

Preservación de hepatocitos en soluciones de UW y HTK con adición de fluorocarbonos

Dr. Héctor Díliz-Pérez,* Dra. Guadalupe Valencia B,** Dr. Daniel Campos,* Dr. Héctor Díliz-Nava*

* Departamento de Trasplantes, **Departamento de Cirugía Experimental. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". México, D.F. Correspondencia: Dr. Héctor Díliz-Pérez. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Vasco de Quiroga 15. Del. Tlalpan. C.P. 14000, México D.F. México. Tels: (52)-5573-1200 ext. 2502, (52)-5655-9471, Fax: (52)-5655-9471. E-mail: dcampos@hotmail.com

Recibido para publicación: 27 de junio de 2000.

Aceptado para publicación: 17 de enero de 2001.

RESUMEN. *Antecedentes:* una de las limitantes del trasplante de hepatocitos es la corta supervivencia de los hepatocitos aislados. **Objetivo:** este estudio evalúa la utilidad de los fluorocarbonos adicionados a la solución de Universidad de Wisconsin (UW) y a la solución de Histidina-Triptófano-Ketoglutarato (HTK) en la preservación de hepatocitos. **Método:** se aislaron hepatocitos de ratas Fisher con la técnica de digestión por colagenasa, con una viabilidad mayor a 85% de acuerdo a la técnica de exclusión de azul de tripano. Se suspendieron 1.2×10^8 un volumen total de 20 mL de: HTK (HTK), HTK con perfluoro-n-octano (HTK+ PFC), UW (UW), UW con perfluoro-n-octano (UW-PFC) y medio E. Williams como grupo control (GC). Las cinco muestras de cada grupo se almacenaron a 4 °C durante 40 horas. Se realizaron determinaciones de viabilidad celular, formación de vesículas de membrana grandes y LDH extracelular a las: 0, 12, 24 y 36 horas. **Resultados:** la viabilidad de los hepatocitos fue menor en la solución UW comparada con el resto de los grupos de estudio a las 12 horas y 24 horas ($p < 0.05$ para ambas), pero a las 36 horas no existió diferencia entre los grupos. La presencia de vesículas de membranas grandes fue menor en la solución de UW + PFC que en el resto de las soluciones de estudio, pero esta diferencia sólo alcanzó significancia estadística al comparar soluciones con o sin fluorocarbonos en ninguno de los tiempos de estudio. **Conclusiones:** la adición de fluorocarbonos en la solución de UW disminuye la formación de vesículas de membrana grandes (daño irreversible), mejorando la viabilidad de los hepatocitos. Sin embargo, la adición de fluorocarbonos a cada solución no incrementa el tiempo de preservación con una viabilidad superior al 50% más allá de 24 horas.

Palabras clave: Hepatocitos, preservación, fluorocarbonos, UW, HTK.

SUMMARY Background: One of the limitations for hepatocyte transplantation is the short survival of isolated hepatocytes. **Objective:** We evaluated the utility of fluorocarbons (PFC) added to University of Wisconsin (UW) and histidine-tryptofane-ketoglutarate (HTK) solutions on hepatocyte preservation. **Method:** Rat hepatocytes were isolated by collagenase digestion technique, with a viability greater than 85% measured by tripan blue exclusion. We suspended 1.2×10^8 hepatocytes in 20 mL of: HTK solution, HTK with perfluoro-n-octane (HTK+ PFC), UW solution, and E. Williams medium as control group (CG). Five samples of each group were stored at 4°C for 40 h. We measured Cell viability, large membrane bleb formation and extracellular LDH at 0, 12, 24 and 36 hours. **Results:** Cell viability was lower in the UW at 12 h ($p < 0.05$) and 24 h ($p < 0.05$) compared to the rest of the study groups; at 36 h we found no differences in cell viability. There were fewer hepatocytes with large membrane blebs in UW+PFC; compared with the remainder of the solutions, but this difference was only reached statistical significance when compared to UW at 24 h ($p < 0.05$) and at 36 h ($p < 0.05$). When comparing groups with or without fluorocarbons LDH levels showed no difference at 0, 12, 24, and 36 h. **Conclusions:** The present study shows that the addition of fluorocarbons to UW solution diminishes large membrane formation (irreversible damage) and improves cell viability at 12 and 24 h. However, fluorocarbons added to both solutions failed to increase preservation time beyond 24 h.

Key words: Hepatocytes, preservation, fluorocarbons, UW, HTK.

INTRODUCCIÓN

El trasplante de hepatocitos ha demostrado aplicaciones potenciales en el tratamiento de enfermedades congénitas del metabolismo y falla hepática fulminante.¹⁻⁴ Los hepatocitos sobreviven pocas horas y requieren de condiciones ambientales complejas para conservar sus funciones en un medio de preservación. Esta corta supervivencia es una de las limitantes al uso de hepatocitos humanos en el tratamiento de enfermedades hepáticas.⁵ Por lo anterior, se han desarrollado diferentes métodos de preservación para prolongar la supervivencia de los hepatocitos en condiciones experimentales.

Actualmente existen varias soluciones de preservación con uso clínico: solución EuroCollins (EC), solución de la Universidad de Wisconsin (UW) y solución Histidina-Triptófano-Ketoglutarato (HTK). Éstas se han comparado con otras soluciones como: citrato y lactobionato,⁶ solución de Krebs-Henseleit,⁷ medio de Hans-HEPES,⁸ medio de Leibovitz,⁹ y manitol.¹⁰ La mayoría de los autores ha coincidido en que el tiempo de preservación más prolongado (24 a 30 horas) se ha presentado en los hepatocitos preservados en la solución de la Universidad de Wisconsin.

La muerte del hepatocito aislado en la solución de preservación se debe a varios factores⁸ entre los más importantes se pueden citar: edema celular y acidosis, el primero causado por disfunción de la bomba Na/K ATP producida por la hipotermia e hipoxia,¹⁰ la segunda es resultado del metabolismo anaerobio. Para prolongar la vida del hepatocito se han utilizado soluciones de preservación, porque éstas: inhiben la acidosis, mediante sistemas de amortiguamiento de pH;¹¹ mantienen un volumen intracelular adecuado, mediante compuestos osmóticos de alto peso molecular y proporcionan sustratos energéticos adecuados.¹⁰⁻¹² La hipotermia se usa con fines de preservación, porque disminuye los requerimientos energéticos al deprimir el metabolismo celular.¹⁰⁻¹¹

Los fluorocarbonos (PFC) son compuestos químicos sintéticos formados por carbono y flúor, en el cual se pueden disolver grandes cantidades de oxígeno, son biológica y químicamente inertes y proporcionan una presión potencial de oxígeno de 400 a 500 mm Hg con una curva de disociación de oxígeno lineal independiente a la temperatura.¹³ En la aplicación de estos compuestos con fines de perfusión y preservación de órganos, se ha escrito muy poco: en 1995 Ohya T. concluye que la perfusión hipotérmica usando PFC previene el daño celular hepático durante una hepatectomía prolongada *in situ*.¹⁴ En 1996 Kuroda Y. demuestra que la oxigenación del

intestino delgado, por medio de un almacén hipotérmico en dos capas (UW/PFC) hace posible prolongar el tiempo de preservación del intestino de una rata hasta 48 horas.¹⁵ También en 1996 Ralph M. demostró que la adición de PFC a soluciones de cardioplegia convencionales mejora la protección miocárdica, al mejorar la función ventricular izquierda postisquémica, disminuye el edema celular y genera mejores niveles de pH y tensión de oxígeno al final de la isquemia.¹³ A pesar de estos resultados, hasta ahora no se ha realizado ningún estudio, en el que se usen fluorocarbonos, con el objetivo de prolongar la preservación de hepatocitos aislados.

Aunque el papel exacto del ATP en el mantenimiento de la viabilidad celular en isquemia fría no está del todo esclarecido, es de conocimiento que esta molécula participa en la mayoría de los procesos celulares indispensables para mantener la viabilidad celular: bomba Na/K ATPasa,¹⁶ Ca⁺⁺ ATPasa,¹⁷ mantenimiento de redes de actinmiosina.¹⁸ Una alternativa viable es usar fluorocarbonos como fuente de oxígeno, para mantener niveles adecuados de ATP provenientes de la glucólisis aerobia, y así mantener las funciones vitales. Utilizando estos compuestos en combinación con sustancias que contengan un buen sistema de amortiguamiento del pH, y un adecuado aporte de sustratos energéticos (soluciones de preservación), se podría obtener una poderosa arma en la preservación de órganos y células durante periodos prolongados de tiempo. El objetivo de este estudio es evaluar si la adición de PFC a soluciones de preservación ya estandarizadas incrementa la viabilidad de los hepatocitos aislados, así como el tiempo global de preservación.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 25 ratas Fisher machos con un peso entre 250-300 g alimentadas a libre demanda. Para aislar los hepatocitos se empleó una rata por cada muestra, y una modificación de la técnica de perfusión de colagenasa descrita por Berry y Friend.¹⁹ Se determinó la viabilidad celular con la técnica de exclusión de azul de tripano. Se suspendieron los hepatocitos en la solución correspondiente a cada grupo, realizando diluciones hasta conseguir una concentración de 6 millones de hepatocitos por mL, en volumen total de 20 mL:

Grupo 1: solución HTK (HTK) (F. Kohler Chemie, Alemania). Grupo 2: solución HTK en combinación con perfluoro-n-octano al 5% peso/volumen (28.4 mL/L) con un aporte de oxígeno al 95% (1.5 L/min) (HTK+PFC). Grupo 3: solución UW (UW) (NPBI Emmer-Compascuum, Holanda). Grupo 4: solución UW en combinación con per-

fluoro-n-octano al 5% peso/volumen (28.4mL/L). Grupo 5: medio de E. Williams (Gibco BRL, USA) condicionado con suero bovino fetal 10% como grupo control (GC).

De cada grupo descrito se realizaron cinco muestras que se almacenaron a 4 °C durante 40 horas, se realizó determinación de LDH extracelular (Synchron Cx-7, Beckman) y de viabilidad celular con la técnica de exclusión de azul de tripano al 0.4% a las: 0, 12, 24 y 36 horas; en cada uno de estos periodos se estudiaron 100 células bajo microscopio de luz a 280X, para cada grupo se realizó un conteo del número y tamaño de las vesículas grandes formadas en la membrana celular. Las vesículas se clasificaron como pequeñas (10-25%), medianas (25-50%) y grandes (> 50% de diámetro celular). Siendo esto de mucha importancia, porque se considera que la formación de vesículas indica daño funcional reversible cuando éstas son pequeñas o medianas, e irreversible cuando son grandes.⁸

RESULTADOS

Para el análisis estadístico, no se asumió una distribución normal de los datos dado el tamaño reducido de las muestras. Se usaron pruebas de Kruskal-Wallis para comparar todos los grupos y pruebas de Mann-Whitney para la comparación independiente de dos grupos.

No se encontró una diferencia en la viabilidad basal ($p = 0.59$). A las 12, 24 y 36 horas de estudio, la viabilidad en el GC fue menor que en el resto de las soluciones, $p < 0.012$. A las 12 y 24 horas de estudio la viabilidad en UW fue menor que en el resto de los grupos de estudio ($p < 0.05$ para ambas comparaciones); a las 36 horas de estudio dicha diferencia perdió significancia estadística. Al comparar HTK+PFC con HTK en los diferentes tiempos de estudio no se encontraron diferencias significativas (*Cuadro 1*).

Con relación a la formación de vesículas grandes (hepatocitos no viables); a las 0 horas no se encontraron vesículas grandes en ninguno de los grupos. A las 12, 24 y 36 horas el número de hepatocitos con vesículas grandes fue mayor en el grupo control que en el resto de las soluciones, $p < 0.012$. La presencia de vesículas de membranas grandes fue menor en la solución UW+PFC que en el resto de las soluciones de estudio, pero esta diferencia sólo alcanzó diferencia significativa al compararla con UW a las 24 horas ($p < 0.05$) y a las 36 horas ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias entre HTK+PFC y HTK en ninguno de los tiempos de estudio (*Cuadro 2*).

Los niveles de LDH extracelular al comparar soluciones con o sin fluorocarbonos no mostraron diferencias a las 0, 24 ni 36 horas. A las 12 horas los niveles de LDH fueron menores en UW comparados con el resto de los grupos de estudio ($p < 0.016$) (*Cuadro 3*).

CUADRO 1

MEDIANA E INTERVALO EN PORCENTAJE DE HEPATOCITOS VIABLES EN SOLUCIONES DE PRESERVACIÓN A 4° C DE ACUERDO A LA TÉCNICA DE EXCLUSIÓN DE AZUL DE TRIPANO EN DIFERENTES TIEMPOS DE ESTUDIO. (N = 5 POR GRUPO)

	0 horas		12 horas		24 horas		36 horas	
	Med	(Min-Max)	Med	(Min-Max)	Med	(Min-Max)	Med	(Min-Max)
GC	88.0	86.0-90.0	51.9*	40.6-63.1	32.8*	28.7-40.0	20.4*	16.7-25.7
HTK n	90.0	86.0-92.6	68.2	65.8-69.3	56.7	52.5-62.8	37.5	32.7-42.0
HTK+PFC	89.2	88.3-93.7	69.9	67.8-72.3	52.3	48.5-54.6	39.5	36.5-40.2
UW	89.7	87.0-90.2	63.7 ^a	63.1-65.4	45.5 ^{**}	32.9-52.1	38.2	32.1-41.3
UW+PFC	88.5	86.5-89.8	67.9	65.7-69.1	53.8	49.4-56.2	39.8	36.7-41.5
Valor p•	.599		.0004		.0008		.0092	

• Comparación de todas las soluciones, prueba de K-W.

* Comparación del GC contra el resto de las soluciones, donde $p < 0.012$.

^a Comparación de UW contra el resto de las soluciones de estudio a las 12 horas, donde $p < 0.05$.

^{**} Comparación de UW contra el resto de las soluciones de estudio, donde $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

El aporte de oxígeno a los tejidos preservados en hipotermia, podría ser un elemento importante en la prolongación de los tiempos de preservación, porque al activarse el metabolismo aeróbico se podría generar ATP para preservar funciones celulares vitales. En general, la adición de fluorocarbonos de la manera descrita en este estudio,

no produce una marcada mejoría en la viabilidad de los hepatocitos, tampoco incrementa el tiempo de preservación en las soluciones estudiadas. Aunque es difícil ofrecer explicaciones puntuales en la ausencia de estudios funcionales, es sabido que la hipotermia disminuye el metabolismo celular^{10,11} y el consumo de oxígeno,²⁸ por lo que el metabolismo aeróbico también está y es factible que el oxígeno aportado no sea de gran utilidad.

CUADRO 2.

MEDIANA E INTERVALO DE HEPATOCITOS CON VESÍCULAS DE MEMBRANA GRANDES EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE ESTUDIO. (N = 5 POR GRUPO)

	12 horas		24 horas		36 horas	
	Med	(Min-Max)	Med	(Min-Max)	Med	(Min-Max)
GC	26*	20-31	70*	68.76	85*	79-89
HTK	8	6-12	6	4-16	20	20-42
HTK+PFC	12	10-20	12	8-20	24	22-24
UW	8	2-12	18	6-20	24	22-26
UW+PFC	6	4-10	6•	4-12	18••	12-24
Valor p•	.0018		.0022		.0031	

• Comparación de todas las soluciones, prueba de K-W.

* Comparación de GC contra el resto de las soluciones, donde $p < 0.012$.

• Comparación entre UW+PFC con UW a las 24 horas, donde $p = 0.05$.

•• Comparación entre UW+PFC con UW a las 36 horas, donde $p=0.05$.

CUADRO 3.

MEDIANA Y RANGO DE NIVELES DE DESHIDROGENASA LÁCTICA (DHL) EXTRACELULAR EN UI/ML EN LOS MEDIOS DE PRESERVACIÓN CON HEPATOCITOS. (N = 5 POR GRUPO)

	0 horas		12 horas		24 horas		36 horas	
	Med	(Min-Max)	Med	(Min-Max)	Med	(Min-Max)	Med	(Min-Max)
HTK	1267	921-1667	2315	2143-2435	2670	2159-2761	3663	3562-3728
HTK+PFC	1233	1123-1234	2425	1975-2435	2521	2114-2736	3642	3415-3791
UW	1314	1120-1384	1845*	1667-1969	2761	2676-2812	3498	3400-3614
UW+PFC	1410	1279-1714	2115	2045-2135	2678	2148-3049	3694	3562-3728
Valor p•	.1830		.0033		.3091		.0617	

• Comparación de todas las soluciones, prueba de K-W.

* Comparación de UW contra el resto de las soluciones de estudio, donde $p < 0.016$.

Al analizar los resultados obtenidos con relación a la solución de UW se encontró que la viabilidad fue significativamente menor en esta solución hasta las 24 horas de estudio, y que la adición de fluorocarbonos a esta solución mejoró la viabilidad de los hepatocitos, así como disminuyó la formación de vesículas de membrana grandes, las cuales son compatibles con daño irreversible. Estos hallazgos indican que los fluorocarbonos podrían ser útiles en la preservación de hepatocitos en solución de UW. Sin embargo, dado el reducido tamaño de nuestra muestra son necesarios más estudios para validar los hallazgos anteriores.

La LDH es una enzima exclusivamente intracitoplasmática, la determinación de esta enzima en el medio extracelular indica que un número de células dañadas se ha desintegrado, en este estudio se observa un incremento progresivo de LDH en los medios de preservación estudiados con relación al tiempo de preservación. Sin embargo, no se encontraron diferencias importantes entre los grupos estudiados, por lo que se concluyó que la lisis de los hepatocitos preservados es progresiva en las diferentes soluciones y no se ve modificada por la adición de fluorocarbonos.

Otras publicaciones reportan viabilidades de hepatocitos que varían entre del 27% a 78% después de 24 horas de preservación en UW.²⁹ De acuerdo a nuestros resultados, el tiempo máximo de preservación con o sin la adición de fluorocarbonos con una viabilidad celular mayor al 50% no supera las 24 horas en promedio, por lo que el uso de hepatocitos preservados más allá de 24 horas no es adecuado. La adición de fluorocarbonos con fines de preservación, como fuente de oxígeno en las soluciones, cuenta con una fuerte base teórica. Sin embargo, no prolonga el tiempo de preservación de los hepatocitos, en la manera descrita en este estudio.

REFERENCIAS

- Gupta S, Aragona E, Vemeru RP, Bhargava K, Burk R, et al. Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implications in gene therapy and liver repopulation. *Hepatology* 1991; 14(1): 144-9.
- Oren R, Dabeva M, Petkov P, Hurston E, Laconi E, et al. Restoration of serum albumin levels in nagase analbuminemic rats by hepatocyte transplantation. *Hepatology* 1999; 29(1): 75-81.
- Hirai S, Kasai S, Mito M. Encapsulated hepatocyte transplantation for the treatment of D-galactosamine-induced acute hepatic failure in rats. *Eur Surg Res* 1993; 25: 193-202.
- Makowa L, Rotstein LE, Falk RE, Falk JA, Nossal NA, et al. Allogenic and xenogenic hepatocyte transplantation in experimental hepatic failure. *Transplantation* 1980; 30(6): 429-35.
- Gupta S, Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation: back to the future. *Hepatology* 1992; 15(1): 156-61.
- Michell ID, Chimpman JK, McMaster P. The isolated hepatocytes preservation model: a comparison of hypertonic citrate and lactobionate solutions. *Transplant Proc* 1990; 22(5): 1312-3.
- Viebahn R, de Groot H, Lauchart W, Becker HD. Primary hepatocyte culture: a model for the study of liver preservation. *Transplant Proc* 1990; 22(2): 511-2.
- Sorrentino D, Van Ness K, Ribeiro I, Miller C. Functional and morphological features of isolated hepatocytes preserved in University of Wisconsin Solution. *Hepatology* 1991; 14(2): 331-9.
- Poullain MG, Fautrel A, Guyomard C, Chesne C, Grislain L, Guillouzo A. Viability and primary culture of rat hepatocytes after hypothermic preservation: the superiority of the Leibovitz medium over the University of Wisconsin solution for cold storage. *Hepatology* 1992; 15(1): 331-9.
- Calvo MA, Guillén A, Toledo-Pereyra LH, Cejalvo D, Lloris JM. Forty-eight hours liver preservation and subsequent testing of isolated hepatocytes: an evaluation of University of Wisconsin vs. M-400 solution. *Transplant Proc* 1993; 25(6): 3020-1.
- Schilling M, Redaelli C, Friess H, Laeuffer J, Buchler M. Temperature dependence of proton buffering capacity of HTK, Euro-Collins and UW solution. *Transplant Proc* 1996; 28(1): 343-4.
- Holscher M, Groenewoud AF. Current status of the HTK solution for organ preservation. *Transplant Proc* 1991; 23(5): 2334-7.
- Mosca R, Rohs TJ, Waterford RR, Childs KF, Brunsting LA, et al. Perfluorocarbon supplementation and posts ischemic cardiac function. *Surgery* 1996; 120(2): 197-203.
- Ohya T, Ohwada S, Kawashima Y. The effect of hypothermic perfusion with oxygenated perfluorochemical during *in situ* extended hepatectomy of canine liver. *J of Am Coll Surg* 1996; 182: 219-25.
- Kuroda Y, Sakai T, Suzuki Y, Tanioka Y, Matsumoto S et al. Small bowel preservation using a cavitory two layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 1996; 61(3): 370-3.
- Seya K, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Mitochondrial function in liver preservation at low temperatures. *Transplant Proc* 1996; 28(1): 327-8.
- Thomas CE, Reed DJ. Current status of calcium in the hepatocellular injury. *Hepatology* 1989; 10: 375-84.
- Weeds A. Actin binding proteins regulators of cell architecture and motility. *Nature* 1982; 296: 811-816.
- Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biology* 1969; 43: 506-16.
- Michell A, Vons C, Icard P, Hillaire S, Hazebroucq G, et al. Efficacy of a modified University of Wisconsin solution in rat liver preservation: its prevailing role on vascular endothelium rather than hepatocyte protection. *Transplant Proc* 1990; 22(5): 2291-2.
- Vreugdenhil PK, Marsh DC, Mack VE, Belzer FO, Southard JH. Effect of fasting on hepatocytes cold stored in University of Wisconsin solution for 24 hours. *Transplantation* 1993; 56(6): 1454-59.
- Dich J, Vind C, Niels G. Long term culture of hepatocytes: effect of hormones on enzyme activities and metabolic capacity. *Hepatology* 1988; 8(1): 139-45.
- Den Buttr G, Saunder A, Marsh DC, Belzer FO, Southard. Cold storage solution for liver preservation. *Transplant Proc* 1996; 25(6): 3022.
- Vine W, Thoma WJ, Ugurbil K. Biochemical differences between Ringer's lactate and Collin's solution in hepatic preservation: detection by P magnetic resonance spectroscopy. *Transplant Proc* 1989; 21(1): 1338-9.
- Nedelec JF, Capron-Laudereau M, Adam R, Dimicoli J, Gugenheim J et al. Liver preservation: P and CNMR stereoscopic assessment of liver energy and metabolism after cold storage. In: Collins and Marshall. Ringer's lactate, UW and modified UW solutions. *Transplant Proc* 1989; 21(1): 1327-29.
- Sumimoto R, Linell S, Southard JH, Belzer FO. A comparison of histidine-lactobionate and UW solution in 48 hour dog liver preservation. *Transplantation* 1992; 54(4): 610-14.
- Eberl T, Schmid T, Wodlinger R, Hengster P, Herold M, et al. Which organ preservation solution best protects vascular endothelium? *Transplant Proc* 1993; 25(6): 3019.
- Fujita S, Nakamura K, Tanaka K, Ozawa K. Isolated perfusion of rat livers: effect of temperature on O₂ consumption, enzyme release, energy store and morphology. *Nippon Geka Hokan* 1993; 62(2): 58-70.
- Olinga P, Merema M, Slooff M, Meijer D, Groothuis G. Influence of 48 hours of cold storage in University of Wisconsin organ preservation solution on metabolic capacity of rat hepatocytes. *Hepatology* 1997; 27: 735-743.