

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular

**O PAPEL DAS PLAQUETAS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA
EM MODELO DE HEPATECTOMIA DE 90%**

Mónica Luján López

*Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Genética e Biologia Molecular*

Orientadora: Ursula Da Silveira Matte

Porto Alegre, Março de 2012

Este trabalho foi realizado no Centro de Terapia Gênica, localizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA-UFRGS), com recursos do CNPq, FIPE/HCPA e PRONEX.

Agradecimentos

À Dra Ursula Matte, por ter aceitado me orientar, pelas oportunidades oferecidas, pelo ensino, e principalmente por ter confiado no meu trabalho.

A todos os colegas do Centro de Terapia Gênica (CTG) pelo companheirismo, pela troca de idéias e sugestões. Ao Guilherme Baldo por ter-me ajudado com as figuras do artigo.

Ao grupo do “fígado” pelas horas de cirurgias fazendo delas divertidas, pela ajuda e colaboração no projeto.

Aos professores do PPGBM pelos conhecimentos repassados durante este período. Ao Elmo, por estar sempre dispostos a ajudar.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela infra-estrutura essencial ao desenvolvimento deste trabalho. Principalmente aos laboratórios do Centro de Terapia Gênica e a Unidade de Experimentação Animal.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de mestrado.

E finalmente à toda minha família, pelo amor, apoio incondicional e compreensão.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1. Introdução.....	9
1.1. Insuficiência hepática aguda.....	9
1.1.1. Mecanismo do dano hepático.....	11
1.2. Tratamento para insuficiência hepática aguda: Terapia celular.....	15
1.2.1. Tecnologia de encapsulação: Estudo do efeito parácrino.....	17
1.3. Plaquetas.....	19
2. Objetivos.....	24
2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. Artigo.....	26
4. Discussão.....	42
5. Conclusão.....	50
6. Referências bibliográficas.....	51

Lista de Abreviaturas

5HT	5-hidroxitriptofano
5HT2B	Receptor 5-hidroxitriptofano tipo 2 B
Akt	Proteína Quinase Serina/Treonina
EC	<i>Empty Capsules</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
ERK	Quinase Regulada por Sinais Extracelulares
FM	Fração Mononuclear
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
HP	Hepatectomia Parcial
IGF-1	Fator de Crescimento do Tipo Insulina 1
IHA	Insuficiência Hepática Aguda
IL10	Interleucina 10
IL6	Interleucina 6
MOT	Medula Óssea Total
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa beta
PDGF	Fator de Crescimento derivados de Plaquetas
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PRP	Plasma Rico em Plaquetas / <i>Platelet Rich-Plasma</i>
SOCS	Supressoras de Sinalização de Citocina
STAT3	Tradutor de Sinais e Ativador da Transcrição 3
TGF- β	Fator Transformador de Crescimento beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WBM	<i>Whole Bone Marrow</i>

Lista de figuras

Figura 1 – Etiologia da Insuficiência Hepática Aguda (IHA) em adultos e crianças.....	10
Figura 2 – Mecanismo da Insuficiência Hepática Aguda (IHA).....	12
Figura 3 – Regeneração hepática ativada após hepatectomia parcial ou dano hepático.....	14
Figura 4 – Curva de sobrevida pós-hepatectomia de 85% e 90%.....	18
Figura 5 – Sobrevida em 10 dias após hepatectomia de 90% conforme o tipo de célula encapsulada.....	19
Figura 6 – Esquema da regeneração hepática promovida pelas plaquetas.....	22
Figura 7 – Aspecto histológico do fígado.....	22

RESUMO

A hepatectomia de 90% em murinos é um modelo de insuficiência hepática aguda. Recentemente, tem sido demonstrado que as plaquetas possuem um efeito importante na regeneração hepática. As plaquetas promovem a regeneração de tecidos através da liberação de fatores de crescimento tais como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e a Serotonina. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do plasma rico em plaquetas (PRP) em modelo de hepatectomia de 90% em ratos. Para isso, PRP ou medula óssea total (WBM) foram imobilizados em microcápsulas de alginato de sódio implantadas no peritônio de ratos imediatamente após a hepatectomia. O grupo controle recebeu cápsulas vazias (EC). Os animais foram sacrificados às 6, 12, 24, 48, 72 horas pós-hepatectomia (n=5-8/grupo/tempo) para avaliar a taxa de regeneração hepática, o índice mitótico, o índice de marcação com 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), HGF sérico, e a expressão no fígado remanescente de *5Ht2b* e *Pdgf*. A taxa de sobrevivência em 10 dias foi avaliada em outro grupo de animais (n=20/grupo). Foi observado que o grupo PRP apresentou a maior taxa de sobrevivência aos 10 dias apesar da menor taxa de regeneração hepática em todos os tempos. Já o grupo EC mostrou uma taxa de regeneração maior nas primeiras 72 horas. O índice mitótico foi maior para o grupo PRP às 48 horas, porém o índice de BrdU não foi diferente entre os grupos em nenhum tempo. A expressão de *5Ht2b* e *Pdgf* foi elevada no grupo PRP às 72 horas, entretanto o HGF sérico não apresentou diferenças entre os grupos. Estes resultados sugerem que o efeito benéfico do PRP pode ser mediado pelo incremento gradual e uniforme da taxa de regeneração e por uma resposta a fatores mitogênicos como a serotonina e o PDGF.

ABSTRACT

Ninety percent hepatectomy in rodents is a model for acute liver failure. Recently, it has been reported that platelet has a strong effect enhancing liver regeneration, due to its several growth factors such as Platelet Derived Growth Factor (PDGF) and serotonin. The aim of this study was to investigate the role of Platelet-Rich Plasma on 90% hepatectomy in rats. Platelet rich-plasma (PRP) or Whole Bone Marrow (WBM) were microencapsulated in sodium alginate and implanted in the peritoneum of rats immediately after 90% hepatectomy. Control group received empty capsules (EC). Animals were sacrificed at 6, 12, 24, 48, and 72 hours post hepatectomy (n=5-8/group/time) to evaluate liver regeneration rate, mitotic index, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labeling index, serum HGF, and *5Ht2b* and *Pdgf* expression in liver. Survival rate in 10 days was also evaluated in a different set of animals (n=20/group). PRP group showed the highest survival rate at 10 days despite the lowest liver regeneration rate at any time point. EC group showed the highest regeneration rate in the first 72 hours. Mitotic index was highest in PRP group at 48 hours although BrdU index did not show any difference among groups. Gene expression of *5Ht2b* and *Pdgf* was both up-regulated at 72 hours in PRP group, whereas serum HGF did not show any differences among groups. These results suggest that the beneficial effect of PRP may be mediated by a gradual increase in the regeneration rate and a response to mitogenic factors such as serotonin and PDGF.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Insuficiência hepática aguda

O fígado tem um papel central na homeostase metabólica do organismo, já que é responsável pelo metabolismo, síntese, armazenamento e redistribuição dos nutrientes, carboidratos, gorduras e vitaminas. É também o principal órgão de desintoxicação, removendo resíduos e xenobióticos por conversão metabólica e através da excreção biliar (Taub, 2004).

A insuficiência hepática aguda (IHA), também conhecida como falência hepática fulminante, é uma síndrome de alto risco, caracterizada pela repentina e grave necrose hepatocitária, que leva a uma perda da função hepática em indivíduos previamente saudáveis (Lee et al., 2008; Nguyen e Vierling, 2011). As principais manifestações da IHA incluem icterícia, coagulopatia e encefalopatia hepática (Sundaram e Shaikh, 2011). Esta condição é extremamente grave e apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade. Nos Estados Unidos, a incidência de IHA é estimada em 2000 a 3000 casos por ano (Sundaram e Shaikh, 2011) o que representa 0,1% de todas as mortes, e 6% das mortes relacionadas ao fígado (Sass e Shakil, 2005).

A síndrome tem diversas etiologias que mostram uma ampla distribuição geográfica. Na Europa ocidental e nos Estados Unidos as causas predominantes são toxicidade por acetaminofeno (acetil para-aminofenol, APAP) e reações idiossincráticas a drogas (Nguyen e Vierling, 2011). Em neonatos as principais causas de IHA são as doenças metabólicas. Em crianças, as causas mais comuns identificadas são vírus, hepatotoxicidade devido a drogas e hepatites auto-imunes (Devictor et al., 2011). Aproximadamente em 17% dos casos as causas são desconhecidas (Sass e Shakil, 2005) (Figura 1). Em nosso meio, a hepatite viral A é a principal causa de IHA em crianças. Entre 1996 e 2006, de 33 crianças com hepatite fulminante avaliadas pelo Programa de Transplante Hepático Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 13 (39,4%) tinham hepatite A (Ferreira et al., 2008). Na Argentina, 60% dos casos pediátricos de IHA submetidos a transplante hepático foram por vírus A (Centeno et al., 2002).

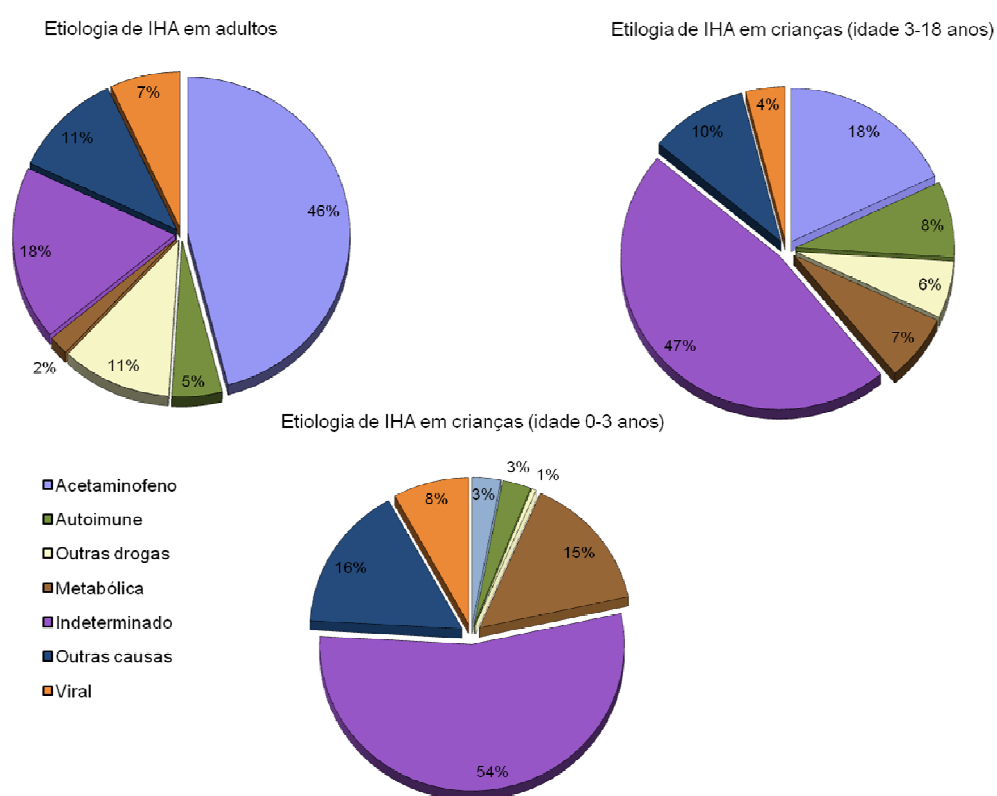


Figura 1 – Etiologia da Insuficiência Hepática Aguda (IHA) em adultos e crianças. (Adaptado de Nguyen e Vierling, 2011).

Embora nas últimas décadas tenha-se conseguido avanços no manejo clínico dos pacientes com essa síndrome, o único tratamento eficiente ainda é o transplante hepático (Sass e Shakil, 2005).

Atualmente, são relatadas taxas de sobrevida espontânea de 40%. Cerca de 25% dos pacientes nos Estados Unidos são submetidos a transplante ortotópico de fígado, e 30% morrem sem receber o transplante (Lee et al., 2008; Nguyen e Vierling, 2011). Com o transplante de fígado tem-se atingido de 80 a 90% de sobrevivência. Contudo, a falta de órgãos disponíveis em tempo hábil dificulta o emprego do transplante (Polson e Lee, 2005). Isto enfatiza a necessidade de desenvolver novas estratégias para o manejo e tratamento de IHA.

1.1.1. Mecanismos do dano hepático

O fígado é composto por vários tipos celulares, os principais são as células parenquimatosas, chamadas hepatócitos e correspondem 80% da massa hepática. Os 20% restante corresponde às células não-parenquimatosas, e incluem as células endoteliais, células de Kupffer (macrófagos do fígado), linfócitos e células estreladas (Taub, 2004).

Os hepatócitos desempenham um papel central no metabolismo do organismo. Por exemplo, o fígado é responsável pelos níveis de glicose plasmática e amônia. Portanto, a perda da função hepática leva a uma “encefalopatia hepática” e, eventualmente, coma (Michalopoulos, 2007). Embora os hepatócitos adultos, normalmente, não entrem em divisão celular, estas células mantêm a capacidade de proliferação em resposta a dano por tóxicos e infecção. A perda da massa hepática ativa uma resposta inflamatória que remove os debris celulares, seguido por uma resposta regenerativa (Michalopoulos, 2007; Gilgenkrantz e Collin del’Hortet, 2011).

Na insuficiência hepática aguda, como no choque séptico, ocorre a ativação da síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), resultando na disfunção no sistema circulatório com falência múltipla de órgãos (Antoniades et al., 2008). Para controlar o dano hepático, o sistema imune (inato e adaptativo) converge nas vias de morte celular incluindo apoptose, necrose e necroptose também conhecida como necrose programada (Figura 2) (Rutherford e Chang, 2008; Wu et al., 2010). As citocinas envolvidas nestes processos estão intimamente relacionadas com a subsequente regeneração do fígado (Taub, 2004; Michalopoulos, 2007).

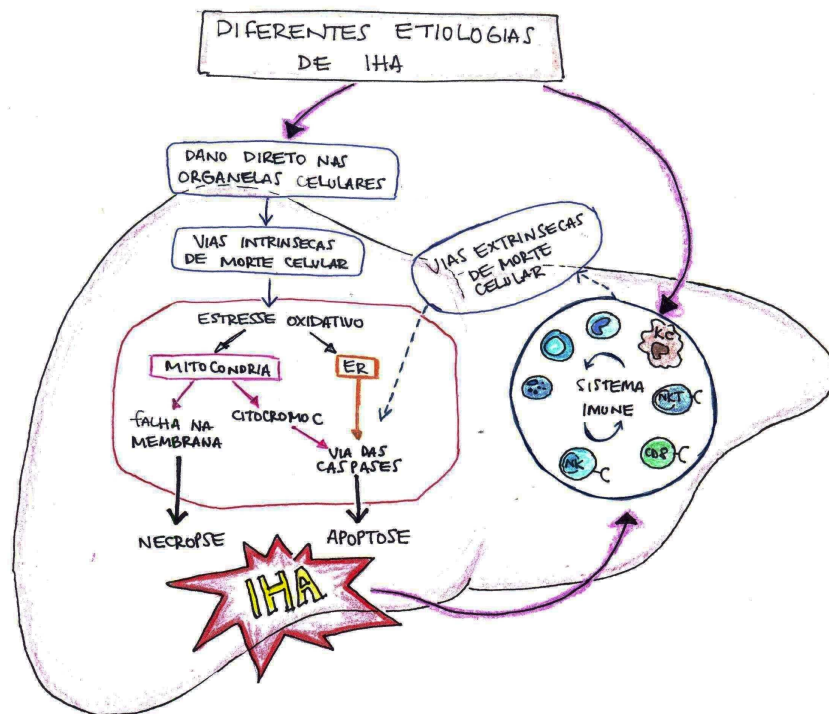


Figura 2 – Mecanismo da Insuficiência Hepática Aguda (IHA). Primeiro, patógenos ou substâncias tóxicas danificam as organelas celulares perturbando a homeostase intracelular ativando as vias apoptóticas. Segundo, a resposta imune (inata e adaptativa) converge nas vias de sinalização de morte celular incluindo apoptose, necrose, e necroptose (necrose programada), levando a dano hepático mediado pelo sistema imune. KC, células de Kupffer; NK, *natural killer*; ER, Reticulo Endoplasmático. (Adaptado de Wu et al., 2010).

O estudo dos mecanismos da regeneração hepática se baseia em modelo animal cirúrgico, o qual consiste na remoção de 70% ou 90% do fígado (Higgins e Anderson 1931; Gaub et al., 1984). Depois do dano hepático, ou hepatectomia parcial, o fluxo sanguíneo pela veia porta aumenta enquanto que a capacidade do fígado para detoxificação diminui. Assim, as endotoxinas ou patógenos derivados do intestino danificam organelas celulares, causando interrupção da homeostase intracelular hepatocitária (Wu et al., 2010). Além disso, fatores derivados do intestino, como lipopolissacarídeos (LPS), e membros da Cascata de Complemento (C3 e C5), chegam ao fígado aonde ativam as células de Kupffer (Taub, 2004; Wu et al., 2010). Uma vez ativadas, estas células secretam grandes quantidades do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e de Interleucina 6 (IL6) (Taub, 2004; Michalopoulos, 2007).

Estudos recentes em modelo animal e humanos indicam que o TNF- α tem um papel crucial na patogênese da IHA, através da ativação das vias pró-apoptóticas (Antoniades et al., 2008; Ito et al., 2009). Os efeitos do TNF- α no fígado dependem de sua capacidade de ativar Fator Nuclear Kappa beta (NF- κ B). Na ausência de ativação de NF- κ B, o TNF- α induz o hepatócito a entrar em apoptose (Michalopoulos, 2010). Cressman et al. (1996) e Louis et al. (1997) observaram que a diminuição de TNF- α , mediado por IL6 e Interleucina 10 (IL10), melhora o dano agudo do fígado em modelos murino de IHA. A ação de IL6 através da interação com o receptor gp130, leva à fosforilação do Tradutor de Sinais e Ativador da Transcrição 3 (STAT3) que ativa genes da resposta de fase aguda, mecanismos de redução da apoptose de hepatócitos e induz a regeneração hepática (Wuestefeld et al., 2003; Taub, 2004). Estes primeiros eventos são conhecidos como a fase de “priming”, no qual os hepatócitos ficam mais sensíveis a fatores de crescimento e assim a entrar em G1 (Figura 3) (Fausto, 2000; Michalopoulos, 2007).

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) se liga às células endoteliais nos sinusoides hepáticos, provocando a secreção do Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) pelas células estreladas (Michalopoulos, 2007). Este fator de crescimento estimula diretamente a proliferação dos hepatócitos (Taub, 2004). O HGF é secretado como pró-HGF e depende da ativação por Plasminogênio para produção da sua forma ativa que irá se ligar ao seu receptor Met e assim induzir a síntese de DNA (Figura 3) (Shanmukhappa et al., 2009; Nakamura et al., 2011). O receptor Met além de seus efeitos mitogênicos através das vias fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), S6 quinase e Akt (Okano et al., 2003), também previne a trimerização do receptor Fas, tendo assim um efeito anti-apoptótico (Wang et al., 2002). A ação concertada da IL6 produzida pelas células de Kupffer e do HGF secretado pelas células estreladas desencadeia o processo inicial de regeneração dos hepatócitos que ocorre nas primeiras horas após a lesão (Michalopoulos, 2007).

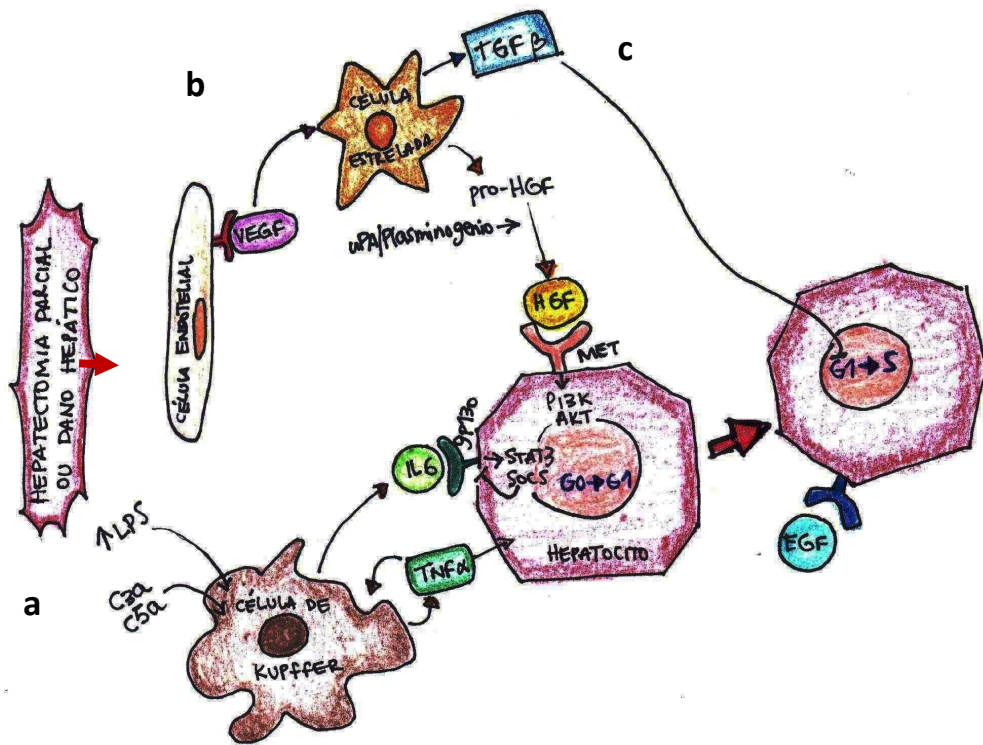


Figura 3 – Regeneração hepática ativada após hepatectomia parcial ou dano hepático. **a.** Após o dano no fígado, lipopolisacarídeos (LPS) derivados do intestino e fatores do Sistema de Complemento C3a, C5a, ativam as células de Kupffer (KC), o qual produz Fator de Necrose Tumoral (TNF) α . Este por sua vez, regula a expressão de Interleucina (IL) 6 pelas KC. TNF α e IL6 ativam os hepatócitos através do Tradutor de Sinais e Ativador da Transcrição (STAT) 3. **b.** O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) se liga às células endoteliais, que provocam a liberação do precursor do Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) pelas células estreladas. O Ativador Plasminogênio tipo urokinase (uPA) e plasminogênio clivam o pro-HGF, o qual libera o HGF que se liga ao receptor Met no hepatócito ativando fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K) e Akt. Outros fatores também são liberados pelo duodeno como o Fator de Crescimento Epidermal (EGF). As citocinas e os fatores de crescimento atuam de forma coordenada para iniciar a entrada dos hepatócitos quiescentes (fase G₀) no ciclo celular desde G₁ à fase S. Isto leva a síntese de DNA e proliferação dos hepatócitos. **c.** Para sinalizar o término da proliferação o Fator Transformador de Crescimento (TGF) β e o Supressor de Sinalização de Citocinas (SOCS) 3, são ativados e bloqueiam a replicação. (Adaptado de Taub, 2004 e Clavien, 2008)

As proteínas Supressoras de Sinalização de Citocina (SOCS) que regulam negativamente a sinalização de IL6, e evitam a fosforilação de proteínas STAT e de NF- κ B, junto com o Fator Transformador de Crescimento beta (TGF- β) controlam o término do processo regenerativo. A sinalização de IL6 no fígado causa uma rápida produção de SOCS3, desse modo bloqueando sua própria expressão (Campbell et al., 2001; Yoshimura et al., 2007). O TGF- β é secretado pelas células não-parenquimatosas, e atinge um pico 72 horas após hepatectomia

de 70%. Neste momento, ocorre a formação da nova rede de sinusóides e a síntese de matriz extra-celular, processos nos quais o TGF- β está envolvido (Taub, 2004; Michalopoulos, 2007).

Na IHA há uma falha na regeneração atribuída a outras circunstâncias. Por exemplo, em situação de SIRS as citocinas IL10 e TGF- β são secretadas em grandes quantidades, como parte da resposta antiinflamatória compensatória (CARS). Este mecanismo de defesa acaba em prejuízo na função celular imune. Assim, parece que as citocinas antiinflamatórias que fornecem proteção hepática no início de IHA, podem causar paralisia imunológica sistêmica subsequente, que leva a um pior prognóstico (Possamai et al., 2010).

1.2. Tratamento para insuficiência hepática aguda: Terapia celular

É importante ressaltar que a insuficiência hepática é potencialmente reversível, devido à capacidade regenerativa do fígado. Assim, o desenvolvimento de alternativas que possam manter ou restaurar a função do fígado após o dano hepático poderia ajudar pacientes com IHA. Nos últimos anos, diversas propostas terapêuticas têm sido estudadas, incluindo a terapia celular, seja por transplante de hepatócitos ou uso de células tronco.

Nas últimas décadas, o transplante de hepatócitos tem sido aplicado em inúmeros experimentos (Horslen e Fox, 2004; Fitzpatrick et al., 2009; Chen et al., 2010), como também no tratamento de pacientes com doenças crônicas (Dhawan et al., 2005; Méndez-Sanchez et al., 2005; Khan et al., 2008b), metabólicas (Khan et al., 2008a; Ellor et al., 2008) e com insuficiência hepática aguda (Bilir et al., 2000; Meyburg et al., 2009; Li et al., 2012). O maior problema no transplante de hepatócitos é a disponibilidade de fígados para o isolamento das células (Muraca, 2011). Além disso, existe uma limitação relacionada ao número necessário de células isoladas para a efetividade do transplante (Horslen e Fox, 2004). A manutenção de culturas primárias de hepatócitos é dificultada pela baixa viabilidade dessas células *in vitro* e pela perda de suas funções celulares, caracterizada como desdiferenciação (Muraca, 2011).

Células derivadas de medula óssea são consideradas uma fonte promissora para terapia celular para várias doenças não hematológicas, inclusive a insuficiência hepática aguda (Belardinelli et al., 2008; Baldo et al., 2010; Wesson e Cameron, 2011). Os mecanismos pelos quais as células derivadas da medula óssea exercem seus efeitos benéficos sobre o fígado lesionado ainda não estão bem esclarecidos. Têm sido propostos três modos de ação dessas células. O primeiro deles sugere fusão com células residentes dando origem a células hepáticas híbridas (Vassilopoulos et al., 2003; Quintana-Bustamante et al., 2006). Outro mecanismo seria por recuperação da população hepatocitária através da transdiferenciação em hepatócitos (Lagasse et al., 2000; Jang et al., 2004; Li et al., 2010). Mais recentemente, foi demonstrada a existência de efeitos parácrinos, que promovem a regeneração hepática através da liberação de fatores solúveis (Van Poll et al., 2008; Almeida-Porada et al., 2010).

As células tronco produzem uma série de fatores de crescimento e citocinas que podem, potencialmente, suprimir a resposta inflamatória que ocorre no dano hepático agudo, reduzir a apoptose hepatocitária e estimular a proliferação dos hepatócitos (Parekkadan et al., 2007a; Parekkadan et al., 2007b; van Poll et al., 2008; Lin et al., 2011). Têm-se mostrado que as células tronco regulam a proliferação de linfócitos B (Corcione et al., 2006) e podem suprimir a atividade de linfócitos T através da secreção de TGF- β , IL10 e HGF (Di Nicola et al., 2002; Tse et al., 2003). Além disso, inibem a atividade de células *natural killer* (NK) mediada pela secreção de PGE2 (Prostaglandina E2) e TGF- β (Sotiropoulou et al., 2006; Spaggiari et al., 2008).

As células tronco também secretam fatores de crescimento como HGF, EGF (Fator de crescimento epidermal) e as citocinas IL6 e TNF- α que estimulam a proliferação de hepatócitos (Parekkadan et al., 2007b; Yagi et al., 2008; van Poll et al., 2008). Estes componentes solúveis podem aumentar a regeneração hepática no modelo de falência hepática aguda (Lin et al., 2011). No entanto, o uso clínico de células tronco derivadas da medula óssea continua no campo experimental, com alguns relatos de utilização em pacientes (Bae, 2008; Amer et al., 2011)

Alguns grupos avaliaram os efeitos parácrinos destas células utilizando meio condicionado de células mantidas *in vitro* (van Poll et al., 2008; Parekkadan et al., 2007a). Uma boa metodologia para avaliar esse tipo de efeito *in vivo* é a microencapsulação celular. A vantagem do uso de células encapsuladas é a possibilidade de isolar as células que serão transplantadas e, ao mesmo tempo, mantê-las em contato com fatores solúveis no organismo, permitindo assim elucidar a interação entre as células transplantadas e o órgão lesado.

1.2.1. Tecnologia de encapsulação: Estudo do efeito parácrino

A tecnologia de microencapsulação celular utiliza membranas de alginato semipermeáveis, com o fim de separar e proteger células xenobióticas do sistema imune (Orive et al., 2004). Estas microcápsulas possibilitam, conforme o diâmetro dos poros, a entrada de nutrientes e oxigênio e saída de proteínas sintetizadas pelas células. Além disso, evita que macromoléculas, como anticorpos, entrem em contato com as células transplantadas (Rabanel et al., 2009). A microencapsulação também permite a fixação das células no local da implantação e evita sua migração para outras partes do corpo (Mai et al., 2005). As microcápsulas são esferas com 400 a 800 μm , compostas de polímeros naturais, como alginato, colágeno ou quitosano; ou por materiais sintéticos, seja celulose ou silicone (Orive et al., 2004; Rabanel et al., 2009; Barminko et al., 2011). O alginato é certamente o polímero mais utilizado, e permite o isolamento de vários tipos celulares (Lagranha et al., 2008; Shi et al., 2009; Barminko et al., 2011, Matte et al., 2011).

Diversos estudos avaliaram os desfechos da microencapsulação em modelos de insuficiência hepática aguda como uma alternativa à infusão direta de hepatócitos, mostrando uma melhora na sobrevivência dos animais (Shi et al., 2009; Mei et al., 2009; Sgroi et al., 2011). Entretanto, há poucos estudos que avaliam o potencial terapêutico da encapsulação de células da medula óssea na insuficiência hepática aguda. Liu e Chang (2005 e 2006) estudaram o efeito terapêutico de células da medula óssea encapsuladas em alginato e implantadas

em ratos com hepatectomia parcial de 90% como modelo de IHA. Eles observaram que a sobrevida foi maior quando comparadas aos animais que receberam células livres. Os autores sugerem que os mecanismos envolvidos na melhora da IHA sejam por transdiferenciação das células da medula óssea em células tipo hepatócitos e pela secreção de HGF aumentada em comparação ao controle.

Em estudo de nosso grupo, utilizando o modelo de hepatectomia de 90%, foi observado um aumento significativo da sobrevida quando os animais foram tratados com células de medula óssea microencapsuladas em alginato de sódio. Esta sobrevida foi equivalente ao observado no modelo de hepatectomia de 85% (Figura 4) (Kieling, 2012). Esse aumento na sobrevida não poderia ser explicado apenas por transdiferenciação, já que o número de células microencapsuladas (1×10^6 células) não seria suficiente para repor em 15% a diferença de massa hepática retirada nos dois modelos (estimada em $1,5 \times 10^7$ células). Portanto, o incremento da sobrevida deve ser devido a outros fatores, possivelmente liberação de substâncias solúveis.

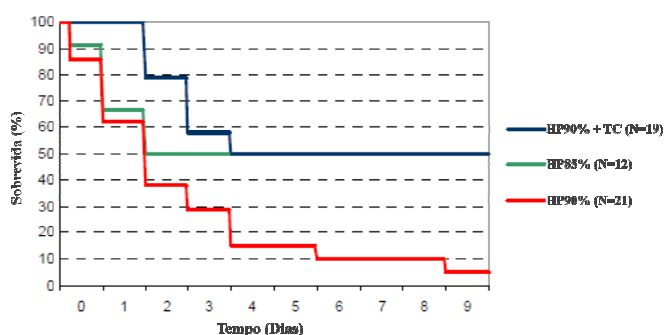


Figura 4 – Curva de sobrevida pós-hepatectomia de 85% e 90%. Animais tratados e não tratados. HP: hepatectomia parcial; TC: Terapia Celular (Kieling, 2012).

Além disso, Kieling (2012) estudou os efeitos na sobrevida em 10 dias de diferentes tipos celulares contidos nas microcápsulas de alginato no modelo de hepatectomia de 90%. Os tipos celulares analisados foram células da medula óssea total (3×10^7 células/animal) e fração mononuclear da medula óssea (3×10^7

ou 1×10^6 células/animal). O grupo que recebeu a totalidade das células da medula óssea atingiu uma sobrevida de 63,6%, entretanto aqueles que receberam a fração mononuclear da medula óssea, independente do número de células, apresentaram sobrevida de aproximadamente 55% (Figura 5). Embora a diferença na sobrevida nos dois grupos não tenha sido significativa, foi observado que a menor sobrevida no grupo fração mononuclear não está relacionada ao número de células. Isto sugere que há fatores na medula óssea total que estão ausentes na fração mononuclear, como por exemplo, as plaquetas (Baldo et al., 2010).

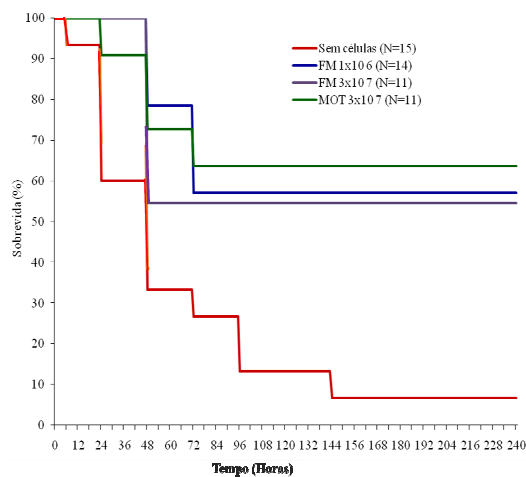


Figura 5 – Sobrevida em 10 dias após hepatectomia de 90% conforme o tipo de célula encapsulada. Log rank=0,001. FM=fração mononuclear; MOT=medula óssea total. (Adaptado de Kieling, 2012)

1.3. Plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados originados pela fragmentação de megacariócitos (MK) na medula óssea (Eckly et al., 2012). As plaquetas possuem mediadores essenciais para a hemostase e trombose (Rendu e Brohard-Bohn, 2001).

As plaquetas vêm sendo estudadas por suas propriedades benéficas na reparação e regeneração de tecidos, como na reparação de ossos, cicatrização da pele, entre outros (Paoloni et al., 2011; Roy et al., 2011; Andia et al., 2012). As diferentes organelas da plaqueta encontram-se distribuídas no citoplasma em união ao citoesqueleto e a um sistema complexo de membranas. Este é constituído por um sistema canalicular aberto, que permite a conexão com o citoplasma e o meio extracelular e por um sistema tubular denso de membranas, onde são armazenadas enzimas metabólicas. Dentre as organelas se incluem algumas mitocôndrias e grânulos secretores tais como: grânulos densos, α -grânulos e lisossomos (Rendu et al., 2001). Estes grânulos contêm importantes fatores de crescimento como o Fator de Crescimento Derivados de Plaquetas (PDGF), HGF, Fator de Crescimento do Tipo Insulina 1 (IGF-1), TGF β 1, Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e serotonina que contribuem com a regeneração dos tecidos (Rendu et al., 2001, Clavien, 2008; Ripoché, 2011).

O papel das plaquetas na fisiopatologia do fígado não tinha sido reconhecido até os finais de 1990 (Clavien e Graf, 2009). Muitos estudos *in vitro* demonstraram que as plaquetas possuem fatores de crescimento estáveis, entre eles o HGF e IGF-1, que promovem a síntese de DNA em cultura primária de hepatócitos via Akt e ERK1/2 (Paul e Piasecki, 1984; Hoshi et al., 2007; Matsuo et al., 2008; Kawasaki et al., 2010).

Estudos experimentais em camundongos com hepatectomia de 70% demonstraram que a inibição da função plaquetária ou a depleção das mesmas reduz notavelmente a regeneração hepática (Lesurtel et al., 2006). Murata et al. (2007) observaram que camundongos com 70% de hepatectomia submetidos a trombocitoses exibiam maior regeneração do fígado, entretanto o grupo trombocitopênico mostrou pouca regeneração. Myrinovych et al. (2008) e Shimabukuro et al. (2009) comprovaram os mesmos achados no modelo de hepatectomia de 90% em camundongos e de 70% em ratos, respectivamente. Além disso, os autores observaram que as plaquetas previnem a diminuição de albumina após a cirurgia, e ativam a proliferação dos hepatócitos através da

ativação de Akt e STAT3. Murata et al. (2008), demonstraram que as plaquetas promovem a regeneração hepática inclusive em condições de depleção das células de Kupffer.

Uma série de experimentos tem mostrado que a serotonina (5-hidroxitriptofano, 5HT) é um fator chave na cascata de sinalização de regeneração hepática. A serotonina, além de ser um neurotransmissor, é um potente mitógeno que atua diretamente no fígado (Balasubramanian e Paulose, 1998; Lesurtel et al., 2006; Nocito et al., 2007). Camundongos carentes da enzima triptofano-hidroxilase 1 (TPH1), que converte o triptofano no precursor de serotonina, 5-HTP (5-difroxitriptofano) não foram capazes de regenerar o fígado após hepatectomia parcial de 70%. O fenótipo foi recuperado após a suplementação de 5-HTP (Lesurtel et al., 2006). Papadimas et al. (2006) demonstraram que a inibição do receptor de serotonina (5-HT₂) pela droga ketanserina quando administrada próximo ao ponto de transição G1/S dos hepatócitos, impede a regeneração do fígado. Estes resultados sugerem que a serotonina pode ser um cofator na síntese de DNA.

Entre todos os fatores de crescimento que respondem a lesões, o PDGF é o mitógeno mais potente (Pinzani, 2002, Moteki et al., 2011). PDGF é uma família de fatores de crescimento, composto por quatro cadeias polipeptídicas diferentes, que por combinação formam cinco dímeros diferentes. As formas clássicas, PDGF-A, PDGF-B e PDGF-AB, são ativadas durante o transporte intracelular e secretadas; enquanto que as formas novas, PDGF-C e PDGF-D, requerem a ativação via protease extracelular (Fredriksson e Eriksson, 2004). O PDGF-B é ainda mais potente na estimulação do crescimento e sinalização intracelular de células estreladas hepáticas, o que se correlaciona com a elevada expressão de subunidades do receptor de PDGF- β (ou tipo B) em comparação ao receptor PDGF- α (ou tipo A) em células estreladas hepáticas ativas (Pinzani, 2002). O receptor de PDGF possui atividade tirosina quinase via cascata ERK (Haluska e Adjei, 2001; Moteki et al., 2011).

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) vem sendo estudado e usado na clínica desde 1970 (Foster et al., 2009). O PRP é muito utilizado para promover a

cicatrização de tecidos em humanos devido à concentração aumentada de fatores de crescimento e proteínas secretoras, que estimulariam o processo de cicatrização no nível celular (Foster et al., 2009; Arora et al., 2009). Os fatores de crescimento do PRP promovem o recrutamento, proliferação, diferenciação das células e o acúmulo de matriz extracelular no tecido em regeneração, além de estimular o crescimento vascular (angiogênese) (Marx, 2001; Foster et al., 2009; Arora et al., 2009).

Matsuo et al. (2011) estudaram o efeito da administração de PRP pela veia porta após hepatectomia de 70% em ratos. Os resultados mostraram um aumento da proliferação hepática através da via Akt, indicando o efeito benéfico da infusão de plaquetas exógenas após lesão hepática. Estes resultados sugerem um potencial terapêutico das plaquetas na IHA (Figura 6). Além do mais, elas poderiam ser um dos fatores diferenciais na terapia de medula óssea total *versus* a fração mononuclear nos ratos com hepatectomia parcial.

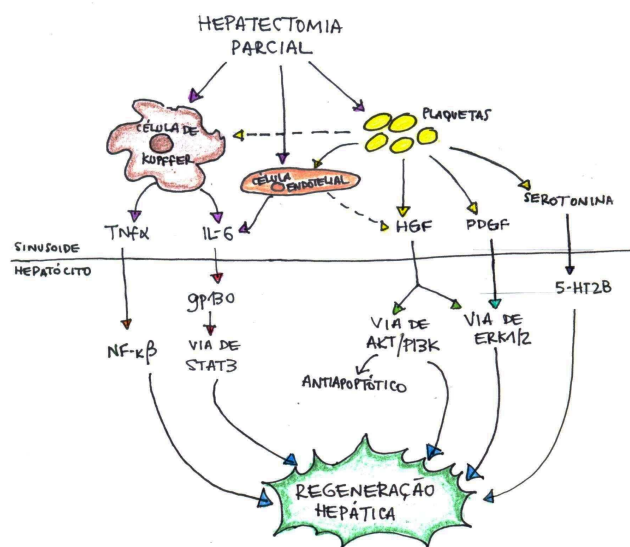


Figura 6 – Esquema da regeneração hepática promovida pelas plaquetas. Após a hepatectomia as plaquetas e células não-parenquimatosas são ativadas. As células de Kupffer ativadas secretam Interleucina (IL) 6 e Fator de Necrose Tumoral (TNF) α que transloca o Fator Nuclear kappa ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) e Tradutor de Sinais e Ativador da Transcrição (STAT) 3, respectivamente, ao núcleo do hepatócito onde promovem a proliferação. As células endoteliais também produzem IL6 e estimulam a secreção de Fator de Crescimento de Hepatócito (HGF). As plaquetas liberam HGF, Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e Serotonina e estimulam a proliferação celular via Akt e ERK1/2. (Adaptado de Murata et al, 2008)

O modelo animal de IHA é uma ferramenta essencial para entender o que acontece na doença e assim avaliar novas terapias. A terapia celular tem sido uma alternativa promissora, no entanto, ainda não se conhecem todos os mecanismos pelos quais as células exercem sua função benéfica no fígado lesionado. Neste contexto, é importante pesquisar e elucidar quais as principais células, vias de sinalização e moléculas envolvidas na regeneração e melhora da função hepática. Tendo em vista as evidências acima descritas, neste estudo foi avaliado o papel das plaquetas na terapia celular no modelo de hepatectomia de 90%.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito das plaquetas em animais submetidos à lesão hepática aguda induzida por hepatectomia parcial de 90% (HP 90%), comparado a animais tratados com medula óssea total ou controles

2.2. Objetivos Específicos

- I. Avaliar a sobrevivência dos animais durante 10 dias após a HP 90%;
- II. Comparar a taxa de regeneração hepática, avaliada pelo peso do fígado remanescente, pós-HP 90% em animais tratados com plasma rico em plaquetas (PRP) encapsulado, medula óssea total (WBM) encapsulada ou cápsulas vazias (EC);
- III. Comparar a taxa de proliferação hepatocitária nas primeiras 72 horas pós-HP 90% nos diferentes grupos;
- IV. Avaliar os níveis séricos de Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) nos diferentes grupos nas primeiras 72 horas pós-HP 90%;
- V. Analisar diferenças na expressão de genes relacionados à regeneração no tecido hepático.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados deste trabalho serão apresentados sob a forma de um artigo científico, a ser submetido para o periódico *Digestive Diseases and Sciences*.

PLATELET-RICH-PLASMA INCREASES SURVIVAL IN A MODEL OF 90% HEPATECTOMY IN RATS

Mónica Luján López^{1,2}, Carlos Kieling^{3,4}, Carolina Uribe Cruz^{1,2}, Alessandro Osvaldt⁵, Gustavo Ochs de Muñoz¹, Rafael Maurer³, Luise Meurer⁶ and Ursula Matte^{1,2}

¹Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Post-Graduation Program in Medicine: Science in Gastroenterology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵Post-Graduation Program in Medicine: Surgery, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁶Pathology Unit, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author:

Ursula Matte

Gene Therapy Center

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

90035-903

Fone: 55 51 3359 8841 / 8838

Fax: 55 51 3359 8010

Abstract

Ninety percent hepatectomy in rodents is a model for acute liver failure. Recently, it has been reported that platelet has a strong effect enhancing liver regeneration, due to its several growth factors such as Platelet Derived Growth Factor (PDGF) and serotonin. The aim of this study was to investigate the role of Platelet-Rich Plasma on 90% hepatectomy in rats. Platelet rich-plasma (PRP) or Whole Bone Marrow (WBM) were microencapsulated in sodium alginate and implanted in the peritoneum of rats immediately after 90% hepatectomy. Control group received empty capsules (EC). Animals were sacrificed at 6, 12, 24, 48, and 72 hours post hepatectomy (n=5-8/group/time) to evaluate liver regeneration rate, mitotic index, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labeling index, serum HGF, and *5Ht2b* and *Pdgf* expression in liver. Survival rate in 10 days was also evaluated in a different set of animals (n=20/group). PRP group showed the highest survival rate at 10 days despite the lowest liver regeneration rate at any time point. EC group showed the highest regeneration rate in the first 72 hours. Mitotic index was highest in PRP group at 48 hours although BrdU index did not show any difference among groups. Gene expression of *5Ht2b* and *Pdgf* was both up-regulated at 72 hours in PRP group, whereas serum HGF did not show any differences among groups. These results suggest that the beneficial effect of PRP may be mediated by a gradual increase in the regeneration rate and a response to mitogenic factors such as serotonin and PDGF.

Introduction

Acute liver failure (ALF) is a severe and sudden hepatocellular loss and dysfunction associated to jaundice, coagulopathy and hepatic encephalopathy (Sundaram and Shaikh, 2011; Nguyen and Vierling, 2011). Liver transplantation remains the most promising treatment for ALF. However, organ availability is limited and a significant percentage of patients die while waiting for transplant (Lee et al, 2008; Nguyen and Vierling, 2011). Nevertheless, due to the liver's unique ability to regenerate after injury or resection, bridge strategies to keep the patient

alive or abbreviate the liver recovery time could be envisaged. Cell therapy with bone marrow derived cells is a promising alternative that enhances the regenerative capacity of the liver (Parekkadan et al, 2007; Belardinelli et al, 2008; Baldo et al, 2010; Gilchrist and Plevris, 2010).

Cell microencapsulation technology has been extensively studied as an alternative to cell transplantation (Orive et al, 2004; Matte et al, 2011). The advantages of this strategy are the isolation of the transplanted cell from the host and the possibility to study paracrine effects of cell therapy (Matte et al, 2011). Many studies have shown that encapsulated cells transplanted in animal models of ALF improve survival rate and liver regeneration (Liu and Chang, 2006; Shi et al, 2009; Mei et al, 2009; Sgroi et al, 2011).

It is well known that platelets play an important role in wound healing and tissue regeneration (Roy et al, 2011). Platelets contain proteins needed for hemostasis and growth factors including platelet-derived growth factor (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), tumor growth factor (TGF) and serotonin, required for tissue regeneration (Assoian et al, 1983; Oka et al, 1983; Raines, 1985; Nakamura et al, 1986; Nakamura et al, 1987; Clavien, 2009; Arora, 2009). Recently, it has been reported that platelets prevent hepatic failure due to hepatocyte apoptosis and stimulate liver regeneration after extensive hepatectomy (Lesurtel et al, 2006; Murata et al, 2007; Murata et al, 2008; Myronovych et al, 2008; Hisakura et al, 2009; Shimabukuro et al, 2009). Matsuo et al, (2011) showed that administration of exogenous platelet as platelet rich-plasma (PRP) improves liver regeneration after 70% hepatectomy in rats via Akt and ERK1/2 pathways. In this work, we used the encapsulation strategy to study the paracrine effects of PRP in ALF animal model.

Materials and Methods

Animals

Two-months-old male Wistar rats, weighting 314 ± 29 g were housed under controlled temperature (between 18 and 22°C) in light–dark cycles of 12 h with free access to water and standard chow at Experimental Animal Unit at Hospital

de Clínicas de Porto Alegre. Handling, care and processing of animals were carried out according to regulations approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Experimental Design

Rats were randomly divided in three groups. Control group (n=23) received empty alginate microcapsules (EC); treated groups received either microencapsulated whole bone marrow (WBM, n=20) or microencapsulated platelet-rich plasma (PRP, n=20). Survival was observed for 10 days after 90% partial hepatectomy (PH). An additional set of animals were sacrificed at 6, 12, 24, 48, and 72h after 90% PH (n=5-8/group/time point) to evaluate the early effects of treatments.

Cell Isolation

Wistar rats were sacrificed in CO₂ chamber and both femurs were isolated. For whole bone marrow preparation, Dulbecco's Medium (DMEM, Invitrogen, USA) supplemented with 10% Bovine Fetal Serum (GIBCO® – Grand Island, NY, EUA) and 1% Penicilin/Streptomycin (GIBCO® – Grand Island, NY, EUA) was used to flush out the bone marrow using a 10 mL syringe with a 22-gauge needle. The cell suspension was centrifuged at 800g for 5 minutes, resuspended in 5 mL of DMEM culture medium and counted in a Neubauer chamber. Cell suspensions containing $1,5 \times 10^7$ cells/mL were encapsulated, as described below.

For PRP group, whole bone marrow was flushed out with acid citrate dextrose (pH 5) in a 1:4 volume and centrifuged at 150g for 10 minutes. Platelets in the supernatant were then washed twice by centrifugation at 1000g at 4°C for 15 minutes, and resuspended in citrate buffer (modified from Matsuo et al, 2011). Then, PRP was counted in an automatic hematological counter (ABX Micros 60, Germany), diluted to $1,5 \times 10^7$ cells/mL and submitted to the encapsulation protocol.

Capsules Production

Cell encapsulation was performed according to our laboratory protocol, previously described by Lagranha et al (2009). Briefly, cells were mixed with 1.5%

sodium alginate (Sigma-Aldrich, USA) in DMEM and extruded through a Encapsulation Unit, type J1 (Nisco, Switzerland), attached to JMS Syringe Pump. Droplets were sheared off with an air flow of 5 L/min delivered to the tip of a 27 G needle and the rate of infusion was 40 mL/h. The droplets fell into a bath of 125 mM CaCl₂ and ionically cross-linked with Ca²⁺ to form solid spherical hydrogel beads containing embedded cells. In each well capsules were produced from a volume of 2 mL of alginate cell suspension, containing 3x10⁷ cells/animal. Cell encapsulation was carried out under sterile conditions. For control group, 2 mL of empty capsules were produced using the same approach. The resulting capsules were maintained under normal cell culture conditions (DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C and 5% CO₂) for 24h prior to administration.

Surgical Procedure and Capsules Transplantation

Ninety percent hepatectomy was performed by a single operator, as described previously (Gaub et al, 1984). In brief, the left lateral (30%), left median (40%), and the right superior lobes (20%) were removed, leaving only the caudate lobe. Hepatectomy was carried out under isoflurane (Forane®, Abbott SA, Buenos Aires, Argentina) anesthesia. Immediately after 90% PH, and before complete suture, microcapsules were placed into the peritoneal cavity with a 60 mL syringe, and glucose was supplemented i.p. (5% of body weight). Postoperatively, animals were given i.p. glucose (5% of body weight) until day seven, received 20% glucose in their drinking water and standard chow *ad libitum*.

Sacrifice

Sacrifice was performed in CO₂ chambers at the designated time points or at 10 days for the surviving animals. Immediately after death, 2 mL of blood was collected by heart puncture and the liver was removed and weighed. Part of the liver was then flash frozen in liquid nitrogen for RNA extraction and part was fixed for histological analysis in 10% neutral-buffered formalin. Serum was separated by centrifugation and stored at -20°C until analysis.

Liver regeneration rate

The liver regeneration rate was calculated as follow; liver regeneration rate (%)=100 x [C- (A-B)]/A, where A is the estimated liver weight before PH, B is the excised liver weight at the time of PH and C is the weight of the regenerated liver at the time of sacrifice (Zhang et al, 2009). The slope of liver regeneration rate was calculated by simple linear regression.

Histology and Immunohistochemistry

Paraffin-embedded liver specimens were cut in 4 μ m sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Liver aspect and presence of necrotic areas and apoptosis were observed. To assess the rate of hepatocyte proliferation, the number of hepatocytes undergoing mitosis was counted in 10 high-power fields (HPF). In addition, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) immunostaining was done using BrdU staining kit (Invitrogen, USA). Two hours before sacrifice, rats (n=3/group) were injected with BrdU (1mL/g). Thereafter, liver sections were incubated with BrdU antibody and the number of positive hepatocytes was counted in 5 HPF.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Serum levels of Hepatocyte Growth Factor were determined by ELISA using RAT-HGF Kit (Life Science Inc, China), according to the manufacturer's instructions.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted from 50 mg of liver tissue using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. Two micrograms of RNA were reverse-transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Gene expression was measured using TaqMan assays (Applied Biosystems, New Jersey, USA) for serotonin receptor *5-Ht2b* (Rn00568450-m1), and platelet-derived growth factor *Pdgf-beta* (Rn01502596_m1). Messenger RNA expression levels were normalized to *Actb* RNA (Rn00667869_m1) using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm SD or medians when required. Statistical analyses were carried out with one-way ANOVA or two-way ANOVA and Tukey's *post hoc*. For non-parametric variables Kruskal Wallis with Mann-Whitney *post hoc* was used. Kaplan–Meier estimator was used for survival rate evaluation. For the slope of liver regeneration rate, simple linear regression was calculated. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Survival Rate

Twenty to 23 rats from each group were operated to evaluate survival rate after 10 days. The survival rate was higher for the PRP group (85%) than for the WBM group (65%) or EC group (30%) ($p=0.001$). Animals in PRP group died predominantly until day three, whereas in the other groups deaths occurred until day six after 90% PH (Figure 1).

Liver regeneration

Liver weight increased gradually after the operation. There were no differences at 6, 24 or 48 hours between groups. EC group showed increased liver weight at 12 hours compared with WBM group ($p=0.006$). At 72 hours EC group showed a higher regeneration rate compared with PRP and WBM groups ($p=0.026$). The liver regeneration rate at day 10 for EC group was 61%, for PRP group was 58% and for WBM group 73%. The only statistical difference at this time point was between PRP and WBM ($p=0.03$) (Figure 2A).

The slope of liver regeneration rate was similar to WBM and PRP groups, whereas for EC it was steeper in the first 72 hours. Liver weight in EC group increased mostly at 24 h to 72 h, whereas WBM increased the regeneration rate after 72 h till day 10 (Figure 2B).

Histology findings

Hydropic and necrotic changes were observed randomly in some animals. Congestion was predominant at 6 hours after hepatectomy. Presence of steatosis

was observed until 10 days after hepatectomy (Figure 3A-C). Mitotic index was significantly higher for PRP group than EC group at 48 hours ($p=0.047$), whereas there were no differences at other time points (Figure 3D-E). BrdU labeling index did not show differences among the groups (Figure 3F-G)

Serum HGF

Serum HGF levels were not different in any group at any time.

Gene expression

The expression levels of *5-Ht2b* and *Pdgf-beta* were significantly increased in PRP group at 72 hours. *Pdgf-beta* mRNA expression level was two-fold to three-fold up-regulated in PRP compared to WBM and EC group ($P<0.05$) (Figure 4A.). The expression of serotonin receptor *5-Ht2b* in PRP group was 40 times higher in PRP at 72 hours compared to the others groups ($P<0.05$) (Figure 4B.).

Discussion

This study was designed to assess the role of platelets in animals submitted to 90% partial hepatectomy as an acute liver failure model. Cell therapy protocols using bone marrow derived cells (Parekkadan et al., 2007; Belardinelli et al., 2008; Baldo et al., 2010), and hepatocytes alone or combined with stem cells (Liu and Chang, 2006; Shi et al., 2009; Mei et al., 2009; Sgroi et al., 2011) have been tested in animal models of acute liver failure. The role of platelets has been investigated by the administration of thrombopoietin (Hisakura et al., 2009; Shimabukuro et al., 2009), or pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor- induced thrombocytosis (Murata et al., 2007; Murata et al., 2008; Myronovych et al., 2008).

In this study, the role of exogenous PRP was investigated using the advantage of microencapsulation technology and compared to microencapsulated whole bone marrow. The implant of encapsulated PRP significantly increased survival rate in ten days. Most deaths in PRP group occurred in the first 72 hours after hepatectomy, which indicates an early beneficial effect of PRP after massive

liver injury. Liver regeneration rate was assessed at different time points and although all groups recovered over than 50% their total liver weight on day 10, EC group showed a steeper increase in the first 72 hours after resection. PRP group, on the other hand, had the lowest regeneration rate and it presented a gradual increased over time. This is in accordance to the findings of Ninomiya et al. (2010) that have demonstrated that deceleration of regenerative response after a massive hepatectomy improves survival. Accordingly, liver aspect on different time points were better in treated groups than EC group, suggesting that transplanted derived-bone marrow cell or platelet protect the animals from other types of stress imposed by liver injury (van Poll et al., 2008; Hisakura et al., 2010).

Despite these observations in liver regeneration rate, no differences were found in BrdU labeling or HGF levels among groups. Mitotic index was higher only for PRP group at 48 hours, a similar result to that of Murata et al. (2007). These authors showed that in thrombocytic mice mitotic index was significantly higher than in thrombocytopenic mice 48 hours after 70% PH. It is possible that the use of distinct markers of cell proliferation, such as PCNA or Ki-67, would contribute to a better understanding of this discrepancy.

It is known that HGF have hepatotrophic role in damaged liver. Liu et al. (2006) showed an increased of serum HGF in rats 48 hours after 90% hepatectomy. The animals were treated with bone marrow cells encapsulated in alginate-polylysine-alginate. Conversely in our study, we did not observed any differences in serum HGF among the groups at any time point.

Hepatocytes have mitogenic response to various growth factors and cytokines such as HGF, Interleucina 6, PDGF and serotonin (Michalopoulos, 2007). Serotonin is not only a neurotransmitter but also has mitogenic properties (Lesurtel et al., 2006) and is secreted by platelets. The 5HT_{2B} receptor is mainly expressed in the liver and it is related to liver regeneration in 70% liver resection (Lesurtel et al., 2006 and 2008). We observed a significant up-regulation of *5Ht2b* in livers from PRP group at 72 hours, suggesting a possible positive feedback mechanism mediated by platelet-derived serotonin. This hypothesis should be confirmed by the measurement of serum levels of serotonin and/or gene expression analysis in encapsulated cells.

PDGF is another important mitogenic factor secreted by platelet. PDGF-stimulated hepatocyte proliferation is mediated via activation of ERK and MAP kinase pathway (Pinzani, 2002; Moteki et al., 2011). Similar to *5Ht2b*, *Pdgf Beta* was up-regulated 72 hours after PH in the in the liver of PRP animals. Again, these results suggest a positive feedback between factors being released from the capsules and the regenerating liver.

Platelets are required for full hepatic response to injury both in patients and animals (Murata et al., 2007; Alkozai et al., 2010). Moreover, administration of exogenous platelet rich-plasma has recently been shown to improve liver regeneration (Matsuo et al., 2011). Our findings suggest that this effect may be mediated by a gradual increase in the regeneration rate and increased response to mitogenic factors such as serotonin and PDGF.

5. References

- Alkozai EM, Nijsten MW, de Jong KP, de Boer MT, Peeters PM, Slooff MJ, Porte RJ, Lisman T. Immediate postoperative low platelet count is associated with delayed liver function recovery after partial liver resection. *Ann Surg*. 2010 Feb;251(2):300-6.
- Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent*. 2009 Aug;18(4):303-10.
- Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*. 1983;258(11):7155–7160.
- Baldo G, Giugliani R, Uribe C, Belardinelli MC, Duarte ME, Meurer L, da Silveira TR, Matte U. Bone marrow mononuclear cell transplantation improves survival and induces hepatocyte proliferation in rats after CCI(4) acute liver damage. *Dig Dis Sci*. 2010 Dec;55(12):3384-92
- Belardinelli MC, Pereira F, Baldo G, Vicente Tavares AM, Kieling CO, da Silveira TR, Meurer L, Soares Duarte ME, Giugliani R, Matte U. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology*. 2008; 247(1):1-5.
- Clavien P. A. and Graf R. Liver regeneration and platelets. *British Journal of Surgery* 2009; 96: 965–966.

- Gaub J, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 1984; 4: 902–904.
- Gilchrist ES, Plevris JN. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl.* 2010 Feb;16(2):118-29.
- Hisakura K, Murata S, Fukunaga K, Myronovych A, Tadano S, Kawasaki T, Kohno K, Ikeda O, Pak S, Ikeda N, Nakano Y, Matsuo R, Konno K, Kobayashi E, Saito T, Yasue H, Ohkohchi N. Platelets prevent acute liver damage after extended hepatectomy in pigs. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010 Nov;17(6):855-64.
- Kay MA, Fausto N. Liver regeneration: Prospects for therapy based on new technologies. *Mol Med Today* 1997;3:108
- Lagranha V.L, Baldo G, de Carvalho T.G, Burin M, Saraiva-Pereira M.L, Matte U, Giugliani R. In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis* 2008; 23: 469–84
- Lee WM, Squires RH Jr, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology.* 2008; 47(4):1401-15.
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science.* 2006 Apr 7;312(5770):104-7.
- Lesurtel M, Soll C, Graf R, Clavien PA. Role of serotonin in the hepatogastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Mar;65(6):940-52.
- Liu ZC, Chang TM. Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model. *Liver Transpl.* 2006 Apr;12(4):566-72.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
- Matsuo R, Nakano Y, Ohkohchi N. Platelet administration via the portal vein promotes liver regeneration in rats after 70% hepatectomy. *Ann Surg.* 2011 Apr;253(4):759-63.
- Matte U, Lagranha VL, de Carvalho TG, Mayer FQ, Giugliani R. Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. *J Inherit Metab Dis.* 2011 Oct;34(5):983-90.
- Mei J, Sgroi A, Mai G, Baertschiger R, Gonelle-Gispert C, Serre-Beinier V, Morel P, Bühler LH. Improved survival of fulminant liver failure by transplantation of

- microencapsulated cryopreserved porcine hepatocytes in mice. *Cell Transplant*. 2009;18(1):101-10.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):286-300.
- Moteki H, Kimura M, Ogihara M. Activation of extracellular-signal regulated kinase by platelet-derived growth factor is potentiated by phenylephrine in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(7):980-6.
- Murata S, Ohkohchi N, Matsuo R, Ikeda O, Myronovych A, Hoshi R. Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. *World J Surg*. 2007;31:808–16.
- Murata S, Matsuo R, Ikeda O, Myronovych A, Watanabe M, Hisakura K, Nakano Y, Hashimoto I, Ohkohchi N. Platelets promote liver regeneration under conditions of Kupffer cell depletion after hepatectomy in mice. *World J Surg*. 2008 Jun;32(6):1088-96.
- Myronovych A, Murata S, Chiba M, Matsuo R, Ikeda O, Watanabe M, Hisakura K, Nakano Y, Kohno K, Kawasaki T, Hashimoto I, Shibasaki Y, Yasue H, Ohkohchi N. Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2008 Sep;49(3):363-72.
- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, et al. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett*. 1987;224(2):311–316.
- Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(17):6489–6493.
- Nguyen NT, Vierling JM. Acute liver failure. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Jun;16(3):289-96.
- Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N, Soejima Y, Taketomi A, Shimada M, Maehara Y. Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. *Am J Transplant*. 2010 Jul;10(7):1580-7.
- Oka Y, Orth DN. Human plasma epidermal growth factor/beta-urogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest*. 1983;72(1):249–259.
- Orive G, Hernández RM, Rodríguez Gascón A, Calafiore R, Chang TM, de Vos P, Hortelano G, Hunkeler D, Lacík I, Pedraz JL. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol*. 2004; 22(2):87-92.
- Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One*. 2007 Sep 26;2(9):e941.

- Pinzani, M. PDGF and Signal Transduction In Hepatic Stellate Cells. *Frontiers in Bioscience* 7, d1720-1726, August 1, 2002.
- Raines EW, Ross R. Purification of human platelet-derived growth factor. *Methods Enzymol.* 1985;109:749–773.
- Roy S, Driggs J, Elgharably H, Biswas S, Findley M, Khanna S, Gnyawali U, Bergdall VK, Sen CK. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound Repair Regen.* 2011 Nov;19(6):753-66.
- Sgroi A, Mai G, Morel P, Baertschiger RM, Gonelle-Gispert C, Serre-Beinier V, Buhler LH. Transplantation of encapsulated hepatocytes during acute liver failure improves survival without stimulating native liver regeneration. *Cell Transplant.* 2011a Mar 7.
- Shi XL, Zhang Y, Gu JY, Ding YT. Coencapsulation of hepatocytes with bone marrow mesenchymal stem cells improves hepatocyte-specific functions. *Transplantation.* 2009 Nov 27;88(10):1178-85.
- Shimabukuro R, Kawanaka H, Tomikawa M, Akahoshi T, Konishi K, Yoshida D, Anegawa G, Uehara H, Hashimoto N, Hashizume M, Maehara Y. Effect of thrombopoietin on platelet counts and liver regeneration after partial hepatectomy in a rat model. *Surg Today.* 2009;39(12):1054-9.
- Sundaram V, Shaikh OS. Acute liver failure: current practice and recent advances. *Gastroenterol Clin North Am.* 2011 Sep;40(3):523-39.
- van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology.* 2008; 47(5):1634-43.
- Watanabe M, Murata S, Hashimoto I, Nakano Y, Ikeda O, Aoyagi Y, Matsuo R, Fukunaga K, Yasue H, Ohkohchi N. Platelets contribute to the reduction of liver fibrosis in mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Jan;24(1):78-89.
- Wesson RN, Cameron AM. Stem cells in acute liver failure. *Adv Surg.* 2011;45:117-30.
- Zhang B, Inagaki M, Jiang B, Miyakoshi M, Arikura J, Ogawa K, Kasai S. Effects of bone marrow and hepatocyte transplantation on liver injury. *J Surg Res.* 2009 Nov;157(1):71-80.

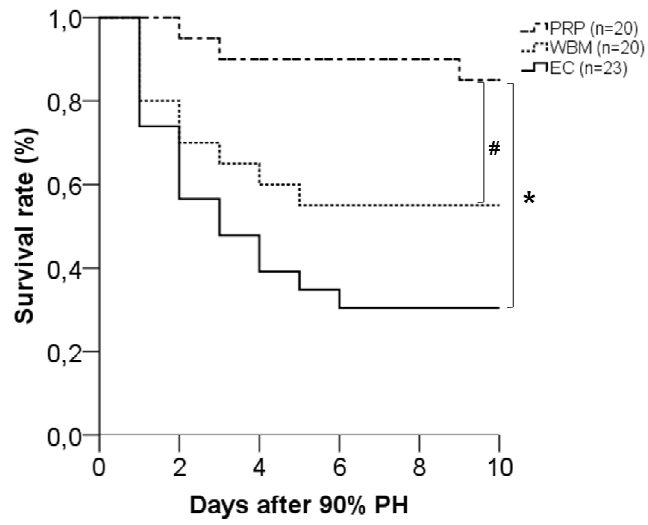


Figure 1. Kaplan-Meier survival curve after 90% partial hepatectomy. EC=Empty capsule group, PRP=Platelet Rich-Plasma, WBM=Whole Bone Marrow. #P=0.031 *P<0.001.

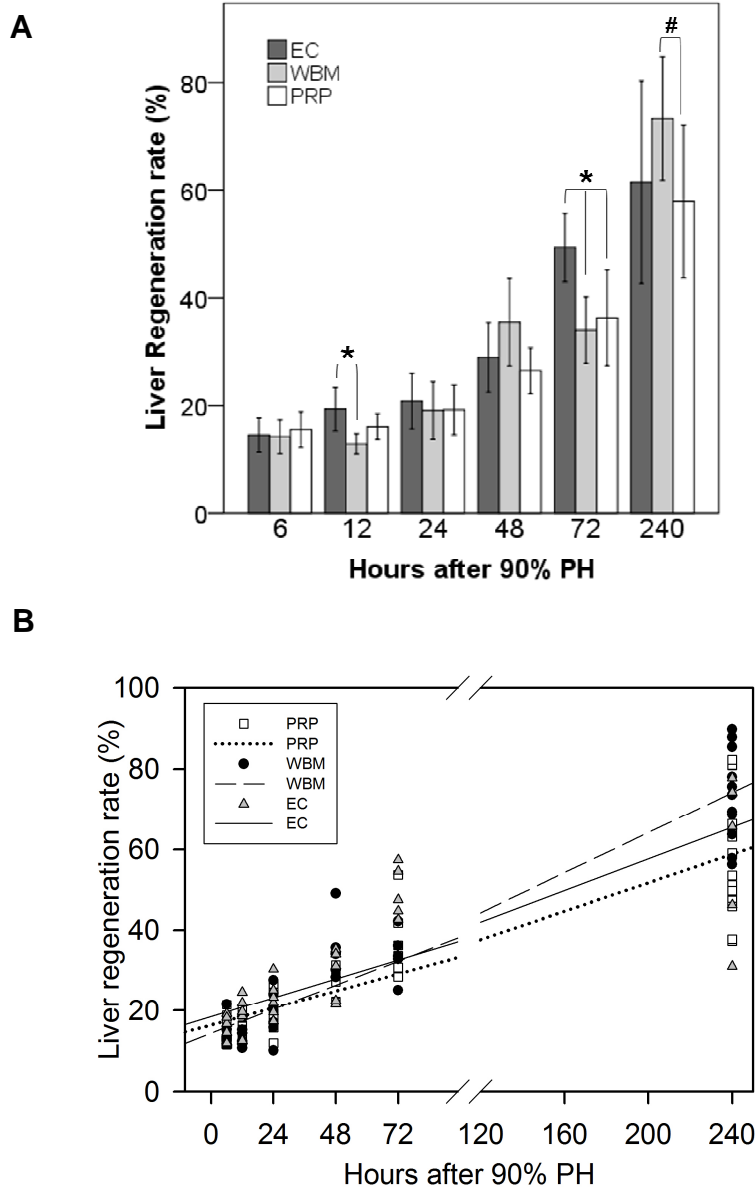


Figure 2. Liver regeneration rate after 90% partial hepatectomy. **A)** Liver regeneration rate. Values are expressed as means \pm SD. One-way ANOVA test. * $P < 0.05$ vs EC; # $P = 0.03$ vs PRP. **B)** Slope of liver regeneration rate calculated as simple linear regression.

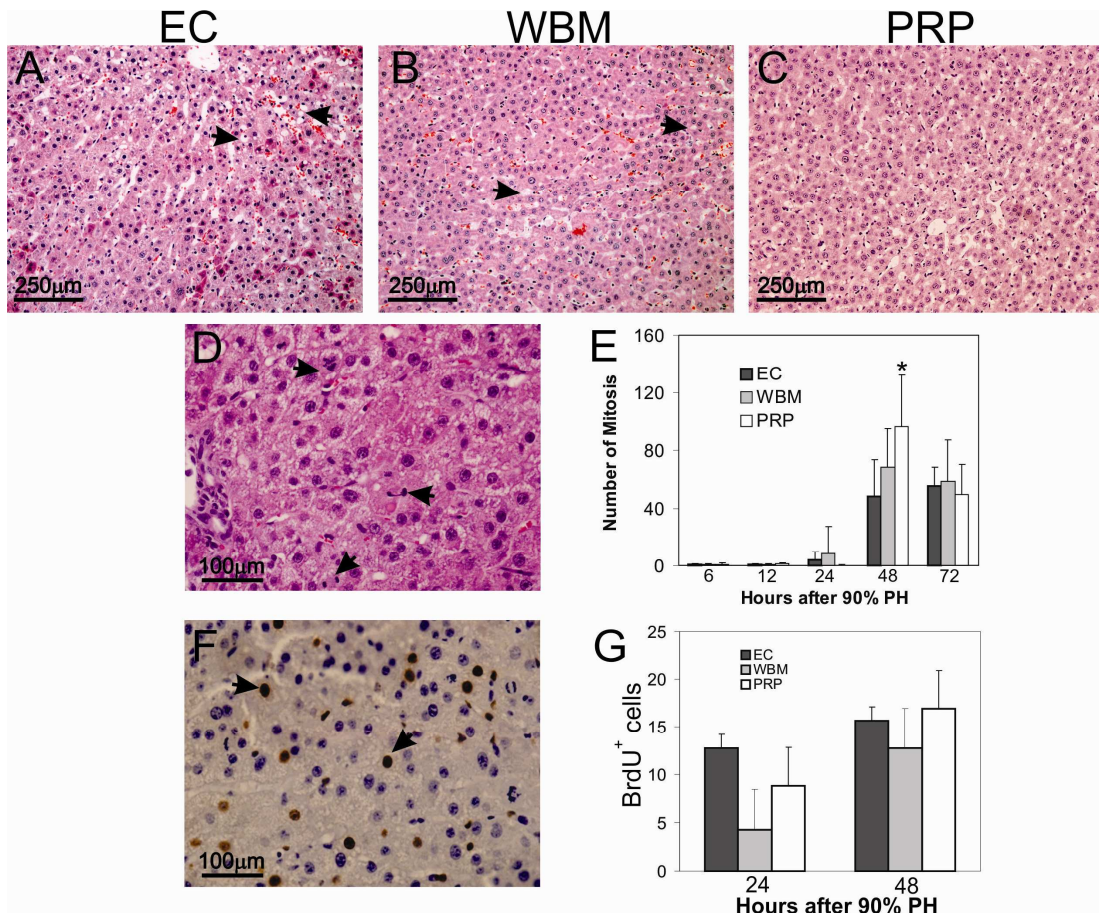


Figure 3. Liver section stained with H&E. **(A-C)** Liver on day 10 after 90% PH. **A)** Empty capsules group (EC), **B)** whole bone marrow group (WBM), and **C)** platelet rich-plasma group (PRP). Arrows indicate steatosis in WBM and in EC group. **D)** Mitosis in PRP at 48 hours after 90% PH. **E).** Mitotic index in each group. **F)** BrdU labeling. Arrow shows positive hepatocyte. **F)** BrdU labeling index in each group. Values are expressed as means \pm SD. One-way ANOVA test. n=5-7 per group. *P<0.05 vs empty capsules (EC).

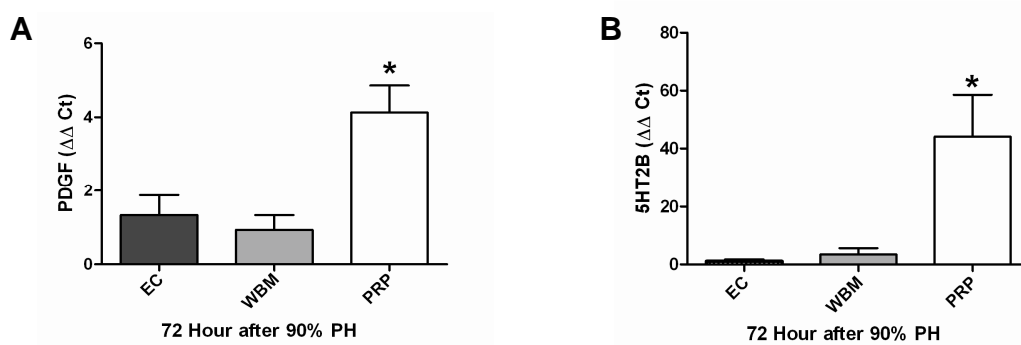


Figure 4. Gene expression 72 hours after hepatectomy. **A)** Relative expression of *Pdgf* – *Beta*. **B)** Relative expression of serotonin receptor *5Ht2b*. One-way ANOVA test. *P<0.05

4. DISCUSSÃO

Animais submetidos a hepatectomia parcial tem sido usados como modelo de IHA, pois uma ressecção maciça causa uma falência hepática fatal (Makino et al., 2005; Martins et al., 2008). Um bom modelo experimental de IHA para avaliação de terapias requer alta mortalidade antes da regeneração hepática e de uma janela terapêutica adequada (Rahman and Hodson, 2000). Muitos grupos usam o modelo de 70% de hepatectomia em ratos ou camundongos para elucidar os mecanismos de regeneração hepática (Higgins e Anderson, 1931; Nikfarjam et al., 2004; Ninomiya et al., 2010; Sgroi et al., 2011b). Uma vez que todos os animais com 70% de hepatectomia sobrevivem, este modelo é pouco adequado para o estudo da falência hepática aguda (Makino et al., 2005).

Panis et al. (1997) mostraram na mortalidade, proporcional ao aumento progressivo na ressecção hepática. Após 85 e 90% de hepatectomia, as taxas de sobrevivência são de 18 e 0%, respectivamente (Martins et al., 2008). Porém, a mortalidade elevada associada a grandes ressecções pode ser reduzida pela administração de glicose solúvel (Gaub e Iversen, 1984; Emond et al., 1989). Por exemplo, a taxa de sobrevivência na hepatectomia de 90% pode aumentar até 60% pela adição de 20% de glicose na água de beber (Emond et al., 1989; Martins et al., 2008). Além disso, um controle na glicemia dos animais e a correção da hipoglicemia com a administração intraperitoneal de 5% glicose em ratos com 90% de ressecção, pode elevar a sobrevivência até 80% (He et al., 2010).

Em estudo prévio do nosso grupo, Kieling (2012) observou que animais submetidos a 85% de hepatectomia apresentaram 50% de sobrevivência com reposição de glicose intraperitoneal e na água de beber. Já no modelo de ressecção de 90% do fígado, a sobrevivência diminuiu consideravelmente, chegando a 5% em 10 dias. Quando os animais foram tratados com células da medula óssea encapsulada, a sobrevivência chegou aproximadamente a 60%, enquanto que no grupo que recebeu apenas a fração mononuclear da medula óssea (FM) a sobrevivência foi de 55%. Sgroi et al. (2011) e Mei et al. (2009), estudaram o efeito de hepatócitos encapsulados e transplantados em animais com IHA. A sobrevivência aumentou de 20% nos controles a 60-70% nos tratados com os hepatócitos

encapsulados. Liu e Chang (2006) estudaram o efeito de células derivadas da medula óssea encapsuladas em alginato-poli-L-lisina-alginato, e transplantadas em ratos com 90% de hepatectomia. A sobrevivência foi de 100% em 14 dias.

No presente estudo, foi observado que a sobrevivência do grupo controle (cápsulas vazias, EC) foi de 30% em 10 dias. Já nos animais tratados com células da medula óssea total encapsuladas em alginato de sódio (WBM), a sobrevivência aumentou a 65%. Este resultado condiz com o obtido por Kieling (2012), mas não com o achado de Liu e Chang (2006), talvez porque o número de animais que estes autores avaliaram foi pequeno ($n=6$ vs. $n=20$ no presente estudo). A sobrevivência no grupo WBM observada em nosso estudo também é superior aos 55% de sobrevivência observada por Kieling (2012) para o grupo FM.

Nosso objetivo neste estudo foi avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) na sobrevivência e regeneração hepática. No grupo tratado com PRP encapsulado, a taxa de sobrevivência (85%) foi significativamente maior que os demais grupos. Este resultado indica que o PRP tem um efeito benéfico nos animais submetidos à hepatectomia de 90%. Este efeito já havia sido sugerido por Myrinovych et al. (2008), que avaliaram a taxa de sobrevivência e regeneração hepatocitária de camundongo submetidos a 90% de hepatectomia associada a trombocitose. Os camundongos do grupo controle morreram 30 horas após a intervenção cirúrgica, enquanto que os animais com trombocitose apresentaram uma sobrevivência de 55%. Entretanto, nossos dados sugerem que PRP é superior ao simples aumento do número de plaquetas. Uma hipótese seria a “contaminação” do PRP com células da fração mononuclear da medula óssea, já que nas preparações usadas neste estudo havia presença de cerca de 1% de leucócitos.

Um aspecto importante foi o momento do óbito nos diferentes grupos. A taxa de mortalidade apresentada no grupo EC foi contínua durante os 10 dias. Porém, tanto no grupo WBM como no grupo PRP, a mortalidade ocorreu principalmente nos primeiros três dias após a hepatectomia. Por este motivo, investigamos em detalhe o período inicial da regeneração hepática através de grupos de animais sacrificados em 6, 12, 24, 48 e 72 horas após cirurgia e

implantação das cápsulas. Nestes tempos foram avaliados o peso do fígado, a taxa de regeneração hepática, a proliferação celular e os níveis séricos e expressão de genes relacionados a fatores de crescimento envolvidos na regeneração hepática.

A taxa de regeneração hepática nos diferentes tempos foi avaliada através do peso do fígado remanescente em relação ao peso total estimado. Ao dia 10, todos os animais recuperaram mais de 50% do peso inicial do fígado. Nas primeiras 72 horas não houve diferenças importantes entre o grupo WBM e PRP, sendo que ambos apresentavam menor taxa de regeneração que o grupo EC. Já o grupo WBM apresentou um rápido aumento do peso do fígado entre o terceiro e o décimo dia, sendo o grupo com a maior taxa de regeneração no dia 10. O coeficiente linear simples demonstrou que o grupo EC apresentou a maior velocidade de regeneração, enquanto o grupo PRP teve uma taxa regenerativa menor e mais uniforme ao longo do tempo. Esse pode ser um dado aparentemente contraditório, pois o grupo que apresenta menor taxa de regeneração hepática possui a maior sobrevivência. Entretanto, esses dados estão de acordo com Ninomiya et al. (2010), que demonstraram que a supressão das vias de sinalização MEK/ERK durante a fase inicial de regeneração após ressecção maciça do fígado melhora o prognóstico dos animais. O mecanismo se deve a uma desaceleração da resposta regenerativa, que permite um melhor balanço entre a regeneração dos hepatócitos e das outras células não parenquimatosas que compõem o fígado.

Entretanto, o índice mitótico foi diferente unicamente no grupo PRP às 48 horas em relação ao grupo EC. Murata et al. (2007) também observaram um aumento significativo no índice mitótico 48 horas após hepatectomia de 70% em camundongos com trombocitose. Embora, a contagem de hepatócitos em mitoses dê uma noção clara de proliferação, esta não é a melhor metodologia para avaliação da regeneração celular. Outros tipos de análises deveriam ser realizados para confirmar esse achado, por exemplo, através do uso de marcadores de síntese de DNA, tais como 5-Bromo-2-deoxiuridina (BrdU), antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) ou antígeno Ki67. Neste estudo não foi possível utilizar marcadores imunohistoquímicos como PCNA ou

Ki-67 devido a falhas no processamento do material. Em uma sub-amostra de 3 animais por grupo foi feita a marcação com BrdU porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Em parte isso pode ser devido à grande variabilidade dos resultados pelo pequeno tamanho amostral. Hisakura et al. (2010) também não observaram diferenças na regeneração celular através do uso de PCNA às 48 horas após hepatectomia de 80% em modelo suíno com administração de trombopoietina.

Quanto ao aspecto microscópico do tecido hepático (Figura 7) foi observada presença de congestão vascular nas primeiras 6 horas independente do grupo. A partir das 12 horas observou-se a formação de esteatose nos hepatócitos e, em alguns casos, presença de áreas necróticas de maneira similar em todos os grupos. A esteatose, ou acúmulo de gordura nos hepatócitos, ocorre como defesa contra hipoglicemia secundária à hepatectomia e é essencial para iniciar a regeneração hepática (Shteyer et al., 2004; Gazit et al., 2010). Ainda que não tenha sido feita uma análise qualitativa sistemática das lâminas, o aspecto do fígado dos animais tratados com PRP aos 10 dias parece ser mais próximo de um fígado normal. Hisakura et al. (2010) mostraram que a indução de trombocitose em modelo suíno de IHA diminui a necrose, a colestase e a ruptura de células endoteliais no tecido hepático como consequência do dano hepático. Isto sugere que as plaquetas possuem um efeito protetor tanto no fígado como nos sinusóides hepáticos.

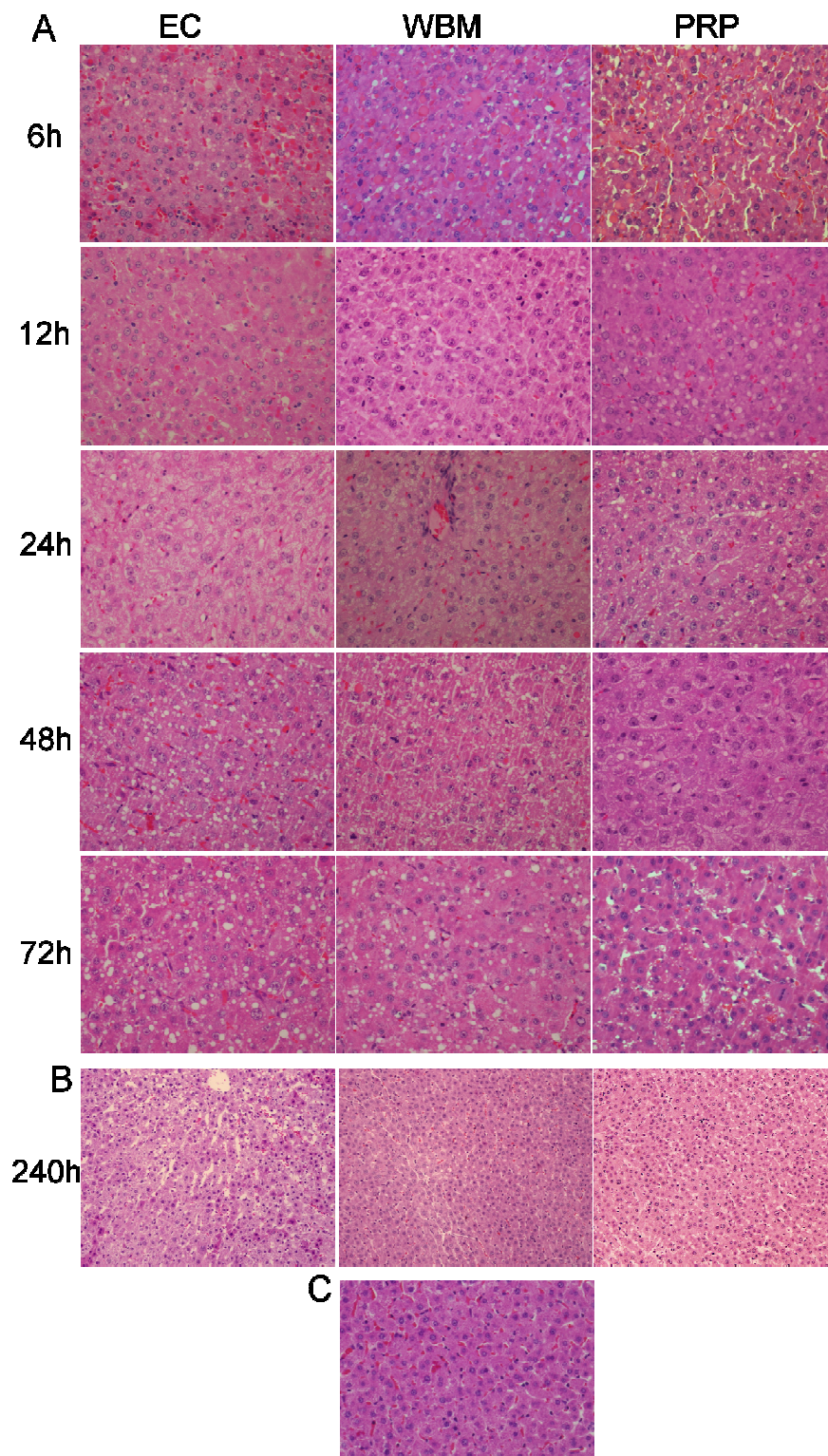


Figura 7 - Aspecto histológico do fígado. **A)** Animais tratados com cápsulas vazias (EC), medula óssea total encapsulada (WBM) ou plasma rico em plaquetas encapsulado (PRP) em 6, 12, 24, 48 e 72 horas após hepatectomia (40x). **B)** Animais tratados com EC, WBM ou PRP em 240 horas (20x). **C)** Aspecto histológico de um fígado normal (40x).

A repentina perda de massa hepática causa alterações em diferentes níveis, uma vez que o fígado é um órgão essencial para manutenção da homeostase corporal. Apenas no tecido hepático, a hepatectomia de 70% ou mais causa a ativação de mais de 100 genes que não são expressos no fígado normal (Michalopoulos, 2007). Um painel de citocinas e fatores de crescimento são liberados pelas células não parenquimatosas e ativam a regeneração hepática. Entre estes, encontram-se TNF- α , IL6, EGF, VEGF, HGF, PDGF e Serotonina, que induzem aos hepatócitos a entrar em mitoses (Taub, 2004; Clavien, 2008).

Sabe-se que o HGF é um fator humoral hepatotrófico que promove a regeneração hepática e que sua expressão aumenta em resposta a danos no fígado (Nakamura et al., 2011). Liu e Chang (2006) observaram um aumento nos níveis séricos de HGF em ratos tratados com células da medula óssea total nas 48 horas após hepatectomia parcial. No presente estudo não foi observado diferenças nos níveis séricos de HGF em nenhum dos grupos em nenhum tempo. Este resultado sugere que outros fatores seriam responsáveis pela melhora dos animais tratados com as células. Há uma complexidade na interação e sobreposição das funções dos fatores de crescimento, o que implica que mesmo na ausência de um deles a regeneração hepática continue (Clavien, 2008).

Outro fator importante na regeneração hepática é o fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGF (Michalopoulos e DeFrances, 1997). Durante a regeneração hepática, os hepatócitos produzem PDGF estimulando a mitogênese nas células estreladas e nas células endoteliais (Pinzani, 2002; Michalopoulos, 2007). Além disso, PDGF promove a síntese de DNA e proliferação nos hepatócitos *in vitro* (Kimura et al., 1998; Moteki et al., 2011). Na hepatectomia parcial, as células endoteliais aumentam os receptores de PDGF durante a fase proliferativa (Michalopoulos, 2007). Estes receptores têm atividade intrínseca tirosina quinase e ativam as vias ERK, PI3K e Akt (Haluska e Adjei, 2001; Moteki et al., 2011). Neste estudo foi avaliada a expressão de *Pdgf-b* nos fígados remanescentes nos diferentes tempos. O grupo PRP mostrou uma expressão significativamente aumentada de quatro vezes os valores do grupo EC nas 72 horas, que eram semelhantes ao observado para o grupo WBM neste mesmo tempo. Pinzani et al. (1994) em um modelo de IHA induzido pela administração de

Tetracloroeto de Cálcio (CCl₄) mostraram, através do ensaio de proteção contra RNase, a presença de PDGF no fígado às 48 horas após o dano, a qual se manteve por 72 horas.

Tem-sido demonstrado que a serotonina derivada de plaquetas e o receptor 5HT2B são potentes iniciadores da regeneração hepática após uma ressecção maciça (Lesurtel et al., 2006). O receptor de serotonina, 5HT2 é uns dos mais abundantes no fígado e é subdividido em 5HT2A, 5HT2B, 5HT2C (Lucaites et al., 1996). Estes receptores pertencem à família de proteínas G acopladas a receptores (Julius et al., 1990; Teitler et al., 2002). Quando a serotonina é ligada ao receptor tipo 5HT2B ativa a proteína G e estimula a fosfolipasa C, provocando a rápida liberação de PI3K que resulta no incremento de cálcio intracelular (Launey et al., 1996). Isto ativa uma cascata de transdução de sinais que culmina na ativação das vias mitogênicas através de ERK e ciclina D1 (Launey et al., 1996; Negibil et al., 2000). Neste estudo foi avaliada a expressão gênica do receptor *5Ht2b* no fígado remanescente nos diferentes tempos. Às 72 horas, o grupo PRP apresentou uma expressão 40 vezes maior em relação aos demais grupos. Lesurtel et al. (2006) encontraram uma expressão quatro vezes aumentada do receptor *5Ht2b* em camundongos às 48 horas após hepatectomia de 70%. Estes resultados indicam que a serotonina derivada de plaquetas tem um efeito importante na regeneração hepática através do receptor 5HT2B.

As plaquetas são necessárias para uma resposta total do fígado ao dano, tanto em animais como em pacientes (Murata et al., 2007; Alkozai et al., 2010). Após uma ressecção parcial em pacientes, uma contagem baixa de plaquetas está associada com um atraso na recuperação das funções hepáticas e aumento da mortalidade (Alkozai et al., 2010; Amano et al., 2011). Além disso, tem se demonstrado as propriedades benéficas do plasma rico em plaquetas na regeneração de vários tipos de tecido, inclusive na regeneração hepática após hepatectomia parcial (Arora et al., 2009; Matsuo et al., 2011; Andia et al., 2012).

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que as plaquetas têm um papel importante na sobrevivência de animais submetidos ao dano hepático e exercem os seus efeitos de forma parácrina. Provavelmente, o efeito do grupo

PRP está associado a uma taxa de regeneração hepática gradual e menor que nos demais grupos e a uma elevada expressão gênica de *5ht2b* e *Pdgf-b* no fígado remanescente 72 horas após a hepatectomia. Ainda que os mecanismos pelos quais o PRP aumente a sobrevida após a hepatectomia de 90% não estejam completamente esclarecidos, este parece ser uma boa opção terapêutica para o tratamento da IHA.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliado o efeito das plaquetas em animais submetidos à lesão hepática aguda induzida por hepatectomia parcial de 90% (HP 90%).

A sobrevivência em 10 dias foi maior no grupo tratado com plasma rico em plaquetas (PRP) encapsulado do que nos grupos medula óssea total (WBM) encapsulada ou cápsulas vazias (EC).

A taxa de regeneração hepática nas primeiras 48 horas não apresentou diferenças importantes entre os grupos. Porém, às 72 horas o grupo EC teve a maior taxa de regeneração hepática. Já no dia 10 o grupo WBM teve maior taxa de regeneração hepática em comparação ao grupo PRP.

A taxa de proliferação hepatocitária, medida pelo número de mitoses, foi maior às 48 horas para o grupo PRP em relação ao grupo EC. Não houve diferença em relação à marcação com BrdU.

Os níveis séricos de HGF não apresentaram diferenças entre os grupos em nenhum tempo.

A expressão de *5Ht2b* e *Pdgf-b* foi significativamente maior no grupo PRP às 72 horas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Alkozai EM, Nijsten MW, de Jong KP, de Boer MT, Peeters PM, Slooff MJ, Porte RJ, Lisman T. Immediate postoperative low platelet count is associated with delayed liver function recovery after partial liver resection. *Ann Surg.* 2010 Feb;251(2):300-6.
- Amano H, Tashiro H, Oshita A, Kobayashi T, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Itamoto T, Asahara T, Ohdan H. Significance of platelet count in the outcomes of hepatectomized patients with hepatocellular carcinoma exceeding the Milan criteria. *J Gastrointest Surg.* 2011 Jul;15(7):1173-81.
- Amer ME, El-Saved SZ, El-Kheir WA, Gabr H, Gomaa AA, El-Noomani N, Hegazy M. Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011. Oct;23(10):936-41.
- Andia I, Sánchez M, Maffulli N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther.* 2012 Jan;12(1):7-22.
- Antoniades CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D. The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *J Hepatol* 2008; 49: 845-861
- Arora NS, Ramanayake T, Ren YF, Romanos GE. Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent.* 2009 Aug;18(4):303-10.
- He S, Atkinson C, Qiao F, Chen X, Tomlinson S. "Ketamine-xylazine-acepromazine compared with isoflurane for anesthesia during liver transplantation in rodents." *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010 49(1): 45-51.
- Bae SH. Clinical application of stem cells in liver disease. *Korean J Hepatol.* 2008 Sep;14(3):309-17.
- Balasubramanian S, Paulose CS. Induction of DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes by serotonin: possible involvement of serotonin S2 receptor. *Hepatology.* 1998 Jan;27(1):62-6.
- Barminko J, Kim JH, Otsuka S, Gray A, Schloss R, Grumet M, Yarmush ML. Encapsulated mesenchymal stromal cells for in vivo transplantation. *Biotechnol Bioeng.* 2011 Nov;108(11):2747-58.
- Belardinelli MC, Pereira F, Baldo G, Vicente Tavares AM, Kieling CO, da Silveira TR, Meurer L, Soares Duarte ME, Giugliani R, Matte U. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology.* 2008; 247(1):1-5.
- Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A, Durham J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl.* 2000; 6(1):32-40.
- Campbell JS, Prichard L, Schaper F, Schmitz J, Stephenson-Famy A, Rosenfeld ME, Argast GM, Heinrich PC, Fausto N. Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin Invest.* 2001 May;107(10):1285-92.

- Centeno MA, Bes DF, Sasbon JS. Mortality risk factors of a pediatric population with fulminant hepatic failure undergoing orthotopic liver transplantation in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2002; 3:227-233.
- 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. *Transplant Proc*. 2010 Jun;42(5):1907-14.
- Clavien P. A. and Graf R. Liver regeneration and platelets. *British Journal of Surgery* 2009; 96: 965–966.
- Clavien PA. Liver regeneration: a spotlight on the novel role of platelets and serotonin. *Swiss Med Wkly*. 2008 Jun 28;138(25-26):361-70.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107(1):367–72.
- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996;274:1379–1383.
- Devictor D, Tissieres P, Afanetti M, Debray D. Acute liver failure in children. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011 Jun;35(6-7):430-7.
- Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for metabolic disorders, experience at King’s College hospital and review of literature. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 457-460.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99(10): 3838–43.
- Eckly A, Strassel C, Cazenave JP, Lanza F, Léon C, Gachet C. Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol Biol*. 2012;788:175-92.
- Ellor S, Shupe T, Petersen B. Stem cell therapy for inherited metabolic disorders of the liver. *Exp Hematol*. 2008; 36(6):716-25.
- Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol*. 2000; 32:19–31
- Ferreira CT, Vieira SM, Kieling CO, Silveira TR. Hepatitis A acute liver failure: follow-up of paediatric patients in southern Brazil. *J Viral Hepat*. 2008; 15 Suppl 2:66-8.
- Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med*. 2009 Oct;266(4):339-57.
- Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB and Rodeo SA. Platelet-Rich Plasma: From Basic Science to Clinical Applications. *Am J Sports Med* 2009 37: 2259.
- Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Aug;15(4):197-204.

- Gazit V, Weymann A, Hartman E, Finck BN, Hruz PW, Tzekov A, Rudnick DA. Liver regeneration is impaired in lipodystrophic fatty liver dystrophy mice. *Hepatology*. 2010 Dec;52(6):2109-17. doi: 10.1002/hep.23920. Epub 2010 Oct 21.
- Gaub J, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 1984; 4: 902–4.
- Gilgenkrantz H, Collin de l'Hortet A. New insights into liver regeneration. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011 Oct;35(10):623-9.
- Haluska P, Adjei AA. Receptor tyrosine kinase inhibitors. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001 Feb;2(2):280-6.
- Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver, 1: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*. 1931; 12:186–202.
- Hisakura K, Murata S, Fukunaga K, Myronovych A, Tadano S, Kawasaki T, Kohno K, Ikeda O, Pak S, Ikeda N, Nakano Y, Matsuo R, Konno K, Kobayashi E, Saito T, Yasue H, Ohkohchi N. Platelets prevent acute liver damage after extended hepatectomy in pigs. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010 Nov;17(6):855-64.
- Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation*. 2004 May 27;77(10):1481-6.
- Hoshi R, Murata S, Matsuo R, Myronovych A, Hashimoto I, Ikeda H, Ohkohchi N. Freeze-dried platelets promote hepatocyte proliferation in mice. *Cryobiology*. 2007 Dec;55(3):255-60.
- Ito H, Ando K, Ishikawa T, et al. Role of TNF-alpha produced by nonantigen-specific cells in a fulminant hepatitis mouse model. *J Immunol* 2009; 182: 391–7.
- Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol*. 2004; 6:532-9.
- Kawasaki T, Murata S, Takahashi K, Nozaki R, Ohshiro Y, Ikeda N, Pak S, Myronovych A, Hisakura K, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Ohkohchi N. Activation of human liver sinusoidal endothelial cell by human platelets induces hepatocyte proliferation. *J Hepatol*. 2010 Oct;53(4):648-54.
- Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, Rao P, Pande G, Narusu ML, Khaja MN, Pramila R, Habeeb A, Habibullah CM. Treatment of Crigler-Najjar Syndrome type 1 by hepatic progenitor cell transplantation: a simple procedure for management of hyperbilirubinemia. *Transplant Proc*. 2008a; 40(4):1148-50.
- Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, Rao P, Pande G, Narusu ML, Khaja MN, Pramila R, Habeeb A, Habibullah CM. Management of hyperbilirubinemia in biliary atresia by hepatic progenitor cell transplantation through hepatic artery: a case report. *Transplant Proc*. 2008b; 40(4):1153-5.

- Kieling CO. Terapia celular na insuficiência hepática aguda: estudo experimental utilizando células microencapsuladas. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Gastroenterológicas, UFRGS. 2012, 130pp.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
- Lagranha VL, Baldo G, de Carvalho TG, Burin M, Saraiva-Pereira ML, Matte U, Giugliani R. In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis.* 2008;23(4):469-84.
- Launay JM, Birraux G, Bondoux D, Callebert J, Choi DS, Loric S, Maroteaux L. Ras involvement in signal transduction by the serotonin 5-HT_{2B} receptor. *J Biol Chem.* 1996 Feb 9;271(6):3141-7.
- Lee WM, Squires RH Jr, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology.* 2008; 47(4):1401-15.
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science.* 2006 Apr 7;312(5770):104-7.
- Li TZ, Kim JH, Cho HH, Lee HS, Kim KS, Lee SW, Suh H. Therapeutic potential of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells differentiated with growth-factor-free coculture method in liver-injured rats. *Tissue Eng Part A.* 2010 Aug;16(8):2649-59.
- Li ZR, Mao XH, Hu XX, Nie SD, Shi YZ, Xiang H, Yang JH, Cao OD. Primary human hepatocyte transplantation in the therapy of hepatic failure: 2 cases report. *Asian Pac J Trop Med.* 2012 Feb;5(2):165-8.
- Lin H, Xu R, Zhang Z, Chen L, Shi M, Wang FS. Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. *Cell Mol Immunol.* 2011 Jan;8(1):19-22.
- Liu ZC, Chang TM. Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model. *Liver Transpl.* 2006 Apr;12(4):566-72.
- Liu ZC, Chang TM. Transplantation of bioencapsulated bone marrow stem cells improves hepatic regeneration and survival of 90% hepatectomized rats: a preliminary report. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2005;33(4):405-10.
- Lucaites VL, Nelson DL, Wainscott DB and Baez M: Receptor subtype and density determine the coupling repertoire of the 5-HT₂ receptor subfamily. *Life Sci* 1996. 59: 1081-1095.
- Louis H, Le Moine O, Peny MO, et al. Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* 1997; 112: 935-42.

- Mai G, Huy NT, Morel P, Mei J, Andres A, Bosco D, Baertschiger R, Toso C, Berney T, Majno P, Mentha G, Trono D, Buhler LH. Treatment of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated primary or immortalized xenogeneic hepatocytes. *Xenotransplantation*. 2005; 12(6):457-64.
- Makino H, Togo S, Kubota T, Morioka D, Morita T, Kobayashi T, Tanaka K, Shimizu T, Matsuo K, Nagashima Y, Shimada H. A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. *J Surg Res*. 2005 Aug;127(2):171-6.
- Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int*. 2008 Jan;28(1):3-11.
- Matte U, Lagranha VL, de Carvalho TG, Mayer FQ, Giugliani R. Cell microencapsulation: a potential tool for the treatment of neuronopathic lysosomal storage diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2011 Oct;34(5):983-90.
- Matsuo R, Ohkohchi N, Murata S, Ikeda O, Nakano Y, Watanabe M, Hisakura K, Myronovych A, Kubota T, Narimatsu H and Ozaki M. Platelets Strongly Induce Hepatocyte Proliferation with IGF-1 and HGF *In Vitro*. *Journal of Surgical Research*. 2008; 145, 279–286.
- Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-8.
- Mei J, Sgroi A, Mai G, Baertschiger R, Gonelle-Gispert C, Serre-Beinier V, Morel P, Bühler LH. Improved survival of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated cryopreserved porcine hepatocytes in mice. *Cell Transplant*. 2009;18(1):101-10.
- Méndez-Sánchez N, Chávez-Tapia NC, Uribe M. Hepatocyte transplantation for acute and chronic liver diseases. *Ann Hepatol*. 2005 Jul-Sep;4(3):212-5.
- Meyburg J, Schmidt J, Hoffmann GF. Liver cell transplantation in children. *Clin Transplant*. 2009 Dec;23 Suppl 21:75-82.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):60-6.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):286-300.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*. 2010 Jan;176(1):2-13.
- Moteki H, Kimura M, Ogihara M. Activation of extracellular-signal regulated kinase by platelet-derived growth factor is potentiated by phenylephrine in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(7):980-6.
- Muraca M . Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. *Dig Liver Dis*. 2011 Mar;43(3):180-7.
- Murata S, Ohkohchi N, Matsuo R, Ikeda O, Myronovych A, Hoshi R. Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. *World J Surg*. 2007;31:808–16.

- Myronovych A, Murata S, Chiba M, Matsuo R, Ikeda O, Watanabe M, Hisakura K, Nakano Y, Kohno K, Kawasaki T, Hashimoto I, Shibasaki Y, Yasue H, Ohkohchi N. Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *Hepatol.* 2008 Sep;49(3):363-72.
- Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Jan;26 Suppl 1:188-202.
- Nguyen NT, Vierling JM. Acute liver failure. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011 Jun;16(3):289-96.
- Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Fanartzis M, Daruwalla J, Christophi C. A model of partial hepatectomy in mice. *J Invest Surg.* 2004 Sep-Oct;17(5):291-4.
- Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N, Soejima Y, Taketomi A, Shimada M, Maehara Y. Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. *Am J Transplant.* 2010 Jul;10(7):1580-7.
- Nocito A, Georgiev P, Dahm F, Jochum W, Bader M, Graf R, Clavien PA. Platelets and platelet-derived serotonin promote tissue repair after normothermic hepatic ischemia in mice. *Hepatology.* 2007 Feb;45(2):369-76.
- Okano, J. et al. Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 309, 298–304.
- Orive G, Hernández RM, Rodríguez Gascón A, Calafiore R, Chang TM, de Vos P, Hortelano G, Hunkeler D, Lacík I, Pedraz JL. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol.* 2004; 22(2):87-92.
- Paoloni J, De Vos RJ, Hamilton B, Murrell GA, Orchard J. Platelet-rich plasma treatment for ligament and tendon injuries. *Clin J Sport Med.* 2011 Jan;21(1):37-45.
- Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery.* 1997 121:142–149.
- Papadimas GK, Tzirogiannis KN, Panoutsopoulos GI, Demonakou MD, Skaltsas SD, Hereti RI, Papadopoulou-Daifoti Z, et al. Effect of serotonin receptor 2 blockage on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat liver. *Liver Int.* 2006;26:352–61.
- Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007a; 363:247–52.
- Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One.* 2007b Sep 26;2(9):e941

- Paul D, Piasecki A. Rat platelets contain growth factor(s) distinct from PDGF which stimulate DNA synthesis in primary adult rat hepatocytes cultures. *Exp Cell Res* 1984;154:95–100.
- Pinzani, M. PDGF and Signal Transduction In Hepatic Stellate Cells. *Frontiers in Bioscience* 7, d1720-1726, August 1, 2002.
- Polson J, Lee WM; American Association for the Study of Liver Disease. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology*. 2005; 41(5):1179-97.
- Possamai LA, Antoniades CG, Anstee QM, Quaglia A, Vergani D, Thursz M, Wendon J. Role of monocytes and macrophages in experimental and human acute liver failure. *World J Gastroenterol*. 2010 Apr 21;16(15):1811-9.
- Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise ND, Segovia JC. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology*. 2006; 43:108-116.
- Rabanel JM, Banquy X, Zouaoui H, Mokhtar M, Hildgen P. Progress Technology in Microencapsulation Methods for Cell Therapy. *Biotechnol. Prog.* 2009; Vol. 25, No. 4.
- Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol*. 2000 Apr;81(2):145-57
- Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001;12:261—73.
- Ripoche J. Blood platelets and inflammation: their relationship with liver and digestive diseases. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011 May;35(5):353-7
- Roy S, Driggs J, Elgharably H, Biswas S, Findley M, Khanna S, Gnyawali U, Bergdall VK, Sen CK. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound Repair Regen*. 2011 Nov;19(6):753-66.
- Rutherford A, Chung RT. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. *Semin Liver Dis*. 2008 May;28(2):167-74.
- Sass DA, Shakil AO. Fulminant hepatic failure. *Liver Transpl*. 2005; 11(6):594-605.
- Sgroi A, Gonelle-Gispert C, Morel P, Baertschiger RM, Niclauss N, Mentha G, Majno P, Serre-Beinier V, Buhler L. Interleukin-1 receptor antagonist modulates the early phase of liver regeneration after partialhepatectomy in mice. *PLoS One*. 2011b;6(9):e25442.
- Sgroi A, Mai G, Morel P, Baertschiger RM, Gonelle-Gispert C, Serre-Beinier V, Buhler LH. Transplantation of encapsulated hepatocytes during acute liver failure improves survival without stimulating native liver regeneration. *Cell Transplant*. 2011a Mar 7.
- Shanmukhappa K, Matte U, Degen JL, Bezerra JA. Plasmin-mediated proteolysis is required for hepatocyte growth factor activation during liver repair. *J Biol Chem*. 2009; 284(19):12917-23.

- Shi XL, Zhang Y, Gu JY, Ding YT. Coencapsulation of hepatocytes with bone marrow mesenchymal stem cells improves hepatocyte-specific functions. *Transplantation*. 2009 Nov 27;88(10):1178-85.
- Shimabukuro R, Kawanaka H, Tomikawa M, Akahoshi T, Konishi K, Yoshida D, Anegawa G, Uehara H, Hashimoto N, Hashizume M, Maehara Y. Effect of thrombopoietin on platelet counts and liver regeneration after partial hepatectomy in a rat model. *Surg Today*. 2009;39(12):1054-9.
- Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ, Hruz PW, Rudnick DA. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2004 Dec;40(6):1322-32.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006 Jan;24(1):74-85.
- Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1327-33.
- Sundaram V, Shaikh OS. Acute liver failure: current practice and recent advances. *Gastroenterol Clin North Am*. 2011 Sep;40(3):523-39.
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10): 836-47.
- Teitler M, Herrick-Davis K, Purohit A. Constitutive activity of G-protein coupled receptors: emphasis on serotonin receptors. *Curr Top Med Chem*. 2002 Jun;2(6):529-38.
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75:389-397.
- van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*. 2008; 47(5):1634-43.
- Van Thiel DH, Brems J, Nadir A, Idilman R, Colantoni A, Holt D, Edelstein S. Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol* 2001; 36:1-4.
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. 2003 Apr 24;422(6934):901-4.
- Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Padiaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK, Zarnegar R. 2002. A mechanism of cell survival: Sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 9:411-421.
- Watanabe M, Murata S, Hashimoto I, Nakano Y, Ikeda O, Aoyagi Y, Matsuo R, Fukunaga K, Yasue H, Ohkohchi N. Platelets contribute to the reduction of liver fibrosis in mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Jan;24(1):78-89.
- Wesson RN, Cameron AM. Stem cells in acute liver failure. *Adv Surg*. 2011;45:117-30.

- Wu Z, Han M, Chen T, Yan W, Ning Q. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver Int.* 2010 Jul;30(6):782-94
- Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Betz U, Lauber J, Buer J, Manns MP, Müller W, Trautwein C. Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11281-8.
- Yagi K, Kojima M, Oyagi S, Ikeda E, Hirose M, Isoda K, Kawase M, Kondoh M, Ohgushi H. Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine. *Yakugaku Zasshi.* 2008 Jan;128(1):3-9.
- Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jun;7(6):454-65.