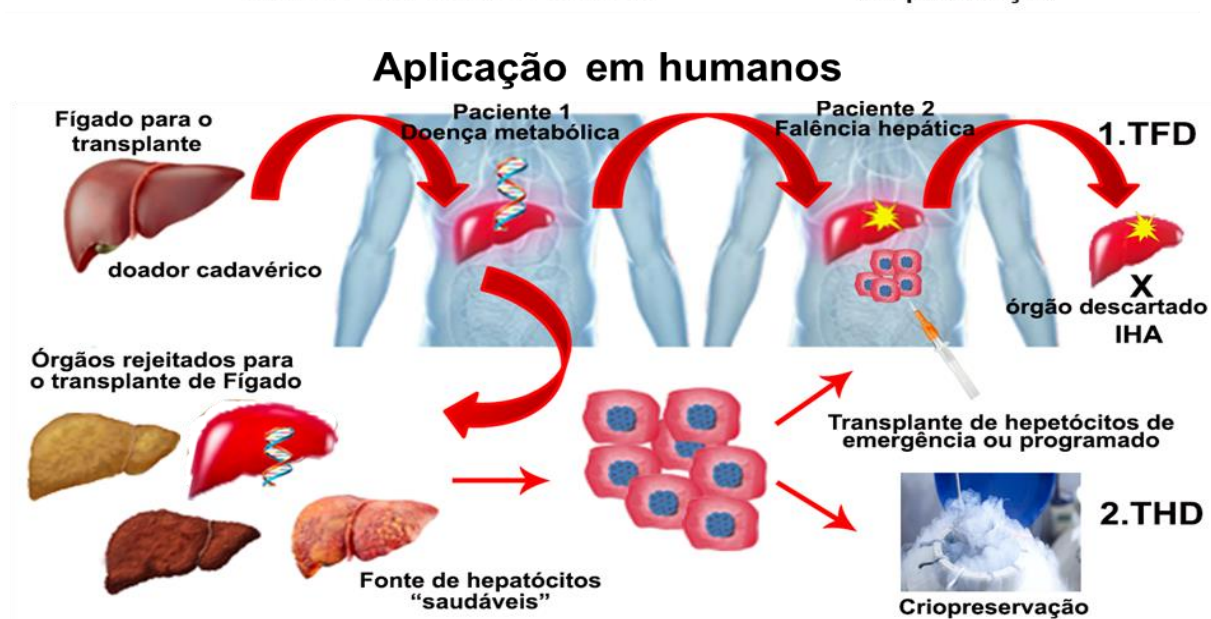
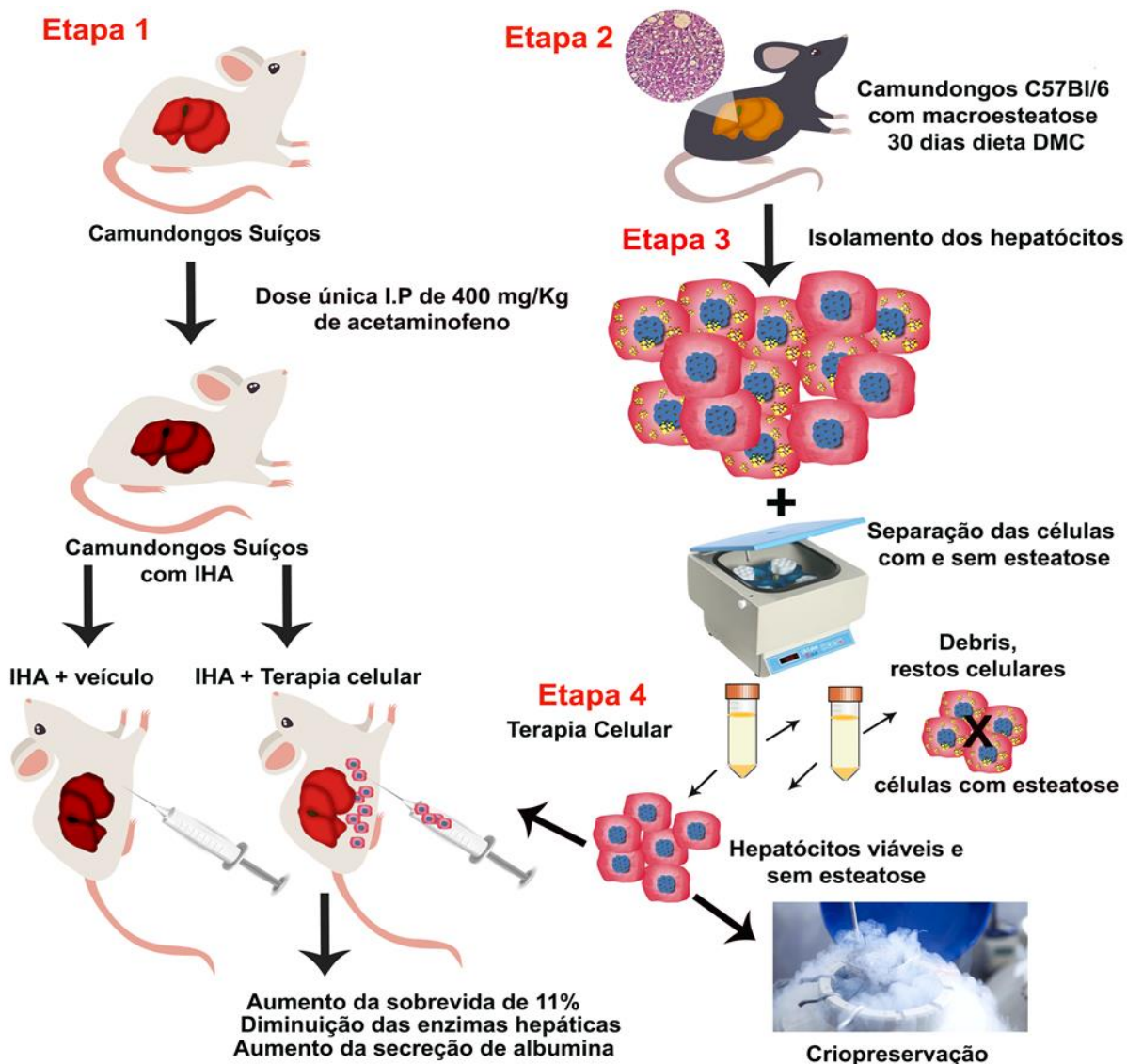


Figura 5.1. Esquema representativo do transplante hepatocitário, com abordagem no conceito dominó, desenvolvido neste projeto. Para realizar este trabalho, foram

desenvolvidos dois modelos experimentais. O primeiro, representado no esquema como etapa 1, o modelo químico de IHA com uma dose única I.P de 400 mg/Kg de peso corporal de acetaminofeno (APAP). Esse modelo foi capaz de reproduzir características importantes da IHA desenvolvida em humanos (modelo receptor de células). Em seguida, etapa 2, desenvolvemos um modelo de macroesteatose em camundongos C57Bl/6 submetidos a uma dieta deficiente em metionina e colina (DMC) durante 30 dias (animais doadores de células). Após o desenvolvimento do modelo de macroesteatose, foi realizada a terceira etapa: isolamento e separação por centrifugação dos hepatócitos. As células foram obtidas do tecido hepático com esteatose acima de 60%, representando os órgãos rejeitados para o transplante de fígado. A separação dessas células representa uma etapa importante, uma vez que seleciona as células saudáveis em uma população celular com alto grau de esteatose. As células “saudáveis” podem ter dois destinos, o transplante celular imediato com células frescas ou a criopreservação em soluções de congelamento favorecendo a criação de bancos de células hepáticas. Neste trabalho realizamos a terapia celular em camundongos Suíços imunossuprimidos com Tacrolimo®, e observamos que o transplante hepatocitário com células de órgãos com macroesteatose representa um modelo promissor ao tratamento da IHA. Os animais que receberam a terapia celular tiveram um aumento na sobrevivência de 11% e melhora do quadro bioquímico dos animais após 24 horas quando comparados aos animais que receberam apenas o veículo. Os resultados deste trabalho visam a aplicação futura em humanos. O transplante de fígado dominó (TFD) é uma técnica cirúrgica realizada para aumentar o número de enxertos para o transplante de fígado. Nesse tipo de transplante, pacientes com doenças metabólicas do fígado necessitam realizar o transplante hepático e dependem de um órgão de doador cadavérico. O fígado desses pacientes por sua vez, desempenham suas funções normais, exceto para o defeito congênito diagnosticado. Com isso, esses órgãos podem ser transplantados em outro paciente, selecionado, com doença hepática terminal. Além disso, essa estratégia permitiu também utilizar esses órgãos não somente no transplante hepático, mas também para a obtenção de hepatócitos saudáveis que poderão ser utilizados na terapia celular. A partir dessa idéia surgiu o conceito Transplante dominó hepatocitário (TDH). Dessa forma, é possível reutilizar órgãos que seriam descartados por não atenderem critérios básicos para o transplante de fígado. Neste trabalho otimizamos o protocolo para a utilização de órgãos com macroesteatose e sugerimos que essas células podem representar Transplante dominó hepatocitário (TDH). Dessa forma, é possível reutilizar órgãos que seriam descartados por não atenderem critérios básicos para o transplante de fígado.

CAPÍTULO VI
6.REFERÊNCIAS

6.1.REFERÊNCIAS

1. Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, et al. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *Journal of hepatology*. 2006;45(1):144-59. Epub 2006/05/30.
2. Bhatia SN, Underhill GH, Zaret KS, Fox IJ. Cell and tissue engineering for liver disease. *Science translational medicine*. 2014;6(245):245sr2. Epub 2014/07/18.
3. Mitchell SJ, Kane AE, Hilmer SN. Age-related changes in the hepatic pharmacology and toxicology of paracetamol. *Curr Gerontol Geriatr Res*. 2011;2011:624156. Epub 2011/07/19.
4. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *The Surgical clinics of North America*. 2010;90(4):643-53. Epub 2010/07/20.
5. Treyer A, Musch A. Hepatocyte polarity. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(1):243-87. Epub 2013/05/31.
6. Jaeschke H. Acetaminophen: Dose-Dependent Drug Hepatotoxicity and Acute Liver Failure in Patients. *Dig Dis*. 2015;33(4):464-71. Epub 2015/07/15.
7. Corcoran GB, Racz WJ, Smith CV, Mitchell JR. Effects of N-acetylcysteine on acetaminophen covalent binding and hepatic necrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985;232(3):864-72. Epub 1985/03/01.
8. Jacobs F, Wisse E, De Geest B. The role of liver sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer. *The American journal of pathology*. 2010;176(1):14-21. Epub 2009/12/02.
9. Bumgardner GL, Li J, Prologo JD, Heininger M, Orosz CG. Patterns of immune responses evoked by allogeneic hepatocytes: evidence for independent co-dominant roles for CD4+ and CD8+ T-cell responses in acute rejection. *Transplantation*. 1999;68(4):555-62. Epub 1999/09/10.
10. Jitraruch S, Dhawan A, Hughes RD, Filippi C, Soong D, Philippeos C, et al. Alginate microencapsulated hepatocytes optimised for transplantation in acute liver failure. *PLoS One*. 2014;9(12):e113609. Epub 2014/12/02.
11. Muhammad Shahid1, Fazal Subhan2. COMPARATIVE HISTOPATHOLOGY OF ACETAMINOPHEN INDUCED HEPATOTOXICITY IN ANIMAL MODELS OF MICE AND RATS. *Pharmacology online [Internet]*. 2014; 33:[32-43 pp.].
12. Smedsrod B, Pertoft H, Gustafson S, Laurent TC. Scavenger functions of the liver endothelial cell. *The Biochemical journal*. 1990;266(2):313-27. Epub 1990/03/01.
13. Yokota S, Yoshida O, Ono Y, Geller DA, Thomson AW. Liver transplantation in the mouse: Insights into liver immunobiology, tissue injury, and allograft tolerance. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2016;22(4):536-46. Epub 2015/12/29.
14. Saenz del Burgo L, Ciriza J, Hernandez RM, Orive G, Pedraz JL. Microencapsulated Cells for Cancer Therapy. *Methods Mol Biol*. 2017;1479:261-72. Epub 2016/10/16.
15. Possamai LA, McPhail MJ, Quaglia A, Zingarelli V, Abeles RD, Tidswell R, et al. Character and temporal evolution of apoptosis in acetaminophen-induced acute liver failure*. *Crit Care Med*. 2013;41(11):2543-50. Epub 2013/08/21.
16. Shimoda M, Matsumoto S. Methods for Microencapsulated Porcine Islet Production. *Methods Mol Biol*. 2017;1479:347-56. Epub 2016/10/16.
17. McGill MR, Williams CD, Xie Y, Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;264(3):387-94. Epub 2012/09/18.
18. Lee CA, Dhawan A, Iansante V, Lehec S, Khorsandi SE, Filippi C, et al. Cryopreserved neonatal hepatocytes may be a source for transplantation: Evaluation of functionality toward clinical use. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2018;24(3):394-406. Epub 2018/01/23.

19. Martins PN, Selzner M, Dayangac M, Ling Q, Ng KT, Huang KT, et al. What Is Hot and New in Basic Science in Liver Transplantation in 2018? Report of the Basic Science Committee of the International Liver Transplantation Society. *Transplantation*. 2019;103(4):654-9. Epub 2019/02/26.
20. Norris S, Collins C, Doherty DG, Smith F, McEntee G, Traynor O, et al. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *Journal of hepatology*. 1998;28(1):84-90. Epub 1998/04/16.
21. Norris S, Doherty DG, Collins C, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, et al. Natural T cells in the human liver: cytotoxic lymphocytes with dual T cell and natural killer cell phenotype and function are phenotypically heterogeneous and include Valpha24-JalphaQ and gammadelta T cell receptor bearing cells. *Hum Immunol*. 1999;60(1):20-31. Epub 1999/02/10.
22. Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, et al. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol*. 1999;163(4):2314-21. Epub 1999/08/10.
23. Nguyen DG, Funk J, Robbins JB, Crogan-Grundy C, Presnell SC, Singer T, et al. Bioprinted 3D Primary Liver Tissues Allow Assessment of Organ-Level Response to Clinical Drug Induced Toxicity In Vitro. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158674. Epub 2016/07/09.
24. Benseler V, McCaughan GW, Schlitt HJ, Bishop GA, Bowen DG, Bertolino P. The liver: a special case in transplantation tolerance. *Seminars in liver disease*. 2007;27(2):194-213. Epub 2007/05/24.
25. Demetris AJ, Lunz JG, 3rd, Randhawa P, Wu T, Nalesnik M, Thomson AW. Monitoring of human liver and kidney allograft tolerance: a tissue/histopathology perspective. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2009;22(1):120-41. Epub 2008/11/05.
26. Sanchez-Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology*. 2011;140(1):51-64. Epub 2010/11/16.
27. Feng S, Ekong UD, Lobritto SJ, Demetris AJ, Roberts JP, Rosenthal P, et al. Complete immunosuppression withdrawal and subsequent allograft function among pediatric recipients of parental living donor liver transplants. *JAMA*. 2012;307(3):283-93. Epub 2012/01/19.
28. Tiegs G, Lohse AW. Immune tolerance: what is unique about the liver. *J Autoimmun*. 2010;34(1):1-6. Epub 2009/09/01.
29. Rogers AB, & Dintzis, R.Z. Hepatobiliary System. *Comparative Anatomy and Histology*. In: Dintzis. PMTSM, editor. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*. Second Edition ed2018. p. 229-39.
30. Fiebig T, Boll H, Figueiredo G, Kerl HU, Nittka S, Groden C, et al. Three-dimensional in vivo imaging of the murine liver: a micro-computed tomography-based anatomical study. *PLoS One*. 2012;7(2):e31179. Epub 2012/03/01.
31. Baratta JL, Ngo A, Lopez B, Kasabwalla N, Longmuir KJ, Robertson RT. Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochem Cell Biol*. 2009;131(6):713-26. Epub 2009/03/04.
32. Scott TR, Kronsten VT, Hughes RD, Shawcross DL. Pathophysiology of cerebral oedema in acute liver failure. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(48):9240-55. Epub 2014/01/11.
33. Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *The New England journal of medicine*. 2014;370(12):1170-1. Epub 2014/03/22.
34. Lee WM. Etiologies of acute liver failure. *Seminars in liver disease*. 2008;28(2):142-52. Epub 2008/05/03.
35. Lee WM. Acute liver failure. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2012;33(1):36-45. Epub 2012/03/27.

36. Qian S, Demetris AJ, Murase N, Rao AS, Fung JJ, Starzl TE. Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology*. 1994;19(4):916-24. Epub 1994/04/01.
37. Cardoso L, Moreira LFP, Pinto MA, Henriques-Pons A, Alves LA. Domino Hepatocyte Transplantation: A Therapeutic Alternative for the Treatment of Acute Liver Failure. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018:2593745. Epub 2018/08/02.
38. Nakano H, Nakajima Y, Segawa M, Kanehiro H, Murao Y, Nakagawa K, et al. Immunologic significance of hepatocytes in tolerance induction after liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1987;19(1 Pt 1):511-3. Epub 1987/02/01.
39. Sagias FG, Mitry RR, Hughes RD, Lehec SC, Patel AG, Rela M, et al. N-acetylcysteine improves the viability of human hepatocytes isolated from severely steatotic donor liver tissue. *Cell transplantation*. 2010;19(11):1487-92. Epub 2010/07/01.
40. Bernuau J, Goudeau A, Poynard T, Dubois F, Lesage G, Yvonnet B, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in fulminant hepatitis B. *Hepatology*. 1986;6(4):648-51. Epub 1986/07/01.
41. Rumack BH, Peterson RC, Koch GG, Amara IA. Acetaminophen overdose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment. *Arch Intern Med*. 1981;141(3 Spec No):380-5. Epub 1981/02/23.
42. Lee WM. Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away? *Journal of hepatology*. 2017;67(6):1324-31. Epub 2017/07/25.
43. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet*. 2010;376(9736):190-201. Epub 2010/07/20.
44. Marsman WA, Wiesner RH, Rodriguez L, Batts KP, Porayko MK, Hay JE, et al. Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival. *Transplantation*. 1996;62(9):1246-51. Epub 1996/11/15.
45. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009;41(4):1149-60. Epub 2009/11/10.
46. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Annals of internal medicine*. 2002;137(12):947-54. Epub 2002/12/18.
47. Du WB, Pan XP, Li LJ. Prognostic models for acute liver failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2010;9(2):122-8. Epub 2010/04/13.
48. Mishra A, Rustgi V. Prognostic Models in Acute Liver Failure. *Clinics in liver disease*. 2018;22(2):375-88. Epub 2018/04/02.
49. Blei AT. Selection for acute liver failure: have we got it right? *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2005(11 Suppl 2):S30-4. Epub 2005/10/21.
50. Lee WM. Recent developments in acute liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(1):3-16. Epub 2012/04/10.
51. O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*. 1989;97(2):439-45. Epub 1989/08/01.
52. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*. 2000;31(4):864-71. Epub 2000/03/25.
53. Merion RM. When is a patient too well and when is a patient too sick for a liver transplant? *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2004;10(10 Suppl 2):S69-73. Epub 2004/09/24.
54. Lopez PM, Martin P. Update on liver transplantation: indications, organ allocation, and long-term care. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. 2006;73(8):1056-66. Epub 2007/02/08.

55. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the Liver in Humans. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1963;117:659-76. Epub 1963/12/01.
56. Song AT, Avelino-Silva VI, Pecora RA, Pugliese V, D'Albuquerque LA, Abdala E. Liver transplantation: fifty years of experience. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(18):5363-74. Epub 2014/05/17.
57. Rubin A, Sanchez-Montes C, Aguilera V, Juan FS, Ferrer I, Moya A, et al. Long-term outcome of 'long-term liver transplant survivors'. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2013;26(7):740-50. Epub 2013/05/30.
58. Seehofer D, Schoning W, Neuhaus P. [Deceased donor liver transplantation]. *Chirurg*. 2013;84(5):391-7. Epub 2013/04/12. Lebertransplantation mit postmortalen Organen.
59. Sagmeister M, Mullhaupt B, Kadry Z, Kullak-Ublick GA, Clavien PA, Renner EL. Cost-effectiveness of cadaveric and living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2002;73(4):616-22. Epub 2002/03/13.
60. Trotter JF, Mackenzie S, Wachs M, Bak T, Steinberg T, Polsky P, et al. Comprehensive cost comparison of adult-adult right hepatic lobe living-donor liver transplantation with cadaveric transplantation. *Transplantation*. 2003;75(4):473-6. Epub 2003/02/28.
61. Alam A, Chun Suen K, Ma D. Acute-on-chronic liver failure: recent update. *J Biomed Res*. 2017;31(4):283-300. Epub 2017/08/16.
62. Habka D, Mann D, Landes R, Soto-Gutierrez A. Future Economics of Liver Transplantation: A 20-Year Cost Modeling Forecast and the Prospect of Bioengineering Autologous Liver Grafts. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131764. Epub 2015/07/16.
63. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz-Barriga M, Adani GL, Zambito AM, et al. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2003;9(5):506-12. Epub 2003/05/13.
64. Gramignoli R, Tahan V, Dorko K, Skvorak KJ, Hansel MC, Zhao W, et al. New potential cell source for hepatocyte transplantation: discarded livers from metabolic disease liver transplants. *Stem cell research*. 2013;11(1):563-73. Epub 2013/05/07.
65. Emre S. Living donor liver transplantation: a critical review. *Transplantation Proceedings*. 2001;33(7-8):3456-7.
66. Emre S, Umman V. Split liver transplantation: an overview. *Transplantation proceedings*. 2011;43(3):884-7. Epub 2011/04/14.
67. Kitchens WH. Domino liver transplantation: indications, techniques, and outcomes. *Transplant Rev (Orlando)*. 2011;25(4):167-77. Epub 2011/08/02.
68. Antonini TM, Lozeron P, Lacroix C, Mincheva Z, Durrbach A, Slama M, et al. Reversibility of acquired amyloid polyneuropathy after liver retransplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(10):2734-8. Epub 2013/08/07.
69. Rai R. Liver transplantation- an overview. *The Indian journal of surgery*. 2013;75(3):185-91. Epub 2014/01/16.
70. Hernandez RM, Orive G, Murua A, Pedraz JL. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(7-8):711-30. Epub 2010/02/16.
71. Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. Liver regeneration. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2014;163(4):352-62. Epub 2014/02/06.
72. Florman S, Miller CM. Live donor liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(4):499-510. Epub 2006/03/24.
73. Rauchfuss F, Bauschke A, Barthel E, Scheuerlein H, Schule S, Malessa C, et al. [Living Donor Liver Transplantation - Past and Present.]. *Zentralblatt fur Chirurgie*. 2013. Epub 2013/07/05. Lebertransplantation mit Lebendspende - Historie und Gegenwart.

74. Brown RS, Jr. Live donors in liver transplantation. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1802-13. Epub 2008/05/13.
75. Dou K, Wang D, Tao K, Yue S, Ti Z, Song Z, et al. A modified heterotopic auxiliary living donor liver transplantation: report of a case. *Annals of hepatology*. 2014;13(3):399-403. Epub 2014/04/24.
76. Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet*. 1989;2(8661):497. Epub 1989/08/26.
77. Lee SG. A Complete Treatment of Adult Living Donor Liver Transplantation: A Review of Surgical Technique and Current Challenges to Expand Indication of Patients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014. Epub 2014/11/02.
78. Neshar E, Island E, Tryphonopoulos P, Moon J, Nishida S, Selvaggi G, et al. Split liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2011;43(5):1736-41. Epub 2011/06/23.
79. Belghiti J, Sommacale D, Dondero F, Zinzindohoue F, Sauvanet A, Durand F. Auxiliary liver transplantation for acute liver failure. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2004;6(2):83-7. Epub 2008/03/12.
80. Gubernatis G, Pichlmayr R, Kemnitz J, Gratz K. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation (APOLT) for fulminant hepatic failure: first successful case report. *World journal of surgery*. 1991;15(5):660-5; discussion 5-6. Epub 1991/09/01.
81. Moritz MJ, Jarrell BE, Armenti V, Radomski J, Carabasi RA, Zeitoun G, et al. Heterotopic liver transplantation for fulminant hepatic failure--a bridge to recovery. *Transplantation*. 1990;50(3):524-6. Epub 1990/09/01.
82. Boudjema K, Jaeck D, Simeoni U, Bientz J, Chenard MP, Brunot P. Temporary auxiliary liver transplantation for subacute liver failure in a child. *Lancet*. 1993;342(8874):778-9. Epub 1993/09/25.
83. Terpstra OT, Schalm SW, Weimar W, Willemse PJ, Baumgartner D, Groenland TH, et al. Auxiliary partial liver transplantation for end-stage chronic liver disease. *The New England journal of medicine*. 1988;319(23):1507-11. Epub 1988/12/08.
84. Popescu I, Dima SO. Domino liver transplantation: how far can we push the paradigm? *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2012;18(1):22-8. Epub 2011/10/12.
85. Furtado A, Tome L, Oliveira FJ, Furtado E, Viana J, Perdigoto R. Sequential liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1997;29(1-2):467-8. Epub 1997/02/01.
86. Barreiros AP, Galle PR, Otto G. Familial amyloid polyneuropathy. *Dig Dis*. 2013;31(1):170-4. Epub 2013/06/26.
87. Ohdan H. Response: Domino liver transplantation as a valuable option. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2014;27(4):e29-30. Epub 2013/11/19.
88. Golbus JR, Farhat L, Fontana RJ, Rubenfire M. Rapidly progressive atherosclerosis after domino liver transplantation from a teenage donor with homozygous familial hypercholesterolemia. *Journal of clinical lipidology*. 2017;11(5):1284-8. Epub 2017/08/16.
89. Zhu ZJ, Wei L, Qu W, Sun LY, Liu Y, Zeng ZG, et al. First case of cross-auxiliary double domino donor liver transplantation. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(44):7939-44. Epub 2017/12/07.
90. Schielke A, Conti F, Goumard C, Perdigao F, Calmus Y, Scatton O. Liver transplantation using grafts with rare metabolic disorders. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2015;47(4):261-70. Epub 2014/12/17.
91. Badell IR, Hanish SI, Hughes CB, Hewitt WR, Chung RT, Spivey JR, et al. Domino liver transplantation in maple syrup urine disease: a case report and review of the literature. *Transplant Proc*. 2013;45(2):806-9. Epub 2012/12/27.

92. Dixit N, Castano A, Farr MJ, Traub R, Lentzsch S, Brown RS, Jr., et al. Rapidly Progressive Transthyretin-Mediated Amyloidosis in a Domino Liver Transplant Recipient of a Ser23Asn Donor. *J Clin Neuromuscul Dis.* 2016;17(3):142-5. Epub 2016/02/26.
93. Kiley JE, Pender JC, Welch HF, Welch CS. Ammonia intoxication treated by hemodialysis. *The New England journal of medicine.* 1958;259(24):1156-61. Epub 1958/12/11.
94. Lee C, Tink A. Exchange transfusion in hepatic coma: report of a case. *Med J Aust.* 1958;45(2):40-2. Epub 1958/01/11.
95. Denis J, Opolon P, Nusinovici V, Granger A, Darnis F. Treatment of encephalopathy during fulminant hepatic failure by haemodialysis with high permeability membrane. *Gut.* 1978;19(9):787-93. Epub 1978/09/01.
96. O'Grady J. Bioartificial liver in acute liver failure: impostor or simply misunderstood? *Hepatology.* 2005;41(2):383-5. Epub 2004/12/04.
97. McLean JA, Luke HA. Direct exchange blood transfusion in treatment of hepatic coma. *Br Med J.* 1967;4(5571):78-80. Epub 1967/10/14.
98. Carpentier B, Gautier A, Legallais C. Artificial and bioartificial liver devices: present and future. *Gut.* 2009;58(12):1690-702. Epub 2009/11/20.
99. Ozdemir FN, Tatal E, Sezer S, Gur G, Bilgic A, Haberal M. Effect of supportive extracorporeal treatment in liver transplantation recipients and advanced liver failure patients. *Hemodial Int.* 2006;10 Suppl 2:S28-32. Epub 2006/10/07.
100. Stange J, Ramlow W, Mitzner S, Schmidt R, Klinkmann H. Dialysis against a recycled albumin solution enables the removal of albumin-bound toxins. *Artif Organs.* 1993;17(9):809-13. Epub 1993/09/01.
101. Rifai K, Ernst T, Kretschmer U, Bahr MJ, Schneider A, Hafer C, et al. Prometheus--a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *Journal of hepatology.* 2003;39(6):984-90. Epub 2003/12/04.
102. Evenepoel P, Laleman W, Wilmer A, Claes K, Kuypers D, Bammens B, et al. Prometheus versus molecular adsorbents recirculating system: comparison of efficiency in two different liver detoxification devices. *Artif Organs.* 2006;30(4):276-84. Epub 2006/04/29.
103. Skwarek A, Grodzicki M, Nyckowski P, Kotulski M, Zieniewicz K, Michalowicz B, et al. The use Prometheus FPSA system in the treatment of acute liver failure: preliminary results. *Transplantation proceedings.* 2006;38(1):209-11. Epub 2006/03/01.
104. Wauters J, Wilmer A. Albumin dialysis: current practice and future options. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver.* 2011;31 Suppl 3:9-12. Epub 2011/08/17.
105. Banares R, Nevens F, Larsen FS, Jalan R, Albillos A, Dollinger M, et al. Extracorporeal albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system in acute-on-chronic liver failure: the RELIEF trial. *Hepatology.* 2013;57(3):1153-62. Epub 2012/12/06.
106. Matsumura KN, Guevara GR, Huston H, Hamilton WL, Rikimaru M, Yamasaki G, et al. Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report. *Surgery.* 1987;101(1):99-103. Epub 1987/01/01.
107. Millis JM, Cronin DC, Johnson R, Conjeevaram H, Conlin C, Trevino S, et al. Initial experience with the modified extracorporeal liver-assist device for patients with fulminant hepatic failure: system modifications and clinical impact. *Transplantation.* 2002;74(12):1735-46. Epub 2002/12/25.
108. van de Kerkhove MP, Di Florio E, Scuderi V, Mancini A, Belli A, Bracco A, et al. Phase I clinical trial with the AMC-bioartificial liver. *Int J Artif Organs.* 2002;25(10):950-9. Epub 2002/11/29.
109. Demetriou AA, Brown RS, Jr., Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg.* 2004;239(5):660-7; discussion 7-70. Epub 2004/04/15.

110. Nyberg SL, Rimmel RP, Mann HJ, Peshwa MV, Hu WS, Cerra FB. Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver. *Ann Surg.* 1994;220(1):59-67. Epub 1994/07/01.
111. Gerlach JC, Mutig K, Sauer IM, Schrade P, Efimova E, Mieder T, et al. Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study. *Transplantation.* 2003;76(5):781-6. Epub 2003/09/23.
112. Baccarani U, Donini A, Sanna A, Risaliti A, Cariani A, Nardo B, et al. First report of cryopreserved human hepatocytes based bioartificial liver successfully used as a bridge to liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2004;4(2):286-9. Epub 2004/02/21.
113. Park JK, Lee DH. Bioartificial liver systems: current status and future perspective. *J Biosci Bioeng.* 2005;99(4):311-9. Epub 2005/10/20.
114. Pares A, Mas A. Extracorporeal liver support in severe alcoholic hepatitis. *World journal of gastroenterology.* 2014;20(25):8011-7. Epub 2014/07/11.
115. Chistiakov DA. Liver regenerative medicine: advances and challenges. *Cells, tissues, organs.* 2012;196(4):291-312. Epub 2012/05/11.
116. Li YS, Harn HJ, Hsieh DK, Wen TC, Subeq YM, Sun LY, et al. Cells and materials for liver tissue engineering. *Cell transplantation.* 2013;22(4):685-700. Epub 2012/11/07.
117. Vacanti JP, Kulig KM. Liver cell therapy and tissue engineering for transplantation. *Seminars in pediatric surgery.* 2014;23(3):150-5. Epub 2014/07/06.
118. Alexandrova K, Griesel C, Barthold M, Heuft HG, Ott M, Winkler M, et al. Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application. *Cell transplantation.* 2005;14(10):845-53. Epub 2006/02/04.
119. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society.* 2000;6(1):32-40. Epub 2000/01/29.
120. Stephenne X, Najimi M, Sokal EM. Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? *World journal of gastroenterology.* 2010;16(1):1-14. Epub 2009/12/30.
121. Sun K, Xie X, Xie J, Jiao S, Chen X, Zhao X, et al. Cell-based therapy for acute and chronic liver failures: distinct diseases, different choices. *Scientific reports.* 2014;4:6494. Epub 2014/09/30.
122. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *The Journal of cell biology.* 1969;43(3):506-20. Epub 1969/12/01.
123. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz M, Adani GL, Lorenzin D, et al. Cryopreserved human hepatocytes from cell bank: in vitro function and clinical application. *Transplantation proceedings.* 2005;37(1):256-9. Epub 2005/04/06.
124. Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, Mauer SM, Sowe A, Simmons RL, et al. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science.* 1976;192(4242):892-4. Epub 1976/05/28.
125. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplantation proceedings.* 1992;24(6):3052-3. Epub 1992/12/01.
126. Gramignoli R, Vosough M, Kannisto K, Srinivasan RC, Strom SC. Clinical hepatocyte transplantation: practical limits and possible solutions. *Eur Surg Res.* 2015;54(3-4):162-77. Epub 2015/01/31.
127. Iansante V, Mitry RR, Filippi C, Fitzpatrick E, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation for liver disease: current status and future perspectives. *Pediatr Res.* 2018;83(1-2):232-40. Epub 2017/11/18.

128. Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Seminars in liver disease*. 1999;19(1):39-48. Epub 1999/06/01.
129. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *The New England journal of medicine*. 1998;338(20):1422-6. Epub 1998/05/15.
130. Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, Guariso G, Franchin E, Miotto D, et al. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell transplantation*. 2005;14(2-3):151-7. Epub 2005/05/11.
131. Lysy PA, Najimi M, Stephenne X, Bourgois A, Smets F, Sokal EM. Liver cell transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I: update and perspectives. *World journal of gastroenterology*. 2008;14 (22):3464-70. Epub 2008/06/21.
132. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ, 3rd, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nature medicine*. 1995;1(11):1148-54. Epub 1995/11/01.
133. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *Journal of inherited metabolic disease*. 2006;29(2-3):431-5. Epub 2006/06/10.
134. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation*. 2004;78(12):1812-4. Epub 2004/12/23.
135. Lee KW, Lee JH, Shin SW, Kim SJ, Joh JW, Lee DH, et al. Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. *Cell transplantation*. 2007;16(6):629-37. Epub 2007/10/05.
136. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet*. 2002;359(9303):317-8. Epub 2002/02/07.
137. Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, et al. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation*. 2003;76(4):735-8. Epub 2003/09/16.
138. Beck BB, Habbig S, Dittrich K, Stippel D, Kaul I, Koerber F, et al. Liver cell transplantation in severe infantile oxalosis--a potential bridging procedure to orthotopic liver transplantation? *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(7):2984-9. Epub 2012/01/31.
139. Stephenne X, Debray FG, Smets F, Jazouli N, Sana G, Tondreau T, et al. Hepatocyte transplantation using the domino concept in a child with tetrabioplerin nonresponsive phenylketonuria. *Cell transplantation*. 2012;21(12):2765-70. Epub 2012/08/15.
140. Soltys KA, Setoyama K, Tafaleng EN, Soto Gutierrez A, Fong J, Fukumitsu K, et al. Host conditioning and rejection monitoring in hepatocyte transplantation in humans. *Journal of hepatology*. 2017;66(5):987-1000. Epub 2016/12/29.
141. Meyburg J, Das AM, Hoerster F, Lindner M, Kriegbaum H, Engelmann G, et al. One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. *Transplantation*. 2009;87(5):636-41. Epub 2009/03/20.
142. Stephenne X, Najimi M, Sibille C, Nassogne MC, Smets F, Sokal EM. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1317-23. Epub 2006/04/19.
143. Puppi J, Tan N, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Mieli-Vergani G, et al. Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation--a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(2):452-7. Epub 2008/01/24.
144. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation*. 1994;58(8):951-2. Epub 1994/10/27.
145. Schneider A, Attaran M, Meier PN, Strassburg C, Manns MP, Ott M, et al. Hepatocyte transplantation in an acute liver failure due to mushroom poisoning. *Transplantation*. 2006;82(8):1115-6. Epub 2006/10/25.

146. Khan AA, Habeeb A, Parveen N, Naseem B, Babu RP, Capoor AK, et al. Peritoneal transplantation of human fetal hepatocytes for the treatment of acute fatty liver of pregnancy: a case report. *Trop Gastroenterol.* 2004;25(3):141-3. Epub 2005/02/03.
147. Ponder KP, Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, DeMayo J, et al. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991;88(4):1217-21. Epub 1991/02/15.
148. Gupta S, Rajvanshi P, Lee CD. Integration of transplanted hepatocytes into host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(13):5860-4. Epub 1995/06/20.
149. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, et al. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology.* 1999;29(2):509-19. Epub 1999/01/27.
150. Soltys KA, Soto-Gutierrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, Ito R, et al. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol.* 2010;53(4):769-74. Epub 2010/07/30.
151. Ohashi K, Waugh JM, Dake MD, Yokoyama T, Kuge H, Nakajima Y, et al. Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology.* 2005;41(1):132-40. Epub 2004/12/25.
152. Cai J, Ito M, Nagata H, Westerman KA, Lafleur D, Chowdhury JR, et al. Treatment of liver failure in rats with end-stage cirrhosis by transplantation of immortalized hepatocytes. *Hepatology.* 2002;36(2):386-94. Epub 2002/07/27.
153. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, Cai J, Gao C, Hammel JM, et al. Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology.* 2000;31(4):851-7. Epub 2000/03/25.
154. Allameh A, Kazemnejad S. Safety evaluation of stem cells used for clinical cell therapy in chronic liver diseases; with emphasize on biochemical markers. *Clin Biochem.* 2012;45(6):385-96. Epub 2012/02/07.
155. Mitry RR, Jitraruch S, Iansante V, Dhawan A. Alginate Encapsulation of Human Hepatocytes and Assessment of Microbeads. *Methods Mol Biol.* 2017;1506:273-81. Epub 2016/11/11.
156. Sharkey J, Starkey Lewis PJ, Barrow M, Alwahsh SM, Noble J, Livingstone E, et al. Functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles provide highly efficient iron-labeling in macrophages for magnetic resonance-based detection in vivo. *Cytotherapy.* 2017;19(4):555-69. Epub 2017/02/19.
157. Alwahsh SM, Rashidi H, Hay DC. Liver cell therapy: is this the end of the beginning? *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(8):1307-24. Epub 2017/11/29.
158. LeCluyse EL. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci.* 2001;13(4):343-68. Epub 2001/06/16.
159. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2010;7(5):288-98. Epub 2010/04/07.
160. Lake JR. Hepatocyte transplantation. *The New England journal of medicine.* 1998;338(20):1463-5. Epub 1998/05/15.
161. Baquerizo A, Mhoyan A, Kearns-Jonker M, Arnaout WS, Shackleton C, Busuttil RW, et al. Characterization of human xenoreactive antibodies in liver failure patients exposed to pig hepatocytes after bioartificial liver treatment: an ex vivo model of pig to human xenotransplantation. *Transplantation.* 1999;67(1):5-18. Epub 1999/01/28.
162. Bonavita AG, Quresma K, Cotta-de-Almeida V, Pinto MA, Saraiva RM, Alves LA. Hepatocyte xenotransplantation for treating liver disease. *Xenotransplantation.* 2010;17(3):181-7. Epub 2010/07/20.

163. Bonora-Centelles A, Donato MT, Lahoz A, Pareja E, Mir J, Castell JV, et al. Functional characterization of hepatocytes for cell transplantation: customized cell preparation for each receptor. *Cell transplantation*. 2010;19(1):21-8. Epub 2009/10/03.
164. Lin Z, Wu F, Lin S, Pan X, Jin L, Lu T, et al. Adiponectin protects against acetaminophen-induced mitochondrial dysfunction and acute liver injury by promoting autophagy in mice. *Journal of hepatology*. 2014;61(4):825-31. Epub 2014/06/03.
165. Alexandre E, Viollon-Abadie C, David P, Gandillet A, Coassolo P, Heyd B, et al. Cryopreservation of adult human hepatocytes obtained from resected liver biopsies. *Cryobiology*. 2002;44(2):103-13. Epub 2002/08/02.
166. Cardoso L, Pinto MA, Henriques Pons A, Alves LA. Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy. *Cryobiology*. 2017;78:15-21. Epub 2017/08/08.
167. Lloyd TD, Orr S, Berry DP, Dennison AR. Development of a protocol for cryopreservation of hepatocytes for use in bioartificial liver systems. *Annals of clinical and laboratory science*. 2004;34(2):165-74. Epub 2004/07/02.
168. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology*. 2006;53(2):149-59. Epub 2006/06/24.
169. Terry C, Mitry RR, Lehec SC, Muiesan P, Rela M, Heaton ND, et al. The effects of cryopreservation on human hepatocytes obtained from different sources of liver tissue. *Cell transplantation*. 2005;14(8):585-94. Epub 2005/12/17.
170. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2015;1257:3-19. Epub 2014/11/28.
171. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 2004;48(2):146-56. Epub 2004/04/20.
172. Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology*. 2004;48(2):157-78. Epub 2004/04/20.
173. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*. 1970;168(3934):939-49. Epub 1970/05/22.
174. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996;17(3):243-56. Epub 1996/02/01.
175. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*. 2007;47(5):935-45. Epub 2007/05/01.
176. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006;65(1):236-44. Epub 2005/11/18.
177. Szell A, Shelton JN. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *Journal of reproduction and fertility*. 1986;78(2):699-703. Epub 1986/11/01.
178. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009;5(3):90-6. Epub 2010/01/05.
179. Vincent C, Johnson MH. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxford reviews of reproductive biology*. 1992;14:73-100. Epub 1992/01/01.
180. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949;164(4172):666. Epub 1949/10/15.
181. Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*. 1959;183(4672):1394-5. Epub 1959/05/16.
182. Motta JP, Gomes BE, Bouzas LF, Paraguassu-Braga FH, Porto LC. Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology*. 2010;60(3):301-7. Epub 2010/02/16.
183. Sauer-Heilborn A, Kadidlo D, McCullough J. Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. *Transfusion*. 2004;44(6):907-16. Epub 2004/05/26.

184. Asghar W, El Assal R, Shafiee H, Anchan RM, Demirci U. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnology journal*. 2014;9(7):895-903. Epub 2014/07/06.
185. Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, Fowler A, Cheley S, Bayley H, et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature biotechnology*. 2000;18(2):163-7. Epub 2000/02/05.
186. Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*. 2007;67(1):81-9. Epub 2006/10/31.
187. Hunt CJ. Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. *Methods Mol Biol*. 2017;1590:41-77. Epub 2017/03/30.
188. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015;71(2):181-97. Epub 2015/07/19.
189. Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril*. 2014;102(1):19-26. Epub 2014/06/04.
190. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003;46(3):205-29. Epub 2003/06/24.
191. Slichter SJ, Jones M, Ransom J, Gettinger I, Jones MK, Christoffel T, et al. Review of in vivo studies of dimethyl sulfoxide cryopreserved platelets. *Transfus Med Rev*. 2014;28(4):212-25. Epub 2014/12/03.
192. Alotaibi NA, Slater NK, Rahmoune H. Salidroside as a Novel Protective Agent to Improve Red Blood Cell Cryopreservation. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162748. Epub 2016/09/16.
193. Liu J, Tanrikut C, Wright DL, Lee GY, Toner M, Biggers JD, et al. Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant. *Cryobiology*. 2016;73(2):162-7. Epub 2016/08/09.
194. Yong KW, Pingguan-Murphy B, Xu F, Abas WA, Choi JR, Omar SZ, et al. Phenotypic and functional characterization of long-term cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Scientific reports*. 2015;5:9596. Epub 2015/04/16.
195. Fuller BJ, Paynter SJ. Cryopreservation of mammalian embryos. *Methods Mol Biol*. 2007;368:325-39. Epub 2007/12/18.
196. Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation research*. 2015;18(5):422-36. Epub 2015/04/01.
197. Fuller BJ, Petrenko AY, Rodriguez JV, Somov AY, Balaban CL, Guibert EE. Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. *Cryo Letters*. 2013;34(4):432-52. Epub 2013/09/03.
198. Fahy GM, Wowk B, Wu J. Cryopreservation of complex systems: the missing link in the regenerative medicine supply chain. *Rejuvenation research*. 2006;9(2):279-91. Epub 2006/05/19.
199. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *The New England journal of medicine*. 2004;350(11):1118-29. Epub 2004/03/12.
200. Lv GC, Yao JM, Yang YD, Zheng L, Sheng JF, Chen Y, et al. Efficacy of combined therapy in patients with hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(22):3481-6. Epub 2013/06/27.
201. Brockbank KG, Campbell LH, Greene ED, Brockbank MC, Duman JG. Lessons from nature for preservation of mammalian cells, tissues, and organs. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2011;47(3):210-7. Epub 2010/12/31.
202. Sullivan KJ, Storey KB. Environmental stress responsive expression of the gene *li16* in *Rana sylvatica*, the freeze tolerant wood frog. *Cryobiology*. 2012;64(3):192-200. Epub 2012/02/04.
203. Kristiansen E, Zachariassen KE. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiology*. 2005;51(3):262-80. Epub 2005/09/06.

204. Sinclair BJ, Renault D. Intracellular ice formation in insects: unresolved after 50 years? *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology*. 2010;155(1):14-8. Epub 2009/11/03.
205. Storey KB, Storey JM. Freeze tolerance in animals. *Physiol Rev*. 1988;68(1):27-84. Epub 1988/01/01.
206. Storey KB, Mosser DD, Douglas DN, Grundy JE, Storey JM. Biochemistry below 0 degrees C: nature's frozen vertebrates. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1996;29(3):283-307. Epub 1996/03/01.
207. Storey KB, Storey JM. Natural freeze tolerance in ectothermic vertebrates. *Annual review of physiology*. 1992;54:619-37. Epub 1992/01/01.
208. Duman JG. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual review of physiology*. 2001;63:327-57. Epub 2001/02/22.
209. Duman JG, Serianni AS. The role of endogenous antifreeze protein enhancers in the hemolymph thermal hysteresis activity of the beetle *Dendroides canadensis*. *Journal of insect physiology*. 2002;48(1):103-11. Epub 2003/05/29.
210. Rexer-Huber KM, Bishop PJ, Wharton DA. Skin ice nucleators and glycerol in the freezing-tolerant frog *Litoria ewingii*. *J Comp Physiol B*. 2011;181(6):781-92. Epub 2011/03/05.
211. Ramlov H. Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals. *Hum Reprod*. 2000;15 Suppl 5:26-46. Epub 2001/03/27.
212. Zachariassen KE. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol Rev*. 1985;65(4):799-832. Epub 1985/10/01.
213. Costanzo JP, Lee RE, Jr. Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates. *J Exp Biol*. 2013;216(Pt 11):1961-7. Epub 2013/05/17.
214. Churchill TA, Storey KB. Responses to freezing exposure of hatchling turtles *Trachemys scripta elegans*: factors influencing the development of freeze tolerance by reptiles. *J Exp Biol*. 1992;167:221-33. Epub 1992/06/01.
215. Storey KB. Reptile freeze tolerance: metabolism and gene expression. *Cryobiology*. 2006;52(1):1-16. Epub 2005/12/03.
216. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, Lehec SC, Girlanda R, Rela M, et al. Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(5):713-7. Epub 2006/03/11.
217. Mitry RR, Hughes RD, Aw MM, Terry C, Mieli-Vergani G, Girlanda R, et al. Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function. *Cell transplantation*. 2003;12(1):69-74. Epub 2003/04/16.
218. Li AP, Gorycki PD, Hengstler JG, Kedderis GL, Koebe HG, Rahmani R, et al. Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chemico-biological interactions*. 1999;121(1):117-23. Epub 1999/07/27.
219. Darr TB, Hubel A. Postthaw viability of precultured hepatocytes. *Cryobiology*. 2001;42(1):11-20. Epub 2001/05/05.
220. Zaleski J, Richburg J, Kauffman FC. Preservation of the rate and profile of xenobiotic metabolism in rat hepatocytes stored in liquid nitrogen. *Biochem Pharmacol*. 1993;46(1):111-6. Epub 1993/07/06.
221. Silva JM, Day SH, Nicoll-Griffith DA. Induction of cytochrome-P450 in cryopreserved rat and human hepatocytes. *Chemico-biological interactions*. 1999;121(1):49-63. Epub 1999/07/27.
222. Le Cam A, Guillouzo A, Freychet P. Ultrastructural and biochemical studies of isolated adult rat hepatocytes prepared under hypoxic conditions. *Cryopreservation of hepatocytes. Exp Cell Res*. 1976;98(2):382-95. Epub 1976/03/15.
223. Novicki DL, Irons GP, Strom SC, Jirtle R, Michalopoulos G. Cryopreservation of isolated rat hepatocytes. *In vitro*. 1982;18(4):393-9. Epub 1982/04/01.

224. Strom SC, Jirtle RL, Jones RS, Novicki DL, Rosenberg MR, Novotny A, et al. Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. *Journal of the National Cancer Institute*. 1982;68(5):771-8. Epub 1982/05/01.
225. Woods RJ, Fuller BJ, Attenburrow VD, Nutt LH, Hobbs KE. Functional assessment of hepatocytes after transplantation into rat spleen. *Transplantation*. 1982;33(2):123-6. Epub 1982/02/01.
226. Lloyd TD, Orr S, Skett P, Berry DP, Dennison AR. Cryopreservation of hepatocytes: a review of current methods for banking. *Cell Tissue Bank*. 2003;4(1):3-15. Epub 2004/07/17.
227. Pareja E, Cortes M, Gomez-Lechon MJ, Maupoey J, San Juan F, Lopez R, et al. [Current status and future perspectives of hepatocyte transplantation]. *Cirugia espanola*. 2014;92(2):74-81. Epub 2013/09/07. Estado actual y perspectivas futuras del trasplante de hepatocitos.
228. Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A. Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Seminars in cell & developmental biology*. 2002;13(6):463-7. Epub 2002/12/07.
229. Mitry RR, Lehec SC, Hughes RD. Cryopreservation of human hepatocytes for clinical use. *Methods Mol Biol*. 2010;640:107-13. Epub 2010/07/21.
230. de Sousa G, Langouet S, Nicolas F, Lorenzon G, Placidi M, Rahmani R, et al. Increase of cytochrome P-450 1A and glutathione transferase transcripts in cultured hepatocytes from dogs, monkeys, and humans after cryopreservation. *Cell biology and toxicology*. 1996;12(4-6):351-8. Epub 1996/12/01.
231. Dou M, de Sousa G, Lacarelle B, Placidi M, Lechene de la Porte P, Domingo M, et al. Thawed human hepatocytes in primary culture. *Cryobiology*. 1992;29(4):454-69. Epub 1992/08/01.
232. Skett P, Roberts P, Khan S. Maintenance of steroid metabolism and hormone responsiveness in cryopreserved dog, monkey and human hepatocytes. *Chemico-biological interactions*. 1999;121(1):65-76. Epub 1999/07/27.
233. Kasai S, Mito M. Large-scale cryopreservation of isolated dog hepatocytes. *Cryobiology*. 1993;30(1):1-11. Epub 1993/02/01.
234. De Loecker W, Koptelov VA, Grischenko VI, De Loecker P. Effects of cell concentration on viability and metabolic activity during cryopreservation. *Cryobiology*. 1998;37(2):103-9. Epub 1998/10/14.
235. Pegg DE. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*. 2010;60(3 Suppl):S36-44. Epub 2010/02/18.
236. Baust JM, Vogel MJ, Van Buskirk R, Baust JG. A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival. *Cell transplantation*. 2001;10(7):561-71. Epub 2001/11/21.
237. Yagi T, Hardin JA, Valenzuela YM, Miyoshi H, Gores GJ, Nyberg SL. Caspase inhibition reduces apoptotic death of cryopreserved porcine hepatocytes. *Hepatology*. 2001;33(6):1432-40. Epub 2001/06/08.
238. Chesne C, Guyomard C, Fautrel A, Poullain MG, Fremond B, De Jong H, et al. Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology*. 1993;18(2):406-14. Epub 1993/08/01.
239. Matsushita T, Yagi T, Hardin JA, Cragun JD, Crow FW, Bergen HR, 3rd, et al. Apoptotic cell death and function of cryopreserved porcine hepatocytes in a bioartificial liver. *Cell transplantation*. 2003;12(2):109-21. Epub 2003/06/12.
240. Gutteridge JM, Quinlan GJ. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1159(3):248-54. Epub 1992/10/20.
241. Kunieda T, Maruyama M, Okitsu T, Shibata N, Takesue M, Totsugawa T, et al. Cryopreservation of primarily isolated porcine hepatocytes with UW solution. *Cell transplantation*. 2003;12(6):607-16. Epub 2003/10/29.

242. Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M, et al. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug metabolism reviews*. 2000;32(1):81-118. Epub 2000/03/11.
243. Diener B, Utesch D, Beer N, Durk H, Oesch F. A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics. *Cryobiology*. 1993;30(2):116-27. Epub 1993/04/01.
244. Stokich B, Osgood Q, Grimm D, Moorthy S, Chakraborty N, Menze MA. Cryopreservation of hepatocyte (HepG2) cell monolayers: impact of trehalose. *Cryobiology*. 2014;69(2):281-90. Epub 2014/08/17.
245. Aghdai MH, Jamshidzadeh A, Nematizadeh M, Behzadiannia M, Niknahad H, Amirghofran Z, et al. Evaluating the Effects of Dithiothreitol and Fructose on Cell Viability and Function of Cryopreserved Primary Rat Hepatocytes and HepG2 Cell Line. *Hepatitis monthly*. 2013;13(1):e7824. Epub 2013/04/16.
246. Lee JH, Park JH, Park HJ, General T, Cho MG, Lee SK. Cryopreservation of immobilized rat hepatocytes for the development of a bioartificial liver system. *Transplantation proceedings*. 2012;44(4):1005-8. Epub 2012/05/09.
247. Limaye LS, Kale VP. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001;10(5):709-18. Epub 2001/10/24.
248. De Leon-Nava MA, Alvarez-Delgado C, Donis-Maturano L, Hernandez-Ruiz J, Manjarrez-Reyna AN, Cruz-Aviles E, et al. A non-hepatotropic parasite infection increases mortality in the acetaminophen-induced acute liver failure murine model: possible roles for IL-5 and IL-6. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(12):757-64. Epub 2016/11/05.
249. Rodrigues JP, Paraguassu-Braga FH, Carvalho L, Abdelhay E, Bouzas LF, Porto LC. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology*. 2008;56(2):144-51. Epub 2008/03/04.
250. Woelders H, Matthijs A, Engel B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*. 1997;35(2):93-105. Epub 1997/09/23.
251. Lynch AL, Slater NK. Influence of intracellular trehalose concentration and pre-freeze cell volume on the cryosurvival of rapidly frozen human erythrocytes. *Cryobiology*. 2011;63(1):26-31. Epub 2011/05/03.
252. Eroglu A, Bailey SE, Toner M, Toth TL. Successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. *Biol Reprod*. 2009;80(1):70-8. Epub 2008/09/26.
253. Min Xu JMDSHK. he Fourth Industrial Revolution: Opportunities and Challenges. *International Journal of Financial Research*. 2018;9(2):90-5.
254. Silver D, Hubert T, Schrittwieser J, Antonoglou I, Lai M, Guez A, et al. A general reinforcement learning algorithm that masters chess, shogi, and Go through self-play. *Science*. 2018;362(6419):1140-4. Epub 2018/12/14.
255. 2019 [cited 2019 23 de setembro]; Tesla's mission is to accelerate the world's transition to sustainable energy.]. Available from: <https://www.tesla.com/autopilot?redirect=no%2529>.
256. Silver D, Schrittwieser J, Simonyan K, Antonoglou I, Huang A, Guez A, et al. Mastering the game of Go without human knowledge. *Nature*. 2017;550(7676):354-9. Epub 2017/10/21.
257. Hashimoto DA, Rosman G, Rus D, Meireles OR. Artificial Intelligence in Surgery: Promises and Perils. *Ann Surg*. 2018;268(1):70-6. Epub 2018/02/02.
258. Libbrecht MW, Noble WS. Machine learning applications in genetics and genomics. *Nat Rev Genet*. 2015;16(6):321-32. Epub 2015/05/08.
259. Chicco D. Ten quick tips for machine learning in computational biology. *BioData Min*. 2017;10:35. Epub 2017/12/14.
260. Yip KY, Cheng C, Gerstein M. Machine learning and genome annotation: a match meant to be? *Genome Biol*. 2013;14(5):205. Epub 2013/06/05.

261. Rahman M, Shariff AA, Shafie A, Saaid R, Tahir RM. Caesarean delivery and its correlates in Northern Region of Bangladesh: application of logistic regression and cox proportional hazard model. *Journal of Health, Population and Nutrition*. 2015;33(1):8.
262. Sun T. Naive Bayes Classification. *Spam Filtering based on Naive Bayes Classification* 2009. p. 5-11.
263. Proceeding of the International Conference on Computer Networks, Big Data and IoT (ICCB - 2018), (2018).
264. Esteva A, Robicquet A, Ramsundar B, Kuleshov V, DePristo M, Chou K, et al. A guide to deep learning in healthcare. *Nature medicine*. 2019;25(1):24-9. Epub 2019/01/09.
265. Eraslan G, Avsec Z, Gagneur J, Theis FJ. Deep learning: new computational modelling techniques for genomics. *Nat Rev Genet*. 2019;20(7):389-403. Epub 2019/04/12.
266. Minor LB. *Stanford Medicine 2017 Health Trends Report*. Stanford Medicine, 2017.
267. Carpenter KA, Cohen DS, Jarrell JT, Huang X. Deep learning and virtual drug screening. *Future Med Chem*. 2018. Epub 2018/10/06.
268. Baldi P. Autoencoders, Unsupervised Learning, and Deep Architectures. In: Isabelle G, Gideon D, Vincent L, Graham T, Daniel S, editors. *Proceedings of ICML Workshop on Unsupervised and Transfer Learning; Proceedings of Machine Learning Research: PMLR*; 2012. p. 37--49.
269. P. H. *The Owner's Manual for the Brain: Everyday Applications from Mind-Brain Research*. 2nd ed ed. Atlanta, GA 2000.
270. Basheer IA, Hajmeer M. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *J Microbiol Methods*. 2000;43(1):3-31. Epub 2000/11/21.
271. Rosenblatt F. The perceptron: A probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychological Review*. 1958;65(6):386-408.
272. John A. Hertz ASK, and Richard G. Palmer,. *Introduction to the Theory of Neural Computation ARTIFICIAL INTELLIGENCE*. USA 1992. p. 352.
273. Anand BS. Cirrhosis of liver. *Western Journal of Medicine*. 1999;117(2):110-5.
274. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*. 2014;60(2):715-35. Epub 2014/07/22.
275. Kang JH, Matsui T. Changing Etiology in Liver Cirrhosis in Sapporo, Japan. *Euroasian J Hepatogastroenterol*. 2018;8(1):77-80. Epub 2018/07/03.
276. Naveau S, Perlemuter G, Balian A. [Epidemiology and natural history of cirrhosis]. *Rev Prat*. 2005;55(14):1527-32. Epub 2005/11/01. *Epidemiologie et histoire naturelle de la cirrhose*.
277. Di Bisceglie AM. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology*. 2000;31(4):1014-8. Epub 2000/03/25.
278. Innes HA, Hutchinson SJ, Barclay S, Cadzow E, Dillon JF, Fraser A, et al. Quantifying the fraction of cirrhosis attributable to alcohol among chronic hepatitis C virus patients: implications for treatment cost-effectiveness. *Hepatology*. 2013;57(2):451-60. Epub 2012/09/11.
279. Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1426-37, 37 e1-9. Epub 2013/03/12.
280. Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci*. 1991;36(6):770-4. Epub 1991/06/01.
281. Belanger M, Butterworth RF. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. *Metabolic brain disease*. 2005;20(4):409-23. Epub 2005/12/31.
282. Filipponi F, Mosca F. Animal models of fulminant hepatic failure: need to test liver support devices. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2001;33(7):607-13. Epub 2002/01/31.

283. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 2013;87(8):1315-530. Epub 2013/08/27.
284. Colaci CS, Mendizabal M, Bessone F. Idiosyncratic Drug-Induced Acute Liver Failure: A Challenging and Distressing Scenario. *Curr Drug Saf.* 2019;14(2):94-101. Epub 2019/02/16.
285. Dart RC, Bailey E. Does therapeutic use of acetaminophen cause acute liver failure? *Pharmacotherapy.* 2007;27(9):1219-30. Epub 2007/08/29.
286. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clinics in liver disease.* 2007;11(3):525-48, vi. Epub 2007/08/29.
287. Holt MP, Ju C. Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J.* 2006;8(1):E48-54. Epub 2006/04/06.
288. Jaeschke H. Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice in vivo: the protective effect of allopurinol. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;255(3):935-41. Epub 1990/12/01.
289. Antoine DJ, Williams DP, Park BK. Understanding the role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity: state of the science. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(11):1415-27. Epub 2008/10/28.
290. Ingawale DK, Mandlik SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014;37(1):118-33. Epub 2013/12/11.
291. Jimenez W, Claria J, Arroyo V, Rodes J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 1992;7(1):90-7. Epub 1992/01/01.
292. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim.* 2015;49(1 Suppl):4-11. Epub 2015/04/04.
293. Maes M, Vinken M, Jaeschke H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;290:86-97. Epub 2015/12/04.
294. McGill MR, Lebofsky M, Norris HR, Slawson MH, Bajt ML, Xie Y, et al. Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: dose-response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;269(3):240-9. Epub 2013/04/11.
295. Adamson GM, Harman AW. Oxidative stress in cultured hepatocytes exposed to acetaminophen. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(11):2289-94. Epub 1993/06/09.
296. 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(2):509-16. Epub 2004/10/07.
297. Bajt ML, Farhood A, Lemasters JJ, Jaeschke H. Mitochondrial bax translocation accelerates DNA fragmentation and cell necrosis in a murine model of acetaminophen hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(1):8-14. Epub 2007/10/02.
298. Williams CD, Bajt ML, Sharpe MR, McGill MR, Farhood A, Jaeschke H. Neutrophil activation during acetaminophen hepatotoxicity and repair in mice and humans. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;275(2):122-33. Epub 2014/01/21.
299. McGill MR, Staggs VS, Sharpe MR, Lee WM, Jaeschke H. Serum mitochondrial biomarkers and damage-associated molecular patterns are higher in acetaminophen overdose patients with poor outcome. *Hepatology.* 2014;60(4):1336-45. Epub 2014/06/14.
300. Ni HM, McGill MR, Chao X, Du K, Williams JA, Xie Y, et al. Removal of acetaminophen protein adducts by autophagy protects against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of hepatology.* 2016;65(2):354-62. Epub 2016/05/07.

301. Placke ME, Ginsberg GL, Wyand DS, Cohen SD. Ultrastructural changes during acute acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse: a time and dose study. *Toxicol Pathol.* 1987;15(4):431-8. Epub 1987/01/01.
302. Uchida NS, Silva-Filho SE, Aguiar RP, Wiirzler LA, Cardia GF, Cavalcante HA, et al. Protective Effect of *Cymbopogon citratus* Essential Oil in Experimental Model of Acetaminophen-Induced Liver Injury. *The American journal of Chinese medicine.* 2017:1-18. Epub 2017/04/01.
303. Huo Y, Yin S, Yan M, Win S, Aung Than T, Aghajan M, et al. Protective role of p53 in acetaminophen hepatotoxicity. *Free radical biology & medicine.* 2017;106:111-7. Epub 2017/02/16.
304. Martin-Murphy BV, Holt MP, Ju C. The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Toxicology letters.* 2010;192(3):387-94. Epub 2009/11/26.
305. Gonzalez-Ponce HA, Martinez-Saldana MC, Rincon-Sanchez AR, Sumaya-Martinez MT, Buist-Homan M, Faber KN, et al. Hepatoprotective Effect of *Opuntia robusta* and *Opuntia streptacantha* Fruits against Acetaminophen-Induced Acute Liver Damage. *Nutrients.* 2016;8(10). Epub 2016/10/27.
306. El-Agamy DS, Makled MN, Gamil NM. Protective effects of BML-111 against acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Journal of physiology and biochemistry.* 2014;70(1):141-9. Epub 2013/09/17.
307. Carvalho NR, Tassi CC, Dobraschinski F, Amaral GP, Zemolin AP, Golombieski RM, et al. Reversal of bioenergetics dysfunction by diphenyl diselenide is critical to protection against the acetaminophen-induced acute liver failure. *Life sciences.* 2017. Epub 2017/05/16.
308. Song E, Fu J, Xia X, Su C, Song Y. Bazhen decoction protects against acetaminophen induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice. *PLoS One.* 2014;9(9):e107405. Epub 2014/09/16.
309. Olivo R, Guarrera JV, Pysopoulos NT. Liver Transplantation for Acute Liver Failure. *Clinics in liver disease.* 2018;22(2):409-17. Epub 2018/04/02.
310. Keeffe EB. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology.* 2001;120(3):749-62. Epub 2001/02/17.
311. Jitraruch S, Dhawan A, Hughes R, Filippi C, Soong D, Philippeos C, et al. Alginate Microencapsulated Hepatocytes Optimised for Transplantation in Acute Liver Failure. *PLoS ONE.* 2014;9.
312. Mai G, Huy NT, Morel P, Mei J, Bosco D, Berney T, et al. Treatment of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated primary or immortalized xenogeneic hepatocytes. *Transplantation proceedings.* 2005;37(1):527-9. Epub 2005/04/06.
313. Forbes SJ, Gupta S, Dhawan A. Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. *Journal of hepatology.* 2015;62(1 Suppl):S157-69. Epub 2015/04/29.
314. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation.* 2006;82(4):441-9. Epub 2006/08/24.
315. Bhogal RH, Hodson J, Bartlett DC, Weston CJ, Curbishley SM, Haughton E, et al. Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS One.* 2011;6(3):e18222. Epub 2011/04/12.
316. Nagamoto Y, Takayama K, Ohashi K, Okamoto R, Sakurai F, Tachibana M, et al. Transplantation of a human iPSC-derived hepatocyte sheet increases survival in mice with acute liver failure. *Journal of hepatology.* 2016;64(5):1068-75. Epub 2016/01/19.
317. Seppen J, Filali EE, Elferink RO. Small animal models of hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol.* 2009;481:75-82. Epub 2008/12/20.
318. Follenzi A, Benten D, Novikoff P, Faulkner L, Raut S, Gupta S. Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice. *J Clin Invest.* 2008;118(3):935-45. Epub 2008/02/16.

319. Dirican A, Baskiran A, Dogan M, Ates M, Soyer V, Sarici B, et al. Evaluation of Potential Donors in Living Donor Liver Transplantation. *Transplantation proceedings*. 2015;47(5):1315-8. Epub 2015/06/22.
320. Lan X, Zhang H, Li HY, Chen KF, Liu F, Wei YG, et al. Feasibility of using marginal liver grafts in living donor liver transplantation. *World journal of gastroenterology*. 2018;24(23):2441-56. Epub 2018/06/23.
321. Perkins JD. Saying "Yes" to obese living liver donors: short-term intensive treatment for donors with hepatic steatosis in living-donor liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(6):1012-3. Epub 2006/05/25.
322. Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, et al. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(15):8536-41. Epub 2000/07/19.
323. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology*. 1996;111(6):1645-53. Epub 1996/12/01.
324. Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Seminars in liver disease*. 2001;21(1):89-104. Epub 2001/04/12.
325. Reid DT, Reyes JL, McDonald BA, Vo T, Reimer RA, Eksteen B. Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159524. Epub 2016/07/28.
326. Reid DT, Eksteen B. Murine models provide insight to the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Res Rev*. 2015;28(2):133-42. Epub 2015/10/24.
327. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):643-54 e1-9; quiz e39-40. Epub 2014/04/29.
328. Leoni S, Tovoli F, Napoli L, Serio I, Ferri S, Bolondi L. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World journal of gastroenterology*. 2018;24(30):3361-73. Epub 2018/08/21.
329. Wong RJ, Cheung R, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology*. 2014;59(6):2188-95. Epub 2014/01/01.
330. Machado MV, Michelotti GA, Xie G, Almeida Pereira T, Boursier J, Bohnic B, et al. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127991. Epub 2015/05/29.
331. Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology*. 1988;95(4):1056-62. Epub 1988/10/01.
332. Bhogal RH, Curbishley SM, Weston CJ, Adams DH, Afford SC. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(11):1303-13. Epub 2010/10/30.
333. Baccarani U, Donini A, Risaliti A, Piccolo G, Dialti V, Cautero N, et al. Steatotic versus cirrhotic livers as a source for human hepatocyte isolation. *Transplant Proc*. 2001;33(1-2):664-5. Epub 2001/03/27.
334. Diehl R, Ferrara F, Muller C, Dreyer AY, McLeod DD, Fricke S, et al. Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(2):146-79. Epub 2016/10/11.
335. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit*. 1995;17(6):584-91. Epub 1995/12/01.

336. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 1995;29(6):404-30. Epub 1995/12/01.
337. Kinugasa F, Nagatomi I, Ishikawa H, Nakanishi T, Maeda M, Hirose J, et al. Efficacy of oral treatment with tacrolimus in the renal transplant model in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Sci.* 2008;108(4):529-34. Epub 2008/12/23.
338. Korobko ES, Suprunenko EA, Vasil'ev AV. [Efficiency of Cell Transplantation in Repair of Mouse Liver Damage]. *Ontogenez.* 2017;48(1):55-62. Epub 2017/01/01.
339. Boudechiche L, Tranchart H, Branchereau S, Davit-Spraul A, Lainas P, Groyer-Picard MT, et al. Improvement of hepatocyte transplantation efficiency in the *mdr2^{-/-}* mouse model by glyceryl trinitrate. *Transplantation.* 2015;99(1):36-40. Epub 2014/10/24.
340. De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ, Smith AJ, Aten J, Oude Elferink RP. Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology.* 2000;119(6):1720-30. Epub 2000/12/13.
341. Roll GR, Willenbring H. Transplanted nonviable human hepatocytes produce appreciable serum albumin levels in mice. *Stem cell research.* 2010;5(3):267-70. Epub 2010/09/11.
342. Sevc J, Goldberg D, van Gorp S, Leerink M, Juhas S, Juhasova J, et al. Effective long-term immunosuppression in rats by subcutaneously implanted sustained-release tacrolimus pellet: effect on spinally grafted human neural precursor survival. *Exp Neurol.* 2013;248:85-99. Epub 2013/06/12.
343. Choe JY, Park KY, Park SH, Lee SI, Kim SK. Regulatory effect of calcineurin inhibitor, tacrolimus, on IL-6/sIL-6R-mediated RANKL expression through JAK2-STAT3-SOCS3 signaling pathway in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(1):R26. Epub 2013/02/15.
344. Herbst S, Shah A, Carby M, Chusney G, Kikkeri N, Dorling A, et al. A new and clinically relevant murine model of solid-organ transplant aspergillosis. *Dis Model Mech.* 2013;6(3):643-51. Epub 2012/12/25.
345. Backes AN, Tannuri AC, Backes FN, Queiroz AJ, Coelho MC, da Silva EL, et al. Effects of tacrolimus and insulin in a liver regeneration model in growing animals with portal vein stenosis: immunohistochemical and molecular studies. *Pediatr Surg Int.* 2014;30(4):423-9. Epub 2014/01/29.
346. Wu SC, Rau CS, Yang JC, Lu TH, Wu YC, Chen YC, et al. Identification of Circulating miRNAs in a Mouse Model of Nerve Allograft Transplantation under FK506 Immunosuppression by Illumina Small RNA Deep Sequencing. *Dis Markers.* 2015;2015:863192. Epub 2015/10/06.
347. Zamorano-Leon JJ, Hernandez-Fisac I, Guerrero S, Tamarit-Rodriguez J, Santos-Sancho JM, Sopena B, et al. New strategy of tacrolimus administration in animal model based on tacrolimus-loaded microspheres. *Transpl Immunol.* 2016;36:9-13. Epub 2016/04/23.
348. Nacif LS, David AI, Pinheiro RS, Diniz MA, Andraus W, Cruz RJ, Jr., et al. An analysis of tacrolimus-related complications in the first 30 days after liver transplantation. *Clinics (Sao Paulo).* 2014;69(11):745-9. Epub 2014/12/18.
349. Zhang X, Han S, Kang Y, Guo M, Hong S, Liu F, et al. SAHA, an HDAC inhibitor, synergizes with tacrolimus to prevent murine cardiac allograft rejection. *Cell Mol Immunol.* 2012;9(5):390-8. Epub 2012/08/28.
350. Uchiyama H, Kong Y, Kishihara K, Sugimachi K, Nomoto K. Approach to withdrawal from tacrolimus in a fully allogeneic murine skin graft model. *Immunology.* 1999;97(2):294-300. Epub 1999/08/14.
351. Spunda R, Hruby J, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. Immunosuppressive protocols with tacrolimus after cryopreserved aortal allotransplantation in rats. *PLoS One.* 2018;13(8):e0201984. Epub 2018/08/10.
352. Karadeniz E, Ozbilgin M, Egeli T, Agalar C, Cevlik AD, Aysal A, et al. Assessment of Effect of Intraperitoneal Tacrolimus on Liver Regeneration in Major (70%) Hepatectomy Model After Experimental Pringle Maneuver in Rats. *Transplantation proceedings.* 2019;51(4):1172-9. Epub 2019/05/19.

353. Jee-Heon Jeong[†], Simmyung Yook^{†,2,3}, and Youngro Byun^{*,2,4}. Dose Optimization of Tacrolimus for Improving Survival Time of PEGylated Islets in a Rat-to-Mouse Xenograft Model. *Macromolecular Research*. 2016;24(12):1047-55.

CAPÍTULO VII
7.APÊNDICES

Tabela 1. Transplante celular com hepatócitos primários ou linhagem celular hepática em camundongos.

Tipo de células	Concentração de células	Local de infusão	ref.
células-tronco adultas derivadas do estroma do tecido adiposo ou Linhagem de hepatocarcinoma - HepG2	1×10^6 cells in 200 μ L of saline	intraperitoneal	(338)
células-tronco adultas derivadas do estroma do tecido adiposo ou Linhagem de hepatocarcinoma - HepG2	5×10^6 cells in 50 μ L of saline	intraesplênico	(338)
Hepatócitos de camundongos	5×10^5 cells in 200 μ L of saline	veia porta	(339)
Hepatócitos de camundongos	2×10^6 cells	intraesplênico	(340)
Hepatócitos de camundongos	1×10^6 cells	intraperitoneal	(341)
Hepatócitos de camundongos	-	intraesplênico	(5)
Hepatócitos de camundongos Células tronco de fígado humano (HLSC - MCB)	6: $0,5 \times 10^6$ cells 8: $3,0 \times 10^6$ cells	Intravenoso veia da cauda	(6)
Células tronco derivadas da medula óssea	1.0×10^6 /body weight	intraperitoneal	(7)
Linhagem de hepatocarcinoma de camundongos (BW1J)	1×10^6 20 μ L cell suspension	Transplantation of cell sheets to the live	(8)
células-tronco derivadas do estroma da medula óssea (BM-MSCs)	5×10^5 cells	intraperitoneal ou veia da cauda	(9)
Hepatócitos humanos	5×10^5 cells	veia porta	(10)
Hepatócitos humanos	5.0 to 7.5×10^6 cells	intraesplênico	(11)
Hepatócitos humanos	1×10^6 cells	intraesplênico	(12)
Hepatócitos humanos	50×10^6 cells	intraperitoneal	(13)
Hepatócitos de ratos e humanos	7.5 or 10×10^5 cells	intraesplênico	(14)
Hepatócitos humanos	40×10^6 cells	intraperitoneal	(15)
Linhagem de hepatocarcinoma - HepG2	$3-6 \times 10^6$ cells	intraperitoneal	(16)
Linhagem de Hepatócitos humanos (h-hep)	2.5×10^6 cells	Subcutaneo	(17)
Linhagem de Hepatócitos humanos - HL7702	2.5×10^6 cells/ml	intraperitoneal	(18)
Hepatócitos humanos	1×10^6 cells	intraperitoneal	(20)
Hepatócitos humanos	1×10^6 cells	intraesplênico	(21)
Hepatócitos de porco ou humanos	2×10^6 cells	intraesplênico	(22)
Hepatócitos de porcos microencapsulados	1×10^7 cells/ml	intraperitoneal	(23)

Tabela 2. Trabalhos publicados com imunossupressão por Tacrolimo® em animais experimentais e humanos.

Espécie	Dose mg/kg de peso corporal	Via de administração	Tempo de administração	Níveis plasmáticos	Indicação	Ref.
macacos <i>cynomolgus</i>	0,5, 1,0 e 2,0	Oral	1 vez ao dia durante 90 dias após o transplante	Análise após 2 semanas (ng/ml) 1.40 ± 0.3 2.40 ± 1.07 8.90 ± 3.72	Transplante de rins	(337)
Ratos <i>Sprague-Dawley</i>	3,0 1,5	Subcutânea	24h/ 24h durante 5 dias 12/12 h durante 5 dias	39.5 ng/ml 9 hr após administração; 9 ng/ml após 24 horas 11.9 ng/ml 12 h após a injeção; 13.5 ng/ml após a segunda dose	Enxerto celular de precursores neuronais humanos	(342)
Camundongos C57BL/6	1,0	Intraperitoneal	4 vezes por semana	Não avaliado	Efeito inibitório na expressão de ptns RANKL, JAK2, STAT3 e SOCS3	(343)
Camundongos BALB/c	1,0	Intraperitoneal	1 vez ao dia	6.9 ng/ml	Aspergilose no transplante de pulmão	(344)
Ratos <i>Wistar</i>	1,0	gavagem	1 vez ao dia	Não avaliado	Regeneração hepática	(345)
Camundongos BALB/c	1,0	Subcutânea	3, 7 e 14 days after surgery	Não avaliado	Alotransplante de nervo	(346)
Ratos <i>Wistar Kyoto</i>	25,0	Subcutânea	1 injeção no primeiro dia e outra 12 dias após o transplante	(2-6 ng/ml)	Manter o efeito imunossupressor do medicamento com microesferas carregadas com Tacrolimo®	(347)

Humanos	0,1 and 0,15	Oral	12/12 h por 30 dias	Não avaliado	Transplante de fígado	(348)
Camundongos C57BL/6	1,0	Intraperitoneal	12/12 h	Não avaliado	Transplante de coração heterotópico	(349)
Camundongos C57BL/6	5,0	Intraperitoneal	Doses alternadas até 21 dias	Não avaliado	Transplante alogênico de pele	(350)
Ratos	0,2	Intramuscular	1 vez ao dia por 30 dias	Análise após 30 dias	Alotransplante de aorta	(351)
Ratos <i>Wistar Albino</i>	1,0	Intraperitoneal	1 vez ao dia	Não avaliado	Regeneração hepática após hepatectomia de 70%	(352)
Camundongos C57BL/6	0,1 0,5 2,0	Intraperitoneal	1 vez ao dia	Não avaliado	Xenotransplante de ilhotas pancreáticas	(353)