



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Tesis para acceder al grado académico de DOCTOR

**“Aplicación de la solución  
BES-Gluconato-Polietilenglicol  
en la preservación de hepatocitos destinados al  
trasplante experimental”**

**Lic. CARLA TOMATIS**

DIRECTOR: Edgardo E. Guibert  
CO-DIRECTOR: Joaquin V. Rodriguez

CENTRO BINACIONAL (ARGENTINA-ITALIA) DE INVESTIGACIONES  
EN CRIOBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA (CAIC)

Rosario - Argentina  
2021

**“Aplicación de la solución**

**BES-Gluconato-Polietilenglicol**

**en la preservación de hepatocitos destinados al trasplante experimental”**

**CARLA TOMATIS**

Licenciada en Biotecnología, UNL

Este trabajo de tesis es presentado como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biomédicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no fue presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC), UNR, durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2016 y el 31 de Marzo de 2021, bajo la dirección del Dr. Edgardo E. Guibert.

Director: Dr. Edgardo E. Guibert

Jurado 1: Dra. Cristina Carnovale

Jurado 2: Dra. Valeria Sigot

Jurado 3: Dr. Pablo Stringa

Defendida: 10 de Septiembre de 2021

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la Universidad Nacional de Rosario y en especial a la Facultad de Ciencias Médicas, por darme la oportunidad de seguir creciendo en la vida académica de excelencia. A los profesores, al personal no docente, autoridades, a todos los que componen este maravilloso sistema público de educación. Mención especial para quien fue director del doctorado durante casi toda mi cursada, Alfredo, por aconsejar, guiar, hacernos sentir la pasión por la ciencia y llevar adelante este doctorado con tanta dedicación y buenos valores.

Gracias al CAIC, por darme el espacio para desarrollar la Tesis, a las personas que me enseñaron y acompañaron en este proceso: a mi director Edgardo y a Joaquín. A Cele con sus consejos desde la experiencia, a los monos Leo y Matías, sin ustedes no hubiese sido lo mismo. Al resto de los integrantes. A las tesinistas que pasaron por el lab y que hoy son parte de mi vida, Andrea, Cata, Noe y la última que me aguantó, Irina. Gracias a los que hicieron esta etapa más amena, a los que bancaron los ataques de furia, llanto, y quejas hasta la línea del abandono. Gracias por las risas y alegrías, gracias por compartir la música, la vida y la ciencia. Gracias a todos por mostrarme lo que quiero hacer y cómo quiero ser.

A mi familia, que sin entender aún qué hago, siempre están, a mis viejos, a mi hermana. Dedicada especialmente a mi abuelo Pocholo. Al resto de mi familia que son un pedazo de mí.

A mis compañeros del doctorado, con los que compartimos la vida académica, por sumar en cada curso y seminario. Para ellos, con quienes además compartí las birras, a Guille, Chuli y Pato por bancar siempre.

A la gente que me regaló el gimnasio y Rosario, a toda la banda del gym UNR que me hizo amar la ciudad y soportó mi intensidad cada día. Mención especial para Lara, Maru, Cele. A Alf y Miriam, al personal no docente y a los profes. A la nueva banda del CCF que llenó de vida esta etapa tan inusual para todos. John, Emi y Luli, los llevo conmigo.

A mis amigos de siempre, a mi persona favorita: Anita.

Gracias a cada uno de los que estuvo en esta etapa de mi vida, apoyando, acompañando y también a los que no confiaron en mí, porque me dieron toda la fuerza para lograrlo.

Gracias a Dios, que siempre estuvo de mi lado.

¡GRACIAS!

## CONGRESOS

Tomatis, C; De Paz, L; Guibert, E. "Application of the BGP-CS solution in cryopreservation of rat hepatocytes", **Reunión Anual de SOCIEDADES DE BIOCIENCIA 2019**. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 13-16 de Noviembre de 2019.

Tomatis, C; Juan de Paz, L; Robert, MC; Guibert, EE. "Optimización de la carga y remoción del agente crioprotector dimetilsulfóxido en hepatocitos de rata mediante un modelo matemático", **XIII Jornadas de Ciencia y Tecnología**. Rosario, Santa Fe, Argentina. 16 de Octubre 2019.

Carnevale, ME; Tomatis, C; Osorio, JS; Guibert, EE; Rodriguez, JV. "¿Es posible utilizar la solución BES-Gluconato-Polietilenglicol (BGP-CS) para preservar tanto hepatocitos aislados como hígados para trasplante?", **XII Jornadas de Ciencia y Tecnología**. Rosario, Santa Fe, Argentina. 17 y 18 de octubre de 2018.

Carnevale, ME; Tomatis, C; Osorio, JS; Guibert, EE; Rodriguez, JV. "Is the Bes-Gluconate-Polyethylene Glycol (BGP-CS) solution suitable for the preservation of isolated hepatocytes and whole livers?", **X Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (10° COLAOB)**. João Pessoa, Brasil. Del 22 al 25 de agosto de 2018.

Tomatis, C; Juan de Paz, L; Osorio, J; Robert, MC; Guibert, EE; Rodriguez, JV. "Un método simple para monitorear la concentración de dimetilsulfóxido en protocolos de criopreservación. Aplicación en hepatocitos aislados de rata", **10° Congreso Latinoamericano de Órganos Artificiales y Biomateriales COLAOB**. Joao Pessoa, Paraíba, Brasil. 22-25 de Agosto de 2018.

Tomatis, C; Berca, C; Rodríguez, JV; Guibert, EE; Robert, MC. "A novel application of Bes-Gluconate-Polyethylene Glycol (BGP) preservation solution to maintain isolated cells for bioartificial devices. Functionality/viability studies", **14° Congreso de la Sociedad de Biomateriales, Órganos Artificiales e Ingeniería de Tejidos de América Latina - SLABO (5ª Edición Taller Biomateriales, Ingeniería de Tejidos y Órganos Artificiales - OBI)**. Maresias, SP, Brasil, 20-24 de Agosto de 2017.

*Carla Tomatis*

## ABREVIATURAS

A: absorbancia

ACP: agente crioprotector

AMP: adenosín monofosfato

ATP: adenosín trifosfato

BES: ácido N,N-bis (2-hidroxietil)-2-aminoetano sulfónico

BGP: BES-Gluconato-Polietilenglicol

CFDA, SE: éster succinimidílico de diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína

CRIO: criopreservación

DMSO: dimetilsulfóxido

EROs: especies reactivas del oxígeno

FDA: diacetato de fluoresceína

H: Hoechst

HBSS: solución salina balanceada tipo Hank's (por sus siglas en inglés *Hank's balanced salt solution*)

H-E: hematoxilina-eosina

HES: almidón hidroxietilado

HTK: Solución Histidina-Triptófano-Cetoglutarato

I/R: isquemia/reperfusión

IP: yoduro de propidio

KH: Krebs-Heinseleit

KHr: solución KH de respiración

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro

PBS: tampón fosfato salino (por sus siglas en inglés: *phosphate-buffered saline*)

*Carla Tomatis*

PC: peso corporal

PEG: polietilenglicol

PH: preservación hipotérmica

SN: sobrenadante

SNP: nitroprusiato de sodio

TB: azul de tripán (por sus siglas en inglés *trypan blue*)

Tg: temperatura de transición vítrea

UWm: solución de la Universidad de Wisconsin modificada

WE: medio de cultivo Williams-E

## ANGLICISMOS

*Blebs*: protuberancias o ampollas en la superficie celular

*Buffer*: sistema constituido por un ácido débil y su base conjugada o por una base y su ácido conjugado que tiene capacidad "tamponante", es decir, que puede oponerse a cambios de pH (en un margen concreto) en una disolución acuosa

*Pellet*: material sólido decantado en el fondo de un recipiente cuando una suspensión es centrifugada

*Pool*: conjunto de muestras de un grupo

*Rewarming*: calentamiento normotérmico

*Carla Tomatis*

*La ciencia es movimiento, es comunidad, es problema y solución.*

*Es ignorar y dudar, error y frustración, es soledad.*

*Es aprender y compartir, es tiempo y equipo, es esfuerzo y dedicación.*

*Es satisfacción.*

*CT*

## RESUMEN

La terapia celular con hepatocitos es una alternativa al trasplante de órgano entero para el tratamiento de ciertas enfermedades del hígado. Una herramienta fundamental en este procedimiento es la preservación de los hepatocitos, cuya finalidad es mantener su funcionalidad desde el aislado hasta el requerimiento.

En el siguiente trabajo de Tesis Doctoral se busca dilucidar el potencial de una solución desarrollada en el laboratorio denominada BGP (por sus componentes BES-Gluconato-Polietilenglicol) para la preservación hipotérmica y la criopreservación de hepatocitos aislados de rata con fines terapéuticos. A fin de validar su uso se la comparó con las soluciones comerciales Histidina-Triptófano-Cetoglucurato y de la Universidad de Wisconsin. En una primera etapa se realizaron pruebas *in vitro* en suspensión y en cultivo. Como prueba final se utilizó un modelo *in vivo* de trasplante de hepatocitos. Adicionalmente, se presentaron dos optimizaciones, una empírica y una teórica, del protocolo de criopreservación por enfriamiento lento.

La solución BGP demostró una performance similar a las soluciones comerciales tanto en la preservación hipotérmica como en la criopreservación de hepatocitos aislados de rata. Los hepatocitos conservaron la viabilidad y funcionalidad en las pruebas en suspensión y en cultivo, y respondieron de manera similar al control en el modelo de trasplante experimental.

En la presente Tesis se logró validar el uso de la solución BGP para la preservación de hepatocitos aislados de rata. La BGP se posiciona como una solución versátil alternativa, de fácil preparación en cualquier laboratorio, sin restricciones de acceso en cuanto a sus componentes y de menor costo que las soluciones existentes en el mercado.

ÍNDICE

<b>1)</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Hígado</b>	<b>1</b>
1.1.1	Características generales.....	1
1.1.2	Arquitectura celular .....	4
1.1.3	Funciones.....	6
<b>1.2</b>	<b>Trasplante hepático</b>	<b>7</b>
1.2.1	Estado del arte .....	7
1.2.2	Terapias alternativas.....	9
<b>1.3</b>	<b>Preservación</b>	<b>11</b>
1.3.1	Preservación hipotérmica.....	12
1.3.2	Criopreservación .....	13
1.3.2.1	Agentes Crioprotectores .....	15
	<b>DMSO</b> .....	<b>16</b>
1.3.2.2	Vitrificación .....	17
1.3.2.3	Enfriamiento lento convencional con congelamiento .....	17
	<b>Nucleación</b> .....	<b>18</b>
	<b>Velocidad de enfriamiento</b> .....	<b>19</b>
	<b>Tipo celular</b> .....	<b>21</b>
	<b>Agregado y remoción del ACP</b> .....	<b>22</b>
	<b>Proceso de descongelamiento</b> .....	<b>22</b>
1.3.2.4	Modelado matemático.....	23
1.3.3	Injuria celular en la preservación .....	27
1.3.4	Soluciones de preservación.....	36
	<b>Soluciones de preservación para células aisladas</b> .....	<b>39</b>
<b>2)</b>	<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>42</b>
<b>3)</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>4)</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Descripción de la solución de preservación BGP y soluciones comerciales</b>	<b>44</b>
4.1.1	Formulaciones.....	44
4.1.2	Análisis de costo de las soluciones .....	45
<b>4.2</b>	<b>Establecimiento del modelo experimental</b>	<b>46</b>

4.2.1	Animales de experimentación .....	46
4.2.2	Procedimientos quirúrgicos .....	46
4.2.3	Obtención de hepatocitos aislados .....	47
4.2.4	Pruebas de viabilidad y funcionalidad .....	49
	<i>Trypan Blue</i> .....	49
	<i>Ioduro de Propidio-Hoechst</i> .....	50
	<i>Diacetato de fluoresceína</i> .....	51
	<i>MTT</i> .....	52
	<i>Actividad respiratoria</i> .....	52
<b>4.3</b>	<b>Aplicación de la BGP en la preservación hipotérmica</b>	<b>54</b>
4.3.1	Comparación con las soluciones comerciales.....	54
4.3.1.1	Recuperación normotérmica .....	55
4.3.1.2	Pruebas en suspensión .....	55
4.3.2	Cultivo .....	56
<b>4.4</b>	<b>Aplicación de la BGP en la criopreservación</b>	<b>57</b>
4.4.1	Protocolo de Criopreservación.....	57
	<i>Adición del Crioprotector</i> .....	57
	<i>Velocidad de enfriamiento</i> .....	57
	<i>Etapas de descongelado y remoción del ACP</i> .....	59
4.4.1.1	Recuperación normotérmica.....	59
4.4.1.2	Pruebas en suspensión .....	59
4.4.2	Tolerancia osmótica y modelado matemático. Análisis <i>in silico</i> .....	59
4.4.3	Comparación con las soluciones comerciales.....	61
4.4.3.1	Recuperación normotérmica.....	61
4.4.3.2	Pruebas en suspensión .....	61
4.4.4	Cultivo .....	61
<b>4.5</b>	<b>Trasplante celular de hepatocitos preservados con BGP</b>	<b>61</b>
4.5.1	Marcado de hepatocitos.....	61
4.5.2	Trasplante .....	62
<b>4.6</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>63</b>
<b>5)</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>64</b>
<b>5.1</b>	<b>Descripción de la solución de preservación BGP y soluciones comerciales</b>	<b>64</b>
5.1.1	Formulaciones.....	64
5.1.2	Análisis de costo de las soluciones .....	66

<b>5.2 Aplicación de la BGP en la preservación hipotérmica</b>	<b>70</b>
5.2.1 Comparación con las soluciones comerciales.....	70
5.2.2 Pruebas en cultivo.....	76
<b>5.3 Aplicación de la BGP en la criopreservación</b>	<b>84</b>
5.3.1 Protocolo de criopreservación .....	85
<b>Velocidad de enfriamiento</b> .....	85
<b>Adición del ACP</b> .....	91
<b>Remoción del ACP</b> .....	92
5.3.2 Tolerancia osmótica y modelado matemático. Análisis <i>in silico</i> .....	93
5.3.3 Comparación con las soluciones comerciales.....	99
5.3.4 Pruebas en cultivo.....	104
5.3.5 Actividad respiratoria (células PH y CRIO en suspensión) .....	109
<b>5.4 Trasplante celular. Estudio <i>in vivo</i></b>	<b>111</b>
<b>6) CONCLUSIONES</b>	<b>117</b>
<b>7) BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>120</b>

# 1) INTRODUCCIÓN

## 1.1 Hígado

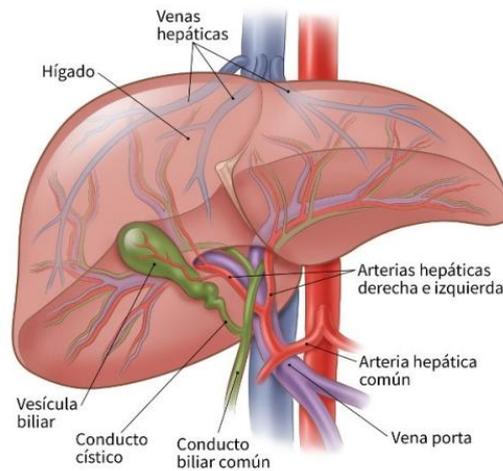
### 1.1.1 Características generales

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo humano y tiene un protagonismo trascendental en la actividad metabólica. Durante la vida fetal, la mayoría de sus funciones son asumidas por el hígado de la madre y la placenta. A partir de la cuarta semana del embarazo aparece como un órgano diferenciado y termina su desarrollo post-natalidad (Grisham, 2009).

El hígado normal tiene una forma triangular y es de color pardo rojizo con una superficie externa lisa. Tiene un peso aproximado de 1500 g, lo que supone alrededor del 2 % del peso de una persona adulta (Sibulesky, 2013).

Anatómicamente, se encuentra situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, justo por debajo del diafragma, y está recubierto por la cápsula fibrosa de Glisson sobre la cual reposa el peritoneo (Chew *et al*, 2019).

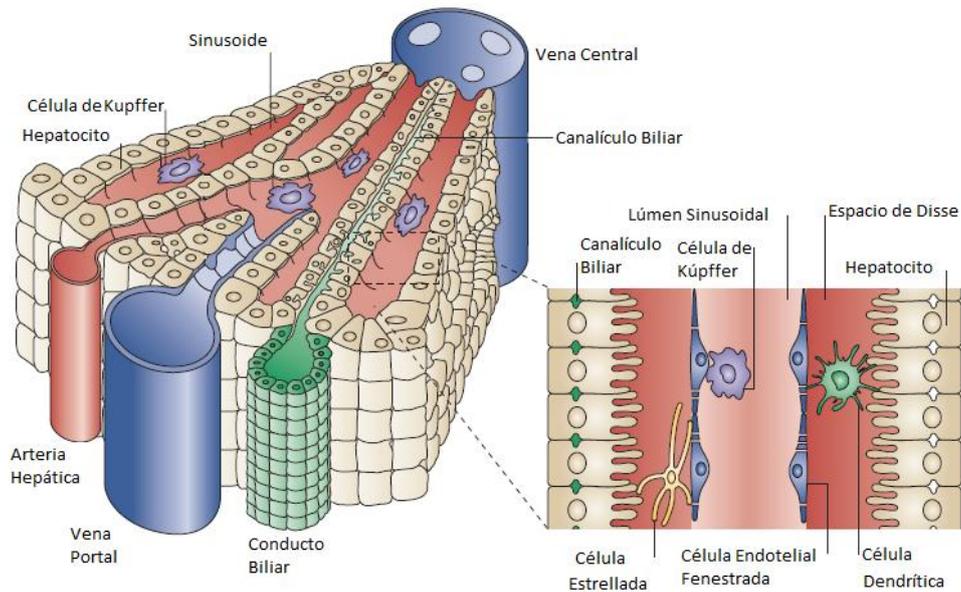
Presenta una consistencia esponjosa debido a la alta cantidad de ramificaciones del sistema microvascular. En el hígado coexisten dos sistemas de irrigación aferentes, la vena porta y la arteria hepática, y uno eferente, a través de las venas hepáticas que desembocan en la vena cava inferior, como se observa en la **Figura 1**. El sistema porta (irrigación funcional) suministra un 80 % del flujo sanguíneo y contiene sangre venosa pobremente oxigenada, pero rica en nutrientes y hormonas provenientes del tracto gastrointestinal y del bazo. El otro 20 % es aportado por la arteria hepática y es sangre oxigenada (irrigación nutricional) proveniente de la aorta. La vena porta está formada por la unión de las venas esplénica y mesentérica superior. La arteria hepática común es una rama del tronco celíaco, junto con las arterias esplénica y gástrica izquierda. En ocasiones, la arteria hepática presenta vasos accesorios o de reemplazo que suministran sangre al hígado (Grisham, 2009; Nagy *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Irrigación hepática. Imagen extraída (American Cancer Society, 2020)

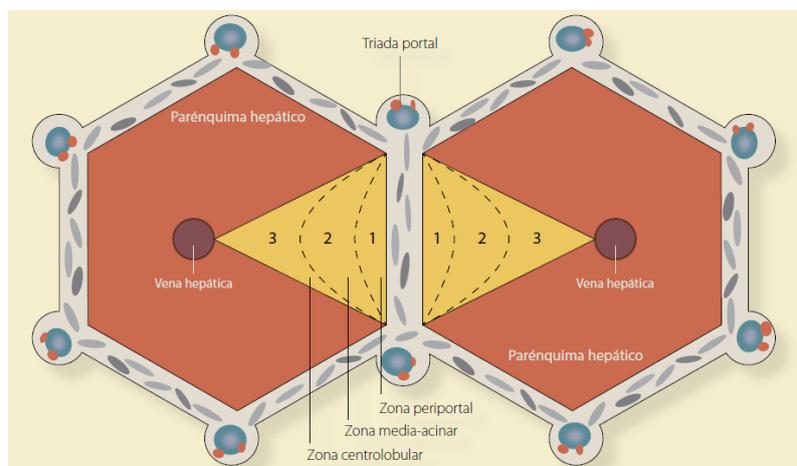
La unidad morfológica clásica del hígado es el lobulillo hepático, representado en la **Figura 2**. Tiene forma hexagonal y se estructura alrededor de una vena central a partir de la cual se organizan los cordones de hepatocitos en forma radial. En medio de dos cordones hepatocitarios se localizan los sinusoides hepáticos, cuya pared está compuesta por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas. El espacio que se establece entre las células endoteliales y los hepatocitos se denomina espacio perisinusoidal o *de Disse*. En tres de los seis vértices del lobulillo hepático se localizan los espacios porta, compuestos por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta, un vaso linfático y un conductillo biliar. Las ramas laterales de estos vasos convergen en los sinusoides hepáticos donde la sangre arterial y venosa se mezcla y entra en contacto con los hepatocitos en el espacio de *Disse*. Los sinusoides convergen hacia la vena centrolobulillar que forman las venas suprahepáticas que finalmente desembocan en la vena cava inferior. Los canalículos biliares formados entre dos hepatocitos adyacentes se extienden a lo largo de los cordones de hepatocitos hasta desembocar en el conductillo biliar de algún espacio porta (Grisham, 2009).

En 1958, Rappaport realizó una división funcional del hígado y elaboró el concepto de acino hepático, el cual representa la mínima unidad funcional hepática, una estructura parenquimatosa cuyo centro es un espacio porta y la periferia una vena centrolobulillar, como se observa en la **Figura 3**. En el hígado existen ocho segmentos funcionales independientes, cada uno con su propio aporte sanguíneo arterial y portal, su propio drenaje biliar y un drenaje venoso por la vena centrolobulillar.



**Figura 2.** Esquema de la arquitectura hepática. Imagen adaptada (Chew et al, 2019)

En el acino, la longitud portal-hepática (aferente-eferente) de las placas hepáticas puede dividirse en tres zonas arbitrarias: Z1 formada por los hepatocitos periportales, Z2 medio-acinar y Z3 compuesta por los hepatocitos perivenosos. Los hepatocitos ubicados en estas zonas difieren en morfología, función y susceptibilidad al daño patológico (Villegas-Serrano et al., 2017).



**Figura 3.** Representación del acino hepático (amarillo) y del lobulillo hepático (rojo). Imagen extraída (Villegas-Serrano et al., 2017)

### 1.1.2 Arquitectura celular

#### *El hepatocito*

Los hepatocitos constituyen el 80 % de la masa hepática y son los responsables de la mayor parte de las funciones metabólicas. Son células poligonales de gran tamaño (sección transversal 25-30  $\mu\text{m}$ ) y altamente polarizadas. A diferencia de otras células epiteliales, no están unidos a una membrana basal, sino que sus membranas basales y laterales están rodeadas por una matriz extracelular de baja densidad sintetizada por los propios hepatocitos. Las membranas tienen especializaciones moleculares, incluidos receptores, bombas, canales de transporte y proteínas transportadoras. Pueden distinguirse tres regiones diferenciadas como se observa en la **Figura 2**: la **membrana sinusoidal** tiene microvellosidades que se extienden hacia el espacio de *Disse* frente al sinusoides, la **membrana canalicular** posee repliegues los cuales delimitan a los canalículos biliares, y la **membrana lateral** en contacto con hepatocitos adyacentes, que puede presentar uniones estrechas y desmosomas (Grisham, 2009).

Dichas células poseen núcleos redondeados y centrados, de tamaño variable según la ploidía. Una característica típica es la poliploidía, que puede representar hasta un 25 % de un hígado normal adulto y aumentar acorde a la edad (Megías *et al.*, 2018). Los hepatocitos periportales suelen ser diploides y contribuir a la regeneración, mientras que las células de mayor ploidía suelen ubicarse más cercanos a la zona perivenosa (Villegas-Serrano *et al.*, 2017). La poliploidía representa un estado de diferenciación terminal, próximo a la senescencia celular, con mayores probabilidades de apoptosis. No está esclarecido aún si ese estado contribuye a una patogénesis o ayuda en la adaptación a la lesión crónica y protege frente al cáncer (Zhang *et al.*, 2018). Poseen heterocromatina dispersa y uno o más nucléolos prominentes. En condiciones normales, es raro encontrar hepatocitos en mitosis (1/ 10000 o 20000), pero son frecuentes cuando hay algún proceso de regeneración.

El aspecto del citoplasma es variable y depende de su estado fisiológico. Poseen abundantes depósitos de glucógeno e inclusiones lipídicas que le dan el aspecto granular en la tinción de hematoxilina y eosina (H-E) (Megías *et al.*, 2018). Además, contienen una matriz compleja de mitocondrias, peroxisomas, lisosomas, agregados de retículo endoplásmico rugoso y liso, complejos de Golgi, y numerosos microtúbulos/microfilamentos (Nagy *et al.*, 2020).

### Otros componentes de la arquitectura celular hepática

Las **células endoteliales** se encuentran tapizando la luz del sinusoides. Poseen una membrana fenestrada a través de la cual acceden los componentes de la sangre hacia la membrana sinusoidal de los hepatocitos. En el espacio de *Disse* hay componentes de matriz extracelular, algunos fibroblastos y células de Ito.

Las **células de Ito** almacenan lípidos (lipocitos, *fatstoring cells*) y vitamina A (*stellate cells*) y cuentan con prolongaciones citoplasmáticas ricas en filamentos de actina que rodean el epitelio del sinusoides ejerciendo un efecto regulador sobre el flujo sanguíneo. Cuando el hígado se lesiona, las células estrelladas se transdiferencian en miofibroblastos y son el principal productor de matriz extracelular.

También se distinguen **células epiteliales biliares** o colangiocitos, las cuales forman los ductos biliares. A diferencia del canalículo biliar que está formado exclusivamente por pliegues de la membrana del hepatocito y orientados transversalmente sobre los planos de los sinusoides, los ductos tienen estructura celular propia.

El hígado humano contiene **linfocitos** de diferentes fenotipos, ubicados a lo largo de los sinusoides y en los espacios portales. Incluye una fracción importante de la capacidad inmune innata del cuerpo, así como un pequeño componente de la capacidad inmune adaptativa.

Las **células de Pit** residen normalmente en el espacio sinusoidal asociadas a las células endoteliales. Corresponden a una clase única de células "*natural killer*" y son linfocitos granulares grandes con actividad citotóxica sobre algunas células tumorales.

El hígado alberga el 80 % de todos los macrófagos del cuerpo. Las **células de Kupffer** son macrófagos fijos que se encuentran en gran número en los sinusoides y que emiten sus prolongaciones hacia el espacio de *Disse*. Tienen estirpe monocítica y origen extrahepático. Son reclutadas desde la circulación general como monocitos, diferenciándose a macrófagos una vez situadas en el hígado. Forman parte del sistema reticuloendotelial del organismo y poseen una notable capacidad para la fagocitosis, lo que contribuye a la eliminación del material particulado que pudiera circular por sangre evitando el contacto directo con el hepatocito. También intervienen en la modulación de la respuesta inmune y la respuesta inflamatoria mediante la liberación de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) (Grisham, 2009; Nagy *et al.*, 2020).

### 1.1.3 Funciones

Fisiológicamente, el hígado tiene un papel vital para el organismo. Presenta una multiplicidad funcional, metabólica, digestiva, homeostática, inmunológica y de reservorio.

El hígado de un humano adulto tiene un flujo de alrededor de 1500 mL de sangre por minuto y se define como un filtro bidireccional: circula la sangre portal, que transporta los compuestos nutricionales y tóxicos provenientes del tracto gastrointestinal, y la sangre sistémica, proporcionando el único canal del cuerpo, el sistema biliar, a través del cual se pueden eliminar las sustancias no solubles en agua.

Existe una zonación funcional desde los hepatocitos periportales, los cuales reciben la sangre con mayor concentración de metabolitos y oxígeno, que va disminuyendo hacia los hepatocitos perivenosos. Por ejemplo: la gluconeogénesis, el almacenamiento de glucógeno, la producción de urea y la oxidación de ácidos grasos son llevadas a cabo por hepatocitos periportales, mientras la glucólisis, eliminación del nitrógeno por la glutamina sintetasa y lipogénesis por hepatocitos perivenosos. El metabolismo de los xenobióticos es más prominente en los hepatocitos pericentrales.

Se presentan las diferentes funciones del hígado de modo resumido:

**Producción de bilis:** los hepatocitos secretan la bilis hacia la vía biliar, la cual se almacena en la vesícula biliar, de donde es excretada al duodeno para facilitar la digestión de los alimentos.

**Metabolismo de los carbohidratos:** realizan gluconeogénesis (glucosa a partir de ciertos aminoácidos, lactato y glicerol), glucogenólisis (liberación de glucosa en la sangre a partir del glucógeno) y glucogenogénesis (síntesis de glucógeno).

**Metabolismo de los lípidos:** síntesis de colesterol y triglicéridos.

**Metabolismo de proteínas:** síntesis de albúmina, lipoproteínas para transporte de ácidos grasos, factores de coagulación (fibrinógeno, protrombina, globulina aceleradora, proconvertina, factor antihemofílico B y factor de coagulación X), proteínas de transporte como la transferrina, aminoácidos no esenciales, enzimas y hormonas.

**Desintoxicación de la sangre:** neutralización de toxinas, metabolización del etanol, de la mayor parte de los fármacos y de la bilirrubina procedente de la degradación de la hemoglobina, transformación del amonio en urea.

**Almacenamiento de múltiples sustancias:** glucógeno, lípidos, vitaminas y minerales.

**Función inmunológica:** las células de Kupffer ubicadas en los sinusoides fagocitan bacterias, virus y macromoléculas extrañas al organismo. Produce la mayor parte de las glucoproteínas que forman el sistema del complemento y la proteína C reactiva, reactante de fase aguda cuya síntesis aumenta considerablemente en los procesos inflamatorios.

**Hematopoyesis:** se encarga de la producción de glóbulos rojos en el feto en el primer trimestre del embarazo. A partir de la semana doce de la gestación, la médula ósea asume esta función (Grisham, 2009; Megías *et al.*, 2018).

## 1.2 Trasplante hepático

### 1.2.1 Estado del arte

El trasplante de hígado está indicado en pacientes con enfermedades hepáticas avanzadas, agudas o crónicas, el cual puede extender la expectativa de vida más allá de lo pronosticado por la historia natural de la enfermedad subyacente, mejorando asimismo la calidad de vida. Se incluyen enfermedades hepáticas crónicas avanzadas (cirrosis), metabólicas (enfermedad de Wilson, defectos en el ciclo de la urea), falla hepática fulminante de cualquier etiología, tumores hepáticos y una miscelánea de otras enfermedades (Mikulic & Mrzljak, 2020). La cirrosis hepática figuró en el 2019 dentro de las 10 principales causas de muerte en el mundo en personas de recursos bajos y medios-bajos según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019).

Con el paso de los años, las contraindicaciones al trasplante se redujeron, la técnica quirúrgica se fue modificando, evolucionaron las metodologías de inmunosupresión, y por consiguiente, los resultados del trasplante hepático mejoraron. En promedio, otorga una supervivencia del 60-80 % a los cinco años después de la práctica (Adam *et al.*, 2018; Córdova *et al.*, 2013).

Conjuntamente con los progresos en el campo del trasplante, surgió la problemática del desbalance entre la cantidad de donantes y receptores de órganos. Esta problemática es mundial y abarca también a los países donde la ley considera a todos los ciudadanos como potenciales donantes. Ante esta escasez, se logró aumentar el *pool* de órganos donantes mediante el aprovechamiento de hígados divididos, hígados marginales y donantes vivos relacionados. Si bien estas estrategias son fundamentales, no alcanzan para revertir el desbalance entre órganos disponibles y receptores, dando lugar a largas listas de espera con alto porcentaje de mortalidad (Contreras *et al.*, 2020). A modo de ejemplo, se muestra la

realidad de EE. UU. en la **Figura 4**, obtenida de la página oficial de la Administración de Recursos y Salud (HRSA, 2020). En dicho país, cada 9 min se suma otra persona a la lista de espera, sólo 3 de cada 1000 individuos pueden ser realmente donantes, y 17 personas de la lista de espera mueren por día.



**Figura 4.** Disponibilidad de órganos para trasplante.  
Imagen extraída (HRSA, 2020)

Según las estadísticas del Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI, 2021), organismo que impulsa, normaliza, coordina y fiscaliza las actividades de donación y trasplante de órganos, tejidos y células en Argentina, el hígado es el segundo órgano con mayor espera en la lista, a pesar de ocupar también ese puesto en el ranking de los trasplantes realizados. En la **Figura 5** se muestra la lista de espera del país en Febrero del corriente año.



**Figura 5.** Lista de espera en Argentina en año 2021.  
Imagen extraída (INCUCAI, 2021)

### 1.2.2 Terapias alternativas

Existen las llamadas terapias alternativas al trasplante de órgano, que si bien no son siempre una solución definitiva, pueden mejorar la calidad de vida del paciente, mantenerlo con vida hasta el momento del trasplante y/o detener la progresión de una enfermedad. Entre las mismas, se puede mencionar a la **terapia celular**, que junto con la administración de factores bioactivos, la ingeniería de tejidos y la terapia génica constituyen la llamada medicina regenerativa. Esta medicina se sustenta en las mismas conductas que el organismo utiliza para reemplazar a las células dañadas por sanas, a través de diversos procesos y en determinados tejidos (Hernández Ramírez, 2017). Lo que posibilita la utilización de las células aisladas como terapia, es la capacidad que tienen de realizar funciones biológicas complejas y como ventaja adicional, su comportamiento puede ser modificado artificialmente (Nicolas *et al*, 2018). La terapéutica basada en células intenta aprovechar esta capacidad para tratar problemas que están más allá del alcance de la farmacología tradicional.

Las terapias celulares se pueden clasificar según: el tipo de célula utilizada, la fuente celular, la duración de la misma (permanente o transitoria) y la forma de administración. De acuerdo a este último punto, las células pueden administrarse al paciente en el proceso conocido como trasplante de células o pueden utilizarse en un sistema de soporte extracorpóreo (Nicolas *et al.*, 2016).

#### ***Trasplante celular hepático***

El trasplante de hepatocitos adultos es una terapia celular estándar clásica. Se probó en diversos modelos animales (Donato *et al*, 2020; Hernández Ramírez, 2017) y es aplicado en la práctica médica con resultados prometedores (Barahman *et al.*, 2019; Cardoso *et al*, 2018; Nicolas *et al.*, 2016).

La metodología consiste en infundir por vía venosa, esplénica o portal, los hepatocitos recién aislados o preservados. Los mismos tienen la capacidad de injertarse y sobrevivir, tanto en el bazo como en el hígado, y restituir o mejorar ciertos parámetros funcionales, por un período de tiempo limitado. Los aspectos claves del implante celular son la vía de infusión, el número de células, el número de infusiones y la viabilidad celular (Iansante *et al*, 2018).

Entre las ventajas del trasplante celular se puede mencionar la utilización de los órganos desechados para el trasplante convencional y ofrece la posibilidad de maximizar los recursos, ya que admite aprovechar un solo donante para varios receptores. Además, constituye un procedimiento quirúrgico seguro que, en general, los pacientes toleran bien, poco invasivo y con menor morbilidad, mortalidad y costo que el trasplante convencional (Iansante *et al.*, 2018; Pareja *et al.*, 2014; Squires *et al.*, 2017). Actualmente, es una estrategia terapéutica alternativa para niños que padecen enfermedades metabólicas como consecuencia de los déficits de transporte / enzimáticos o insuficiencia hepática aguda (Dhawan *et al.*, 2020). La ventaja en niños es que se conserva el hígado nativo y necesita menos inmunosupresión, pudiendo ser una terapia curativa o de soporte (Khan & Strom, 2017). Si bien son candidatos potenciales para el trasplante hepático ortotópico (el nuevo órgano reemplaza al enfermo en su posición anatómica normal), este enfoque puede no ser siempre la primera opción terapéutica debido a la edad del receptor, la invasividad del procedimiento quirúrgico, el frecuente daño multiorgánico concomitante y la falta de donantes de hígado adecuados (Ribes-Koninckx *et al.*, 2012).

Esta metodología tiene dos grandes limitaciones a resolver: por un lado, la fuente de obtención de los hepatocitos y por el otro, la temporalidad de las mejoras metabólicas clínicamente demostrada en la experiencia con los pacientes (Iansante *et al.*, 2018).

Aunque para este objetivo se rescatan órganos descartados para el trasplante convencional, la disponibilidad de fuentes de hepatocitos de calidad (metabólicamente activos) sigue siendo escasa. Esta situación se ve agravada por las complicaciones en la preservación que influyen directamente en la viabilidad y el injerto. Una manera de subsanar esta dificultad es optar por fuentes alternativas de células (xenotrasplante o uso de células madres embrionarias o adultas de distintos orígenes) (Nicolas *et al.*, 2016; Pareja *et al.*, 2017, Pareja *et al.*, 2020) o recurrir a los protocolos de preservación, los cuales requieren mayor rigurosidad y consenso (Pareja *et al.*, 2014; Whaley *et al.*, 2021).

La segunda limitación abarca la temporalidad del beneficio que otorga el procedimiento, y es consecuencia de la eliminación de las células injertadas mediante la activación de la cascada inflamatoria. Para evitarlo, existen diferentes estrategias probadas en la clínica y en estudio. Se puede realizar un pre-acondicionamiento del hígado por irradiación, recurrir a la administración de múltiples infusiones de hepatocitos, al bloqueo

farmacológico de la respuesta inflamatoria, o aplicar estas metodologías en conjunto (Anderson & Zarrinpar, 2018; Lee *et al* 2019; Nicolas *et al.*, 2016; Soltys *et al*, 2017).

### ***Soporte extracorpóreo***

Otra forma de terapia celular es el uso en sistemas extracorpóreos. El sistema ideal de soporte hepático debe ser capaz de proporcionar funciones metabólicas, biosintéticas y detoxificantes durante la espera de un órgano compatible para trasplante. La utilización de estos sistemas disminuyen la tasa de mortalidad (Alshamsi, 2020), sin embargo, todavía no se pudo obtener una recuperación total que supla la necesidad del trasplante (Katarey & Jalan, 2020).

Actualmente, existen dos tipos de sistemas de soporte: los *bioartificiales* que involucran la utilización de células y los *artificiales* que prescinden de ellas. Este último elimina toxinas unidas a proteínas y solubles en agua, pero no proporciona funciones sintéticas. Los sistemas bioartificiales admiten la utilización de hepatocitos humanos o porcinos, células madre diferenciadas o línea celular derivada de hepatoma humano, que se cultivan en una matriz tridimensional biocompatible y se aloja en un biorreactor. El sistema perfunde la sangre o plasma del paciente a través del mismo, el cual mantiene las funciones detoxificantes y biosintéticas del hígado (Nicolas *et al.*, 2016). Las limitantes del órgano bioartificial, al igual que en el trasplante, son el número de hepatocitos viables y la escasez de hepatocitos humanos, que en este caso, se deben alojar en la matriz. Por dicha razón, esta metodología también utiliza las fuentes celulares alternativas y se apoya en la preservación a fin de abastecerse del material biológico en el tiempo requerido.

### **1.3 Preservación**

La preservación de células, tejidos y órganos tiene una importancia inmensa en muchos campos, tales como reproducción humana, trasplante de órganos, medicina regenerativa, bancos de germoplasma, etc. (Weng *et al.*, 2019).

Las células, órganos o tejidos extraídos de un donante pueden tener dos destinos: ser trasplantados de inmediato o ser usados posteriormente. En este último caso, deben ser mantenidos bajo condiciones que aseguren el rápido restablecimiento de su metabolismo luego de ser injertados en el receptor. Para lograr este objetivo hay que considerar dos factores fundamentales:

- 1) La preservación en frío, que permite disminuir las demandas metabólicas del material biológico durante su almacenamiento.
- 2) La solución de preservación, la cual facilita el control de los cambios bioquímicos producidos durante el período de almacenamiento en frío, fundamental para mantener la viabilidad (Fuller *et al.*, 2018).

Independientemente de la utilidad final del material biológico, el objetivo de la preservación es mantener la funcionalidad de las muestras para disponer de ellas a demanda en el tiempo. La preservación de órganos para el trasplante permite disponer de un tiempo, tal que, una emergencia médica pase a ser una operación programada, sin comprometer al órgano o al receptor. En el caso de la preservación de hepatocitos, asegura tener un *pool* de células disponibles para cuando se requieran en un eventual trasplante o para otros múltiples objetivos, como ser la investigación, además de flexibilizar el tiempo para el transporte hacia otros destinos geográficos.

La preservación del material biológico puede dividirse en dos ramas dependiendo de la temperatura utilizada: almacenamiento hipotérmico a bajas temperaturas y criopreservación a temperaturas por debajo del punto de congelamiento del mismo (-80 °C o menos) (Baust *et al.*, 2016).

### **1.3.1 Preservación hipotérmica**

Una de las opciones para el mantenimiento es la preservación hipotérmica (PH). La literatura médica hace referencia a cuatro intensidades de hipotermia: leve (32-35 °C), moderada (27-32 °C), profunda (10-27 °C) y ultraprofunda (<10 °C) (Baust *et al.*, 2016). En general, se lleva a cabo a temperaturas en un rango de 0 a 10 °C y es el método de preservación más utilizado en la actualidad, debido a que es simple, no requiere equipos sofisticados y permite el transporte con facilidad. La limitación de su uso radica en el período que mantiene la funcionalidad, de horas a unos pocos días, dependiendo del material biológico a preservar. Dicho tiempo de almacenamiento puede extenderse de forma significativa si además, se utilizan soluciones de preservación apropiadas a fin de mitigar los daños provocados por la misma (Fuller *et al.*, 2018).

El fundamento de la técnica es la disminución del metabolismo por descenso de la actividad de las enzimas debido a la baja temperatura (hipotermia). La mayoría de las enzimas de los animales normotérmicos muestran una baja en su actividad de 1.5 a 2 veces

por cada 10 °C de disminución en la temperatura (Belzer *et al.*, 1988). Se asumió que la temperatura óptima para el almacenamiento orgánico sería la temperatura más baja posible sin un congelamiento real, siendo 4 °C la temperatura óptima para la preservación hepática (Anaya Prado & Toledo Pereyra, 2014). Nuevos estudios sugieren que podría extenderse el tiempo de almacenamiento a temperaturas menores, realizando un superenfriamiento sin congelamiento (Fuller *et al.*, 2019).

### 1.3.2 Criopreservación

La criopreservación es el uso de temperaturas ultrabajas, de -80 a -196 °C, para mantener el material biológico en un “estado vivo de animación suspendida” por largos períodos de tiempo (hasta años). En cierto rango de temperatura, existen similitudes en los mecanismos de respuesta celular entre la criopreservación y el almacenamiento hipotérmico. Sin embargo, la criopreservación pasa el umbral de hipotermia ultraprofunda e implica la transición de los productos biológicos a un estado vítreo, donde cesa la actividad bioquímica y biomolecular por debajo del punto de transición vítrea ( $T_g$ , generalmente -140 °C) (Baust *et al.*, 2016).

Como se describió anteriormente, a temperaturas de hipotermia (y hasta -25 °C), la actividad enzimática de las células se ralentiza pero permanece activa. A temperaturas inferiores a 0 °C en condiciones isotónicas, el agua pura se vuelve termodinámicamente inestable y tiende a cristalizar, a partir de un primer núcleo cristalino estable. La probabilidad de nucleación se ve favorecida 1) a menor temperatura, debido a que el número de moléculas que deben coordinarse para formar un núcleo cristalino estable es menor y 2) por la presencia de otras moléculas que impongan un cierto nivel de orden local, denominadas nucleadores heterogéneos (John Morris & Acton, 2013).

Una muestra biológica tiende al estado sólido cuando se enfría por debajo de su punto de equilibrio de fusión y las primeras nucleaciones ocurren espontáneamente a partir de los -5 a -15 °C, debido a la presencia de solutos. La formación de hielo comienza preferentemente en el exterior celular, lo que secuestra agua y la remueve de la solución, cambiando abruptamente la concentración de la parte no congelada, mientras el contenido celular permanece descongelado y sobreenfriado. Este aumento en la concentración disminuye el punto de fusión de la solución restante y crea un gradiente osmótico a través de la membrana plasmática, ocasionando la salida de agua desde las células, hacia el medio

extracelular. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio termodinámico entre el estado cristalino y de solución. La cantidad y el tamaño de cristales de hielo que se forman, a una temperatura dada, dependen de la composición inicial de la solución y de la velocidad de enfriamiento (Mazur P, 1984).

Ya por debajo de los  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$  los intercambios fisicoquímicos se detienen y a temperaturas de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  todas las reacciones químicas, procesos biológicos y actividades intra y extracelulares quedan suspendidos. Teóricamente, cualquier tipo de muestra criopreservada puede ser mantenida en esa condición indefinidamente debido a que los únicos estados físicos posibles en tal punto son el cristalino o el vítreo, y en ambos casos, la viscosidad es tan alta que la difusión se vuelve totalmente insignificante. Además, a temperaturas tan bajas, la energía térmica necesaria para las reacciones químicas es insuficiente. Los únicos fenómenos que podrían ocurrir son eventos fotofísicos, tales como la formación de radicales libres y la producción de roturas en macromoléculas, como resultado directo de “golpes” por radiación ionizante o rayos cósmicos (Bakhach J, 2009; Gurruchaga *et al.*, 2018).

El verdadero desafío para la criopreservación de células no es la capacidad para soportar un almacenamiento a temperaturas criogénicas, sino el hecho de superar la letalidad de una zona intermedia de temperatura ( $15$  a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), la cual debe atravesarse dos veces a lo largo del proceso global, una durante el congelamiento y otra durante el descongelamiento (Mazur P, 1984). En esas dos etapas, cuando las temperaturas están por encima de la  $T_g$ , se producen un conjunto significativo de eventos moleculares y bioquímicos dentro de cada célula que influyen drásticamente en la viabilidad y función después de la descongelación (Baust *et al.*, 2016).

A modo general, un proceso de criopreservación implica la adición de un agente crioprotector (ACP) a la muestra hasta su equilibrio, con el fin de otorgar protección en el proceso. Posteriormente, la muestra se enfría hasta una temperatura subcero preestablecida. En la actualidad, existen dos estrategias según la velocidad enfriamiento, la cual limita el proceso de cristalización: el enfriamiento lento convencional con congelamiento y la vitrificación, que carece de formación de hielo. Una vez que la muestra alcanza la temperatura objetivo puede ser almacenada. Algunos tejidos admiten ser mantenidos en freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, es preferible el almacenado a temperaturas ultrabajas logradas en fase vapor o por inmersión en nitrógeno líquido (Baust *et al.*, 2016).

Cuando la muestra biológica es requerida se debe proceder a su descongelamiento, dilución y remoción del ACP, retornando a las condiciones fisiológicas.

El proceso de criopreservación somete a las muestras biológicas a una serie de cambios térmicos y biofísicos. Los cambios por temperatura se deben principalmente a las condiciones de transferencia de calor impuestas durante el enfriamiento y calentamiento, mientras que los cambios biofísicos son generados por la adición/remoción de los ACP y el cambio de fase del medio durante el proceso. Todos ellos afectan la viabilidad celular mediante mecanismos de daño osmótico y de formación de hielo intracelular (Bakhach J, 2009).

### **1.3.2.1 Agentes crioprotectores**

El término de ACP apareció en 1949 cuando Polge, Parks y Smith (Polge *et al.*, 1949) informaron sobre el descubrimiento "casual" del glicerol como protector en la preservación de espermatozoides aviares. Si bien este episodio es trascendental, esta área nace mucho antes, con simples observaciones de muchos científicos en la naturaleza. Ciertos insectos, nematodos, rotíferos y tardígrados acumulan azúcares en el cuerpo para ayudar a sobrevivir a la sequedad severa o a las temperaturas extremas, que a menudo experimentan un fenómeno llamado anhidrobiosis. Además, muchas especies de peces, insectos y plantas que habitan en ambientes fríos poseen proteínas y glucoproteínas anticongelantes para modular el efecto desfavorable del hielo en sus vidas. Hoy en día, existen desarrollos de imitadores sintéticos para incluirlas en formulaciones crioprotectoras (Weng *et al.*, 2019).

Los ACP son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución (una composición de A y B solidifica como un elemento puro). El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor. Este principio representa la base de la teoría de la acción coligativa de los ACP (Lovelock, 1954). De este modo, los ACP se utilizan para aminorar las injurias de la criopreservación. Tienen la capacidad de reducir la formación de hielo intracelular y extracelular, intervenir en el secuestro de radicales libres, promover la transición vítrea, ayudan a preservar la integridad de las membranas plasmáticas y estabilizar la estructura nativa de las proteínas, entre otras cualidades (Weng *et al.*, 2019). Los ACP también parecen controlar los cambios de fase de la membrana inducidos por la

deshidratación de las células durante la congelación. En la búsqueda de nuevos ACP es importante no solo probar criterios como toxicidad, permeabilidad, solubilidad a temperaturas subcero, sino también sus efectos sobre el comportamiento de la fase de la membrana durante la congelación (Spindler *et al.*, 2011).

Se considera ACP a cualquier aditivo que proporcione mayor supervivencia celular luego de descongeladas respecto a la obtenida en su ausencia (Hunt C, 2017). Hay moléculas que actúan como ACP de diversa naturaleza: alcoholes (metanol, etanol, propanol, glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa), polímeros, dimetilsulfóxido (DMSO). Pueden clasificarse de acuerdo a la permeabilidad celular:

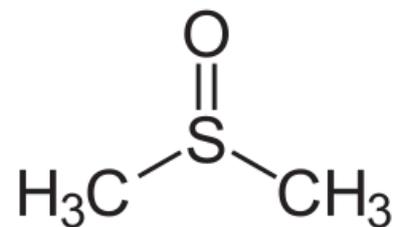
- Agentes penetrantes: son moléculas de bajo peso molecular como el DMSO y el glicerol, capaces de atravesar la membrana plasmática por difusión simple. Proporcionan un efecto de dilución en el citoplasma, reduciendo la concentración de electrolitos y creando las condiciones apropiadas para la remoción de agua intracelular a bajas temperaturas de manera de evitar la formación de cristales de hielo. Son efectivos en la disminución del daño celular en sistemas biológicos preservados por enfriamiento lento.

- No penetrantes: pueden ser de alto peso molecular como polímeros y de bajo peso molecular como azúcares. Son moléculas extracelulares, tienen un efecto coligativo solamente en el espacio extracelular y operan principalmente incrementando la osmolalidad de la solución extracelular, acelerando la deshidratación celular. El congelamiento en este caso se retrasará por la mayor osmolalidad del medio (Hunt C, 2017).

Normalmente, los ACP no se encuentran en los organismos vivos en las concentraciones utilizadas como protectoras en los procesos de criopreservación. Es por ello, que a pesar de su aspecto beneficioso, se debe optimizar la exposición (tiempo y temperatura) a los mismos, para evitar la toxicidad osmótica (no específica del ACP) y química (Bakhach J, 2009).

### DMSO

En 1959 Lovelock y Bishop (Lovelock *et al.*, 1959) describen el uso del DMSO como un ACP, cuya ventaja es la permeabilidad mejorada versus el glicerol para muchos tipos celulares. En los protocolos actuales ocupa el rol de ACP estándar (Hunt C, 2017).



Su acción crioprotectora se atribuye a la alta permeabilidad, promueve la deshidratación, previene la acumulación excesiva de electrolitos intracelulares y la formación de cristales de hielo intra y extracelulares. Modula la estabilidad de las proteínas, y si bien hay varias hipótesis del mecanismo, aún no está dilucidado. Tiene interacciones electrostáticas con la bicapa fosfolipídica, críticas para la integridad de la membrana e interviene en el cambio de fase de la misma (Spindler *et al.*, 2011).

### **1.3.2.2 Vitrificación**

La vitrificación implica la rápida deshidratación celular, y el pasaje a un estado metaestable amorfo, no cristalino. Se da cuando las velocidades de enfriamiento son sumamente altas, por las cuales se alcanza el umbral de fusión de la solución antes que comience la cristalización (Bakhach J, 2009).

Esas tasas de enfriamiento se pueden obtener minimizando el volumen de la solución a vitrificar, mediante la utilización de contenedores de células en suspensión especialmente diseñados para tal fin, como crioloops, criotops, entre otros (An *et al.*, 2015). Esta posibilidad queda descartada para tejidos y órganos. Para menores velocidades de enfriamiento, una viscosidad suficientemente alta puede inhibir la difusión molecular y bloquear la transición del estado líquido a sólido cristalino. Esto se logra adicionando altas concentraciones de ACP, con la salvedad que pueden resultar tóxicas o letales (Baust *et al.*, 2016).

Esta técnica es de elección para suspensiones celulares homogéneas y están surgiendo nuevas metodologías para escalar la preservación a mayores volúmenes. La estrategia tiene un gran potencial a futuro para mejorar significativamente la calidad de los hepatocitos destinados a la terapia celular (de Vries *et al.*, 2019).

### **1.3.2.3 Enfriamiento lento convencional con congelamiento**

El procedimiento es ampliamente utilizado para diversidad de células y tejidos de distintos orígenes. Para cada una de ellas es necesario establecer el protocolo adecuado que asegure la máxima viabilidad y funcionalidad luego de la preservación (Corral *et al.*, 2018; Keros & Fuller, 2021; Marquez-Curtis *et al.*, 2017).

En esta metodología las muestras requieren el agregado y equilibrado del ACP, para luego ser enfriadas de manera lenta y controlada, lo que determina el modo de deshidratación celular y la formación de hielo, por ende la supervivencia celular. Esta

afirmación resulta controversial y todavía está en discusión, debido a la evidencia encontrada en la supervivencia de glóbulos rojos congelados lentamente, la cual depende de la fracción de agua que no se congela sino que se incorpora a una sólido eutéctico o vítreo (Mazur & Cole, 1989). Alcanzada la temperatura preestablecida, se procede al almacenado a temperaturas ultrabajas. Al momento de ser requeridas se deben regresar a las condiciones normotérmicas, previo descongelado y remoción del ACP.

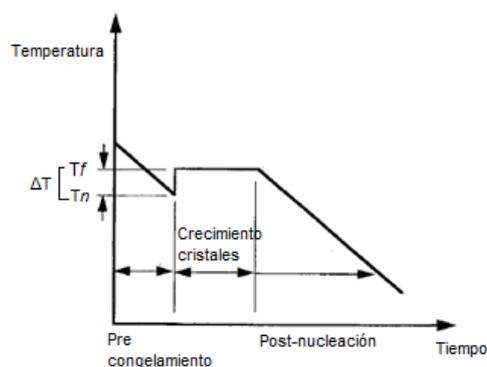
Para el éxito de un protocolo de criopreservación por enfriamiento lento se requiere el análisis de diversos factores: temperatura de nucleación y de almacenamiento, tipo celular, tipo de ACP y concentración, temperatura y tiempo de incubación, modo de agregado y remoción, composición de los medios utilizados, pH, densidad celular, velocidad de enfriamiento y descongelamiento (Gurruchaga *et al*, 2018).

### Nucleación

Para muestras enfriadas a velocidad controlada, la evolución de la temperatura de las mismas en función del tiempo puede representarse como se muestra en la **Figura 6**. La historia térmica de las células puede dividirse en tres regiones:

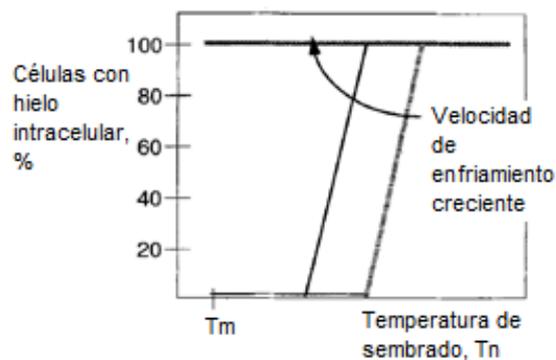
- 1) Pre-congelada: la muestra es enfriada y permanece en estado líquido hasta la temperatura de sembrado, a la cual se forma hielo extracelular;
- 2) Crecimiento rápido de cristales: asociado a la liberación del calor latente de fusión;
- 3) Post-nucleación: continúa el congelamiento de la muestra.

El superenfriamiento de la solución ( $\Delta T$ ) es la diferencia entre la temperatura a la cual la solución funde ( $T_f$ ) y la temperatura a la que se forma hielo extracelular ( $T_n$ ) (Hubel, 1997).



**Figura 6.** Historia térmica de una muestra durante el congelamiento. Adaptada (Hubel, 1997)

La formación de hielo en la solución extracelular está acoplada a cambios significativos en el ambiente celular. La temperatura a la cual se produce juega un rol importante en la determinación de la concentración extracelular y en la respuesta biológica de las células. A valores bajos de  $T_n$  (altos  $\Delta T$ ) la diferencia de potencial químico para el transporte de agua es más alto, aunque la permeabilidad de la membrana es menor. Como resultado, para células congeladas a igual velocidad y con la misma solución de criopreservación, con el incremento del superenfriamiento (cuando la temperatura de sembrado disminuye) aumenta la fracción de hielo intracelular (**Figura 7**) teniendo un efecto negativo en la supervivencia celular.



**Figura 7.** Influencia del superenfriamiento en la probabilidad de formación de hielo intracelular durante el congelamiento. Adaptada (Hubel, 1997)

Como se observa, la nucleación es un paso crítico en la criopreservación. Si bien se da espontáneamente, su inducción por diversos métodos mostró eficacia para aumentar la viabilidad de las células y reducir la variabilidad entre muestras (John Morris & Acton, 2013).

### **Velocidad de enfriamiento**

Una vez iniciada la cristalización en el exterior celular, a temperaturas subcero, los eventos que ocurren están determinados por la velocidad de enfriamiento.

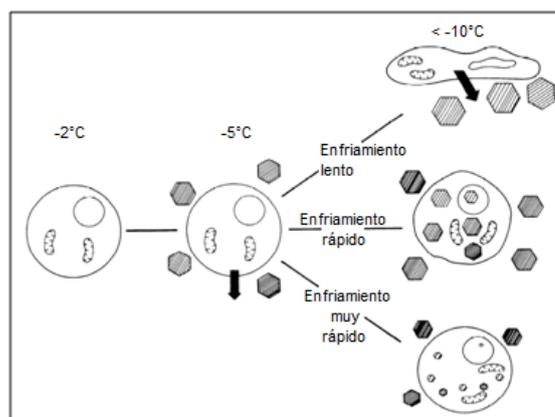
Como se muestra en la **Figura 8**, la velocidad de enfriamiento determina el destino del agua intracelular durante el congelamiento, directamente asociado con el tamaño y número de cristales intracelulares formados y el daño celular observado (Mazur P, 1984).

Si las tasas de enfriamiento son lentas, el agua es arrastrada hacia el exterior y los cristales de hielo extracelular aumentan su tamaño. La célula pierde agua rápidamente para concentrar los solutos intracelulares, de manera de eliminar el sobreenfriamiento y

mantener el potencial químico del agua intracelular en equilibrio con el del agua extracelular. El resultado final es la deshidratación de la célula y el aumento de la concentración del contenido intracelular, evitando la formación de hielo intracelular. Aquí se presentan dos problemas: si la deshidratación es excesiva puede causar muerte por estrés mecánico, y por otro lado, la concentración intracelular aumentada, condición conocida como "efecto solución", puede alcanzar niveles tóxicos o incluso letales. Independientemente de los mecanismos específicos, la viabilidad celular decrece a medida que lo hace la velocidad de enfriamiento (Hunt C, 2017).

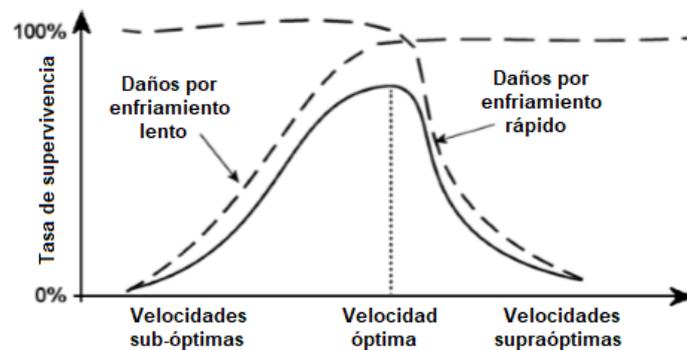
A tasas de enfriamiento elevadas, las células no son capaces de perder agua lo suficientemente rápido como para mantener un equilibrio, entonces se van superenfriando y alcanzan el equilibrio a expensas de la formación de hielo intracelular, perjudicial para las células. A medida que la velocidad aumenta, los cristales formados son de menor tamaño. Por lo tanto, a cierta velocidad lo suficientemente alta, los cristales formados son tan pequeños que las células pueden tolerar su presencia. A partir de este umbral, la viabilidad se incrementa proporcionalmente con el aumento de la velocidad (Baust *et al.*, 2016).

Estos fenómenos constituyen la base de lo que se conoce como "la hipótesis de los dos factores" de Mazur para el daño celular por la velocidad de enfriamiento: efecto de la solución y estrés mecánico durante enfriamiento lento, y formación de hielo intracelular durante el enfriamiento rápido (Gurruchaga *et al.*, 2018).



**Figura 8.** Esquema de los eventos físicos en las células durante el congelamiento. Los hexágonos con líneas cruzadas representan cristales de hielo. Imagen adaptada (Mazur P, 1984)

La velocidad de enfriamiento óptima para un tipo celular determinado es aquella que asegure la máxima supervivencia luego del proceso congelamiento/descongelamiento. Para ello, la deshidratación del volumen celular debe ser la justa. El gráfico de viabilidad en función de velocidad de enfriamiento (**Figura 9**), adopta en la mayoría de los casos la forma de campana, reflejando que hay una velocidad óptima de enfriamiento que es típica de cada tipo celular. Dicha supervivencia es una función de varios parámetros, principalmente, la permeabilidad hidráulica de la membrana y la composición de la solución de criopreservación (Mazur P, 1984).



**Figura 9.** Perfil de supervivencia hipotético según el modelo de daño actualmente aceptado. Imagen adaptada (Karlsson & Toner, 1996)

En el caso particular de los hepatocitos, los mejores resultados se obtienen a velocidades de enfriamiento relativamente bajas (<a 10 °C/min) (Whaley *et al.* 2021), en general cercanas a 1 °C/min, velocidades que permiten los dispositivos comerciales de enfriamiento como el “Mr Frosty” (Nalgene®) (Chow-shi-yée *et al.*, 2020). En general, estos dispositivos se usan en la investigación para pequeños volúmenes celulares y requieren como mínimo un freezer de -80 °C. La clínica requiere mayores volúmenes celulares por lo que el enfriamiento lento se realiza mediante un freezer de velocidad controlada (Coppin *et al.*, 2017; Pless-Petig & Rauen, 2018). En otros casos, se utiliza un enfriamiento en etapas usando distintas fuentes de enfriamiento (da Fonseca Cardoso *et al.*, 2017) o mediante un freezer de velocidad controlada programado (Donato *et al.* 2019).

### Tipo celular

La estructura y la composición de las membranas plasmáticas determinan el comportamiento celular durante la criopreservación. La estructura de su superficie permite a las células sobreenfriarse y probablemente establece la temperatura de nucleación, y junto

con la permeabilidad al agua y al ACP, la extensión del hielo intracelular/deshidratación del proceso, que se refleja luego en los índices de supervivencia de la célula (Hunt C, 2017). Las propiedades fisicoquímicas son particulares de especie, tipo y estadio de la célula.

Además del tipo celular a ser preservado, un factor importante es el estado de agregación en el que se encuentren. El hecho de que las células se preserven como suspensiones de células aisladas, microencapsuladas, en cultivo en monocapa, en soportes o como una porción completa de tejido, puede influenciar en la supervivencia luego del descongelamiento. En general, el éxito de la criopreservación es inversamente proporcional a la complejidad de los sistemas biológicos congelados. Es por ello que esta técnica está aún limitada para sistemas simples como células aisladas o tejidos homogéneos (Baust *et al.*, 2016; Ölander *et al.*, 2019).

### **Agregado y remoción del ACP**

Como ya se desarrolló en la sección de ACP, su uso requiere de la optimización de ciertos parámetros a fin de evitar efectos nocivos por toxicidad química y osmótica: concentración, tiempo, temperatura y modo de agregado/remoción. Se debe hacer el mejor balance entre la injuria osmótica dependiente del modo de agregado/remoción y la injuria por toxicidad dependiente del tiempo de exposición al ACP (Gurruchaga *et al.*, 2018)

La adición y la elución del ACP pueden hacerse en una etapa o en varios pasos, con el fin de minimizar las excursiones de volumen de la célula evitando así el daño mecánico de la membrana celular (Baust *et al.*, 2016). La elección del protocolo depende del ACP, la concentración utilizada, la permeabilidad de la membrana al ACP y al agua y la temperatura a la que se realiza.

Las condiciones consideradas estándares para los hepatocitos es el agregado del 10 % de DMSO por goteo en un paso y su remoción por diluciones sucesivas (Terry *et al.*, 2010). Sin embargo, en la práctica no hay un protocolo universal claramente establecido y aplicado (Pareja *et al.*, 2014; Whaley *et al.*, 2021).

### **Proceso de descongelamiento**

Si bien se abarcan varias hipótesis sobre el daño por la formación de hielo, una de ellas propone que el daño no se produce con su formación, sino durante el descongelamiento. Las células se van rehidratando a medida que el hielo se funde y el hielo

intracelular tiende a recrystalizar si el descongelamiento es lento. Los cristales pequeños se reorganizan en cristales más grandes, que pueden dañar los orgánulos u otras estructuras celulares. Está establecido que la mejor condición es un descongelamiento rápido a 37 °C (Hunt C, 2017).

#### 1.3.2.4 Modelado matemático

Un **modelo matemático** de un objeto o un fenómeno real es un esquema simplificado e idealizado de aquel, constituido por relaciones, variables y parámetros, a fin entender el comportamiento de un sistema mayor ante situaciones difíciles de observar en la realidad (Guts *et al*, 2013).

La criobiología es un campo interdisciplinario, donde el alcance y la escala de las interacciones limitan las ganancias que pueden hacerse mediante una sola teoría o experimento. Es allí donde la criobiología se sustenta del modelado matemático, que contribuye fundamentalmente de dos maneras:

- 1) En la explicación de fenómenos criobiológicos: comprensión de mecanismos biofísicos y bioquímicos de los daños complejos.
- 2) En el diseño y predicción de protocolos mejorados: alcance del equilibrio con el ACP, velocidades de enfriamiento y calentamiento.

El primer modelo criobiológico fue descrito por P. Mazur (Mazur P, 1963) que explica la muerte celular por el estado del agua intracelular de acuerdo a la velocidad de enfriamiento, el cual se detalló en el apartado anterior. El modelado criobiológico moderno incluye descripciones muy detalladas de los fenómenos físicos que ocurren durante la congelación, incluido la cinética de crecimiento del hielo y gradientes de transporte de masa y calor.

Un desarrollo más reciente y que interesa en este caso en particular, es el utilizado para comprender los procesos de equilibrio del ACP. Tanto en la carga como en la descarga del ACP existe un desbalance osmótico temporario. Cuando las células se exponen a altas concentraciones de ACP que penetran la membrana, experimentan una rápida pérdida de volumen de agua debido al gradiente osmótico transmembrana, acoplado con la diferencia de permeabilidad al agua y al ACP. Esta exosmosis puede contraer a la célula por debajo de un volumen crítico, llamado "límite menor de tolerancia osmótica", asociado con un daño

celular irreversible, a menudo después de retomar el volumen isosmótico. Se sugiere como mecanismo de daño la posible fusión de la membrana o reabsorción de la membrana a volúmenes bajos (Benson J, 2021). Lo contrario pasa en la descarga del ACP, cuando la célula cargada con el mismo se somete a lavado, el agua que entra rápidamente a la célula tiende a provocar un aumento de volumen celular, por lo que se deberá respetar el "límite mayor de tolerancia osmótica".

El modelado contribuyó a sugerir estrategias de equilibrio de ACP "seguras" a través de pasos o agregados graduales tanto para la carga como para el lavado. Estos protocolos se pueden determinar matemáticamente mediante el acoplamiento del conocimiento de la cinética del transporte de masa celular y los límites de volumen máximo y mínimo correspondientes a dichos límites de tolerancia osmótica.

### ***Curvas de tolerancia osmótica***

Las curvas de tolerancia osmótica se pueden determinar experimentalmente para cada tipo celular, tanto con solutos permeables como no permeables. Consiste en someter a las células en estudio en soluciones de diferentes osmolalidades (hipo, iso e hipertónicas) bajo condiciones controladas de tiempo y temperatura. Al cabo de un tiempo de equilibrado, se pueden medir los volúmenes, rendimientos y viabilidad celular para cada condición experimental. Elaborando una gráfica de viabilidad/rendimiento versus la osmolalidad se establecen los límites de osmolalidades con la confianza requerida para el estudio. De dichas gráficas también se pueden obtener los volúmenes límites correspondientes a dichas osmolalidades límites.

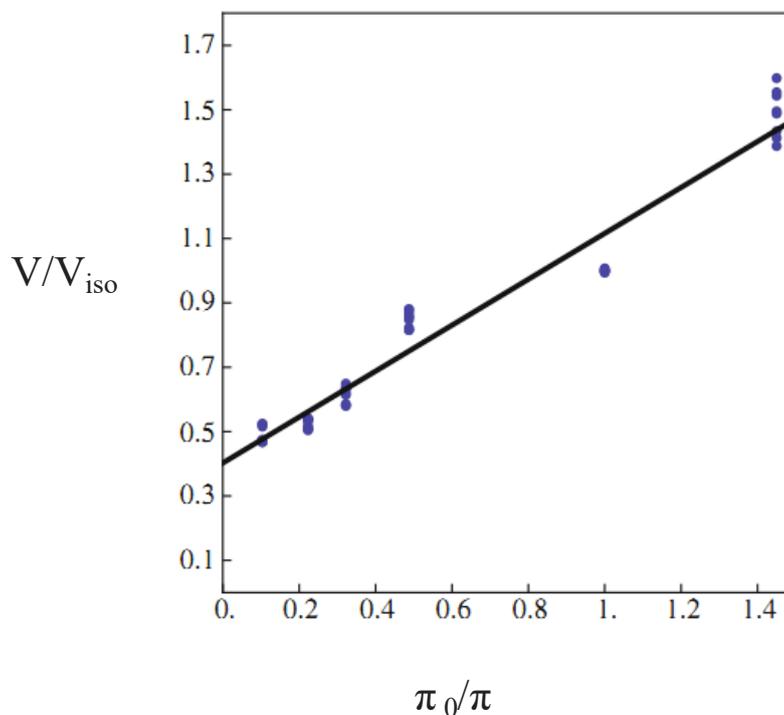
### ***Boyle Van't Hoff: cálculo del volumen celular inactivo***

Teniendo conocimiento de los volúmenes celulares correspondientes a las osmolalidades, el uso de la ecuación de Boyle Van't Hoff resulta fundamental para determinar el volumen celular inactivo necesario para resolver el modelo de transporte que se introducirá más abajo.

Una suposición intrínseca del modelo de transporte de masa a través de la membrana es que el volumen de agua de la célula, y por lo tanto, el volumen celular total, se comporta como un "osmómetro ideal". Esta es una propiedad observada en casi todos los tipos celulares en un rango de osmolalidades de 1/3 a 10 isosmolal. La relación de Boyle

Van't Hoff clásica es definida por:  $\pi W = \pi_0 W_0$ , donde  $\pi$  y  $\pi_0$  son osmolalidades intracelulares,  $W$  es el volumen de agua intracelular y el subíndice 0 define un estado conocido particular (generalmente isosmolal). El volumen de agua de la célula en función de la osmolalidad se puede describir entonces mediante la relación:  $W = \pi_0 W_0 / \pi$ .

El uso de la relación tiene un beneficio adicional. El volumen de equilibrio total de una célula en un medio anisomótico que contiene solo solutos no penetrantes es  $V = W + V_b$ . Reemplazando  $W$  con la expresión de la relación de Boyle Van 't Hoff se resuelve como:  $V = \pi_0 / \pi * W_0 + V_b$ . Por lo tanto, trazar el volumen celular total frente a la inversa de la osmolalidad extracelular produce lo que se conoce como un gráfico de Boyle Van 't Hoff (ver **Figura 10**). En estas gráficas se supone que el volumen tuvo el tiempo suficiente para equilibrarse, pero tiempo insuficiente para que el "supuesto de soluto no penetrante" se vuelva inválido. Al realizar una regresión lineal al volumen celular, equivalente a tomar el límite cuando  $\pi$  llega al infinito, donde el volumen de agua intracelular debe ser 0, permite calcular el "volumen osmóticamente inactivo",  $V_b$ . Con frecuencia, los ejes se normalizan por el  $V_{iso}$  dando la expresión  $V/V_{iso} = \pi_0 / \pi * W_0 / V_{iso} + V_b / V_{iso}$ , que es la forma que se muestra en la **Figura 10**. Para recuperar el volumen, se puede multiplicar por el valor de normalización,  $V_{iso}$  (Benson J, 2021).



**Figura 10.** Gráfica de Boyle Van't Hoff para células madre embrionarias de ratón B6. La línea representa una regresión lineal de todos los datos. Extrapolando al eje se puede determinar la fracción de  $V_b$  (0.402). Imagen extraída (Kashuba Benson et al, 2008).

### **Modelo de transporte de membrana K-K**

Un modelo clásico para definir el transporte de membrana es el formalismo de Kedem y Katchalsky (K-K) basado en la termodinámica irreversible de Onsager (Kedem-Katchalsky, 1958). El modelo supone que los flujos son linealmente proporcionales a las fuerzas. La interacción de los solutos se contabiliza mediante el parámetro  $\sigma$ . El modelo K-K consta de las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned}dV_{w+s}/dt &= -L_p \text{ART} \{(M_n^e - M_n^i) + \sigma(M_s^e - M_s^i)\} \\dN_s/dt &= (1 - \sigma)(1/2) M_s^e - M_s^i dV_{w+s}/dt + P_s A (M_s^e - M_s^i)\end{aligned}$$

$V_{w+s}$ : volumen intracelular de agua y solutos  
 $L_p$ : conductividad hidráulica  
 $P_s$ : permeabilidad al soluto  
 $A$ : área celular  
 $R$ : constante de los gases  
 $T$ : temperatura

$\sigma$ : coeficiente de reflexión  
 $N_s$ : osmoles de solutos dentro de la célula  
 $M_n^e$ : molaridad extracelular de solutos no permeables  
 $M_n^i$ : molaridad intracelular de solutos no permeables  
 $M_s^e$ : molaridad extracelular de solutos permeables  
 $M_s^i$ : molaridad intracelular de solutos permeables

La resolución gráfica de dicho modelo de transporte permite ver el comportamiento del volumen celular con los distintos protocolos de carga y descarga del ACP. Este modelo permite establecer y optimizar los protocolos seguros para el tipo celular en estudio que se adapten a las osmolalidades y volúmenes límites aceptados.

### **Resolución de los modelos criobiológicos**

La simulación es el proceso de diseñar un modelo de un sistema real y llevar a término experiencias con él, con la finalidad de comprender el comportamiento del sistema o evaluar nuevas estrategias -dentro de los límites impuestos por un cierto criterio o un conjunto de ellos- para el funcionamiento del sistema" (Shannon & Johannes, 1976).

El modelado matemático se expandió con la simulación por computadora y es aplicado en infinidad de sistemas naturales, a fin de describir o predecir el comportamiento de un sistema complejo según el conjunto de parámetros iniciales supuestos. La simulación por computadora es frecuentemente usada como un accesorio para sistemas de modelado para los cuales las soluciones analíticas de forma cerrada simple no son posibles, y lo que se suele dar por resultado es una representación gráfica. Es cada vez más común escuchar acerca de simulaciones como "ambientes sintéticos", donde el concepto de "simulación" se

amplió y hoy en día, abarca virtualmente cualquier representación computarizada (Benson J, 2021).

Una forma simple de resolver el sistema de ecuaciones de un modelo, cuando no se cuenta con los programas específicos de simulación, es mediante el uso de un sistema de resolución numérica en planilla de cálculo y obtener las respectivas gráficas resultantes. El **método de Euler** es un procedimiento de integración numérico sencillo para resolver ecuaciones diferenciales ordinarias a partir de un valor inicial dado.

### 1.3.3 Injuria celular en la preservación

La remoción de un órgano del cuerpo del donante desencadena una serie de fenómenos deletéreos para el tejido como consecuencia de la isquemia (falta de irrigación sanguínea) y posterior restauración del flujo sanguíneo en el cuerpo del receptor (reperfusión). Uno de los eventos fundamentales de la isquemia es la anoxia, y las mitocondrias son las organelas más afectadas. La injuria por isquemia-reperfusión (I/R) es un proceso complejo que genera daño de naturaleza reversible o irreversible conduciendo a la muerte celular (Soares *et al.*, 2019). Las secuelas de la injuria por I/R pueden asociarse frecuentemente con el retraso del funcionamiento o fallo primario del injerto (Bhogal *et al.*, 2018). En el caso del aislamiento de hepatocitos, o de cualquier tipo celular, hay una sumatoria de eventos estresantes adicionales provocados por I/R. Sumada a I asociada a la resección del órgano, hay un primer estrés por la R con las soluciones de aislamiento. Este contexto se ve agravado al separar las células de su arquitectura natural (contacto célula-célula y con la matriz) que desencadena de manera inmediata la apoptosis (anoikis) (Li *et al.*, 2019; Smets *et al.* 2002) y otros cambios como la disminución de metabolitos antioxidantes, energéticos) la cual persiste durante el cultivo *in vitro* en condiciones estándar (Cassim, *et al.*, 2017).

La preservación del material biológico para trasplante constituye un aspecto fundamental en el proceso de procuración, ya que permite el desarrollo de tareas de logística como el transporte del órgano (células o tejidos), organización de los equipos de cirugía, preparación del receptor, etc. En este sentido, el descenso de la temperatura es un factor clave en la prevención del daño, ya que el frío disminuye el metabolismo celular y los requerimientos de oxígeno, prolongando el período durante el cual las células pueden retener funciones metabólicas esenciales. Sin embargo, la hipotermia también presenta

consecuencias negativas en los tejidos que contribuyen a la injuria por I/R. Durante la etapa de R, el aumento de temperatura y el nuevo suministro de oxígeno generan radicales peróxidos y superóxidos (EROs) que sumados a la vulnerabilidad que presenta el tejido debido a las lesiones por hipotermia, conducen a una respuesta inflamatoria (Petrenko *et al*, 2019).

Los dos tipos celulares más afectados durante la I/R hepática son los hepatocitos y las células endoteliales. Los hepatocitos son más sensibles al daño por isquemia caliente (37 °C), mientras que, las células endoteliales son mayormente afectadas por la isquemia fría (4 °C) durante el almacenamiento previo al trasplante (Dar *et al*, 2019).

En el campo de preservación hay una tendencia a separar los procesos de preservación hipotérmica y criopreservación. Si bien esta última conlleva al paso por la Tg y acarrea dificultades adicionales por el congelamiento y el uso del ACP, tiene un doble paso por un estado de hipotermia (Baust *et al.*, 2016). Dichos mecanismos de daño sumados a los inducidos por I/R y la hipotermia se resumen en cambios a nivel estructural y funcional de la célula, entre los cuales se destacan:

### ***Cambios en los niveles energéticos***

Durante la isquemia fría las células son depletadas de ATP, debido a la falta de aceptores de electrones (oxígeno) y el consumo con síntesis reducida por la disminución de la temperatura. El consumo de ATP conduce a la desfosforilación a AMP, que es degradado vía adenosina e inosina, a hipoxantina. Las moléculas al desfosforilarse tienen mayor capacidad de difundir libremente a través de la membrana plasmática, disminuyendo los niveles de precursores disponibles para resintetizar ATP. Es importante que las células preservadas cuenten con glucógeno suficiente, para garantizar la formación de ATP post-preservación. Dependiendo del nivel residual de ATP, relacionado con la duración de la isquemia, el daño se manifestará como apoptosis o necrosis (Anaya Prado & Toledo Pereyra, 2014).

### ***Cambios en la homeostasis celular y edema celular***

La despolarización de la membrana celular ocurre muy temprano, lo que conduce a un colapso de la homeostasis iónica y el desenlace de otros eventos intracelulares y asociados a la membrana, que eventualmente culminan en la muerte celular por apoptosis o

necrosis. La depleción de ATP resulta en la pérdida de la regulación de los canales iónicos dependientes del mismo, produciéndose cambios pasivos de iones a través de las membranas celulares; así, el  $K^+$  y el  $Mg^{2+}$  difunden fuera de la célula, y el  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  y el  $H_2O$  difunden hacia el citosol, provocando edema celular.

La inhibición de la bomba Na/K-ATPasa causa el desbalance de los iones  $Na^+$  y  $K^+$ . La concentración de  $Ca^{2+}$  se ve afectada por la inhibición del antiporter Na/Ca ATPasa y la alteración de los mecanismos de secuestro del ion hacia el retículo endoplasmático y mitocondria. El aumento de la concentración en el citosol causa la activación de enzimas degradativas (nucleasas, proteasas y fosfolipasas), desregulación de la función celular y repercute en la estructura de la membrana (formación de protuberancias o ampollas en la membrana plasmática, comúnmente denominadas "blebs" y alteración de la interacción celular) (Fuller *et al.*, 2013).

### **Acidificación celular**

Hay un aumento de las concentraciones intracelulares de  $H^+$  por la ionización del agua (la estabilidad de la molécula es dependiente de la temperatura) y el cambio del metabolismo celular de aeróbico a anaeróbico. Una pequeña acidificación podría ser protectora a bajas temperaturas pero dañina en el retorno a pH normal al activar a las enzimas degradativas (Anaya Prado & Toledo Pereyra, 2014).

### **Generación de especies reactivas del oxígeno (EROs)**

La reoxigenación luego de un período de isquemia promueve la generación de radicales libres y oxidantes como el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el hidroxilo. Las principales fuentes productoras de EROs incluyen la xantina oxidasa, cuyos sustratos productos del catabolismo del ATP (hipoxantina y xantina) durante la isquemia, reaccionan con el  $O_2$  disponible en la R generando  $O_2^-$ , la NADPH oxidasa de las células de Kupffer activadas en respuesta al estrés por isquemia y la cadena respiratoria de la mitocondria en estado reducido (Fuller *et al.*, 2013). También se sabe que la lesión de los hepatocitos inducida por el frío aumenta el hierro "redox activo" intracelular, catalizando la reacción de Haber-Weiss para generar EROs (Li, *et al.*, 2019).

Las EROs tienen como blanco a las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos. Están implicadas en la formación de poros de permeabilidad en la membrana mitocondrial,

participan en la transducción de señales que coordinan la respuesta inflamatoria, activan la señalización proapoptótica como la vía del citocromo C, inducen daño en el ADN, como también cambios en la estructura o función de proteínas y promueven la peroxidación lipídica (Sun *et al.*, 2018)

### **Inducción de la transcripción génica**

Durante el período de isquemia (caliente/fría) las células sobrevivientes reprograman la expresión de sus genes. Uno de los factores de transcripción más importantes involucrados en la respuesta es el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Ante el estrés oxidativo este factor migra al núcleo e induce la transcripción de genes de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y moléculas de adhesión (ICAM-1) que promueven la respuesta inflamatoria reclutando neutrófilos y plaquetas, con la consiguiente congestión y deterioro del tejido. Por otro lado, las células también son capaces de inducir una respuesta adaptativa al estrés generado mediante la activación de factores de transcripción como el Nrf y el factor Inducible por la hipoxia (HIF) (Ke *et al.*, 2013). HIF media la defensa en condiciones de hipoxia estimulando la expresión de genes relacionados con la angiogénesis, metabolismo de la glucosa, proliferación/supervivencia celular, en tanto que, Nrf-2 activa la transcripción de genes antioxidantes como glutatión peroxidasas y superóxido dismutasas (Soares *et al.*, 2019).

Tienen un papel destacado las vías como SAFE (*Survivor Activating Factor Enhancement*) y RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*), que controlan la apoptosis en respuesta al daño celular hipóxico (Soares *et al.* 2019). En la criopreservación con DMSO se activa la apoptosis a través de la vía mitocondrial por un aumento de la proporción de proteínas Bax/Bcl-2, disminución del potencial de membrana mitocondrial y activación de la caspasa-9 (Chow *et al.*, 2020).

### **Cambios en el citoesqueleto**

El citoesqueleto comprende una red de filamentos de proteínas estructurales y está involucrado en el control de la forma de la célula, la movilidad, la adhesividad y procesos tales como la endo/exocitosis, o movimientos del cromosoma. En las células eucariotas, el citoesqueleto consta de microfilamentos (actina), filamentos intermedios y microtúbulos.

Las células sometidas a períodos de I/R muestran despolimerización de los filamentos de actina, lo cual trae asociado muerte celular por apoptosis. Uno de los responsables de

estos cambios es el influjo de calcio provocado por los cambios en la homeostasis celular (Jia *et al.*, 2012). Se propone que varias enzimas reguladas por calcio y más de un proceso celular podrían estar implicados. En el caso particular de hepatocitos, es sabido que la PH provoca la formación de *blebs*, las cuales estarían vinculadas a las alteraciones que se generan en el citoesqueleto (Stefanovich *et al.*, 1995).

### **Cambios a nivel de membrana**

El frío altera el estado físico-químico de las membranas modificando la viscosidad, alterando las funciones y permeabilidad de la misma. Las alteraciones a nivel del citoesqueleto debido a la depleción de sustratos energéticos en conjunto con la activación de lipasas y proteasas, contribuyen a la desestabilización de la superficie celular. Además, los cambios en la membrana plasmática afectan directamente a las proteínas asociadas, lo que puede dificultar la interacción proteína-sustrato, los cambios conformacionales y la actividad enzimática.

Los lípidos (colesterol y ácidos grasos) son los que determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante el proceso. El empaquetamiento y la posición de estas moléculas en las bicapas determinan la rigidez de las membranas y por tanto el transporte de moléculas, fenómeno crítico para la supervivencia celular post descongelación. La transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10 a 16 °C y altera las funciones de la membrana otorgando un alto grado de fragilidad. Durante la deshidratación celular se puede producir pérdida de lípidos que limita luego la capacidad de expansión de la membrana durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas. Esto puede suceder cuando la deshidratación supera el volumen osmóticamente inactivo, fracción de sólidos y agua dentro de las células no disponible para ser transportado fuera de la misma, particular de cada célula.

Las moléculas de colesterol proporcionan rigidez a temperaturas fisiológicas por la unión de sus anillos a las cadenas de ácidos grasos. A pesar de ello, impide por razones estéricas que las cadenas de ácidos grasos se empaqueten libremente (cristalicen) al disminuir la temperatura, aumentando la fluidez de las membranas en ese momento (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Agregado a las injurias por I/R y el estado de hipotermia, en la criopreservación existen cambios térmicos más profundos y cambios biofísicos generados por la adición del

ACP (daño osmótico y toxicidad) y por el cambio de fase del medio (formación de hielo intracelular) que afectan a la membrana, y por lo tanto, a la viabilidad celular (Bakhach J, 2009).

### ***Shock térmico***

Un cambio brusco de temperatura durante el enfriamiento puede causar lesiones a las células, incluso en ausencia de cristales de hielo. Ocurre esencialmente entre 37 y 15 °C y también entre 0 y -80 °C. Existen lesiones de la membrana celular que se producen por la contracción diferencial de sus diversos componentes y están relacionadas con los cambios en la composición aniónica del medio extracelular (Bakhach J, 2009).

### ***Daños dependientes del ACP***

El agregado de un ACP tiene fines beneficiosos, sin embargo, deben ajustarse los parámetros de agregado y remoción dependiendo de la concentración a usar, así como las condiciones de exposición para evitar daños osmóticos y tóxicos. Cada sistema a preservar (muestra biológica, solución y tipo de ACP) debe ser particularmente analizado.

#### ***Daños osmóticos***

La toxicidad osmótica ocurre cuando se agrega el ACP en las concentraciones requeridas (mayor a 1 mol/L). Este penetra por membranas biológicas en forma relativamente lenta mientras el agua fluye rápido, dando un desbalance que provoca un colapso de volumen (Hunt C, 2017).

#### ***Daños por toxicidad***

La naturaleza de la toxicidad química es compleja, dado a la diversidad de estructuras moleculares que se usan para tal fin. Aunque la mayoría son relativamente inocuos, existe un efecto dependiente del tiempo y la temperatura. Para minimizarlos se deben limitar los tiempos de exposición de las células al ACP a temperaturas bajas. Esta última selección también puede causar problemas, ya que la menor temperatura ralentiza la penetración pasiva del ACP y aumenta el tiempo para alcanzar las concentraciones suficientes (Hunt C, 2017).

Si bien los intentos de explicar la toxicidad del ACP son urgentes y loables, es necesario comprender con exactitud qué macromoléculas u orgánulos se están dañando químicamente y cómo lo están haciendo. Es debido a ello que las explicaciones de la

toxicidad del ACP son simplemente especulaciones sin un análisis exacto del daño molecular (Best B, 2015).

### ***Daños por la formación de hielo***

La transición del agua al estado sólido es una preocupación central de la criobiología, teniendo en cuenta que puede alcanzar el 70 % del volumen de los tejidos biológicos. Este punto, como ya se desarrolló, puede controlarse aumentando la viscosidad de fase líquida, siendo primordial la solución de preservación, y mediante el uso de velocidades de enfriamiento relativamente rápidas.

La elección de la velocidad de enfriamiento y el uso de adecuado de la solución-ACP como ya se desarrolló, determinarán los procesos que preponderarán y por consiguiente, la supervivencia celular.

A bajas velocidades de enfriamiento, priman las lesiones debido a la concentración letal de electrolitos agravado por la deshidratación celular. En estas condiciones pueden ocurrir varios tipos de daño:

- ✓ interacciones mecánicas entre las células y los cristales de hielo extracelular debido a la expansión ramificada del mismo,
- ✓ estrés mecánico generado por contracción celular cuando se supera el volumen celular inactivo,
- ✓ desestabilización de las membranas y proteínas.

A altas velocidades de enfriamiento, existen correlaciones evidentes entre las lesiones celulares y la formación de hielo intracelular. Las lesiones de origen mecánico aparecen a nivel de la membrana plasmática o de las membranas de organelas. El daño celular por formación de hielo intracelular no es ampliamente comprendido, pero es evidente que su formación conduce a la muerte de las células.

### ***Deshidratación celular***

La formación de cristales de hielo en el espacio extracelular crea un gradiente químico que impulsa el agua hacia el exterior. La deshidratación es mayor a menores temperaturas, pero la membrana estará condicionada por la menor permeabilidad. Provoca lesiones por el aumento de sales intracelular y variación del pH que llevan a la desnaturalización de proteínas.

### ***Estrés mecánico***

El hielo extracelular deforma a las células mientras éstas son retenidas en canales de líquido residual.

### ***Cristalización intracelular***

La formación de hielo extracelular parece estar directamente implicada en la inducción de la cristalización intracelular, si bien el mecanismo no está dilucidado.

### ***Recristalización del hielo intracelular***

El enfriamiento rápido ocasiona formación de hielo intracelular donde los cristales tienden a ser pequeños y son inocuos. No obstante, son termodinámicamente inestables y tienden a agregarse durante el descongelamiento, formando cristales de mayor tamaño y ocasionando daño celular. Cuanto menor sea la velocidad de calentamiento, más favorable es la recristalización y mayor es el daño ocasionado a las células (Bakhach J, 2009).

A menudo, las células parecen sanas y viables cuando se examinan inmediatamente después de la descongelación, pero a las 24-48 h una porción significativa (30-70 %) se pierde debido a la muerte celular de inicio retardado inducida por criopreservación.

El proceso de criopreservación puede ser optimizado para proteger las células estructuralmente, y se avanzó mucho en la muerte celular por ruptura debido a la formación de hielo intracelular. A pesar de ello, aún no se logra manejar adecuadamente las otras tensiones asociadas con el proceso, que dan lugar a una alta falla del sistema, compromiso en funcionalidad, diferenciación espontánea y alteraciones en la expresión génica después de lo que inicialmente se consideró una criopreservación "exitosa". El estrés celular puede conducir hacia dos rutas moleculares de muerte celular: la necrosis y apoptosis (Baust *et al.*, 2016).

### ***Mecanismos de muerte celular***

#### ***Ruptura por formación de hielo***

La membrana puede sufrir daño mecánico por los cristales de hielo en la cristalización y recristalización, por shock osmótico en las fluctuaciones de volumen al adicionar y retirar el ACP, o por el efecto solución. La mayor parte de la ruptura de la membrana ocurre minutos después de la descongelación. Las células que se rompen una o

más horas después experimentan un daño no reparable en la membrana y, por lo general, mueren por necrosis (Chow shi-yée *et al.*, 2020).

### *Necrosis*

Es una forma de muerte celular independiente de la energía caracterizada por la hinchazón de una célula y sus organelas constituyentes, pérdida de integridad de la membrana, ruptura lisosómica, fragmentación aleatoria del ADN por endonucleasas y finalmente lisis celular. La ruptura celular provoca la liberación de citocinas que activan una respuesta inmune e inflamatoria *in vivo*. La inducción ocurre en fase temprana (minutos a horas) en respuesta al estrés celular severo como isquemia, choque osmótico, estrés térmico severo, desregulación iónica y agentes tóxicos (Baust *et al.*, 2016).

### *Apoptosis*

Denominada muerte celular programada, es un proceso dependiente de la energía que se caracteriza por la contracción celular, la condensación de cromatina, membranas intactas pero con inversión de fosfatidil serina, ruptura no aleatoria del ADN y la formación de *blebs*. A diferencia de la necrosis, la apoptosis no provoca una respuesta inmune ya que el contenido de los *blebs* se recicla a través de la fagocitosis. Puede ser inducida por privación de nutrientes, cambios de temperatura, infección viral, hipoxia, radiación, compuestos tóxicos, estrés osmótico y muchos otros factores que pueden activar las respuestas en las mitocondrias, la membrana plasmática o el núcleo. Las dos "ramas" canónicas de la apoptosis que se identificaron en la falla de la criopreservación son las vías extrínsecas (mediadas por receptores de muerte) e intrínsecas (mediadas por mitocondrias). Una tercera vía apoptótica intrínseca involucra el retículo endoplásmico (RE) y se activa ante dosis bajas de estrés no resuelto. Sendas vías generalmente implican una cascada de proteasas dependientes de cisteína (caspasas). Existen vías de conversación cruzada, retroalimentación y amplificación que complican la delimitación del proceso (Baust *et al.*, 2016; Chow shi-yée *et al.*, 2020).

### *Necroptosis*

Es un tipo de muerte celular recientemente identificada que da como resultado una ejecución de tipo necrótico con características clásicas como la hinchazón celular y la lisis de

la membrana, mientras se mantiene altamente regulada, lo que la distingue de la necrosis convencional. Se demostró que este modo de necrosis programada se activa a través de la señalización de los receptores de muerte. Se necesitan esfuerzos continuos para dilucidar la cascada de señalización específica de la necroptosis y cómo se controla el equilibrio apoptótico / necroptótico durante la muerte programada. Sin embargo, el papel de la necroptosis en las condiciones de estrés relacionadas con la criopreservación, como la lesión por I/R, se está volviendo más evidente (Baust *et al.*; 2016).

### **1.3.4 Soluciones de preservación**

Las soluciones de preservación están especialmente diseñadas con el propósito de disminuir, en el mayor grado posible, todos los mecanismos de injuria generados por la isquemia fría-reperusión. Además, deben contener los sustratos necesarios para la actividad metabólica durante el período de hipotermia, la cual se encuentra reducida pero no eliminada.

Hasta la actualidad, se formularon una variedad de soluciones. Todas tienen una serie de componentes destinados a minimizar el edema tisular y celular, mantener un balance iónico apropiado, prevenir la acidosis, remover o prevenir la formación de radicales libres y proveer sustratos para la regeneración de compuestos de alta energía que promuevan la recuperación durante la reperusión normotérmica (Petrenko *et al.*, 2019). Algunas de esas soluciones fueron ampliamente utilizadas tanto en el trasplante experimental como en la clínica. Cada una tiene características particulares y hasta el momento, no hay consenso sobre una solución universal para prolongar el tiempo de preservación y maximizar el rendimiento de los trasplantes.

Centrarse en las soluciones de preservación representa una vía potencial para mejorar los resultados del paciente y del injerto en el trasplante y puede ser una estrategia efectiva para disminuir los costos de atención médica asociados con el trasplante (Latchana N, 2015). A continuación se detallan las soluciones de preservación más destacadas:

#### **Solución de la Universidad de Wisconsin (UW) o ViaSpan®**

Fue desarrollada en 1986 por Belzer y Southard (Southard & Belzer, 1995) en la Universidad de Wisconsin para la preservación hipotérmica de órganos destinados para trasplante. Desde su creación hasta el año 2000 fue considerada la estándar de las

soluciones de preservación para hígado (Adam *et al.*, 2018; Stewart Z, 2015) y luego extendida a órganos abdominales como páncreas y riñón (Jing *et al.*, 2018). También fue considerada de primera elección para la preservación de hepatocitos aislados, tanto en fase experimental como en la clínica (Iansante *et al.*, 2018; Pareja *et al.*, 2013; Tolosa *et al.*, 2014).

Esta solución es de tipo intracelular (alta en  $K^+$  y baja en  $Na^+$ ) y contiene como componentes fundamentales: lactobionato y rafinosa que previenen el hinchamiento celular, almidón hidroxietilado (HES), un coloide estable no tóxico que previene la expansión del espacio extracelular o intersticial, adenosina la cual estimula la síntesis de ATP, glutatión que confiere protección ante radicales libres del oxígeno al igual que el alopurinol, que inhibe a la xantina oxidasa). Por otro lado, la omisión de la glucosa en su composición evita el aumento de la acidez intracelular (Petrenko *et al.* 2019).

Un punto clave a destacar en cuanto a esta solución es que en los últimos años se hizo dificultosa la adquisición por la discontinuidad en su producción y su alto costo (Carnevale *et al.*, 2019).

### **Solución Histidina, Triptófano y Cetoglutarato (HTK) o Custodiol®**

Esta solución fue diseñada por Bretschneider, originalmente pensada para cirugías cardíacas (Bretschneider *et al.*, 1975). Se caracteriza por la baja viscosidad y el bajo contenido en iones ( $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Mg^{2+}$ ), lo que permite un enfriamiento y lavado más rápido, y la convierten en una solución segura para la liberación directa en el sistema circulatorio del receptor. Sus principales componentes son: histidina de alto poder *buffer*, manitol como barrera osmótica y aminoácidos de baja permeabilidad (triptófano y ácido  $\alpha$ -cetoglutárico) que estabilizan las membranas plasmáticas y son sustratos para el metabolismo anaeróbico (Petrenko *et al.*, 2019). Además se informó que la histidina (al igual que el lactobionato y el glutatión en la UW) poseen efectos inhibidores sobre la acción de metaloproteasas involucradas en la lesión tisular (Upadhya & Strasberg, 2000).

Un beneficio atractivo de la solución Custodiol® es su bajo costo respecto de la solución UW que le hizo ganar popularidad en las últimas décadas sumado a los buenos resultados obtenidos en la preservación, no solo en corazón, sino también en órganos como riñón e hígado (Jing *et al.*, 2018; Szilágyi *et al.*, 2018).

### **Celsior®**

Fue formulada en 1994 (Menasché *et al.*, 1994), inicialmente pensada para trasplantes de corazón. En los últimos años se la adoptó en la clínica con buenos resultados además en pulmón, riñón, hígado y páncreas, comparables a los obtenidos con HTK y UW (Jing *et al.*, 2018; Petrenko *et al.*, 2019).

Tiene una formulación de tipo extracelular que combina el efecto de los sustratos metabólicos inertes de la solución de Belzer (lactobionato, manitol) y el de actividad tampón de la solución HTK. Al igual que esta última, es adecuada para ser utilizada durante perfusiones hipotérmicas debido a su baja viscosidad y su bajo contenido de  $K^+$  (Petrenko *et al.*, 2019).

### **Solución del Institut Georges Lopez-1 (IGL-1®)**

Se basa en gran medida en la solución UW, pero tiene un equilibrio iónico cercano a las relaciones extracelulares de  $Na^+/K^+$  y un coloide menos viscoso (PEG). En la clínica obtuvo resultados en hígado similares a la HTK (Petrenko *et al.*, 2019).

### **Solución Ti-Protec**

Su fórmula es similar a la solución HTK, pero a diferencia de esta posee un mayor contenido de iones fraccionados,  $\alpha$ -cetoglutarato y aspartato como intermediarios metabólicos, y quelantes de hierro para prevenir el estrés oxidativo catalizado por el hierro. Aún no hay estudios clínicos que la avalen (Fuller *et al.*, 2018).

### **HypoThermosol® (HTS)**

En 2005 se publicó esta solución de tipo intracelular basada en dextrán, que demostró beneficios en la criopreservación al compararla con un medio de cultivo (Sosef *et al.*, 2005). Su modificación HTS-FRS es un medio de preservación hipotérmico optimizado (2-8 °C) que permite la preservación mejorada y prolongada de células, tejidos y órganos. Está formulado para abordar la respuesta biológica molecular de las células durante el proceso de preservación hipotérmica, incluye iones en concentraciones que equilibran el estado intracelular a temperaturas hipotérmicas. Los componentes adicionales incluyen tampones de pH, sustratos de energía, captadores de radicales libres y estabilizadores osmóticos/oncóticos (Biolifolutions, 2021).

### **Solución BGP y modificaciones**

Durante la última década, no hubo un gran cambio en la composición base de las soluciones de preservación, sí en los aditivos que se incluyen. A partir de la falta de consenso y la necesidad de encontrar una solución universal, accesible y con resultados prometedores, el laboratorio se vio impulsado al desarrollo de nuevas soluciones de preservación con una composición diferente.

En principio y de acuerdo con las líneas de trabajo existentes en el momento, se fue gestando una solución de preservación basada en los componentes BES como *buffer*, gluconato como impermeante y PEG como coloide, denominada BGP. Inicialmente se la utilizó para la preservación hipotérmica de microorganismos (Mandolino *et al.*, 2011) y luego para la preservación dinámica de órgano entero (Carnevale ME, 2019; Pascucci *et al.*, 2012). Con esta solución se buscó proteger el injerto proporcionando una concentración de oxígeno adecuada, manteniendo el pH y la presión oncótica vascular durante la reperfusión. A fin de lograr una solución más versátil, adecuada también para la preservación estática de órgano entero, se le hizo una simple modificación en su composición aumentando la concentración de PEG (Carnevale *et al.*, 2019).

### **Soluciones de preservación para células aisladas**

En el uso de las soluciones de preservación para células aisladas se dan varias extrapolaciones. Como se vio, todas las soluciones fueron diseñadas originalmente para la preservación hipotérmica atendiendo las demandas de un órgano entero particular, y con el tiempo, ampliando su espectro de funcionalidad en otros.

Existe una segunda extrapolación del sistema de preservación de órgano entero a las células aisladas. No hay desarrollo de soluciones de preservación particulares, sino que se extiende la utilidad de esas mismas soluciones, con igual o con algún cambio de formulación. El principal problema radica en que el almacenamiento hipotérmico puede activar diferentes vías de estrés que son específicas de células y tejidos. Por lo tanto, aunque las soluciones demostraron ser efectivas para transportar y almacenar órganos completos, no fueron pensadas para el almacenamiento hipotérmico de células y tejidos utilizados para la terapia celular, los cuales pueden requerir formulaciones únicas para lograr una preservación óptima (Buskirk *et al.*, 2004).

Para la PH de hepatocitos, la UW fue la solución de referencia hasta los años 2000, tanto en la investigación como en la clínica (Gramignoli *et al.*, 2014). Esta solución fue ampliamente estudiada y a sufrido adaptaciones para preservación de células aisladas. Entre las modificaciones realizadas a la solución comercial para preservación de órganos se pueden mencionar la adición de glicina, que demostró ser eficaz para prevenir el daño isquémico por frío (Marsh *et al.*, 1989) y fundamentalmente de polietilenglicol (PEG). La inclusión de este último previene la hinchazón celular, preserva la estructura del citoesqueleto y disminuye notablemente daños celulares producidos por el incremento de EROs como consecuencia de la hipotermia (Marsh *et al.*, 1989; Puts *et al.*, 2015). Además se eliminaron componentes controversiales como el HES y la dexametasona (Southard & Belzer, 1995). La solución posee diferentes concentraciones de adenosina y penicilina, y una osmolaridad levemente superior. A esta solución de PEG a base de lactobionato se denomina solución UW modificada (UWm).

Después de los años 2000 aparecieron nuevas soluciones, de las cuales la HTK es una de las soluciones más usadas en la práctica, aunque no fue ampliamente estudiada ni comparada con la UW. Hay escasos reportes que ubican a la solución Celsior con performance similar a la UW, y un menor rendimiento para la HTK (Duret *et al.*, 2015; Janßen *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2019). HTS-FRS e IGL-1 se ven prometedoras para la PH de hepatocitos humanos respecto a la UW (Duret *et al.*, 2015; Ostrowska *et al.*, 2009).

Otro punto clave en las células aisladas, que resulta más indispensable que la preservación hipotérmica, es la criopreservación, a fin constituir un banco celular disponible por largos períodos de tiempo, para el momento del trasplante. Existe aquí una tercera extrapolación, ya que tampoco hay desarrollo de soluciones para este objetivo, sino que se adaptan medios de cultivo o soluciones de preservación hipotérmica, con aditivos particulares (ACP, suero, azúcares) (Press-Petig & Rauen, 2018). Si bien esta formulación proporciona protección física adecuada y control de la formación de hielo intracelular, solo brinda protección de bajo nivel contra muchas de las otras tensiones que encuentra una célula durante el proceso de congelación/descongelación. Para abordar esto, se emprendió el desarrollo y la utilización de soluciones "intracelulares" a fin de amortiguar los efectos producidos por las soluciones "extracelulares" como los medios de cultivo basales, las cuales mostraron mejores resultados.

La UW con el agregado de 10 % de DMSO es la solución estándar usada en procedimientos clínicos y experimentales de criopreservación (Pareja *et al.*, 2013; Ribes-Koninckx *et al.*, 2012; Whaley *et al.*, 2021). HTS mostró beneficios en la criopreservación al compararla con un medio de cultivo (Sosef *et al.*, 2005), aunque hay escasa bibliografía que comparan la criopreservación con UW y las otras soluciones de tipo intracelular (Fuller *et al.*, 2016). La HTK por su parte, es una solución de composición extracelular pero con bajo contenido de iones, ampliamente difundida, de menor costo que la UW y con buena performance para PH de órganos y células, sin embargo, fue pobremente explorada para este objetivo.

## 2) HIPÓTESIS DE TRABAJO

La práctica médica del trasplante hepático desde su surgimiento se fue superando hasta obtener resultados muy favorables y aún sigue evolucionando. Es así, que en los últimos años el trasplante hepático se convirtió en el tratamiento de elección para la mayoría de las patologías que conducen a la falla hepática terminal. Este hito tan favorable para la salud y la calidad de vida de los pacientes, trae aparejado una crisis: la demanda de órganos para el trasplante no puede ser cubierta con los órganos disponibles creando largas listas de espera. A fin de subsanar esta demanda, aparece el uso de terapias alternativas como una herramienta prometedora. Las mismas, tienen como finalidad mejorar la calidad de vida del paciente, extender el tiempo de sobrevida hasta que se concrete el trasplante y en ciertas ocasiones, revertir patologías.

El éxito de un trasplante de órgano entero o de la práctica de una terapia alternativa depende, en gran medida, de la calidad del material biológico disponible y la preservación del mismo. La preservación tiene como objetivo resguardar la viabilidad y funcionalidad del material biológico una vez extraído del donante, flexibilizando el tiempo hasta su injerto en el receptor. La preservación hipotérmica es ampliamente utilizada tanto para órganos enteros como para células, pero su uso está restringido a pocas horas, mientras que la criopreservación, por el momento disponible para células aisladas o tejidos homogéneos, da la posibilidad de una preservación extendida.

Resultan fundamentales las investigaciones en el campo de preservación incluyendo la optimización de metodologías y el desarrollo de soluciones de preservación, en búsqueda de menores costos y mejores resultados para ampliar el *pool* de material biológico de calidad disponible.

### **3) OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la performance de la solución BGP en la preservación de hepatocitos aislados de rata destinados al trasplante celular y validarla frente a las soluciones comerciales HTK y UWm.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 2.1 Caracterizar la solución de preservación BGP
- 2.2 Aplicar y analizar el uso de la solución BGP en la preservación hipotérmica
- 2.3 Aplicar y caracterizar la performance de la solución BGP en la criopreservación
- 2.4 Evaluar el trasplante de los hepatocitos preservados con la solución BGP

## 4) MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Descripción de la solución de preservación BGP y soluciones comerciales

La solución BGP se desarrolló e implementó en el laboratorio para la preservación dinámica de hígado entero de rata. La misma se fue modificando y analizando para la preservación estática del mismo órgano. Esta última versión, con mayor concentración de PEG, se escogió en este trabajo para la preservación hipotérmica y criopreservación de hepatocitos aislados de rata a fin de determinar su performance. Para la validación de su uso se la comparó con dos soluciones comerciales: la UWm, en un principio la estándar de oro para la preservación de células pero actualmente de acceso dificultoso por discontinuidad de producción y costo, y la HTK, una solución más accesible y ampliamente utilizada en PH, no así en criopreservación, en la que se opta por soluciones de composición intracelular.

#### 4.1.1 Formulaciones

El anhelo final de la formulación de la solución BGP es alcanzar una solución versátil destinada a la preservación estática y dinámica de órganos abdominales, tejidos y células. Además, se apuesta a su fácil preparación en cualquier laboratorio y a una mayor facilidad de acceso.

En la **Tabla 1** se detalla la composición de las tres soluciones utilizadas en el desarrollo de esta investigación.

#### Preparación de las soluciones

Las tres soluciones de preservación, así como las demás soluciones usadas en este trabajo, fueron íntegramente preparadas en el laboratorio siguiendo las especificaciones para cada una. Se les realizó control de pH (Denver Instruments y Hanna Instruments) y osmolalidad (osmómetro crioscópico Osmomat030, Gonotec, Germany) y se asumieron los recaudos necesarios para que cada solución y experimento realizado siga las buenas prácticas de fabricación.

**Tabla 1.** Composición química, pH y osmolalidad de las soluciones BGP, HTK Y UWm

BGP		HTK		UWm	
Componentes		Componentes		Componentes	
<b>Impermeantes (mM)</b>					
K <sup>+</sup> Gluconato	7.00	Manitol	30.00	Ácido lactobiónico	100.00
Na <sup>+</sup> Gluconato	100.00			Rafinosa.5H <sub>2</sub> O	30.00
Sacarosa	20.00				
<b>Buffers (mM)</b>					
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.50	Histidina.HCl.H <sub>2</sub> O	18.00	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25.00
BES	30.00	Histidina	180.00		
		Triptofano	2.00		
<b>Coloides</b>					
PEG-35	9.53 g/L			PEG-8000	5 % p/v
<b>Sustratos y electrolitos (mM)</b>					
MgSO <sub>4</sub>	5.00	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4.00	Alopurinol	1.00
Glutación	3.00	NaCl	15.00	Glutación	3.00
Adenosina	5.00	KCl	9.00	Adenosina	2.50
Glicina	15.00	Alfa-cetoglutarato	1.00	Glicina	15.00
		CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0.015		
<b>Antibióticos</b>					
Estreptomina (mg/mL)	0.25			Estreptomina (mg/mL)	0.25
Penicilina-G (U/mL)	10			Penicilina-G (U/mL)	10
<b>pH (a 25 °C) / osmolalidad (mOsm/kg H<sub>2</sub>O)</b>					
7.40 / 320		7.02-7.20 / 310		7.40 / 340	

#### 4.1.2 Análisis de costo de las soluciones

Se realizó el estudio de costo de cada solución a fin de realizar un comparativo entre las mismas, teniendo en cuenta los componentes de cada una. Este cálculo es parte del costo variable (unitario, por litro) ya que se limita a la materia prima, pero no incluye el *packaging*, por ejemplo. El precio de venta es más elevado debido a que se deben sumar otros costos variables, como el envasado, los costos fijos (alquiler, validación, servicios de producción, comercialización) y las utilidades.

El costo de cada solución se determinó por la sumatoria del costo de cada componente en la cantidad requerida para formular un litro de solución. Para ello se utilizaron los productos de la página de Sigma-Aldrich Argentina, con fecha de búsqueda

Marzo del 2020 (<https://www.sigmaaldrich.com/argentina.html>). Se unificó el criterio de elección de reactivos de grado ACS o superior. Esto significa que los productos químicos cumplen con las especificaciones definidas por el Comité de reactivos analíticos de la Sociedad Química Americana, y tienen la cualidad de ser comparables entre diferentes proveedores.

## **4.2 Establecimiento del modelo experimental**

### **4.2.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley cuyos pesos oscilaron entre 250-300 g. Los animales fueron provistos por el Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos (CIPReB)-Facultad de Ciencias Médicas-UNR y mantenidas en el bioterio del CAIC hasta el momento de la cirugía en un ambiente climatizado (25 °C), con alimento balanceado estándar y agua *ad-libitum*, sometidos a períodos de luz/oscuridad de 12 h hasta el momento de su utilización.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo a las reglamentaciones internacionales para el cuidado y manejo de animales de laboratorio bajo protocolos aprobados con el plan de trabajo de Tesis Doctoral por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas (RESOLUCIÓN C.D. N° 1658/2016). En el desarrollo de esta Tesis se procuró utilizar el menor número de animales posibles y se tomaron las medidas para evitar, en el mayor grado posible, el sufrimiento de los mismos en todo momento.

### **4.2.2 Procedimientos quirúrgicos**

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en una sala de cirugía diseñada específicamente para pequeños animales de laboratorio. La misma cuenta con el mobiliario y material de cirugía necesarios: mesa de cirugía, tabla adaptada como área de cirugía para animales pequeños, con orificios para el escurrimiento de fluidos y sujetadores para el posicionamiento del animal, lámpara con lupa, lámpara infrarroja, material de cirugía, descartadores de material cortopunzante, llaves de suministro de carbógeno, aire acondicionado, extractor de aire, etc.

Los animales se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (Parafarm) 30 mg/100 g de pc. Luego de anestesiado el animal fue fijado mediante tiras adhesivas a la tabla de cirugía.

#### 4.2.3 Obtención de hepatocitos aislados

Para el procedimiento de obtención de hepatocitos aislados, en primer lugar, se le administró a los animales heparina sódica (Rivero), en una dosis de 350 U/kg pc por vía intravenosa, para evitar la formación de trombos que impidan la correcta perfusión del hígado. Para ello, se realizó una disección de la región antero-interna del muslo y se inyectó la heparina en la vena femoral, inmediatamente antes de la cirugía. El procedimiento experimental procedió con una incisión abdominal en T invertida, desplazando los intestinos hacia el lado izquierdo del animal y dejando visible los grandes vasos abdominales. Se pasaron dos ligaduras alrededor de la vena porta, se introdujo un catéter 14 G en la misma y se anudaron las ligaduras para fijarlo.

El aislamiento de hepatocitos se realizó mediante perfusión enzimática con colagenasa por vena porta, un protocolo desarrollado por Seglen (Seglen, 1976) y adaptado por el equipo del CAIC (Sigot *et al.*, 2011). Todos los aislamientos fueron realizados entre las 9 y 11 horas, con el objetivo de minimizar la influencia de las variaciones circadianas.

La perfusión implicó el paso de tres soluciones por la vena porta, sin recirculación, mediante una bomba peristáltica (Masterflex Cole Parmer), a una velocidad de 20 mL/min. Las soluciones son variantes de una solución madre tipo Hank's (HBSS por sus siglas en inglés *Hank's Balanced Salt Solution*; **Tabla 2**). Las mismas fueron mantenidas a 37 °C y oxigenadas con una mezcla de carbógeno (95 % O<sub>2</sub>-5 % CO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub> 140 mm Hg) inmediatamente antes de ingresar al órgano.

Se inició el proceso perfundiendo 150 mL de *Solución de Lavado*. Acto seguido, se cortó la vena cava inferior a nivel abdominal, por debajo de las venas renales, con el fin de eliminar la sangre y el líquido de lavado y evitar un aumento de la presión intrahepática. El objetivo de esta etapa fue eliminar la sangre y el calcio del hígado (mediante el quelante EGTA), para desestabilizar las uniones intercelulares. Todos los pasos fueron favorecidos con una suave manipulación del hígado con los dedos.

En la segunda etapa, el medio de perfusión fue reemplazado por la *Solución con enzima* colagenasa tipo IV de *Clostridium histolyticum* (Sigma, Lote C5138) y calcio, cofactor necesario para su actividad, la disgregación de la matriz extracelular para la liberación de las células. Se utilizaron aproximadamente 100 mL de la solución hasta observar grietas en la cápsula y el hinchamiento del hígado.

En la última etapa, se perfundieron 100 mL de la *Solución Stop*, libre de calcio, para

detener la acción de la colagenasa.

El hígado digerido fue cuidadosamente extraído del animal, enjuagado con *Solución Stop*, y colocado en un vaso de cristalización de vidrio con 40 mL de la misma. Los hepatocitos se liberaron por disgregación mecánica del órgano por medio de pinzas metálicas. Finalmente, la suspensión de células fue filtrada a través de dos capas de gasa de algodón hidrófilo, con el fin de eliminar los agregados celulares y restos de tejido hepático.

**Tabla 2.** Soluciones HBSS para el aislamiento de hepatocitos

	Solución de lavado (mM)	Solución con enzima (mM)	Solución Stop (mM)
KCl	5.40	5.40	5.40
NaCl	140.00	140.00	140.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.34	0.34	0.34
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.52	0.52	0.52
Glucosa	5.60	5.60	5.60
NaHCO <sub>3</sub>	7.00	7.00	7.00
EGTA	0.60	-	-
CaCl <sub>2</sub>	-	2.50	2.50
MgSO <sub>4</sub>	-	1.00	1.00
HEPES	12.60	12.60	12.60
Colagenasa	-	0.06 g/L	-
pH=7.40			
Osmolalidad=290-310 mOsm/kg H <sub>2</sub> O			

La suspensión celular obtenida resultante contiene diferentes tipos de células (parenquimatosas intactas, no parenquimatosas, dañadas), agregados celulares, partes de tejido conectivo y vascular y restos subcelulares. Como las células no parenquimatosas y parenquimatosas dañadas poseen menor peso y densidad, es posible separar los diferentes tipos celulares por centrifugación diferencial. A fin de enriquecerla en hepatocitos intactos, dicha suspensión fue sometida a centrifugación diferencial (39 g, 3 min, 4 °C) en centrífuga refrigerada (Hettich). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en la *Solución Stop* fría. Se repitió este proceso de lavado dos veces. La resuspensión final se hizo con el medio y volumen adecuado para el grupo experimental a realizar.

Una alícuota de esta suspensión fue utilizada para realizar el recuento celular y el cálculo de viabilidad en cámara de Neubauer. Se utilizaron los aislamientos con viabilidades

mayores al 70 % obtenidas por la tinción con Trypan Blue (TB) la cual se detalla a continuación.

#### 4.2.4 Pruebas de viabilidad y funcionalidad

La suspensión celular debe ser cuantificada y sometida a pruebas de viabilidad/funcionalidad para determinar la calidad de la misma.

La técnica de TB fue utilizada para el seguimiento de la viabilidad y número celular en cada etapa de los procesos realizados. Otras técnicas complementarias fueron utilizadas para caracterizar al grupo CONTROL y a los grupos preservación a  $t_0$  (células aisladas/células recuperadas de la preservación, respectivamente) y a  $t_1$ , luego de una hora de *rewarming*. Se incluyeron: la prueba de viabilidad por tinción con ioduro de propidio (IP)-Hoechst y las pruebas funcionales de metabolización de diacetato de fluoresceína-IP, metabolización del MTT y actividad respiratoria.

A continuación se describen cada una de las técnicas mencionadas:

##### *Trypan Blue*

La exclusión del colorante TB es un método comúnmente utilizado por su rapidez y simplicidad. Se basa en la integridad de las membranas como índice de viabilidad celular: las células con la membrana plasmática intacta excluyen el colorante observándose refringentes al microscopio, mientras que las células dañadas captan el colorante y se tiñen de azul, más intensamente en el núcleo.

Para la prueba se adicionó una alícuota de la suspensión celular a una de solución 0.4 % p/v de TB (Fluka) en PBS, se reposó 2 minutos y se hizo el recuento bajo microscopía óptica convencional (Microscopio Axiolab, Zeiss) en cámara de Neubauer. Se contaron células vivas (incolores) y muertas (azules) y se determinó:

Número de células/mL= Número de células/cuadrantes contados\*dilución\*10000

Viabilidad=número de células vivas/número de células totales\*100

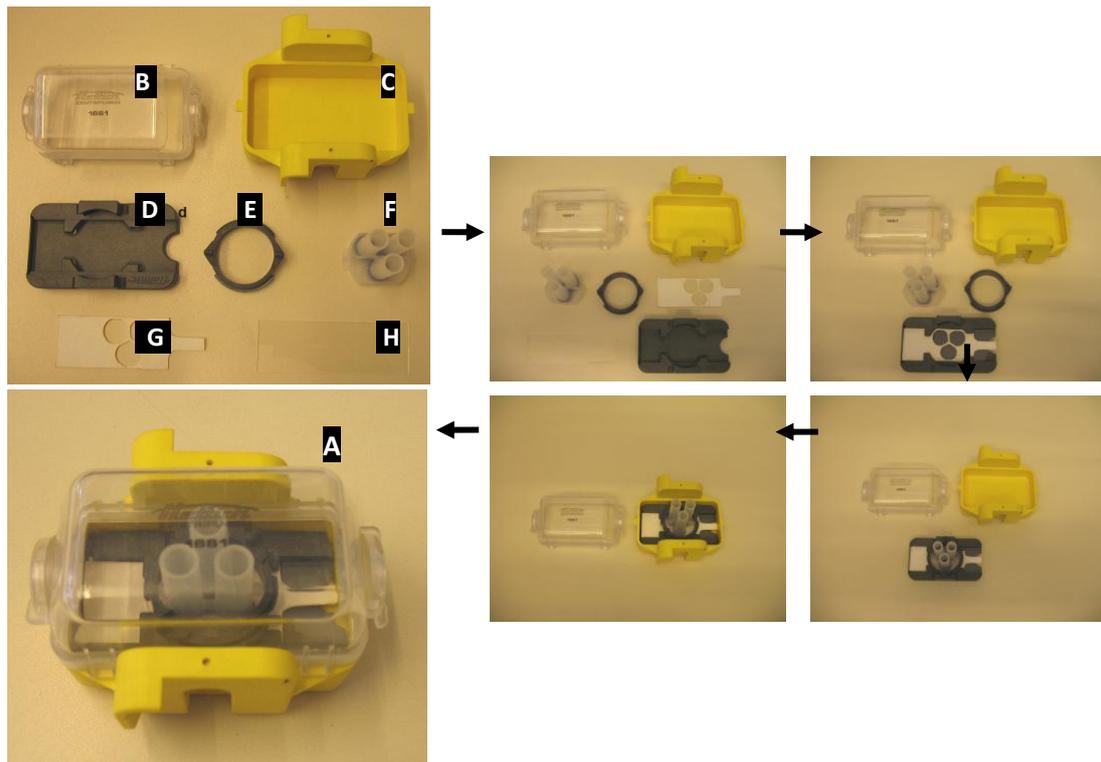
*Ioduro de Propidio-Hoechst*

Esta prueba de viabilidad al igual que anterior, discrimina a las células intactas de aquellas que poseen la membrana comprometida. La diferencia es que utiliza compuestos fluorescentes. El Hoechst (H) es un intercalador de ADN que penetra la membrana celular marcando todos los núcleos, mientras el IP es un compuesto intercalador de ADN que penetra sólo en las membranas dañadas marcando los núcleos de células muertas.

Para esta tinción se incubó en placa una alícuota de suspensión celular con 0.6  $\mu\text{M}$  de IP y 18  $\mu\text{M}$  Hoechst en 1 mL de PBS por 15 min en baño (Lab-Line/Dubnoff) con agitación lateral, T y atmósfera controlada de gases (5 %  $\text{CO}_2$ , 37 °C).

Transcurrido el tiempo se realizó un cytospin para lograr un extendido celular sobre un portaobjeto. El sistema utilizado consta de un soporte oscilante con tapa, constituido por los elementos que se observan en la **Figura 11**. Luego de ensamblar el sistema, se descargó la suspensión celular tomada de la placa en los tres tubos del contenedor (f) y se centrifugó a 39 *g* a 20 °C en centrífuga refrigerada (Hettich, Rotor 1624, Cabezal 1661) durante 5 minutos. Se lavó con PBS y posteriormente con agua destilada centrifugando en cada paso y finalmente se dejó secar en oscuridad.

Se observaron los preparados en microscopio de fluorescencia (Labomed T121100) y se fotografiaron mediante el programa ISCapture. Se hizo recuento de viabilidad en 10 fotos por duplicado por mediante la herramienta contador del software público ImageJ del National Institutes of Health (<http://imagej.nih.gov>). Se contaron células totales (núcleos azules por H) y muertas (núcleos rojos por IP). Por diferencia se calculó el número de células vivas. Se determinaron los porcentajes de viabilidad.



**Figura 11.** Fotografías del montaje secuencial del soporte oscilante utilizado para realizar la técnica de cytopspin. Componentes: a) Soporte oscilatorio completo, b) Tapa, c) Base, d) Soporte del portaobjetos, e) Anillo para ajustar el sistema, f) Contenedor de la suspensión celular, g) Tira de papel de filtro, h) Portaobjetos

### *Diacetato de fluoresceína*

El diacetato de fluoresceína (FDA) es un compuesto no fluorescente el cual atraviesa por difusión simple la membrana plasmática. Una vez en el citoplasma, puede ser metabolizado por esterasas inespecíficas de las células activas convirtiéndose en un compuesto verde fluorescente que es retenido en la célula. Esta característica permite evaluar la funcionalidad de las mismas.

Para este ensayo en placa se incubó una alícuota de suspensión celular con 5  $\mu\text{M}$  FDA y 0.6  $\mu\text{M}$  de IP en 1 mL de PBS por 15 min, bajo agitación, T y atmósfera controlada de gases (5 %  $\text{CO}_2$ , 37 °C) en baño (Lab-Line/Dubnoff). Se realizó un cytopspin y se procedió como se detalló anteriormente. Se contaron células vivas activas metabólicamente (verdes) y muertas (núcleos rojos). Se determinaron los porcentajes de funcionalidad.

### *MTT*

Este es un ensayo colorimétrico por el cual se mide la actividad metabólica mitocondrial. Las enzimas oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H pueden reducir el colorante amarillo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) en formazán insoluble de color púrpura. La intensidad de color obtenida por la conversión refleja la actividad metabólica de las células vivas.

Para este estudio se incubó una alícuota de células de concentración conocida (células/mL) con 0.5 mg/mL de MTT bajo agitación, atmósfera y T controladas (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) en baño por 75 min. Para células en suspensión: se levantó la muestra, se centrifugó, se descartó el sobrenadante (SN) y se resuspendió en 400 µL de DMSO para disolver la sal. Para células en cultivo: se quitó el SN y agregó 400 µL de DMSO para disolver la sal.

Se midieron las absorbancias (A) a 560 nm en lector de placa (Tecan *infinite*F50) de dos muestras por triplicado para cada determinación. Se hicieron los cálculos correspondientes para expresar el resultado como A/10<sup>6</sup> células.

### *Actividad respiratoria*

La capacidad para captar O<sub>2</sub> del medio es un indicador de funcionalidad celular ya que sólo las células vivas metabólicamente activas pueden consumirlo. Una disminución en la respiración mitocondrial lleva a la depleción de ATP y al consecuente daño en las vías metabólicas y procesos de transporte dependientes de energía.

Se determinó el consumo de oxígeno de hepatocitos controles y preservados, durante el calentamiento normotérmico. Los hepatocitos se incubaron en medio Krebs Heinsleit (KH) a 37 °C en un baño (Lab-Line/Dubnoff) con atmósfera de carbógeno (5 % CO<sub>2</sub>) y agitación continua durante 60 min. A los 0 y 60 min se centrifugaron alícuotas de suspensiones celulares que contenían 2\*10<sup>6</sup> células, se resuspendieron en 100 µL de medio KH de respiración (KHr, KH **Tabla 3** sin NaCO<sub>3</sub>H, con agregado de 10 mmol/L de hepes y 2 mmol/L de piruvato) y se añadieron a una cámara termostatzada diseñada en el laboratorio la cual contenía un electrodo de oxígeno tipo Clark (YSI 5300, Yellow Spring, OH, EEUU). La cámara se completó con 1.9 mL del mismo medio equilibrado con aire medicinal a 36 °C (volumen cámara de 2 mL) y allí comenzó la medición como se detalla más abajo.

El contenido de oxígeno ( $cO_2$ ) del medio KHR equilibrado con aire medicinal se determinó de acuerdo con el método de Robinson (Robinson & Cooper, 1970) siendo ( $0.203 \pm 0.008$ )  $\mu\text{mol/mL}$ ,  $n=8$  a  $36^\circ\text{C}$  y una presión barométrica de 760 mmHg.

El consumo de oxígeno de las suspensiones de hepatocitos se evaluó en dos condiciones:

A) Respiración basal o respiración endógena (**Vend**): velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial de los hepatocitos en el medio de incubación, utilizando los sustratos que tiene disponibles. La misma está acoplada a la síntesis de ATP y depende de los requerimientos energéticos de la célula.

B) Respiración estimulada por succinato (**Vsucc**): este sustrato atraviesa lentamente la membrana plasmática de los hepatocitos normales y provoca poca estimulación de la tasa de respiración endógena. Sin embargo, en células con integridad de membrana comprometida, el succinato puede llegar más fácilmente a las células y producir una estimulación marcada de la respiración mayor de dos veces, como se muestra en las células permeabilizadas químicamente.

Las mediciones se llevaron a cabo de la siguiente manera. Luego de un período de estabilización de 2 minutos, la velocidad de consumo de oxígeno presentó una respuesta lineal que fue registrada en un registrador Sekonic por 2 minutos, obteniéndose una recta. A partir de la pendiente de dicha recta, se calculó el % de disminución de la señal ( $\Delta s/\Delta t$ ) y se obtuvo el consumo de oxígeno aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de consumo de } O_2 \text{ (nmol/min/10}^6 \text{ cél)} = (cO_2 \times VC \times \Delta s/\Delta t) \div (D \times CC \times 1000)$$

donde  $cO_2$  es el contenido de oxígeno en el medio de respiración ( $0.203 \mu\text{mol de } O_2/\text{mL}$ ); VC es el volumen de la cámara (2 mL);  $\Delta s/\Delta t$  es el porcentaje de disminución de la señal calculado como:  $\Delta s$ : señal inicial menos señal final y  $\Delta t$ : tiempo de registro en minutos; CC número de células en la cámara ( $10^6$  células), y D son las divisiones de la escala del registrador luego de la calibración del sensor. La calibración se realizó llenando la cámara con solución KHR equilibrada con aire medicinal y ajustando la escala en un valor cercano al 100 %. Luego se agregó ditionito de sodio a esta solución, compuesto que consume todo el

oxígeno disuelto en la misma, y se llevó la escala a 0. Este procedimiento se repitió hasta tener valores constantes en ambos extremos de la escala.

Después de la determinación de la respiración basal, se añadió succinato a la cámara (concentración final 2  $\mu\text{M}$ ) y se registró la tasa de consumo durante 2 minutos. El tiempo total de medición incluida la prueba de succinato fue de 6 min. Se realizaron mediciones en tres muestras independientes para cada condición experimental. Los resultados se expresaron como  $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^6$  células teniendo en cuenta las correcciones por T y presión atmosférica al momento de la medición. Se calculó el cociente entre la **Vsucc** y la **Vend** como marcador de daño celular.

### 4.3 Aplicación de la BGP en la preservación hipotérmica

#### 4.3.1 Comparación con las soluciones comerciales

Se optó por realizar la preservación hipotérmica de las células aisladas en suspensión. Se utilizaron las soluciones BGP, UWm y HTK (**Tabla 1**). La BGP y la UWm fueron burbujeadas con nitrógeno 10 min inmediatamente antes de ser utilizadas con el fin de eliminar el oxígeno presente. Se incluyó también un grupo preservado con medio de cultivo Williams-E (MP Biomedicals, USA).

Luego del aislamiento celular se ajustó la concentración a  $2 \cdot 10^6$  células/mL y se fraccionaron cinco muestras de 20 mL cada una en tubos falcon. Se centrifugaron y se resuspendieron en los medios correspondientes para los siguientes grupos experimentales:

- Control sin preservación: KH (**Tabla 3**)
- Preservación hipotérmica 24 h: BGP, HTK, UWm, medio WE

Los tubos correspondientes al grupo de preservación hipotérmica se dispusieron en hieleras, cubiertos con hielo granizado, y se preservaron en heladera a 4 °C por 24 h.

Se debe considerar que el almacenamiento de las células a 4 °C fue llevado a cabo en tubos no sellados, en una atmósfera de composición no controlada, por lo que durante el período en que las células fueron preservadas, se permitió el intercambio gaseoso, resultando en una PH normóxica.

**Tabla 3. Buffer KH**

Componente	Concentración (mM)
NaCl	118.00
KCl	4.80
KPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	1.20
CaCl <sub>2</sub>	1.50
MgSO <sub>4</sub>	1.20
NaCO <sub>3</sub> H	25.00
Glucosa	5.00
Saturación con carbógeno (95 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> ) por 20 min	
Osmolalidad= 300-310 mOsm/Kg H <sub>2</sub> O	
pH= 7.40	

Este *buffer* es de uso estándar para la perfusión del hígado aislado. En los experimentos realizados se utilizó durante el *rewarming*.

#### 4.3.1.1 Recuperación normotérmica

Luego de la preservación se regresó a las células a las condiciones fisiológicas. Se procedió a centrifugar las suspensiones celulares a 39 *g* en centrífuga refrigerada (Hettich) a 20 °C y se resuspendieron los *pellets* en KH. A las mismas se les realizaron pruebas en suspensión y en cultivo. Cabe destacar que la etapa posterior a la PH en este trabajo corresponde a un calentamiento normotérmico (*rewarming*), en lugar de reperfusión o reoxigenación normotérmica, como es llamada en la práctica médica, ya que este último término implica una PH en ausencia de oxígeno.

#### 4.3.1.2 Pruebas en suspensión

Inmediatamente luego de la preservación se les realizaron las pruebas de viabilidad y funcionalidad descriptas en 4.2.4, llamando a estas pruebas  $t_0$ .

Una parte de la suspensión celular se llevó a *rewarming* en baño termostático (Lab-Line/ Dubnoff), con agitación lateral, T y atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) por 60 min. En este momento se ensayaron nuevamente las pruebas de viabilidad y funcionalidad descriptas en 4.2.4, llamando a estas pruebas  $t_1$ .

El grupo CONTROL fue sometido a las mismas pruebas el día del aislamiento, a  $t_0$  (luego del aislamiento) y a  $t_1$  pasada la hora de *rewarming*.

#### 4.3.2 Cultivo

Se procedió a evaluar en cultivo a las células luego de preservadas en BGP. Como grupo CONTROL se hicieron cultivos de células aisladas sin preservación.

##### *Medios de cultivo utilizados*

*Medio de cultivo WE estéril para lavado:* medio de cultivo WE (MP Biomedicals, USA), suplementado con 1 g/L albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma), 2.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 133 IU/L penicilina (ICN) y 0.1 mg/L estreptomicina (Sigma).

*Medio de cultivo WE con suero:* medio de cultivo WE, suplementado con 5 % suero fetal bovino (SFB) (Sigma, cat. F7524), 1 g/L BSA, 2.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 133 IU/L penicilina y 0.1 mg/L estreptomicina.

*Medio post-adhesión celular:* medio de cultivo WE, suplementado con 1 g/L ASB, 5% SFB, 2.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 133 IU/L penicilina, 0.1 mg/L estreptomicina, 5 mg/L insulina bovina (Betasing, U-40) y 50 µM prednisolona 21-hemisuccinato (MP Biomedicals, USA).

La suspensión celular fue lavada con *Medio de cultivo WE para lavado*. El *pellet* resultante fue resuspendido cuidadosamente con la punta de la pipeta con el *Medio de cultivo WE con suero*. Una vez obtenida la suspensión celular se ajustó la concentración de hepatocitos a  $2 \times 10^6$  células/mL y se sembraron en placas de 35 mm de diámetro (Orange Scientific, Braine-l'Alleud Belgium) o placas multiwell 24 (GBO), con el objeto de obtener una confluencia celular entre 60-80 % a las 24 h. Las placas fueron previamente cubiertas con colágeno tipo I proveniente de tendón bovino (Sigma, USA, cat. C9879). En algunas se agregaron cubreobjetos de vidrio aptos para microscopía óptica, sometidos a un proceso de lavado previo en HCl 1 M y etanol al 70 %, los cuales también fueron cubiertos con colágeno.

Las células se incubaron 3 horas en estufa de cultivo (SANYO) a 37 °C y atmósfera controlada (5 % CO<sub>2</sub>, humedad 90 %) Transcurrido este período de tiempo, se cambió el medio que recubre las células por *Medio post-adhesión celular*. Las placas fueron incubadas durante 24 o 48 h.

Se sacaron fotos con una cámara (Canon PowerShot A620) conectada a un microscopio invertido (Olympus CK2) en 40 X al momento de la siembra, a las 3, 24 y 48 h. Se realizó un análisis morfológico de las células sobre dichas fotos. Se determinó el porcentaje de

adherencia celular contabilizando las células en 10 fotos de cada condición cultivo, 24 h respecto del día de sembrado, mediante el contador del programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov>).

En las placas de 24 pocillos se realizó la prueba de MTT a las 24 y 48 h.

#### 4.4 Aplicación de la BGP en la criopreservación

Para la criopreservación se utilizaron las soluciones de preservación BGP, UWm y HTK. En una primera etapa, se optimizó el protocolo de preservación utilizando la solución BGP mediante la evaluación con pruebas en suspensión.

Seguido a este punto, se corroboró el protocolo con un modelo matemático *in silico*.

En una segunda etapa, los hepatocitos fueron criopreservados con el protocolo optimizado, utilizando las soluciones comerciales UW y HTK a fin de establecer las comparaciones con la BGP. Se realizó el análisis con las pruebas en suspensión. Finalmente, las células criopreservadas con BGP con el protocolo optimizado se evaluaron en cultivo.

Luego del aislamiento las células se resuspendieron en los medios correspondientes y se ajustó la concentración a  $3.5 \times 10^6$  células/mL.

##### 4.4.1 Protocolo de Criopreservación

###### ***Adición del Crioprotector***

Se utilizó el ACP y la concentración establecidos como estándar. Se agregó 10 % v/v de DMSO a 4 °C por goteo de dos maneras diferentes, con una incubación final de 5 min:

- 1) **En pasos sucesivos** de 1 %/min
- 2) **En un paso** (método estándar)

La suspensión celular resultante fue alicuotada en fracciones de 1 mL por criotubo.

###### ***Velocidad de enfriamiento***

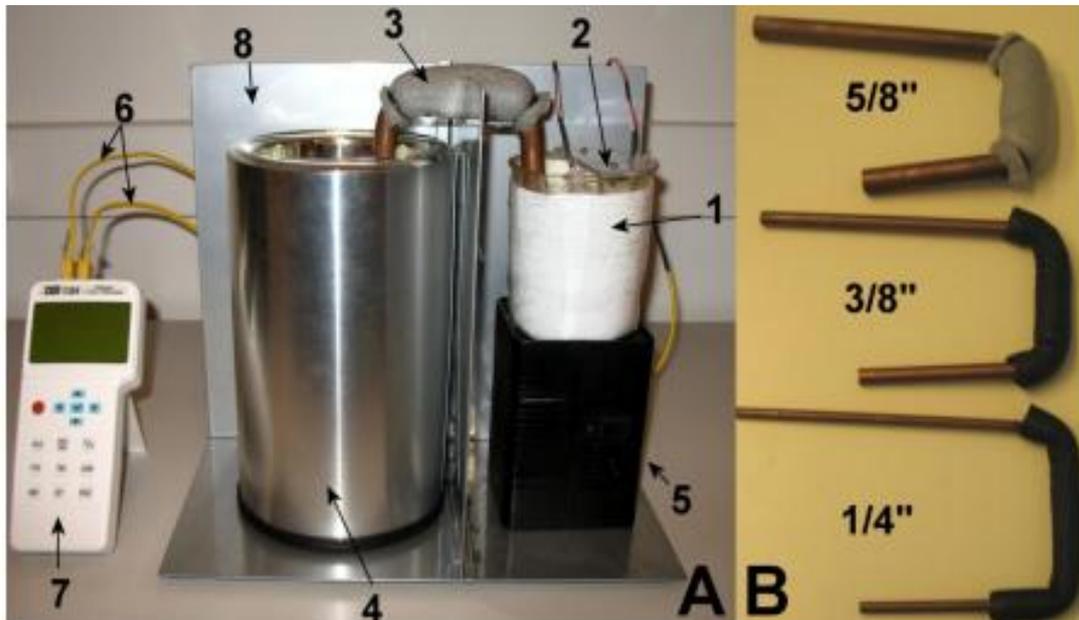
Para el enfriamiento lento de las células se utilizó el dispositivo ilustrado en la **Figura 12**, desarrollado en el laboratorio (Juan De Paz *et al.*, 2015), el cual permite un exhaustivo control del proceso. Este dispositivo permite variar las velocidades de enfriamiento

combinando barras de cobre de diferentes diámetros, las cuales facilitan el intercambio de calor entre el nitrógeno líquido y las muestras sumergidas en el medio intercambiador de calor, en este caso, metanol. Se incluyeron dos termocuplas conectadas a un termómetro, una en el medio y otra en una muestra testigo, con las cuales se hizo un registro de la T cada 10 segundos. Con estos datos se construyó la gráfica de temperatura vs tiempo, del medio y de la muestra. De la misma se obtuvieron los parámetros físico-químicos característicos del procedimiento: velocidad de enfriamiento, T de nucleación espontánea, tiempo al que se produce la nucleación y T de fusión.

Se evaluaron tres velocidades de enfriamiento obtenidas con las distintas barras de cobre:

- 1) 3/8" (más refuerzo de 3/8" a -20 °C)
- 2) 5/8" (más refuerzo de 3/8" a -30 °C)
- 3) dos barras de 5/8" simultáneas

Cuando el sistema llegó a los -80 °C, las muestras fueron sumergidas en nitrógeno líquido para el almacenado a -196 °C.



**Figura 12.** Dispositivo de enfriamiento lento. Imagen extraída (Juan De Paz et al., 2015).

**A)** 1-Cámara de enfriamiento: allí se coloca el contenedor de muestras sumergido en el medio intercambiador de calor (metanol), 2-contenedor de muestras, 3-barra de cobre, 4-termo Dewar: contenedor del nitrógeno líquido, 5-agitador magnético, 6-termocuplas (muestra testigo, metanol), 7-termómetro electrónico TES-1384: conectado a una PC, 8-plataforma de soporte;

**B)** Barras de cobre de diferentes diámetros

### ***Etapa de descongelado y remoción del ACP***

Se realizó un descongelado rápido en baño a 37 °C seguido del lavado del DMSO.

Se ensayaron tres tipos de lavado con el medio correspondiente a 4 °C. Por cada mL de suspensión celular, por goteo cada 5 minutos, se agregó:

***Dil 1)*** 1, 2, 3, 6 y 12 mL

***Dil 2)*** 0.5, 1, 1.5, 3 y 6 mL (método estándar)

***Dil 3)*** 1 mL

Luego de una incubación de 5 min final, se centrifugó a 39 *g* en centrífuga refrigerada (Hettich) a 4 °C por 5 min y se resuspendió en igual volumen inicial de KH.

#### 4.4.1.1 Recuperación normotérmica

Luego de la preservación se regresó a las células a las condiciones fisiológicas. Una vez removido el ACP, las células fueron centrifugadas y los *pellets* resuspendidos en KH.

#### 4.4.1.2 Pruebas en suspensión

Inmediatamente luego de recuperadas las células se les realizaron las pruebas de viabilidad/funcionalidad descritas en **4.2**, llamando a estas pruebas  $t_0$ .

El resto de la suspensión celular se llevó a *rewarming* en baño termostático (Lab-Line/ Dubnoff) con agitación lateral, T y atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) por 60 min. En este momento se hicieron nuevamente las pruebas de viabilidad/funcionalidad descritas en **4.2**, llamando a estas pruebas  $t_1$ .

El grupo CONTROL se sometió a las mismas pruebas el día del aislamiento, a  $t_0$  (luego del aislamiento) y a  $t_1$  pasada la hora de *rewarming*.

#### 4.4.2 Tolerancia osmótica y modelado matemático. Análisis *in silico*

Además de la evaluación empírica, se decidió utilizar un modelo teórico para optimizar la carga y descarga del ACP.

En primer lugar, se realizó la determinación de las osmolalidades límites que otorguen el rendimiento y viabilidad deseados. Para ello, los hepatocitos aislados se resuspendieron en soluciones de osmolalidades en el rango 0 a 3000 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Las soluciones hipotónicas se prepararon a partir de diluciones de KH 0.3 Osm/kg H<sub>2</sub>O: 200, 100 y 50 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Las soluciones hipertónicas se prepararon por diluciones de una solución

stock (100 mL de KH con 9.4 g de NaCl): 3000, 2000, 1500, 1000 y 500 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Las células se incubaron 15 min a T ambiente en cada solución. Una alícuota se dispuso en cámara de Neubauer y se sacaron 10 fotos bajo microscopio (Labomed T121100) en 40 X, sobre las cuales se midieron los diámetros de las células usando la herramienta del programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov>). Con otra alícuota se hizo recuento para el cálculo del rendimiento y viabilidad por TB.

Con los datos obtenidos se construyeron gráficas de rendimiento y viabilidad vs osmolalidad. De allí se establecieron los límites de osmolalidades que otorguen el 80 % de rendimiento celular.

Con los diámetros medidos se obtuvieron los volúmenes normalizados ( $V/V_{iso}$ ) para cada punto y se determinaron los volúmenes correspondientes para dichos límites de osmolalidad. Se construyó la gráfica de Boyle Van't Hoff ( $V/V_{iso}$  vs  $\pi_0/\pi$ ) para estimar la fracción del volumen celular osmóticamente inactivo ( $V_b$ ) correspondiente a la ordenada al origen, necesario para el modelado matemático.

Finalmente, se utilizó el Formalismo de Kedem-Katchalsky (Kedem & Katchalsky, 1958) para predecir el comportamiento del volumen celular de los hepatocitos en los protocolos de carga y descarga del DMSO estudiados. Se simuló el siguiente sistema de ecuaciones resolviéndolo por el método numérico de Euler, en una planilla de cálculo diseñada a tal fin:

$$\begin{aligned} dV_{w+s}/dt &= -L_p A R T \{ (M_n^e - M_n^i) + \sigma (M_s^e - M_s^i) \} \\ dN_s/dt &= (1-\sigma)(1/2) M_s^e - M_s^i dV_{w+s}/dt + P_s A (M_s^e - M_s^i) \end{aligned}$$

Se obtuvieron las gráficas correspondientes y se corroboró que las excursiones de volumen de los distintos protocolos de carga y descarga del ACP respeten los límites establecidos por el estudio de la tolerancia osmótica. Con las mismas también se optimizaron los tiempos de equilibrado del ACP.

Si bien existen otros modelos, se escogió el K-K debido a que algunos valores de los parámetros celulares para hepatocitos de rata fueron obtenidos de la bibliografía (Weng *et al.*, 2017) y correspondían al mismo:  $L_p=1.11 \mu\text{m}/\text{atm}\cdot\text{min}$ ,  $P_s=7.7 \mu\text{m}/\text{min}$  y  $\sigma=0.581$ . Las condiciones iniciales fijadas para el modelado fueron:  $M_n^e=0.3 \text{ mol/L}$  y  $M_n^i=0.3 \text{ mol/L}$  para

ambos procesos de carga y descarga, mientras que para la carga:  $M_s^e=1.4$  mol/L y  $M_s^i=0.0$  mol/L y para la descarga:  $M_s^e=0.0$  mol/L y  $M_s^i=1.4$  mol/L.

#### 4.4.3 Comparación con las soluciones comerciales

Se criopreservaron hepatocitos bajo el protocolo optimizado y ajustado mediante el modelo matemático usando las soluciones BGP, UWm y HTK, a fin de establecer la performance de la nueva solución frente a las soluciones comerciales.

##### 4.4.3.1 Recuperación normotérmica

Luego de la preservación se realizó la recuperación normotérmica (descongelado rápido, lavado del DMSO y resuspensión en KH) como se describe en **4.4.1.1**.

##### 4.4.3.2 Pruebas en suspensión

Seguido a la etapa anterior se procedió a la evaluación mediante las pruebas en suspensión a  $t_0$  y  $t_1$  como se describe en **4.4.1.2**.

#### 4.4.4 Cultivo

Se procedió a evaluar a las células en cultivo luego de criopreservadas en BGP, en las condiciones optimizadas con las pruebas en suspensión (velocidad de enfriamiento, agregado y remoción del ACP) y el modelo teórico. Como CONTROL se hicieron cultivos de células aisladas sin preservación. Se evaluó la morfología, la adherencia y la capacidad metabólica por MTT como se detalla en el apartado de cultivo de PH **4.3.2**.

### 4.5 Trasplante celular de hepatocitos preservados con BGP

#### 4.5.1 Marcado de hepatocitos

Los hepatocitos trasplantados debieron ser marcados para distinguirse en el parénquima del animal receptor. Para ello se utilizó la molécula comercial éster succinimidílico de diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína (CFDA, SE). Tiene una gran capacidad de penetrar las membranas celulares debido a la presencia de los dos grupos acetato y no es fluorescente hasta que las esterasas intracelulares retiran los grupos acetato dando como resultante la molécula CFSE. En el interior celular forma complejos covalentes con grupos amino de las proteínas u otras moléculas. Una vez establecidos estos complejos,

la fluorescencia en la célula se mantiene por largos periodos de tiempo. Puede ser utilizado además como indicador de proliferación celular.

Se preparó una solución stock 3.6 mM de CFDA, SE (Molecular Probes, Cat C1157) en 100 % de DMSO. Los hepatocitos fueron resuspendidos en HBSS ( $2 \times 10^6$  células/mL) con 20  $\mu$ M de CFDA, SE y se incubaron 20 min en baño termostático (Lab-Line/Dubnoff) con agitación, atmósfera y T controlada (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). Luego la suspensión fue centrifugada a 39 g y lavada dos veces con HBSS. Se midió la viabilidad por TB.

#### 4.5.2 Trasplante

Los animales receptores fueron trasplantados con suspensiones de hepatocitos recién aislados (CONTROL) o recuperados de la preservación en BGP (PH 24 h o CRIO) marcados como se describió anteriormente.

Antes de ser utilizadas para la cirugía, las células marcadas y lavadas fueron llevadas a 1 mL ( $10^6$  células/mL) y se le adicionó 24 nmol/100 g pc de nitroprusiato de sodio (SNP) con posterior homogenización. El SNP produce una caída transitoria en la presión arterial y una reducción sostenida en la presión portal, mejorando la migración al hígado sin riesgo para la supervivencia animal (Sigot *et al.*, 2004).

El animal fue anestesiado como se describió en sección **4.2.2** y se posicionó decúbito lateral derecho sobre la tabla de cirugía. Se le practicó una pequeña incisión del lado izquierdo abdominal, justo por debajo de las costillas, por la cual se localizó el bazo y se lo expuso hacia el exterior.

La suspensión celular fue inyectada en el parénquima esplénico con aguja de calibre 25. Se hizo presión con gasa estéril y de ser necesario se selló el sitio de inyección para evitar el sangrado y la pérdida de las células marcadas. El bazo fue reubicado y se suturó la incisión. Se colocó anestésico de uso tópico sobre la misma.

El animal trasplantado fue vigilado permanentemente y mantenido en el Bioterio a T controlada y alimento *ad-libitum* por 24 o 48 h post cirugía.

Transcurrido el tiempo experimental, el animal fue anestesiado y posteriormente sacrificado por neumotórax quirúrgico. Se extrajeron el bazo y el hígado los cuales se lavaron con PBS. Se tomaron muestras aleatorias de los diferentes lobulillos del hígado y del bazo, excluyendo los bordes. Se lavaron nuevamente con PBS y se fijaron con formaldehído 10 % en PBS. Las muestras se remitieron a la Cátedra de Morfología de la Facultad de Bioquímica y

Farmacia (UNR) para el procesamiento histológico (deshidratación, aclaramiento, inclusión en bloque de parafina, microtomía, montaje en portaobjeto y tinción con H-E).

Los preparados fueron examinados bajo microscopio (Labomed T121100) en campo claro y en modo fluorescencia para localizar los hepatocitos trasplantados. Se tomaron 10 fotos al azar de cada biopsia a 10 y 40 X con la cámara acoplada al microscopio y el Software ISCapture (Tucsen Photonics Co., Ltd versión 4.1.3).

Las imágenes tomadas con el objetivo 40 X se procesaron con el programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov>). Sobre cada imagen se superpuso una grilla de 108 puntos y se contabilizaron los cuadrantes ocupados por los hepatocitos marcados con los que se determinó el porcentaje de área con marca.

#### **4.6 Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados con el programa GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, La Jolla California USA). Con esta herramienta informática se realizaron los test estadísticos de análisis de la variancia (ANOVA) para las muestras que cumplieren el supuesto de distribución normal e igualdad de variancias, en caso contrario se aplicó un test no paramétrico (Kruskal-Wallis). Las comparaciones múltiples se realizaron a través del test de Bonferroni y de Tukey-Kramer. Se consideró una  $p \leq 0.05$  como diferencia estadísticamente significativa. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (SD) o mediana  $\pm$  error estándar (SE) según correspondiera por el criterio de normalidad. El número de observaciones fue indicado en cada caso.

## 5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Descripción de la solución de preservación BGP y soluciones comerciales

#### 5.1.1 Formulaciones

El éxito de los trasplantes depende de múltiples variables: la condición base de los pacientes, la técnica quirúrgica, los tratamientos inmunosupresores y una preservación adecuada del material biológico a ser implantado.

Históricamente la PH y la criopreservación se consideraron como dos procesos únicos que comparten poco en común más allá del uso de bajas temperaturas para disminuir el tiempo biológico. No obstante, ciertas investigaciones sobre ambos revelaron una serie de similitudes entre los procesos a nivel celular y molecular. En ambos casos, la supervivencia celular (y la función) pueden verse significativamente afectadas por las variables del proceso de preservación. A través del diseño adecuado de la solución de preservación, la eficacia de la preservación puede mejorar sustancialmente (Baust *et al.*, 2016). Una solución óptima permite controlar bioquímicamente los cambios que se llevan a cabo durante el período de isquemia fría y mantener la viabilidad del material hasta el momento de su implantación (Fuller *et al.*, 2018).

El desarrollo clásico de soluciones de preservación se centró en algunas áreas críticas: mantenimiento del equilibrio iónico y osmótico a través de una adecuada concentración de electrolitos (altos o bajos índices de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), inhibición de la acidosis usando un *buffer*, prevención de la inflamación celular a través de un agente impermeante, control de la acumulación de radicales libres y la activación de la apoptosis, minimización del edema intersticial adicionando un coloide, así como la provisión de energía con el agregado de nutrientes (Petrenko *et al.*, 2019).

La solución UW es ampliamente utilizada y es considerada la estándar en la preservación de ciertos órganos abdominales (Adam *et al.*, 2018; Jing *et al.*, 2018) y de células aisladas como es el caso de los hepatocitos (Whaley *et al.*, 2021; Iansante *et al.*, 2018). No obstante, su alto costo y un desarrollo de formulaciones considerable, puso en auge otras soluciones alternativas, entre las que se destaca la HTK, con la cual se obtuvieron rendimientos comparables (Jing *et al.*, 2018; Szilágyi *et al.*, 2018). En este contexto, existe

una continua búsqueda sobre la formulación idónea y versátil para la preservación de distintos tipos de materiales biológicos, en vías de mejorar tanto el rendimiento celular como el aspecto económico.

Las razones antes mencionadas impulsaron al laboratorio al desarrollo de una solución de preservación propia, basada en los componentes BES-Gluconato-Polietilenglicol. A continuación se describen las características de los componentes de la solución BGP:

- Anión gluconato (provisto como gluconato de sodio y gluconato de potasio): debido a su tamaño y carga es un agente impermeable a la membrana plasmática. Su función es evitar el edema celular que genera el ingreso de agua asociado al ingreso de  $\text{Cl}^-$  a la célula durante la hipotermia. El gluconato se adiciona con el fin de remplazar al  $\text{Cl}^-$ , impidiendo el desbalance iónico (Carnevale ME, 2019).

- PEG: es un polímero impermeante que previene el edema celular, la expansión del espacio intersticial y preserva la estructura del citoesqueleto (Zaoiali, *et al.*, 2014). Posee un efecto protector sobre la membrana plasmática de los hepatocitos, evitando la peroxidación lipídica generada por las EROs (Puts *et al.*, 2015). Estabiliza la membrana ante los cambios de T (Aghdaie *et al.*, 2020) y tiene efecto antiinflamatorio y anticongelante (Fuller *et al.*, 2018).

- BES: es un sistema *buffer* basado en el ácido sulfónico, con pKa de 7.09 a 25 °C. Existen pocos estudios realizados con BES como *buffer* en soluciones de preservación hipotérmica. El mismo resultó ser el agente *buffer* más efectivo en la preservación de corazón y es una alternativa interesante a estudiar. Se lo incluye con el fin de regular el pH de la solución previniendo la acidosis intracelular (Carnevale ME, 2019).

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : contribuye a la regulación del pH.
- $\text{MgSO}_4$ : es un estabilizador de membrana.
- Glicina: mejora el funcionamiento mitocondrial (respiración y síntesis de ATP) y mantiene la integridad de la membrana. Existe evidencia la cual indica que es un inhibidor de las calpaínas, una familia de proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que se relacionan con el procesamiento de numerosas enzimas y proteínas del citoesqueleto, además están involucradas en la muerte celular (Carnevale ME, 2019). Este aminoácido mostró una protección significativa en condiciones hipóxicas *in vitro* para células de diferentes orígenes y para órganos aislados *ex vivo*, así como en estudios con animales. Estos efectos beneficiosos pueden deberse a la prevención de la entrada de sodio inducida por hipoxia al

inhibir la apertura de los canales de cloruro o al impedir la formación de poros no específicos para iones pequeños (Mohr *et al.*, 2020).

- Sucrosa: actúa como soporte osmótico adicional.
- Penicilina G y estreptomicina: las concentraciones de estos antibióticos se ajustaron para inhibir el crecimiento bacteriano sin afectar la viabilidad de los hepatocitos.
- Glutathione: es un factor importante de protección contra las EROs y es incluido para evitar su depleción durante la isquemia fría.
- Adenosina: es un sustrato agregado para generar ATP durante la reperfusión (Carnevale ME, 2019).

En una investigación anterior del CAIC se realizó una caracterización fisicoquímica de dicha solución: capacidad *buffer*, punto de congelamiento, concentración de O<sub>2</sub>, presión oncótica y viscosidad (Carnevale ME, 2019). En el presente trabajo de Tesis se decidió continuar con la aplicación de la BGP, particularmente en hepatocitos aislados de rata, apostando a una solución propia nacional, versátil, de fácil preparación y accesible.

Cabe destacar que los nuevos conocimientos impactan significativamente en la estrategia de diseño de la solución de preservación. El campo de la biología molecular avanza continuamente en la identificación de las diferentes vías involucradas en la preservación en frío, tanto beneficiosas como perjudiciales. Esto complejiza el enfoque clásico de formulación de soluciones de preservación para mantener la homeostasis celular y la integridad de membrana. Las soluciones actuales tienden a incorporar la modulación farmacológica para evitar la activación de las vías de estrés y la muerte celular posterior (Fuller *et al.*, 2018). Este parece ser el futuro de las soluciones de preservación, que seguirá progresando conjuntamente con la comprensión de los procesos involucrados.

### 5.1.2 Análisis de costo de las soluciones

El costo de un trasplante depende de varios factores, entre los que se destacan la internación, los recursos humanos altamente calificados, las intervenciones terapéuticas, entre otros (Boerr *et al.*, 2013). Dentro de las intervenciones terapéuticas podemos incluir el costo de la solución de preservación que, si bien podría representar un pequeño porcentaje del mismo, se torna significativo al multiplicarlo por la cantidad de casos que un efector público o privado debe afrontar.

En las siguientes tablas (**Tabla 4, 5 y 6**) se presenta el costo de la preparación de un litro de solución BGP, HTK y UWm teniendo en cuenta el precio de cada componente. La información fue extraída de la página Sigma-Aldrich Argentina en Marzo del 2020. Se incluye el número del catálogo del producto, el precio de la presentación y el costo que representa para la preparación de un litro de solución (se expresan en dólares, USD).

**Tabla 4. Costo/L de la solución BGP**

BGP COMPONENTES	CATÁLOGO	PRESENTACIÓN (g)	PRECIO (USD)	mM	COSTO (USD)
Na <sup>+</sup> gluconato	S2054	1000	219.01	100	4.77
K <sup>+</sup> gluconato	G4500	1000	1049.07	7	1.72
Sacarosa	S0389	1000	203.28	20	1.39
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P3786	1000	560.23	2.5	0.19
BES	B9879	1000	2371.60	30	15.18
PEG-35000	94646	1000	435.60	9.53 g/L	4.15
MgSO <sub>4</sub>	208094	500	219.01	5	0.26
Glutación	G4251	250	3000.80	3	10.80
Adenosina	A9251	100	709.06	5	9.22
Glicina	410225	250	302.50	15	1.33
Estreptomicina	S9137	25	93.41	0.25 mg/mL	0.93
Penicilina G	P3032	10000000 U	67.52	10 U/mL	0.07
					<b>50.02</b>

**Tabla 5. Costo/L de la solución HTK**

HTK COMPONENTES	CATÁLOGO	PRESENTACIÓN (g)	PRECIO (USD)	mM	COSTO (USD)
NaCl	S9888	1000	197.23	15	0.17
KCl	P3911	1000	341.22	9	0.23
2-cetoglutarato K <sup>+</sup>	K2000	1000	5977.40	1	0.90
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	M9272	1000	480.37	4	0.39
Histidina.HCl.H <sub>2</sub> O	53370	500	855.47	18	7.01
L-triptófano	T8941	500	2783.00	2	2.27
Manitol	M9647	1000	199.65	30	1.09
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	C3306	500	177.87	0.015	0.001
Histidina	H8000	500	1162.81	180	64.88
					<b>76.95</b>

**Tabla 6.** Costo/L de la solución UWm

UWm COMPONENTES	CATÁLOGO	PRESENTACIÓN (g)	PRECIO (USD)	mM	COSTO (USD)
Lactobianato	L2398	100	820.38	100	292.06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P3786	1000	560.23	25	1.90
Rafinosa.5H <sub>2</sub> O	R7630	100	1010.35	30	180.25
PEG-8000	P5413	1000	279.51	5%	13.98
Alopurinol	A8003	5	182.71	1	4.97
Glicina	410225	250	302.5	15	1.33
Penicilina G	S9137	10000000 U	67.52	10 U/mL	0.07
Estreptomina	S9137	25	93.41	0.25 mg/mL	0.93
Adenosina	A9251	100	709.06	2.5	9.22
Glutación	G4251	250	3000.80	3	10.80
					<b>515.51</b>

En un trasplante de órgano, el costo que implica la solución depende no solo del costo por litro de la solución, sino también de los litros de solución requeridos para el proceso total (reperfusión, lavado). La HTK tiene un costo/L menor que la UW, lo cual implica un ahorro en el costo total del trasplante (Mangus *et al.*, 2008; Martínez Castillo *et al.*, 2014), sin embargo, hay investigaciones que reportan un mayor gasto con HTK, ya que se necesita mayor volumen de esta solución respecto a la UW (Barros Schelotto *et al.*, 2008).

El abordaje para dicho análisis en la presente Tesis Doctoral es diferente, ya que se trabajó con suspensiones de células aisladas. La preservación de hepatocitos aislados es una preservación estática que requiere un determinado volumen para una concentración dada de células. En este caso, se puede independizar de la cantidad de solución requerida ya que es fijo y se necesita evaluar solo el costo por litro para establecer comparaciones. Los resultados aquí obtenidos comprueban el elevado costo de la UW, que se debe al costo de sus componentes, casi siete veces más elevado que el de la HTK. En el compromiso de hacer una solución más accesible, la BGP es además 1.5 veces más económica que la HTK en cuanto a los componentes de su formulación, y puede ser fácilmente preparada en cualquier laboratorio de calidad certificado para tal fin. Cabe resaltar que en este objetivo no se presenta ni fue calculado el costo total de producción ni el precio de venta comercial de las soluciones.

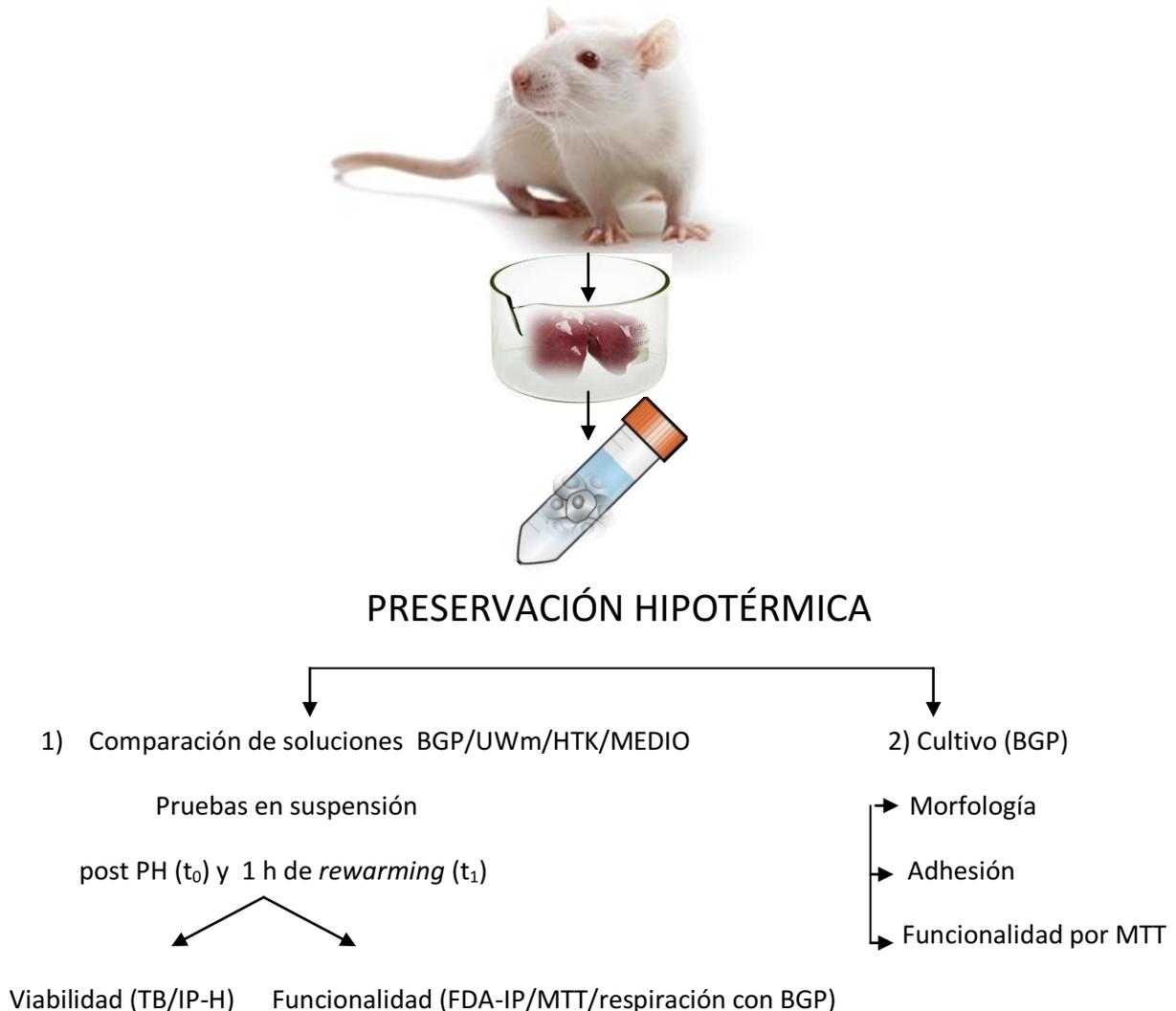
Por otro lado, un punto interesante a favor del desarrollo de una solución nacional, es la ventaja de independizarse de los insumos importados, como lo son ambas soluciones comerciales en estudio, evitando así las complicaciones por discontinuidad de elaboración

*Carla Tomatis*

de las soluciones como es el caso de la UW (Carnevale *et al.*, 2019) y del comercio internacional en un país como Argentina el cual es dependiente de las políticas de turno.

## 5.2 Aplicación de la BGP en la preservación hipotérmica

A continuación (**Figura 13**) se presenta un esquema de trabajo de este apartado para una mejor comprensión de los resultados presentados.

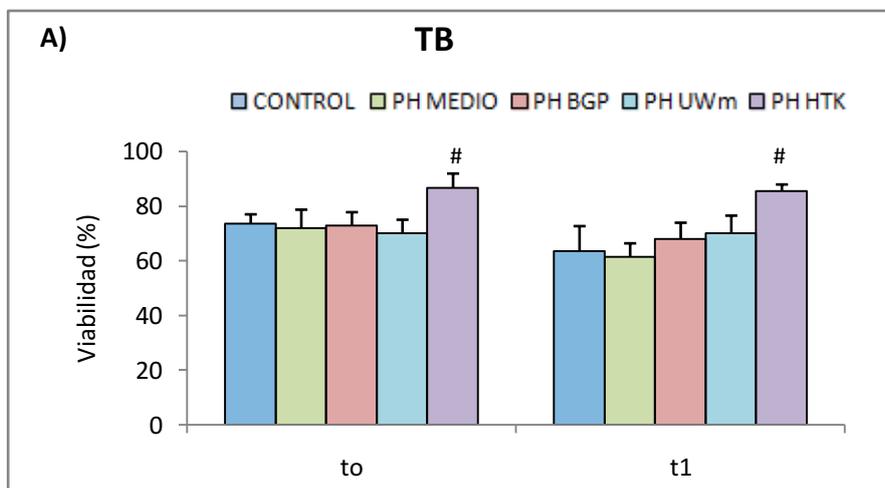


**Figura 13.** Esquema de trabajo de la aplicación de la BGP en la PH

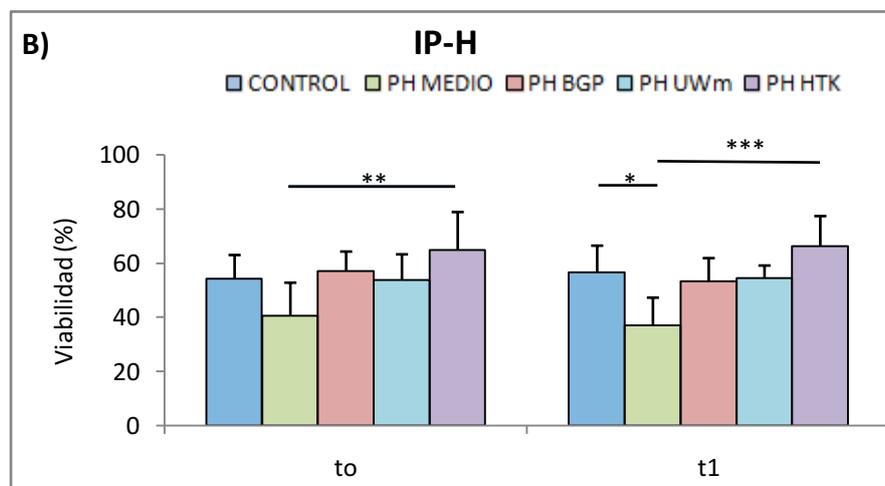
### 5.2.1 Comparación con las soluciones comerciales

Los hepatocitos aislados fueron preservados en hipotermia a 4 °C por 24 h en las soluciones BGP, HTK, UWm y medio WE. Se incluyeron las soluciones comerciales con el fin de validar la performance de la BGP frente a las mismas. Se realizó también el grupo experimental de preservación en medio para confirmar las ventajas de la preservación con una solución desarrollada para tal fin y un CONTROL sin preservación.

Para corroborar la calidad celular obtenida luego de la preservación se ensayaron pruebas en suspensión de viabilidad (TB, IP-H) y de funcionalidad (FDA-IP, metabolización de MTT) a  $t_0$  (inmediatamente post PH) y a  $t_1$  (luego de 60 min de *rewarming* en KH), detalladas en la sección 4.2.4. Las pruebas del CONTROL fueron realizadas el día del aislamiento a  $t_0$  y  $t_1$ . Se optó por dos pruebas de viabilidad que dan una idea de la integridad de la membrana celular y dos de funcionalidad las cuales muestran la capacidad de retener una particularidad del metabolismo activo. Si bien escoger varias pruebas podrían pensarse como redundantes, cada técnica tiene un fundamento particular, lo que brinda información complementaria que se estaría perdiendo optando por alguna de ellas. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 14 y 15.

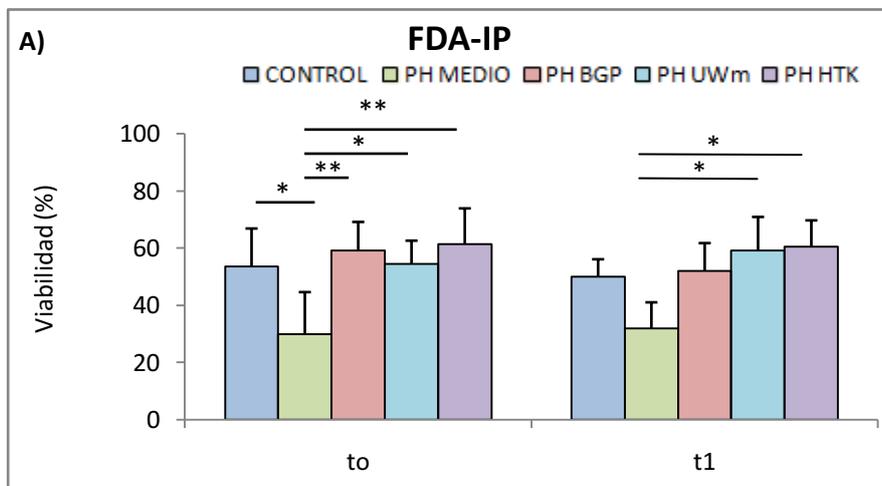


**Figura 14 A)** Viabilidad obtenida por exclusión de TB  
(media  $\pm$  SD, # HTK vs todos los grupos  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ )

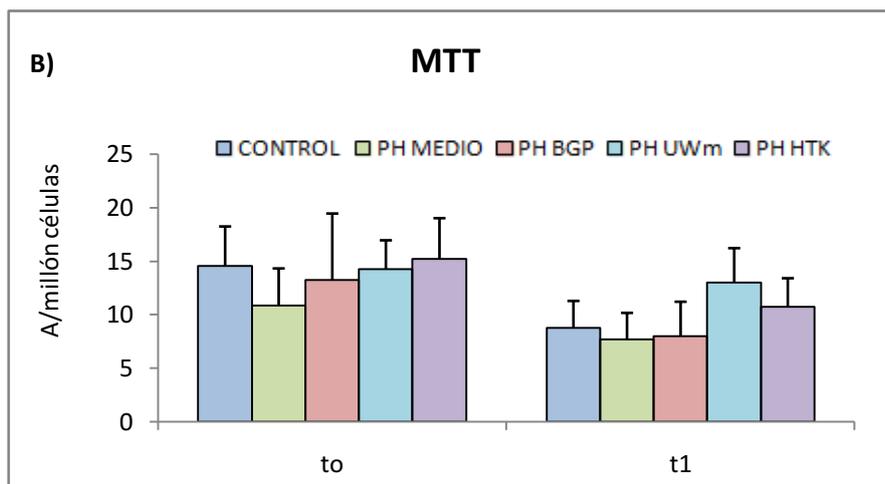


**Figura 14 B)** Viabilidad obtenida por tinción IP-H  
(media  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 5$ )

Las células preservadas con HTK mostraron una superioridad en las pruebas de viabilidad frente a todos los grupos experimentales, incluso muy superior al CONTROL. Este resultado da el indicio de que algún componente de la solución provocaría la impermeabilización de la membrana celular que impediría la entrada de los compuestos, aún estando dañada. La prueba de TB, a excepción de la HTK, no evidenció discriminación entre las soluciones de preservación, ni de ellas con el CONTROL y el medio. La prueba de IP-H, por el contrario, mostró la menor capacidad del medio para la preservación celular obteniéndose una diferencia estadística significativa respecto a la HTK en los dos tiempos y frente al CONTROL luego de la hora de *rewarming*.



**Figura 15 A)** Funcionalidad obtenida por metabolización de FDA-IP (media  $\pm$  SD, \*p<0.05, \*\*p<0.01, n=5)



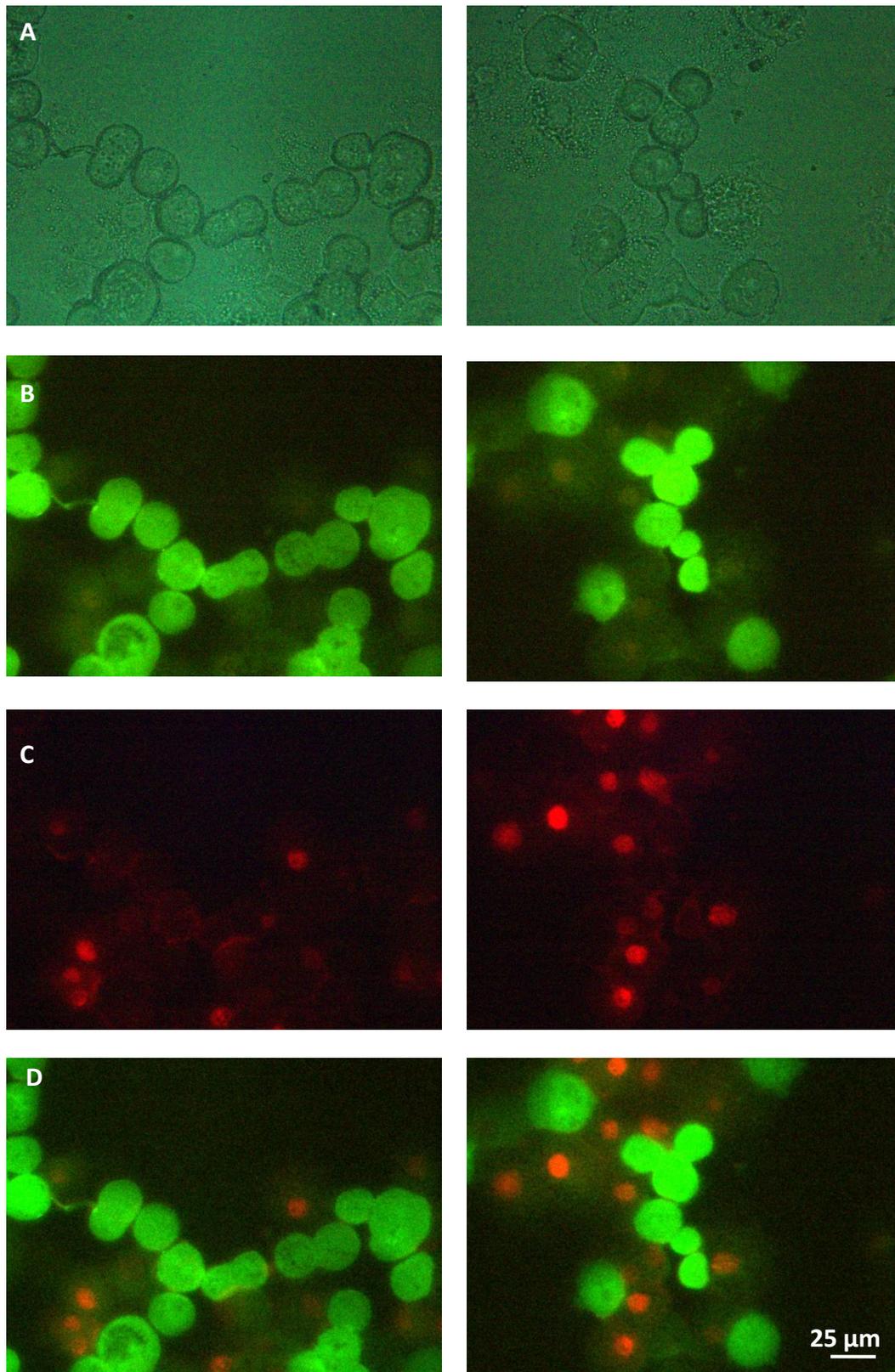
**Figura 15 B)** Funcionalidad calculada por metabolización de MTT (media  $\pm$  SD, n=5)

La funcionalidad de los hepatocitos en la PH se vio más comprometida que la membrana celular con el medio de cultivo. En la prueba de FDA-IP se evidenció la carencia del mismo para la preservación, donde la metabolización cayó notablemente frente al CONTROL y a las soluciones de preservación. Si bien los medios de cultivo se suelen utilizar para la preservación, especialmente para la criopreservación con el agregado de ACP (Press-Petig & Rauen, 2018), los mismos están diseñados para funcionar a 37 °C. Por lo tanto, es un resultado esperable lógico la menor eficacia del mismo para mantener la viabilidad y funcionalidad de las células a las bajas temperaturas frente a las soluciones desarrolladas y destinadas para tal fin.

La prueba de metabolización de MTT no mostró diferencias estadísticas significativas entre los grupos experimentales, lo que denotaría que no habría diferencias entre las soluciones para mantener la actividad mitocondrial.

Se compararon los porcentajes de viabilidad y funcionalidad otorgada por cada prueba (IP-H, FDA-IP, TB) por grupo (solución a  $t_0$ , solución a  $t_1$ ). Se demostró en todos los casos que las pruebas otorgan porcentajes con diferencias estadísticamente significativas (con al menos  $p < 0.01$  entre TB/FDA-IP e IP-H/FDA-IP, gráficas no mostradas). Las células muestran menor daño por TB, seguido por la tinción IP-H, mientras que se ven más comprometidas en la tinción con FDA-IP. Esto vislumbra por un lado, que la PH afectó más a la funcionalidad que la viabilidad celular, para todos los grupos. Por otro lado, la comparación demuestra la importancia de la complementación de las pruebas y el error que se comete en el uso general de la prueba por TB, que si bien es práctica operacionalmente por tiempo y sencillez, poco representa la realidad de la funcionalidad y viabilidad de las células.

En la **Figura 16** se muestran a modo de ejemplo fotografías de los hepatocitos preservadas con BGP a  $t_0$  y  $t_1$  con tinción FDA-IP. Se observan de color verde brillante los hepatocitos metabólicamente activos que clivaron la FDA, y los núcleos de color rojo por el IP intercalado en el ADN el cual ingresa a los hepatocitos con la membrana dañada.



**Figura 16.** Fotos ilustrativas de hepatocitos preservados hipotérmicamente en BGP con tinción FDA-IP a  $t_0$  (izquierda) y  $t_1$  (derecha), en microscopio de fluorescencia (40 X): A) campo claro, B) tinción FDA, C) tinción IP, D) superposición de B y C.

Los ensayos en suspensión son importantes ya que se pueden aplicar a los hepatocitos recién aislados y preservados, y los resultados disponibles en una hora, ayudan a tomar decisiones a corto plazo. Permiten evaluar la idoneidad para el trasplante de las células recién aisladas o de un lote particular de células preservadas, o en su defecto, estimar la conveniencia de almacenar una preparación celular particular (Donato *et al.*, 2008). En este caso, además, estos ensayos aportan a la obtención de una primera aproximación sobre el rendimiento de la BGP en la preservación de los hepatocitos aislados frente a las soluciones comerciales UWm y HTK.

En cuanto a estas comparaciones, en el presente trabajo la solución BGP fue capaz de mantener la viabilidad y funcionalidad de hepatocitos de rata en suspensión durante la preservación hipotérmica por 24 h y no mostró diferencias estadísticas significativas frente a las soluciones de preservación comerciales (HTK y UWm) y al CONTROL. Adicionalmente, se demostró la importancia del uso de una solución diseñada para tal fin, demostrando la menor eficacia de un medio de cultivo.

La investigación de Gramignoli y su equipo reveló que si bien la PH en UW de hepatocitos humanos disminuye la viabilidad, las células viables restantes conservan las funciones hepáticas críticas durante más de 48 h a niveles no significativamente diferentes de los observados en células recién aisladas (Gramignoli *et al.*, 2014). Duret y colaboradores compararon la PH de hepatocitos humanos en las soluciones UW, HTS-FRS e IGL-1 hasta las 96 h, entre las cuales no se vislumbraron ventajas en la viabilidad por TB. Difiriendo de los resultados aquí presentados, reportaron una baja de viabilidad mayor al 20 % a las 24 h respecto al CONTROL (Duret *et al.*, 2015).

Otra disidencia con los resultados obtenidos, es el reporte de la menor eficacia de la HTK en la PH de cultivos de hepatocitos humanos respecto a las soluciones Celsior y UW (Janßen *et al.*, 2003). Por su parte, Abrahamse y colaboradores evaluaron la PH de hepatocitos porcinos con Celsior, HTK, UW y PBS: se evidenció una disminución de la viabilidad celular de más del 50 % durante las primeras 24 h de preservación por TB, liberación de LDH y MTT, con un ligero aumento de la fragmentación del ADN pero sin aumento significativo de la actividad de la caspasa-3. El almacenamiento en Celsior seguido de la UW fue mejor que en PBS y HTK, pero ninguna de las soluciones fue capaz de prevenir adecuadamente la muerte celular después de una PH de 24 h. Las soluciones UW y Celsior

también fueron superiores con respecto a la necrosis y la fragmentación del ADN de células PH (Abrahamse *et al.*, 2003).

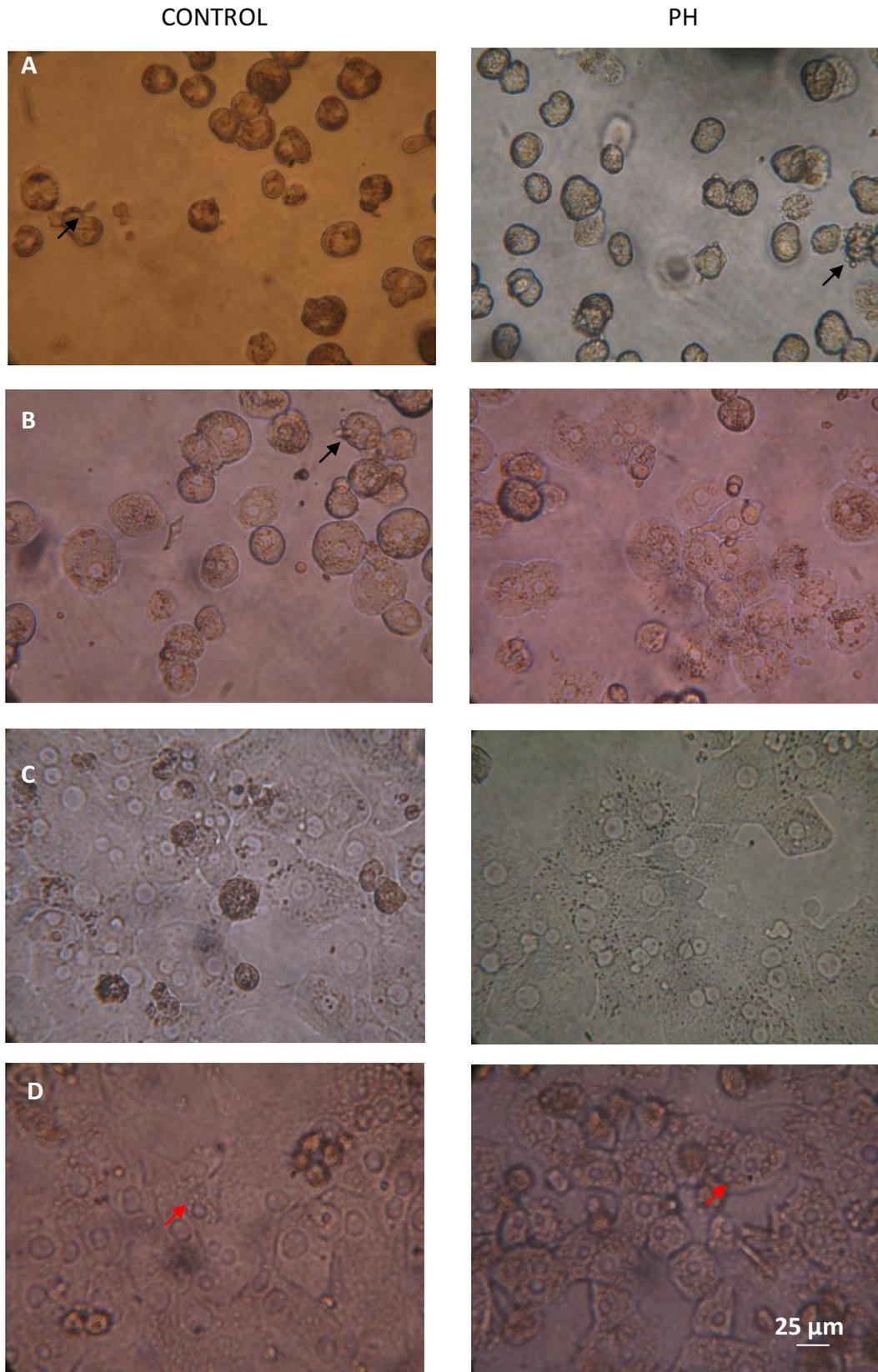
Por su parte, Li y colaboradores estudiaron la PH de esferoides de hepatocitos porcinos con HTK. El comportamiento de dicho sistema preservado en frío durante 24 h fue similar a su respectivo CONTROL. Los esferoides en condiciones de CONTROL comenzaron a perder su capacidad para eliminar el amoníaco mientras la producción de albúmina seguía activa a las 48 y 72 horas. Por el contrario, la viabilidad y la funcionalidad de los esferoides de los hepatocitos, incluida la depuración de amoníaco y la secreción de albúmina, se conservaron en el grupo HTK con agregado de un quelante de hierro (antioxidante) a las 48 y 72 horas (Li *et al.*, 2019). Si bien es otro sistema de preservación, los resultados a las 24 h la preservación con HTK son coincidentes con los aquí obtenidos. A futuro, se podrían estudiar tiempos de preservación extendidos e incluir las nuevas estrategias en las soluciones de preservación, como el agregado de compuestos para reducir las injurias por I/R e inhibir la muerte celular.

Como comentario final del uso de las soluciones para la preservación hipotérmica de hepatocitos, se puede decir que, si bien actualmente existen varias soluciones que son ampliamente utilizadas, las mismas no fueron completamente estudiadas ni comparadas. Como contribución a este campo, en la presente Tesis se cotejaron las soluciones de PH (BGP, UWm y HTK) con pruebas en suspensión de viabilidad y funcionalidad, las cuales muestran ciertas disidencias con la información recabada. Esta apreciación deja en claro que aún falta mucho por dilucidar en la efectividad y aplicación de las diversas soluciones de preservación para este objetivo.

### 5.2.2 Pruebas en cultivo

Las mediciones simples de viabilidad/funcionalidad de los hepatocitos en suspensión no son suficientemente concluyentes para predecir el resultado a largo plazo de un trasplante (Donato *et al.*, 2008). Por ello, una vez corroborada la performance de la BGP en la PH respecto al CONTROL y a las soluciones comerciales con las pruebas en suspensión, se decidió evaluar la respuesta de las células post PH con la solución BGP mediante el cultivo de las mismas. En el mismo, se analizó la morfología de los hepatocitos al adherirse, la capacidad de adherencia y la capacidad metabólica mediante la prueba del MTT.

Se sacaron fotos en microscopio invertido de los cultivos para el análisis y comparación de la morfología de los hepatocitos luego de la PH en BGP respecto al CONTROL. En la **Figura 17** se muestran las microfotografías representativas.



**Figura 17.** Microfotografías de hepatocitos cultivados CONTROL (izquierda) y PH (derecha):

A) t=0, B) t=3 h, C) t=24 h y D) t=48 h de cultivo, (160 X).

La flecha negra indica la presencia de *blebs* o protuberancias de membrana; la flecha roja la presencia de vacuolas intracelulares.

### *Análisis morfológico*

Las células del grupo CONTROL al momento de sembrado presentan una morfología redondeada que va cambiando a medida que se adhieren, lo que ya se puede observar a las 3 h cuando se realiza el cambio de medio. Una vez adheridas, presentan una apariencia poligonal, en monocapa, con uno o más núcleos centrales, citoplasma granular y formación de estructuras similares a canalículos biliares entre las células, ligeramente agrupadas.

Las células preservadas en frío durante 24 h en BGP y luego cultivadas mostraron un comportamiento y apariencia similar al CONTROL. Algunas células presentaron lesiones inducidas por el frío, como *blebs*, inmediatamente después del almacenamiento en frío que permanecieron luego de las 3 h post sembrado. A las 48 h de cultivo se observó la vacuolización del citoplasma, si bien también se vio en algunas fotografías del grupo CONTROL.

La formación de *blebs* en la membrana podría ser un daño irreversible consecuentemente relacionado con el gatillo de la muerte por apoptosis. Este proceso debería corroborarse, por ejemplo, con una tinción de H/E para buscar un segundo factor como la presencia de núcleos picnóticos (condensación de la cromática y contracción del núcleo) (Berghe *et al.*, 2013). Por el contrario, podría tratarse de un cambio ultraestructural de la membrana considerado como un proceso reversible (Soares *et al.*, 2019). En este objetivo, sólo se puede realizar la observación de los cambios en la membrana, pero no se puede concluir respecto a la muerte por apoptosis debido a que no se realizaron pruebas para definir dicho proceso.

Está reportado que el cultivo de hepatocitos humanos preservados en hipotermia por 24 h en UW, preservan bien la morfología respecto al CONTROL, sin embargo, también presentan *blebs* y vacuolas, y desprendimiento celular por la menor adherencia (Aghdaie *et al.*, 2020). Si bien la BGP no estaría dando mayor protección a los hepatocitos que la UW en cuanto a estas lesiones, en principio, se comportaría de manera similar.

### *Adherencia celular*

En el cultivo primario, además del aspecto morfológico, se puede evaluar la adhesión celular al soporte. Esto permite inferir la existencia de una maquinaria celular funcional, capaz de sintetizar las proteínas de membrana encargadas de la adhesión celular y el

contacto célula a célula. Teniendo en cuenta que los hepatocitos no proliferan en estas condiciones de cultivo primario, se evaluó la capacidad de adherencia de los mismos haciendo un recuento de las células adheridas a las 24 h respecto a las células sembradas.

Los resultados obtenidos de este análisis fueron expresados en porcentaje de células adheridas:  $(75.11 \pm 7.58)$  % para células CONTROL (cultivadas post aislamiento) y  $(61.04 \pm 6.27)$  % para las células PH 24 h en BGP. El análisis estadístico para la comparación de ambos grupos no mostró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ , CONTROL  $n=4$ , PH  $n=3$ ). A pesar de ello, para lograr una confluencia del 80 % a las 24 h, las células PH se debieron sembrar en doble de concentración celular que el CONTROL ( $0.05$  vs  $0.1 \cdot 10^6$  células/mL). Esto evidencia que las células sufrieron algún tipo de alteración que repercute en el contacto célula-célula y célula-matriz lo que posiblemente hace necesario una mayor densidad celular para salvar dicha falencia y obtener una adherencia similar.

La eficacia de adherencia de los hepatocitos se puede utilizar como una indicación de la calidad de las suspensiones celulares y es particularmente relevante para el trasplante, donde las células necesitan adherirse al endotelio sinusoidal hepático como parte del proceso de injerto (Donato *et al.*, 2008).

La incapacidad del hepatocito para adherirse al colágeno está relacionada con el estrés celular provocado por el procedimiento de aislamiento. En principio se genera estrés oxidativo por I/R durante la resección quirúrgica (Soares *et al.*, 2019) seguido por el evento de reperfusión durante el aislamiento con colagenasa, que desencadena un estrés adicional por el desprendimiento de las células de su contexto arquitectónico *in vivo* (Li *et al.*, 2019; Smets *et al.* 2002). Este proceso implica la pérdida de interacciones, que parecen desempeñar un papel destacado en el mantenimiento de funciones diferenciadas de los hepatocitos (Donato *et al.*, 2008). Particularmente en este trabajo se obtuvo buena adherencia basal en las células CONTROL teniendo en cuenta la viabilidad obtenida en el proceso de aislamiento ( $73.61 \pm 3.36$  % por TB).

Se propuso que los eventos estresantes mencionados anteriormente inician una respuesta pre-apoptótica, donde los hepatocitos están preparados para entrar en dicho proceso si se someten a un estrés prolongado adicional (Ölander *et al.*, 2019), en este caso la hipotermia. Esto podría explicar los *blebs* observados en el apartado anterior, sin ser concluyentes respecto a ello. Por otro lado, se sabe que en el aislado de hepatocitos hay una disminución inmediata de metabolitos como los energéticos (Cassim, *et al.*, 2017), no

recuperados en el cultivo *in vitro*. Un estudio sugiere que el deterioro mitocondrial con la subsiguiente deficiencia energética es un factor clave para la pérdida de adherencia de las suspensiones de hepatocitos almacenadas en frío (Pless-Petig *et al.*, 2017).

En cuanto a la performance de las soluciones, en el caso de Duret y colaboradores compararon la PH de hepatocitos humanos en las soluciones UW, HTS-FRS e IGL-1 donde observaron la capacidad de los hepatocitos frescos y almacenados en frío para unirse al colágeno, sintetizar y secretar albúmina, factor de coagulación VII y urea en el medio después de 3 días en cultivo. Al igual que en suspensión, el cultivo no demostró diferencias entre las soluciones, sin embargo, se observó una caída del 50 % de la adherencia de las células a las 48 h del mismo. En esa investigación encontraron menores parámetros de viabilidad por TB que porcentajes de adherencia celular, atribuyendo que las células con poco daño en la membrana pueden teñirse de azul, pero aún ser viables y con el potencial de repararse, recuperarse y adherirse. También observaron que la confluencia celular varió dependiendo de las condiciones de almacenamiento (concentración celular y solución) (Duret *et al.*, 2015). A una misma concentración, las diferencias encontradas en la eficacia de adherencia se podrían explicar por los beneficios protectores otorgados por la solución de preservación.

### MTT

Para corroborar la capacidad metabólica de los hepatocitos en cultivo se realizó la prueba de MTT a células CONTROL (recién aisladas) y post preservadas en hipotermia 24 h con BGP. Las pruebas correspondieron a las 24 y 48 h de cultivo. Los cultivos a las 24 h otorgaron una  $A/10^6$  células de  $(23.65 \pm 6.49)$  para el CONTROL y de  $(17.99 \pm 2.85)$  para el cultivo de células PH. Los cultivos a las 48 h otorgaron una  $A/10^6$  células de  $(17.98 \pm 4.81)$  para el CONTROL y  $(13.29 \pm 2.28)$  para las células PH. No hubo diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ , CONTROL  $n=4$ , PH  $n=3$ ) en la actividad de los cultivos CONTROL y PH, ni al comparar los días en cultivo dentro de cada grupo.

En este estudio se hizo el cultivo de los hepatocitos como una prueba de funcionalidad post PH, aunque en otras ocasiones, se mantienen en cultivo para un posterior trasplante. En este último caso, si bien pueden injertarse y proliferar al trasplantarse en

hígados dañados, no lo hacen tan eficientemente como los hepatocitos preservados en frío sin el paso previo por el cultivo (Duret *et al.*, 2015).

Abrahamse y colaboradores compararon la PH de hepatocitos porcinos con PBS, Celsior, UW y HTK. El cultivo primario posterior a la PH mostró disminución de la viabilidad celular de más del 50 % evaluado por la liberación de LDH y la reducción de MTT e indujo la fragmentación del ADN, pero sin aumento de la actividad de la caspasa-3. Ninguna de las soluciones fue capaz de prevenir adecuadamente la muerte celular después del cultivo de 24 h (Abrahamse *et al.*, 2003). A diferencia de ese trabajo, en las condiciones experimentales presentadas, las células preservadas en hipotermia con BGP mantuvieron la capacidad de metabolizar MTT en cultivo por 48 h al igual que los hepatocitos recién aislados. Se deberían incluir paralelamente cultivos de células PH con las soluciones comerciales a fin de comparar el rendimiento de la BGP con las mismas.

En cuanto a los resultados obtenidos, habría concordancia en la hipótesis planteada en el apartado anterior, donde relacionan la disfunción mitocondrial con la eficiencia en la adherencia (Petig, *et al.*, 2017), ya que se obtuvo una similar adherencia de las células PH respecto al CONTROL pero sembrando el doble de células, correlacionado a una merma en la actividad mitocondrial obtenida por MTT del grupo PH (no estadísticamente significativa).

Cabe resaltar que la baja de la actividad mitocondrial del grupo PH respecto al CONTROL no ha superado el 30 % a las 24 y 48 horas, pudiendo atribuir a la solución BGP un cierto efecto protector. Aghdaie y colaboradores encontraron mejoría en la producción de albúmina en hepatocitos humanos cultivados y preservados 24 h en una solución con el agregado de un quelante del hierro y PEG (Aghdaie *et al.*, 2020). El efecto protector de la BGP podría explicarse por la presencia de PEG en la misma, un componente encargado de mantener la integridad celular y estabilización de la membrana a baja temperatura (Zaouali, *et al.*, 2014; Puts *et al.*, 2015; Aghdaie *et al.*, 2020).

La metabolización del MTT de los hepatocitos en cultivo concuerda con el obtenido mediante la prueba del MTT en suspensión, la cual, si bien demostró una leve tendencia a disminuir inmediatamente post PH y *rewarming*, no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos PH con las diferentes soluciones ni respecto al CONTROL.

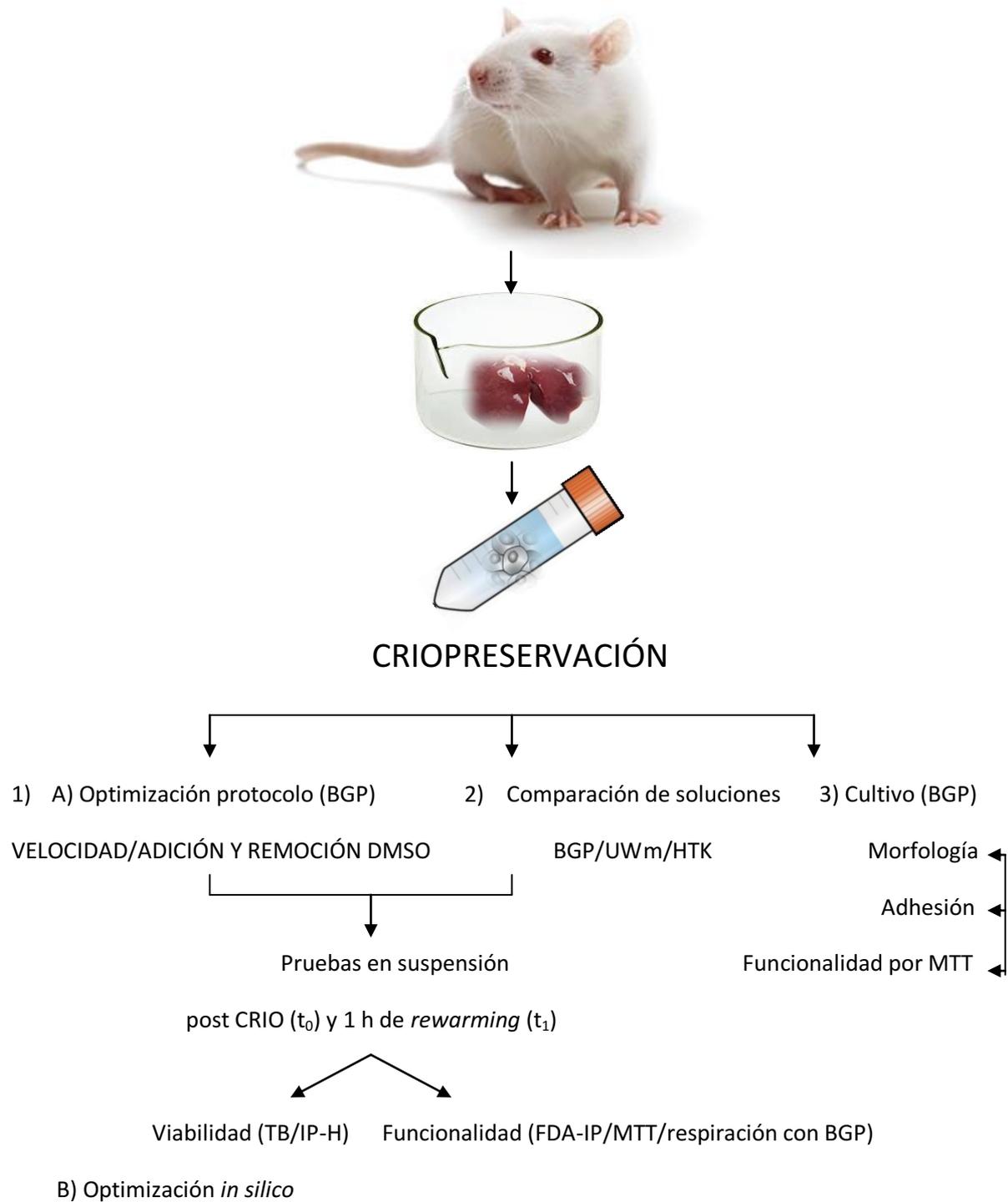
A modo final, al conectar los tres resultados obtenidos en las secciones del cultivo de los hepatocitos PH, se podría explicar la menor adherencia de los hepatocitos PH por la

*Carla Tomatis*

acumulación de estrés con la preservación sumada a una disfunción mitocondrial (baja del MTT) desencadenante de una posible inducción de apoptosis (presencia de *blebs*). Se destaca el efecto protector de la BGP al comparar con los resultados consultados en la bibliografía sobre PH con otras soluciones comerciales. A futuro, se deberían incluir las comparaciones de la BGP con las soluciones comerciales en las pruebas en cultivo que no fueron realizadas en este caso.

### 5.3 Aplicación de la BGP en la criopreservación

A continuación (**Figura 18**) se presenta un esquema de trabajo de este apartado para una mejor comprensión de los resultados presentados.



**Figura 18.** Esquema de trabajo de la aplicación de la BGP en la criopreservación

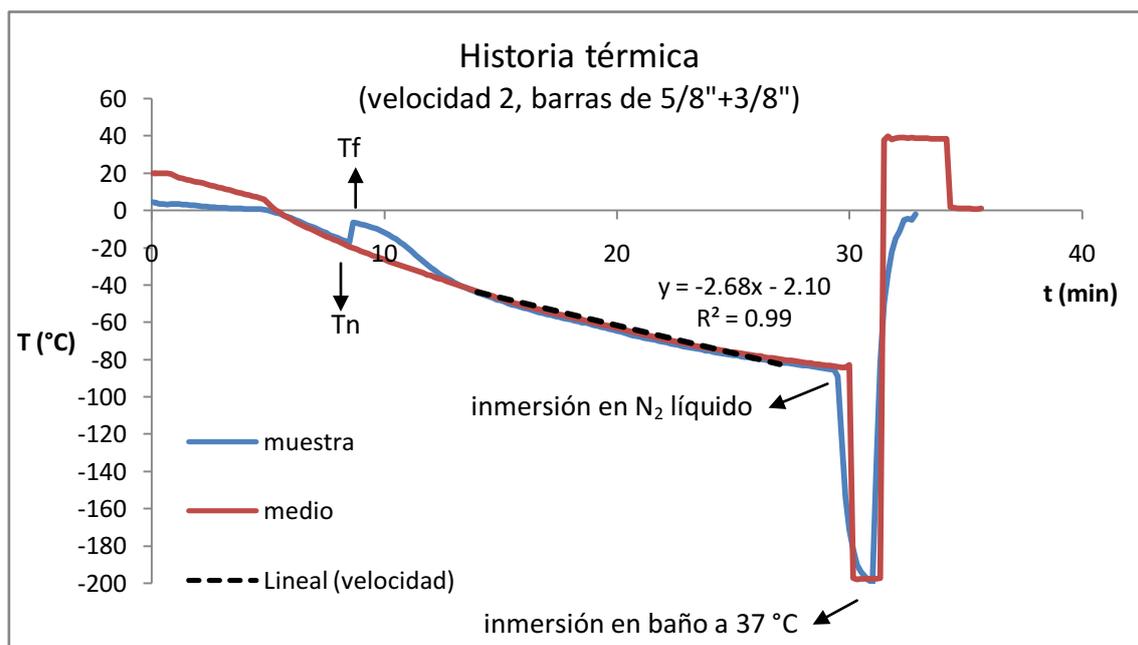
### 5.3.1 Protocolo de criopreservación

El éxito del proceso de criopreservación involucra una metodología razonablemente efectiva para prevenir el daño relacionado con la formación de hielo y el estrés osmótico. En primer lugar, se utilizó la solución BGP para optimizar los parámetros de la criopreservación: velocidad de enfriamiento, modo de agregado y remoción del ACP.

#### ***Velocidad de enfriamiento***

La velocidad de enfriamiento luego de la nucleación resulta fundamental en la supervivencia celular ya que rige el destino del agua intracelular y por consecuencia, la supervivencia celular. El sistema de enfriamiento utilizado en este trabajo permitió estudiar la respuesta celular a tres velocidades de enfriamiento, usando combinaciones de barras de cobre de diferentes diámetros para la transferencia de calor. Como se observa en la **Figura 19**, de cada experimento se registró la historia térmica mediante sondas, tanto del medio intercambiador de calor (rojo) como de una muestra testigo (azul) que luego se descartó.

A continuación, se describe resumidamente lo que se puede visualizar en la historia térmica presentada. Las muestras fueron incubadas a 4 °C con el DMSO y simultáneamente el medio (metanol) se fue llevando a esa temperatura. Transcurrido el tiempo de equilibrado con el ACP y con el medio a T próximas a los 4 °C, las muestras fueron sumergidas en dicho medio y se inició el enfriamiento controlado. El enfriamiento fue constante hasta llegar al estado superenfriado donde no hay congelamiento por la presencia de compuestos que disminuyen la T de cristalización. En este caso, se esperó la formación de un nucleador espontáneo al azar que da la subsecuente formación de cristales de la cual se puede identificar la T de nucleación (T<sub>n</sub>). Este proceso genera la liberación del calor latente de fusión (T<sub>f</sub>) por la transición al estado sólido de la muestra. Desde allí la muestra tardó unos minutos hasta igualar la velocidad de enfriamiento del medio, punto desde el cual se trazó una recta cuya pendiente representa la velocidad de enfriamiento. Llegados a los -80 °C la muestra fue sumergida en N<sub>2</sub> líquido donde permaneció almacenada por el tiempo requerido. Para el retorno a la normotermia, la muestra fue extraída del tanque de N<sub>2</sub> líquido y sumergida en un baño a 37 °C, para realizar un descongelado rápido, donde al cabo de 4 minutos se registró una T de 0 °C.



**Figura 19.** Historia térmica de una muestra (suspensión de hepatocitos de rata) y del medio de enfriamiento (metanol).

De cada experimento se registraron los datos del seguimiento térmico (T y t) a través de las termocuplas, los cuales se extrajeron a un ordenador. Con los mismos se determinaron los parámetros físicos-químicos que dominan los tres protocolos ensayados (distintas velocidades de enfriamiento) que se muestran en la **Tabla 7**.

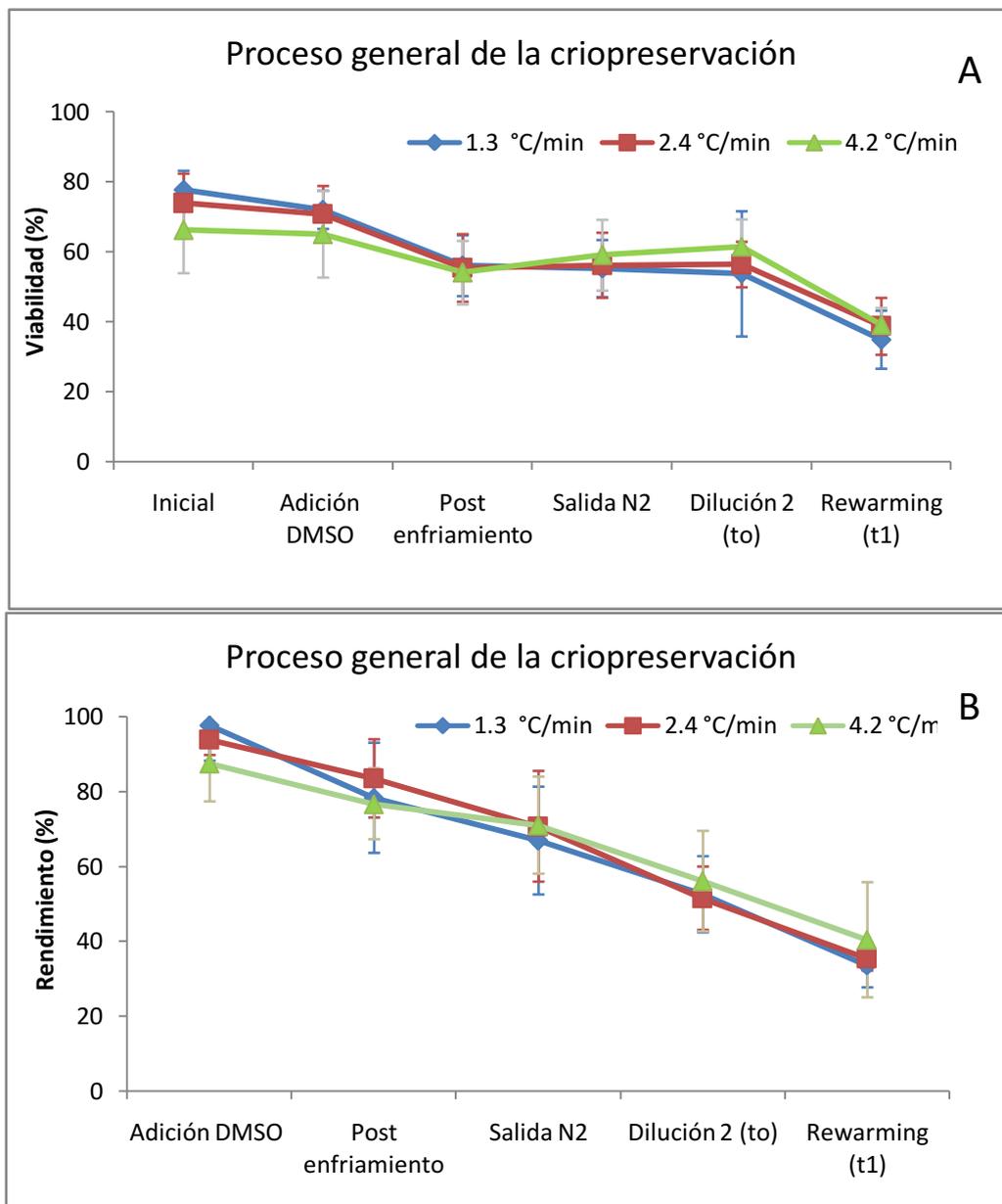
**Tabla 7.** Parámetros del enfriamiento lento obtenidos con las distintas barras de cobre (media ± SD)

	Diámetro barras de cobre (")	Velocidad de enfriamiento (°C/min)	t nucleación (min)	T nucleación (°C)	T fusión (°C)
<b>Velocidad 1</b> <b>(n=10)</b>	3/8 + 3/8 a -20 °C	1.3 ± 0.2	27.3 ± 3.7	-17.4 ± 1.0	-6.9 ± 1.4
<b>Velocidad 2</b> <b>(n=13)</b>	5/8 + 3/8 a -30 °C	2.4 ± 0.4	12.2 ± 2.4	-17.3 ± 2.9	-5.9 ± 1.4
<b>Velocidad 3</b> <b>(n=11)</b>	5/8 + 5/8	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.5	-14.3 ± 3.1	-4.9 ± 1.1

La velocidad de enfriamiento resulta ser crítica en el proceso de criopreservación. Si es lenta priman los efectos de deshidratación y el efecto solución, y si es demasiado rápida, habrá mayor formación de hielo ya que el agua no alcanza a salir al medio extracelular. Estas premisas constituyen la conocida “hipótesis de los dos factores” de Mazur (Mazur P, 1984), y es actualmente aceptada para explicar el daño celular (Gurruchaga *et al.*, 2018; Hunt C, 2017). En estos conceptos radica la importancia de lograr una velocidad media óptima entre los dos extremos que resultan nocivos y conllevan a la muerte celular. Esto es lo que impulsa a la decisión de la prueba de las tres velocidades de enfriamiento, cuya influencia en la supervivencia celular se expone más abajo.

El enfriamiento lento es la metodología más efectiva para la criopreservación de hepatocitos (humanos, porcinos, de rata) donde se adoptan velocidades bajas y es usual el enfriamiento a 1 °C/min (Whaley *et al.* 2021). Esta velocidad puede ser lograda a través de los dispositivos comerciales como el “Mr Frosty” (Nalgene®) (Chow-shi-yée *et al.*, 2020). Los mismos son una herramienta práctica para algunos fines, pero la velocidad que generan no es certeramente controlada y puede conducir a variaciones de enfriamiento (Fuller *et al.*, 2013; Terry *et al.*, 2010). Otro punto es que, el uso de estos dispositivos comerciales requiere de un freezer de -80 °C, equipamiento que puede fallar por interrupción de la temperatura comprometiendo a las muestras, sumado a la dificultad de su adquisición en cualquier centro de preservación o de salud. Estas falencias son las que impulsan la elección del sistema de enfriamiento lento aquí utilizado. En primer lugar, si bien requiere mayor tiempo operativo y manipulación, lo cual podría incorporar errores en el proceso, evita el uso de este tipo de freezer. En segundo lugar, admite operar a distintas velocidades de enfriamiento, lo cual no solo permite optimizar la velocidad de enfriamiento de los hepatocitos, sino que también se puede adaptar a otros tipos celulares. Por último, el monitoreo exhaustivo de las temperaturas en todo el proceso le otorga mayor grado de confiabilidad y permite detectar cualquier cambio que pudiese afectar el resultado final. Como contrapartida, el uso de este dispositivo queda restringido, al igual que los dispositivos comerciales, para pequeños volúmenes de suspensión celular. Para mayores volúmenes como los necesarios en la clínica se utilizan freezer de velocidad controlada (Coppin *et al.*, 2017; Pless-Petig & Rauen, 2018), equipos costosos disponibles en centros con mayor infraestructura que además, facilitan y estandarizan el trabajo operativo.

Para tener un control de cada paso de la criopreservación se realizó la prueba de viabilidad por TB en cada uno de ellos y para las tres velocidades de enfriamiento probadas: estado inicial de las células, agregado del DMSO, post enfriamiento (después de llegar a los -80 °C) y salida del N<sub>2</sub> líquido –ambos después del descongelado rápido–, finalizada la dilución (t<sub>0</sub>) y luego de la hora de *rewarming* (t<sub>1</sub>). Para este objetivo se fijaron las demás variables de la siguiente manera: concentración inicial de 3.5\*10<sup>6</sup> células/mL, el agregado del DMSO se realizó en etapas (goteo 1%/min + 5 min equilibrado) y la dilución usada fue la estándar (número 2, en etapas). Se calculó el rendimiento de células/mL y la viabilidad en cada paso del procedimiento completo como se ilustra en la **Figura 20**.

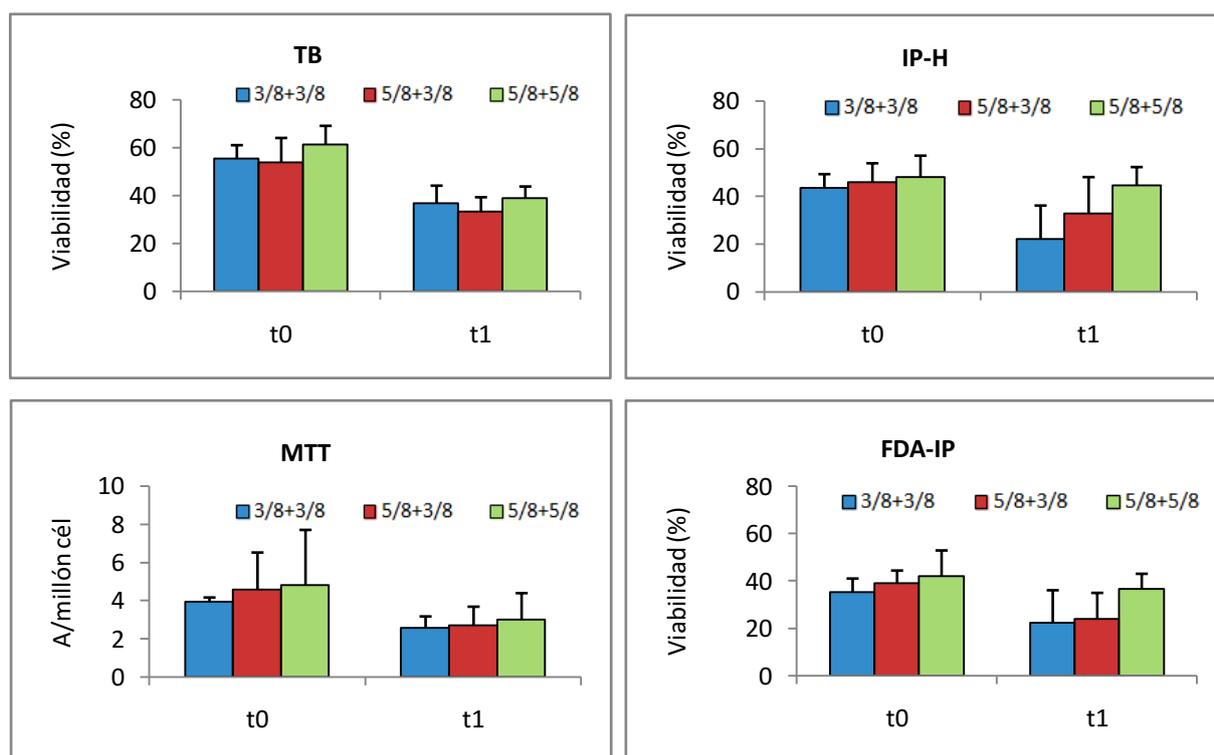


**Figura 20.** Viabilidad (A) y rendimiento (B) por TB de cada paso de la criopreservación para las tres velocidades de enfriamiento ensayadas (media ± SD).

En este sistema, donde los hepatocitos están diferenciados en forma terminal, se enfatiza en optimizar el proceso para obtener un buen rendimiento, ya que no habrá una recuperación del número celular en cultivo como puede ser el caso de otros sistemas (líneas celulares, por ejemplo). Por otro lado, es importante seguir el rendimiento ya que, los procedimientos de criopreservación y el uso de soluciones con DMSO, pueden seleccionar artificialmente células que son más robustas en su capacidad para resistir el proceso de criopreservación, un hecho que a menudo se pasa por alto y que puede contribuir a la deriva genética (Van Buskirk *et al.*, 2005).

Como vemos en ambas gráficas, en cada paso hay pérdida celular y descenso de viabilidad, exacerbado en el último paso. Los mecanismos de daño durante el *rewarming* aún no son claros, una de las teorías propone que es debido a la recristalización, por eso se adopta el criterio del descongelado rápido (Hunt C, 2017), que si bien tiene mejores resultados que un descongelado lento, no subsana ni evita las injurias como podemos observar en este caso. El comportamiento fue similar entre las tres velocidades de enfriamiento probadas y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento y la viabilidad por TB (n=8).

Para dilucidar si las tres velocidades probadas otorgaban algún beneficio en la supervivencia celular se hicieron las pruebas de viabilidad y funcionalidad en suspensión, luego de la dilución ( $t_0$ ) y el *rewarming* ( $t_1$ ). Los resultados de estos ensayos se muestran en la **Figura 21**.



**Figura 21.** Viabilidad determinada por TB, IP-H y funcionalidad por FDA-IP, MTT para las tres velocidades de enfriamiento post lavado ( $t_0$ ) y rewarming ( $t_1$ ) (media  $\pm$  SD,  $n=5$ ).

Como se puede observar en cada gráfico, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas para las distintas pruebas de viabilidad (TB, IP-H) y funcionalidad (FDA-IP, MTT) al comparar las tres velocidades probadas a  $t_0$  y  $t_1$ . Si bien las pruebas no resultaron concluyentes, en todas las pruebas hubo una leve tendencia de mejora en viabilidad y funcionalidad con la **velocidad 3**, mayor a  $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  (**velocidad 1**), la velocidad establecida como estándar para los hepatocitos (Chow-shi-yée *et al.*, 2020; Coppin *et al.*, 2017; Pless-Petig & Rauen, 2018; Whaley *et al.* 2021). Por dicho motivo, la **velocidad 3** se seleccionó para las pruebas posteriores, adicionado a las ventajas prácticas que otorga su aplicación, en cuenta al tiempo total del enfriamiento:  $v_1 = (77.23 \pm 6.87)$  min,  $v_2 = (42.46 \pm 5.78)$  min y  $v_3 = (23.29 \pm 1.85)$  min (media  $\pm$  SD,  $p < 0.001$  entre cada una de ellas), y al costo que representa la cantidad de  $\text{N}_2$  líquido requerido para llevarlo a cabo.

## Adición y remoción del ACP

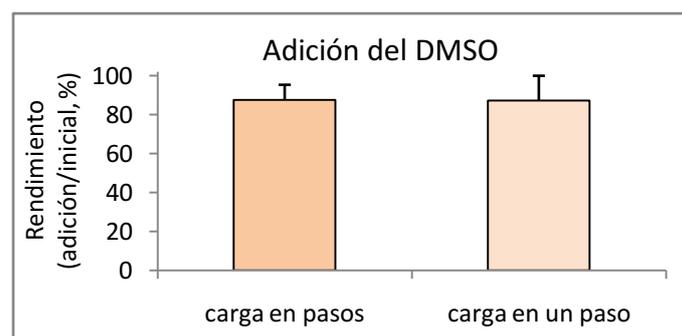
El uso del ACP debe ser minuciosamente optimizado en el sistema en estudio a fin de obtener el mayor rendimiento y funcionalidad celular. Se debe lograr un balance entre los beneficios otorgados por el ACP y los daños que puede ocasionar por toxicidad química (relacionada con la concentración del ACP, el tiempo y T de exposición) y por el desbalance osmótico debido a la diferencia de permeabilidad con el agua al momento de la carga y descarga.

La carga y descarga en pasos si bien disminuye el desbalance osmótico, aumenta el tiempo de exposición al ACP. Es por ello que para aminorar los posibles daños por toxicidad estos procedimientos se suelen realizar a baja T y con la disminución máxima posible del tiempo de equilibrado, que al mismo tiempo, se ve retardado por dicho descenso de T.

Para estudiar este punto,  $3.5 \cdot 10^6$  células/mL se criopreservaron en BGP utilizando la **velocidad 3** y se fijaron las condiciones establecidas como estándar: concentración de DMSO 10 % y carga/descarga realizados a 4 °C.

### **Adición del ACP**

Se evaluaron diferentes modos de adición del DMSO por goteo: agregados sucesivos de 1 %/min (10 minutos de carga) y en un solo paso (método estándar), ambos, con una incubación final de 5 min. Se determinó por TB el rendimiento y viabilidad (resultados no mostrados) después de ambos procesos obteniendo los resultados de la **Figura 22**.



**Figura 22.** Rendimiento celular medido por TB en la carga del ACP: en pasos y en una etapa (media  $\pm$  SD, n=5).

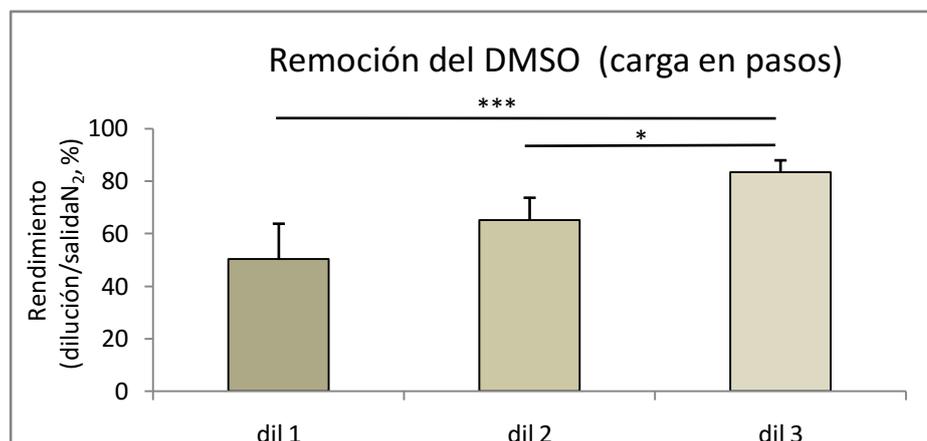
Si bien en este trabajo no se evaluó específicamente toxicidad, para tener en cuenta los posibles daños que ocasiona, fue importante comparar el rendimiento celular de ambos procesos de carga, luego de la dilución en un paso (p=0.32) y después de la hora de

*rewarming* ( $p=0.57$ ), respecto a la concentración de células inicial, en los cuales tampoco se encontró diferencia estadística. Como es sabido, resulta fundamental empezar el enfriamiento lo más pronto posible luego del agregado del DMSO, con una ventana de 10 min según el estudio de Terry y colaboradores (Terry *et al.*, 2010). Se podría suponer que el método de adición por pasos que tarda unos 15 min está dentro de la ventana de error debido a que no mostró cambios respecto al método estándar.

De esta etapa se puede observar que, aunque se suelen probar, usar y analizar las adiciones en pasos, los resultados obtenidos experimentalmente avalan que el agregado en un paso, la metodología estándar, no tiene efectos osmóticos distintos al agregado seriado y supone menor tiempo experimental y de exposición al DMSO.

### **Remoción del ACP**

Para la descarga del DMSO por dilución por goteo se evaluaron tres metodologías: **dil 1** en pasos con una dilución final 1:25, **dil 2** en pasos con una dilución final 1:13 (método estándar) y **dil 3** en un paso con una dilución 1:2, con resuspensión final en medio. Para este objetivo, la carga del DMSO se hizo en pasos. Luego de cada protocolo de dilución, las células fueron evaluadas en suspensión con TB obteniendo los resultados que se muestran en la **Figura 23**.



**Figura 23.** Rendimiento celular en la descarga del ACP obtenido por tinción TB: diluciones seriadas Dil 1 (1/25) y Dil 2 (estándar 1/13) y dilución en un paso Dil 3 (1/2) (media  $\pm$  SD, \* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ ,  $n=5$ ).

En estas metodologías probadas existen dos variables: por un lado volumen de dilución que puede afectar a las células por cambios osmóticos y por otro, el tiempo de

exposición al DMSO, 30 minutos en los dos procesos en etapas frente a los 5 minutos que tardó la **dilución 3**.

El proceso de dilución en un paso resultó prometedor frente a los procesos seriados, por lo que se deberían descartar las injurias osmóticas. Una explicación podría ser que esté influyendo negativamente el tiempo de equilibrado de los procesos seriados, sin embargo, las viabilidades luego del proceso fueron similares en los tres procesos sin diferencia estadística significativa. Lo que resultó curioso es que en la resuspensión final de ambos procesos seriados hubo menor concentración celular, ya descartando la injuria osmótica. Como posible explicación, se abarcó la siguiente hipótesis: los 5 minutos de centrifugación luego de terminadas las diluciones con BGP, no serían suficientes para decantar todas las células en el *pellet* en dicho volumen de dilución, por lo que se perderían en el descarte del SN. Esto se corroboró con la **dilución 2** aumentando el tiempo de centrifugación a 15 min eliminando las diferencias estadísticas significativas en el rendimiento respecto a la **dilución 3**. Si bien el tiempo de equilibrado en la **diluciones 1 y 2** es elevado, el DMSO está en cada paso más diluido y podría no evidenciar efectos tóxicos, punto no determinado específicamente en este trabajo.

Los resultados de Terry y colaboradores mostraron que la dilución con agregados constantes cada 5 min hasta 25 mL (tiempo de prueba 20 min) presentó peores parámetros de viabilidad y funcionalidad atribuyendo el daño al estrés osmótico, mientras el goteo de 25 mL por 3 min otorgó similar resultado que el método estándar, siendo este último el más favorable (Terry *et al.*, 2010).

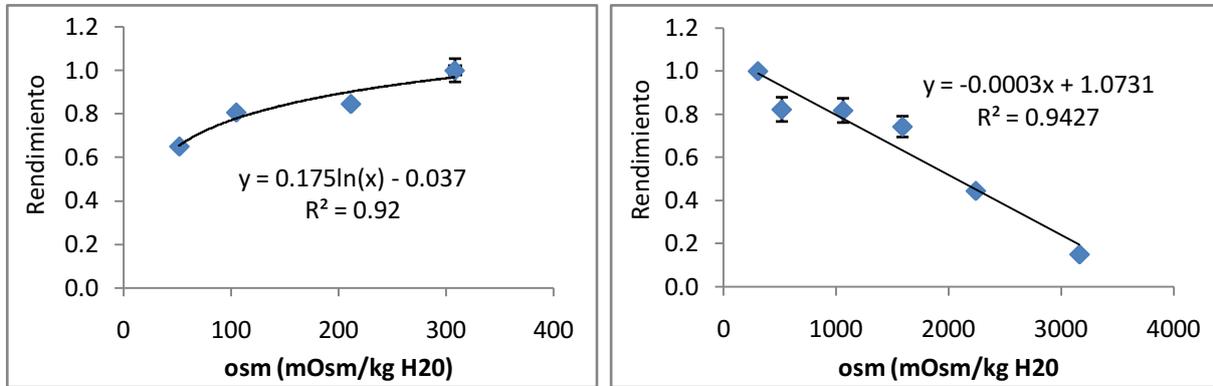
Como comentario final del estudio del lavado del ACP, si bien parece fundamental el agregado de la solución por goteo, la **dilución 3**, al medio y en un paso, sería comparable con la dilución considerada como estándar, sin causar daños osmóticos y con la ventaja de consumir menor tiempo y volumen de solución, con el consecuente ahorro de recursos.

### 5.3.2 Tolerancia osmótica y modelado matemático. Análisis *in silico*

El siguiente apartado se realizó a fin de corroborar los resultados de la carga y descarga del DMSO obtenidos experimentalmente, y de ser necesario, optimizar el proceso.

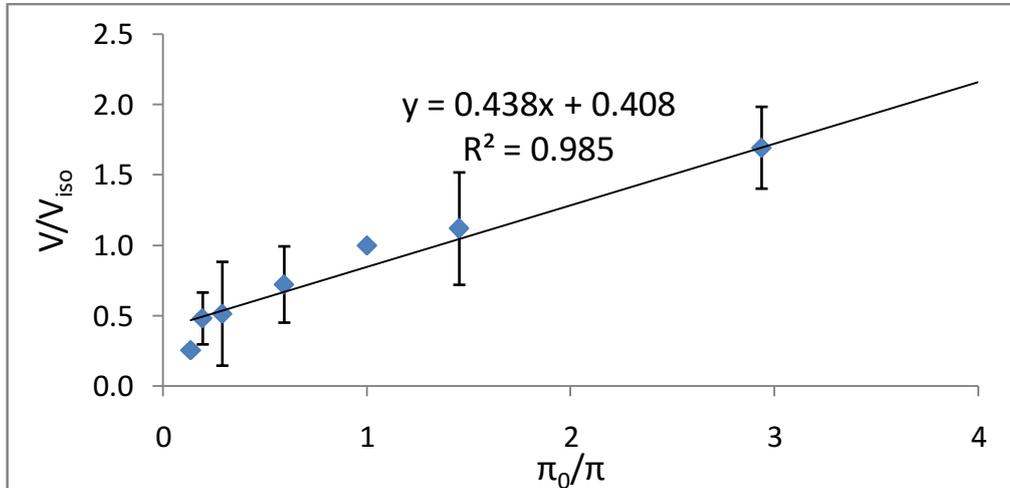
En una primera etapa se realizó la prueba de tolerancia osmótica. Las células ( $2 \times 10^6$  células/mL) fueron sometidas a soluciones de diferentes osmolalidades y para cada punto se determinaron los datos de viabilidad, rendimiento y volumen celular.

Se graficó el rendimiento en función de la osmolalidad y se determinaron los límites de osmolalidad para un rendimiento de células de 0.8, resultando 120 y 868 mOsm/kg (Figura 24).



**Figura 24.** Gráficas de tolerancia osmótica según el rendimiento celular determinado por TB (media  $\pm$  SD, n=4)

A partir de los datos de volumen celular calculados para cada osmolalidad se construyó la Gráfica de Boyle Van't Hoff (volumen normalizado versus la inversa de la osmolalidad) que se presenta a continuación (Figura 25).



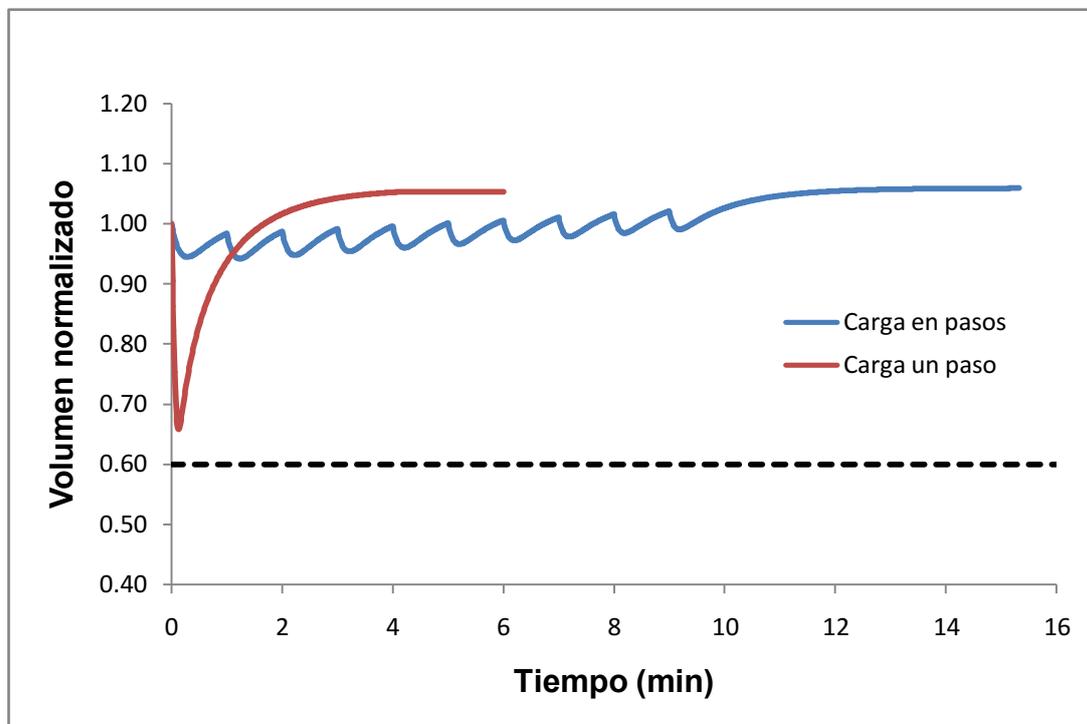
**Figura 25.** Gráfica de Boyle Van't Hoff (media  $\pm$  SD, n=4)

A partir de esta gráfica se determinaron volúmenes normalizados límites para dichas osmolalidades límites (120 y 868) que resultaron 1.5 y 0.6 respectivamente. También se obtuvo la fracción de volumen osmóticamente inactivo ( $V_b$ ) representado por la ordenada al origen que fue 0.41 y se calculó con los datos obtenidos el volumen isotónico que resultó

$8.18 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$ . Estos datos fueron necesarios para el modelado matemático que se desarrolla a continuación.

A partir de las osmolalidades y volúmenes límites obtenidos experimentalmente, se realizó el modelado matemático de K-K. El objetivo de este estudio fue corroborar mediante el modelo si los protocolos ensayados de adición y remoción del DMSO estaban dentro de los límites establecidos en la prueba de tolerancia osmótica.

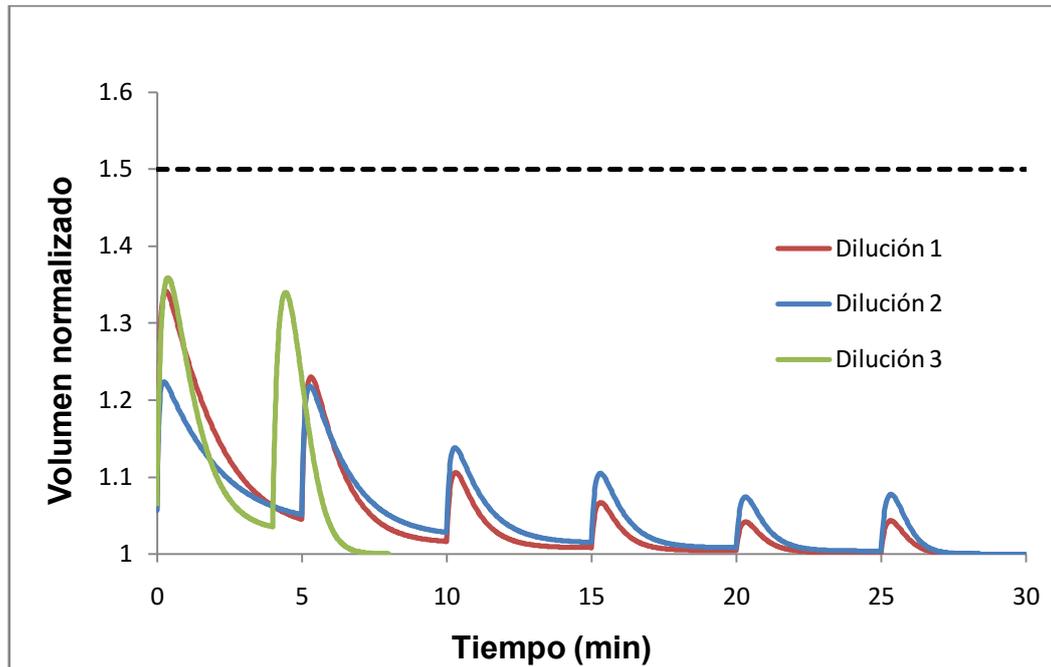
En la **Figura 26** se muestra el modelado por K-K de la variación del volumen de los dos protocolos de adición del DMSO, mientras en la **Figura 27** se observa el modelado de las tres metodologías de remoción del DMSO ensayadas.



**Figura 26.** Modelado por K-K de la fluctuación de volumen celular en la adición del DMSO

Como muestra la gráfica del modelado de la carga del DMSO, si bien el agregado en un paso causa una mayor variación del volumen celular, el mismo se encuentra dentro de los límites establecidos (se muestra el límite inferior en línea de trazo). Verificado el proceso osmótico como no perjudicial en ambas metodologías, resulta conveniente el agregado en el menor tiempo posible, en este caso la carga en un paso, para reducir la exposición al mismo. Aquí está otro punto interesante de estas gráficas, permiten establecer un tiempo de

equilibrado adecuado con el ACP. El mismo puede determinarse una vez que el volumen se mantiene asintótico, en este caso fue establecido en cuatro minutos.



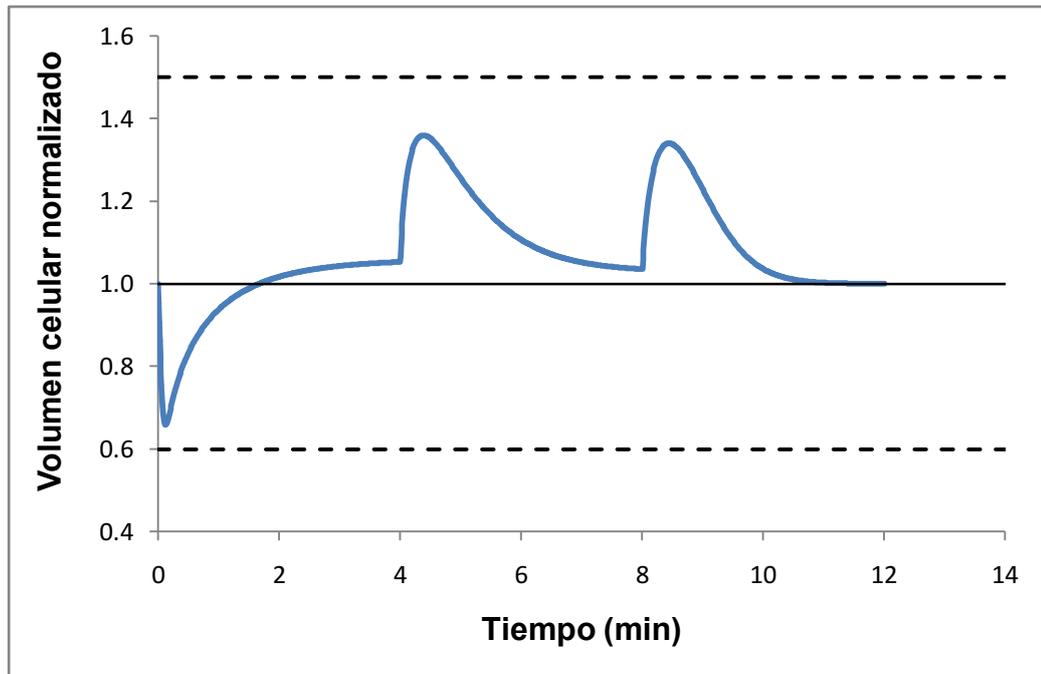
**Figura 27.** Modelado por K-K de la fluctuación de volumen celular en la remoción del DMSO

Como se puede observar en la **Figura 27** el modelado arrojó que las tres metodologías de lavado del DMSO producen volúmenes normalizados dentro del rango límite establecido en la prueba de tolerancia osmótica (se muestra el límite superior en línea de trazo). Estos resultados corroboran que las diferencias de rendimiento en las tres pruebas de dilución no se deberían a pérdida celular por shock osmótico y refuerzan la teoría de la pérdida celular por volumen de dilución.

Tanto la **dilución 1** como **3** producen picos de volúmenes más exacerbados al inicio de la dilución mientras que la **dilución 2** es la más estable en cuanto a la variación de volúmenes.

Las diluciones seriadas durante 30 min muestran múltiples fluctuaciones de volumen, mientras que en la **dilución 3**, si bien la fluctuación es similar a la **dilución 1**, solo se reitera una vez, dando también una menor exposición al DMSO. Al igual que en el proceso de carga, se observa que a partir de los cuatro minutos el volumen ya se mantiene estable y sería adecuado para el equilibrado.

A continuación se presenta la visualización del formalismo K-K optimizado para el proceso completo de carga y descarga de DMSO en los hepatocitos. A modo de resumen, la carga optimizada resultó en un paso por goteo (método estándar), mientras que la descarga por dilución al medio por goteo con la posterior centrifugación y resuspensión en medio libre de ACP. Ambos pasos lograron el equilibrio a los cuatro minutos.



**Figura 28.** Modelado K-K optimizado: fluctuación del volumen celular en la adición y remoción del DMSO

El modelado evolucionó desde la década de 1960, desde un punto de vista biofísico y en cuanto al aspecto computacional. Actualmente, se pueden resolver fácilmente ecuaciones diferenciales no lineales y optimizar los protocolos utilizando paquetes informáticos con la visualización numérica del resultado, lo que requiere un mínimo esfuerzo del operador. Con estos avances, el modelado computacional de procesos criobiológicos es considerablemente más accesible para aquellos científicos no expertos en las matemáticas (Benson J, 2021)

Por otro lado, el modelado contribuye a una de las pautas éticas que rigen la ciencia y la investigación científica, la regla de las 3 R: reducir, reutilizar y reciclar. En un contexto más consciente y responsable en el ámbito de la investigación, se recomienda evitar o reducir al máximo posible el uso de animales de experimentación, donde el uso de líneas y cultivos son alternativas válidas. A pesar de ello, el desarrollo del modelado matemático para la

predicción y la mejora de protocolos, no solo lleva a reducir el uso de animales sino también el número de experimentos a realizar. Una ventaja adicional, y no menor, del trabajo *in silico*, es el ahorro de recursos y tiempo en el trabajo empírico del investigador.

La capacidad de criopreservar con éxito las muestras obteniendo buen rendimiento de células funcionales depende de la sumatoria de tres puntos:

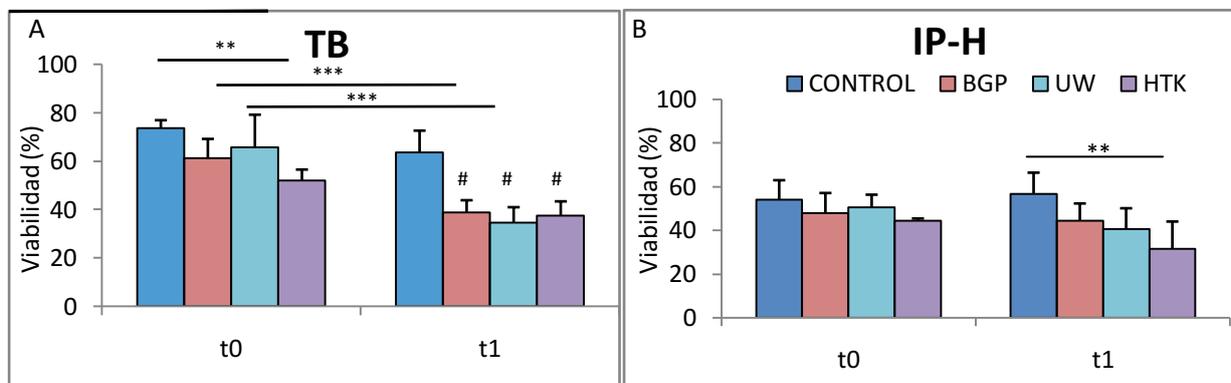
A) Una metodología "optimizada" para prevenir los daños biofísicos, ya que a pesar de ser un proceso aparentemente simple y rutinario, ocurren eventos extremadamente complejos. Es importante reconocer y comprender el impacto de la preparación de las muestras, la velocidad de enfriamiento, la temperatura, la adición y remoción del ACP, el tiempo de almacenamiento, etc. (Baust *et al.*, 2016). Este punto se abarcó en las dos secciones anteriores mediante las pruebas experimentales y teóricas.

B) La integración de estrategias de modulación para reducir mecanismos y puntos de control de la muerte celular de inicio tardío inducida por criopreservación. Punto no abarcado en este trabajo.

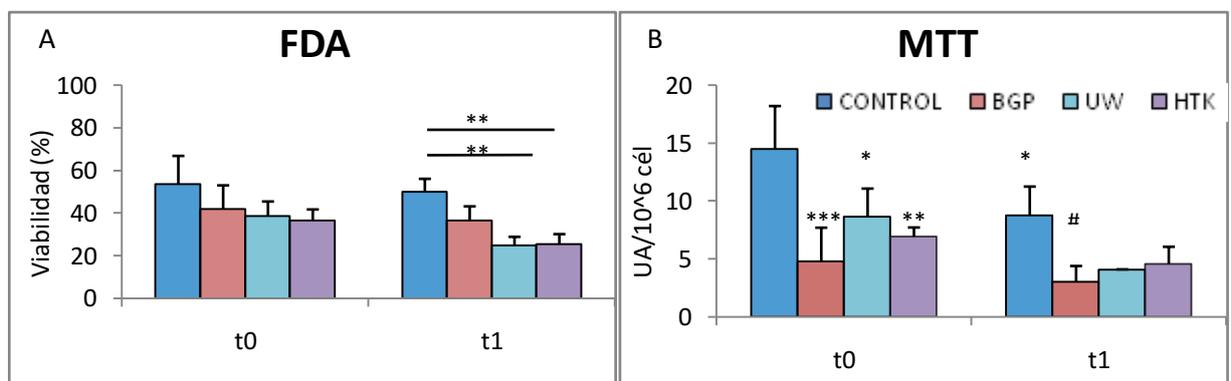
C) El uso de medios de criopreservación complejos (Baust *et al.*, 2016). En la siguiente sección se presentan los resultados correspondientes a este punto.

### 5.3.3 Comparación con las soluciones comerciales

Se probaron las tres soluciones de preservación (BGP, UWm y HTK) con el objetivo de dilucidar la respuesta de las células a la preservación con cada una. Para ello se criopreservaron hepatocitos aislados ( $3.5 \cdot 10^6$  células/mL) bajo el protocolo optimizado empíricamente y corroborado y ajustado teóricamente (velocidad 3, agregado y dilución del DMSO en un paso con incubación de cuatro min). Se incluyó un CONTROL sin preservación. Se hicieron las pruebas de viabilidad (TB, IP-H) y funcionalidad (FDA-IP, metabolización de MTT) en suspensión luego de la dilución del DMSO ( $t_0$ ) y transcurrida una hora de *rewarming* ( $t_1$ ), detalladas en la sección 4.2.4. Los resultados se muestran en las Figuras 29 y 30 respectivamente.



**Figura 29.** Viabilidad post criopreservación ( $t_0$ ) y luego de una hora de rewarming ( $t_1$ ):  
 A) TB (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p < 0.001$  respecto a CONTROL  $t_1$ ) y B) IP-H (\*\* $p < 0.01$ ),  
 media  $\pm$  SD, CONTROL y BGP  $n=5$ , HTK y UW  $n=3$ .

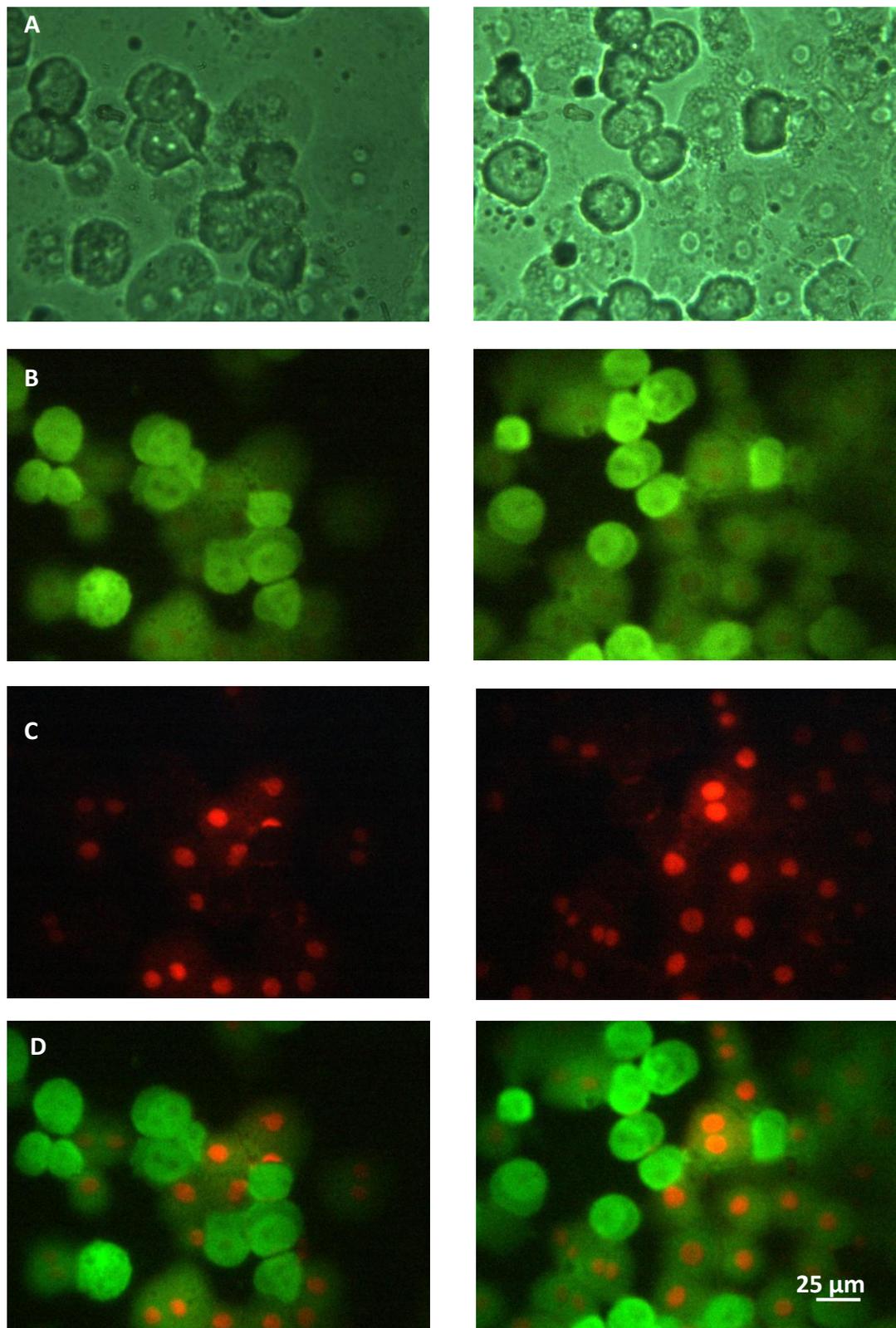


**Figura 30.** Funcionalidad post criopreservación ( $t_0$ ) y luego de una hora de rewarming ( $t_1$ ).  
 A) FDA-IP (\*\* $p < 0.01$ ) y B) metabolización de MTT (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  respecto al CONTROL  $t_0$ , # $p < 0.01$  respecto al CONTROL  $t_1$ ), media  $\pm$  SD, CONTROL y BGP  $n=5$ , HTK y UW  $n=3$ .

Dadas las aplicaciones clínicas que se persiguen con las suspensiones de hepatocitos, como es el caso de la terapia celular, es importante considerar la funcionalidad además de la viabilidad celular. En la prueba de viabilidad por TB la HTK mostró menor viabilidad respecto al CONTROL  $t_0$ , sin embargo, la BGP y la UW, presentaron una pérdida significativa en el *rewarming*, igualando la performance de la HTK, mostrando una viabilidad significativamente menor que el CONTROL  $t_1$ . En cuanto a la prueba de IP-H, solo la HTK luego de la hora de *rewarming* disminuyó la viabilidad respecto al CONTROL  $t_1$  (**Figura 29**).

En la prueba de funcionalidad de FDA-IP las dos soluciones comerciales dieron menor actividad en el *rewarming* respecto al CONTROL (**Figura 30 A**). En la metabolización del MTT las tres soluciones dieron menor actividad que el CONTROL a  $t_0$ , pero solo la BGP difirió respecto al CONTROL a  $t_1$  (**Figura 30 B**).

En la **Figura 31** se muestran microfotografías ilustrativas de hepatocitos criopreservados con BGP con la tinción FDA-IP. Se observan de color verde más brillante los hepatocitos metabólicamente activos que clivaron la FDA, y de color rojo los núcleos de los hepatocitos con la membrana dañada por la cual penetra el IP.



**Figura 31.** Fotos ilustrativas de hepatocitos criopreservados en BGP con tinción FDA-IP a  $t_0$  (izquierda) y  $t_1$  (derecha) en microscopio de fluorescencia (40 X), A) campo claro, B) tinción FDA, C) tinción IP; D) superposición de B y C

En términos generales, se obtuvo un comportamiento similar al CONTROL a la salida de la preservación luego del descongelado rápido con las tres soluciones, exceptuando la prueba de MTT. Coincidiendo parcialmente con esto, una investigación mostró la caída de viabilidad post descongelado de hepatocitos humanos por MTT y TB, con las soluciones UW y HTK (Jitraruch *et al.*, 2017)

Transcurrida la hora de *rewarming*, se vieron comprometidas tanto la viabilidad como la funcionalidad, variando en las pruebas y con las distintas soluciones. Como ya se expresó en el apartado donde se estudiaron las velocidades de enfriamiento, el *rewarming* suele marcar una pérdida celular que hasta el momento es insalvable (Hunt C, 2017). El estudio de Press Pettig no evidenció cambios transcurrida la hora de *rewarming* en el grupo CONTROL y criopreservación (con medio de cultivo y solución de criopreservación con agregado de 10 % de DMSO) de hepatocitos de rata con la prueba de IP (Press-Petig & Rauen, 2018). Con dicha prueba en el presente trabajo, tampoco se discriminaron cambios. Dicho esto, parece fundamental la inclusión de varias pruebas de funcionalidad y viabilidad, cuya información complementaria ayuda a caracterizar mejor la calidad celular obtenida. Si bien las mismas no describen completamente la criolesión (Press-Petig & Rauen, 2018), las alteraciones importantes que se producen inmediatamente después obtención de los hepatocitos y el proceso de criopreservación que se vislumbran en esta etapa de pruebas en suspensión, van a persistir o aumentar durante el cultivo o su aplicación *in vivo* (Cassim *et al.*, 2017).

En cuanto a las soluciones, para la criopreservación de hepatocitos se describió la utilización de soluciones de “tipo intracelular” donde la UW fue hasta los años 2000 la solución estándar clásica (Pareja *et al.*, 2013; Ribes-Koninckx *et al.*, 2012; Whaley *et al.*, 2021). En términos generales, se reporta una pérdida de viabilidad post criopreservación, con esta solución y el protocolo estándar, de aproximadamente el 20 al 40 % tanto en hepatocitos humanos como de ratas/porcinos (Pareja *et al.*, 2013; Terry *et al.*, 2010; Jitraruch *et al.*, 2017). Se reportaron resultados prometedores con la solución HTS y menores rendimientos con medio de cultivo (Sosef *et al.*, 2005; Chow-shi-yée *et al.*, 2020).

Se considera apto para el trasplante un 60 % de viabilidad post descongelado por TB sin contaminaciones (Anderson & Zarrinpar, 2018; Pareja *et al.*, 2014; Khan & Strom, 2017), objetivo que se consumó con la solución UW y BGP, no así con la HTK. La HTK es una solución de uso extendido y validado en la PH de hepatocitos pero no así en este objetivo,

resultando un hallazgo de la Tesis su performance comparable a la UW en la criopreservación. Jitraruch también demostró esto, pero con menores rendimientos de la HTK frente a la UW al comprarlas con el CONTROL de células frescas (Jitraruch *et al.*, 2017). Por su parte, la solución BGP evidenció un comportamiento similar a las dos soluciones comerciales en las pruebas en suspensión, luego del descongelado rápido como transcurrido el *rewarming*, sin hallarse diferencias estadísticamente significativas entre ellas, en ninguna de las pruebas.

Los hepatocitos usualmente se preservan en medio de cultivo celular o en soluciones de preservación hipotérmica de órganos con la adición de DMSO, mientras que unas pocas soluciones se diseñaron para tal fin. Se demostró que la preservación en diferentes medios de características físicas similares resultaron en tasas muy diferentes de unión celular, lo que sugiere que no solo los efectos puramente físicos sino también biológicos de la célula juegan un papel en la lesión por criopreservación (Press-Petig & Rauen, 2018).

El enfoque clásico de la criobiología se ocupó principalmente de los cambios biofísicos como el daño mecánico debido a la formación de cristales de hielo y el daño osmótico. Sin embargo, hay mecanismos subyacentes complejos asociados a la vía molecular y a factores estresantes que influyen en la supervivencia celular. Las aproximaciones futuras en el campo de la criopreservación se focalizan en la integración de ambos paradigmas y se extiende mucho más allá de la muerte celular, donde también tiene un impacto a largo plazo en las vías bioquímicas y la funcionalidad celular (Baust *et al.*, 2016).

Para reducir estos nuevos efectos de la crioinjuria se propuso la adición de disacáridos, compuestos antiapoptóticos como los inhibidores de caspasa y/o antioxidantes en el medio de criopreservación (Best B, 2015; da Fonseca Cardoso *et al.*, 2017; Gurruchaga *et al.*, 2018). Otra estrategia propuesta para mejorar el rendimiento y la viabilidad de los hepatocitos es la encapsulación para protegerlos de los factores de estrés mecánicos durante la criopreservación. Este proceso puede ser además combinado con el agregado de los compuestos anteriores (Jitraruch *et al.*, 2017) y ofrece una protección extra contra las defensas inmunitarias del huésped, una característica atractiva para las células destinadas al trasplante (Gurruchaga *et al.*, 2018; Whaley *et al.*, 2021).

Por último, si bien en este trabajo se adoptó la estrategia estándar de ACP del 10 % DMSO, se discute su presencia en el medio de criopreservación. Por un lado, se sabe que promueve las vías apoptóticas por lo que podría ser reemplazado por otro tipo de ACP

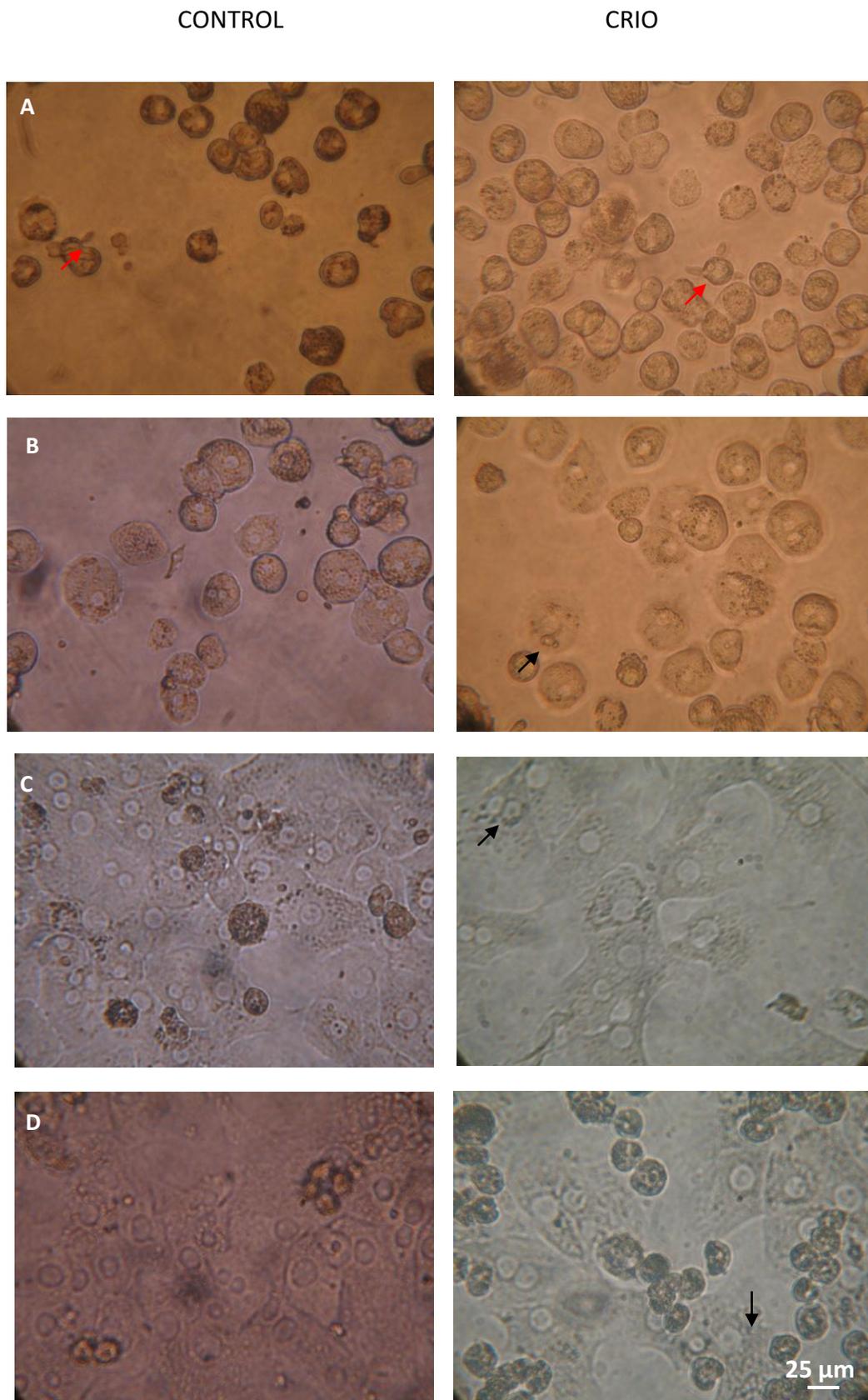
(Chow-shi-yée *et al.*, 2020) o en su defecto, usarlo e inhibir la apoptosis como ya se detalló. Otra cuestión es la aplicación de las suspensiones con el compuesto en el tratamiento de pacientes lo que podría exponerlos a una potencial toxicidad y sus efectos colaterales. En este caso, es primordial el proceso de remoción del DMSO y el correcto lavado con su correspondiente control de calidad (Awan *et al.*, 2020; da Fonseca Cardoso *et al.*, 2017).

#### 5.3.4 Pruebas en cultivo

En la etapa anterior, se realizaron pruebas en suspensión sobre los hepatocitos criopreservados, las cuales no demostraron diferencias estadísticas cuando se comparó la performance de la BGP respecto a las soluciones comerciales. Por este motivo, se procedió a evaluar las células post criopreservadas con BGP bajo el protocolo optimizado de cultivo primario.

La primera observación fue que para lograr una confluencia celular del 80 % a las 24 h se debió sembrar el doble de células CRIO que en el CONTROL (0.1 vs 0.05)\*10<sup>6</sup> células/mL. Esta concentración no difirió de la necesaria para el cultivo de células PH.

Se sacaron fotos en un microscopio invertido para el análisis y cotejo de la morfología de los hepatocitos cultivados luego de la criopreservación en BGP respecto al CONTROL, como se observa en la **Figura 32**.



**Figura 32.** Microfotografías de células cultivadas **CONTROL** (izquierda) y **CRIO** (derecha):  
(A)  $t=0$ , (B)  $t=3$  h, (C)  $t=24$  h y (D)  $t=48$  h de cultivo.

La flecha roja indica la presencia de *blebs* o protuberancias de membrana; la flecha negra la presencia de vacuolas intracelulares.

### *Análisis morfológico*

Las células CRIO en BGP tuvieron similar comportamiento en cultivo que las células CONTROL y PH. Presentaron morfología redondeada al momento de sembrado y forma más aplanada trascurridas las 3 h, momento en que se realiza el cambio al medio de adhesión. A las 24 h los hepatocitos adheridos adquirieron la forma poligonal típica, con núcleos redondeados centralizados y citoplasma granular. Se encontró mayor proporción de células con lesiones como *blebs* respecto a las células CONTROL y PH, y mayor vacuolización del citoplasma desde las 24 h de cultivo. El cultivo a las 48 h mantuvo la morfología. Las células conservaron su tamaño en ambos tiempos.

En el estudio de Jitraruch no hubo diferencia obvia en la apariencia morfológica de los hepatocitos cuando se los observó bajo microscopía óptica. Se conservó la forma hexagonal típica de los hepatocitos en los grupos criopreservados con UW y HTK frente al CONTROL (Jitraruch *et al.*, 2017). Al efectuar esa observación superficial, los resultados obtenidos con la BGP son coincidentes con los obtenidos con las soluciones comerciales en dicho trabajo.

### *Adherencia celular*

Se evaluó la capacidad de adherencia de las células CONTROL (cultivadas post aislamiento) y células criopreservadas en BGP. Se obtuvieron los siguientes porcentajes:  $(75.11 \pm 7.58) \%$  vs  $(29.06 \pm 5.47) \%$ , respectivamente (media  $\pm$  SD,  $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ). Para lograr una confluencia del 80 % a las 24 h con las células criopreservadas se debieron sembrar el doble de concentración celular que el CONTROL ( $0.05$  vs  $0.1 \cdot 10^6$  células/mL) al igual que en las células PH. Si bien se debió sembrar la misma concentración que las células PH para lograr confluencia, se evidenció una mayor afección en cuanto a la adhesión de las células CRIO respecto a las PH.

Este resultado es coincidente con la bibliografía, donde la adhesión es significativamente menor en los grupos criopreservados con UW y HTK frente al CONTROL, con una mayor eficiencia de la UW (Jitraruch *et al.*, 2017).

Como se discutió en PH, está reportado que el estrés celular durante el aislamiento (estrés oxidativo en la resección quirúrgica por I-R y la liberación enzimática por la separación de las células de su matriz) inician una respuesta pre-apoptótica, donde los

hepatocitos están preparados para entrar en apoptosis si se someten a un estrés adicional y prolongado (Ölander *et al.*, 2019). La criopreservación provoca un estrés oxidativo y mecánico adicional, además de regular la baja importantes proteínas de adhesión, incluidas la  $\beta$ 1-integrina, E-cadherina y  $\beta$ -catenina (Donato *et al.*, 2020; Ölander *et al.*, 2019). Ambos procesos causan una pérdida altamente impredecible de la capacidad de unirse y formar interacciones célula-matriz y célula-célula. Se observó la reversión de dicho estrés post descongelado por la exposición a inhibidores de la apoptosis que restauran la capacidad de unión y promueven una morfología diferenciada (Ölander *et al.*, 2019) y una mayor expresión proteínas de adhesión usando la solución Stem-Cellbanker (de composición desconocida) respecto a la UW. Dicha solución también mostró una baja en la caspasa 3 clivada (activa) y mayores niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2, respecto a la UW, indicando una protección ante la apoptosis (Donato *et al.*, 2020).

#### MTT

Para corroborar la capacidad metabólica de los hepatocitos en cultivo se realizó la prueba de MTT a células CONTROL (recién aisladas) y post criopreservadas con BGP. Las pruebas correspondieron a las 24 y 48 h de cultivo. Los cultivos a las 24 h otorgaron una  $A/10^6$  células de  $(23.65 \pm 6.49)$  para el CONTROL y de  $(10.41 \pm 2.72)$  para el cultivo de células CRIO. Los cultivos a las 48 h otorgaron una  $A/10^6$  células de  $(17.98 \pm 4.81)$  para el CONTROL y  $(6.45 \pm 1.30)$  para las células CRIO. Hubo diferencia estadística significativa (media  $\pm$  SD,  $p < 0.05$ ,  $n=4$  CONTROL,  $n=5$  CRIO) entre los cultivos CONTROL y CRIO, a las 24 y 48 h.

Este deterioro de la actividad mitocondrial de los hepatocitos en cultivo post criopreservación con BGP, también se evidenció en la prueba en suspensión, la cual disminuye inmediatamente post CRIO y luego de la hora de *rearming* respecto al CONTROL. En el cultivo post criopreservación, se reafirmó la tendencia observada en el cultivo post PH de los hepatocitos, donde la pérdida de adherencia se vio más comprometida, directamente relacionada con la pérdida de la actividad mitocondrial.

Como es sabido, la anoxia que conlleva la isquemia repercute fundamentalmente en las mitocondrias, cuya afección puede gatillar la vía intrínseca de apoptosis (Baust *et al.*, 2016). Este proceso se puede verse agravado en el caso de la criopreservación, donde el DMSO usado como ACP, promueve la apoptosis no solo por la vía mitocondrial, sino también

por la mediada por el RE. Chow-shi-yée y colaboradores vieron una supervivencia a la muerte por necrosis-apoptosis y mejora en los parámetros funcionales de los hepatocitos cultivados post criopreservación cuando reemplazaron el DMSO por proteínas derivadas de plantas (Chow-shi-yée *et al.*, 2020).

Como se discutió en la PH, el cultivo en este caso se realizó como prueba funcional post preservación y pre trasplante. Esta práctica puede utilizarse post CRIO, como paso intermedio del trasplante o para ciertos estudios *in vitro* ya que es considerado el modelo “gold standard” (Ölander *et al.*, 2019). Para estas prácticas hay que tener en cuenta que el cultivo de hepatocitos se ve afectado por los fenómenos de criopreservación sin recuperación de la viabilidad y funcionalidad celular. El efecto protector de la BGP observado en la PH, en este caso, no resultó suficiente para mitigar el deterioro celular provocado por el proceso.

Queda evidenciado que la composición de solución es un factor clave para amortiguar es estrés provocado por la criopreservación, mantener la morfología, la funcionalidad y evitar la muerte celular. El futuro en este campo, tanto para CRIO como para PH, parece dirigirse al uso de las nuevas estrategias en las soluciones de preservación, que si bien mostraron mejoras post preservación, necesitan mayor investigación. Las mismas implican la adición de agentes que evitan la muerte celular (antiapoptóticos) o el estrés celular, como antioxidantes o quelantes, o en su defecto, el agregado de los mismos posterior a la preservación. También puede discutirse el uso de las soluciones diseñadas para PH, las cuales denotan falencias cuando se extrapola su aplicación a la criopreservación.

A pesar de los inconvenientes existentes, la criopreservación sigue siendo la mejor opción para el almacenamiento a largo plazo de los hepatocitos, proporcionando un suministro celular permanente y suficiente. Sin embargo, los hepatocitos adultos aislados son poco resistentes a tal proceso, con una alteración significativa tanto a nivel morfológico como funcional. La mayoría de los estudios coinciden en la baja calidad y eficiencia de los hepatocitos criopreservados / descongelados en comparación con los hepatocitos recién aislados. Una alternativa, la vitrificación, tiene un potencial para mejorar significativamente la calidad de las suspensiones celulares dedicadas a las terapias basadas en células hepáticas (Stéphenne *et al.*, 2010).

Como comentario globalizador de las estrategias de preservación en frío, se debería hacer énfasis en la gran importancia del estudio integrado de la respuesta celular a las

temperaturas hipotérmicas y al subcongelamiento. Las células en criopreservación experimentan dichas transiciones durante los procesos de congelación y descongelación. Es por esto que a través de una comprensión más completa de la respuesta al estrés a la baja temperatura y la comprensión de los cambios que alteran la línea de base normotérmica de una célula, se pueden lograr mejoras significativas en las estrategias de criopreservación (Baust *et al.*, 2016).

### 5.3.5 Actividad respiratoria (células PH y CRIO en suspensión)

La velocidad de consumo de O<sub>2</sub> es una prueba funcional que otorga información de relevancia, ya que denota si la cadena de respiración celular está activa. Se realizó la prueba a células CONTROL (recién aisladas, n=4), preservadas en hipotermia (n=4) y criopreservadas (n=2) con BGP. Las pruebas se realizaron a t<sub>0</sub> (día del aislamiento para el CONTROL y post preservación para los grupos CRIO y PH) y a t<sub>1</sub>, transcurridos 60 min de *rewarming*. En la **Tabla 8** se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 8.** Velocidad de consumo de O<sub>2</sub> endógeno, estimulado y cociente entre ambas tasas. Resultados expresados como media ± SD (nmoles O<sub>2</sub>/min\*10<sup>6</sup> células)

	Vend	Vsucc	Vsucc/Vend	Vend	Vsucc	Vsucc/Vend
	t <sub>0</sub>			t <sub>1</sub>		
<b>CONTROL</b>	28.68 ± 5.56	64.13 ± 38.3	2.04 ± 1.01	25.65 ± 12.20	57.86 ± 28.45	2.37 ± 1.24
<b>PH</b>	29.38 ± 17.93	51.97 ± 13.35	1.55 ± 0.46	28.20 ± 13.71	53.80 ± 6.86	2.17 ± 0.69
<b>CRIO</b>	28.49 ± 4.27	62.93 ± 2.20	2.24 ± 0.41	31.23 ± 4.80	63.29 ± 3.27	2.05 ± 0.19

En el análisis estadístico comparativo, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos, por lo que se deduce que las células criopreservadas y preservadas en hipotermia con BGP, mantendrían el mismo metabolismo que las células recién aisladas. Sin embargo, se puede observar que las células presentaron un daño basal importante ya que el consumo de oxígeno estimulado prácticamente duplica el consumo endógeno en todas las pruebas, dando un cociente alto, representativo de daño celular. Estas injurias podrían atribuirse al daño basal del aislamiento de los hepatocitos (Li *et al.*, 2019), sin observarse un mayor estrés mitocondrial por la preservación, tanto PH como CRIO. Esta prueba da un dato

adicional de daño complementario a las pruebas en suspensión realizadas en los dos tipos de preservación.

En el trabajo de Pless-Petig y colaboradores, el consumo de O<sub>2</sub> de hepatocitos post PH con la solución TiProtec<sup>®</sup> modificada (pobre en cloro) seguida de *rewarming*, cayó dos veces respecto al grupo CONTROL. Ellos revirtieron esa tendencia con el agregado de un quelante de hierro (Pless-Petig *et al.*, 2017). En contrapartida, los resultados con BGP en la PH no muestran dicho comportamiento, visibilizando nuevamente un cierto efecto protector de la BGP.

Por otro lado, un estudio previo del laboratorio demostró que los hígados preservados con la solución de preservación BGP fueron capaces de mantener un metabolismo sintético activo, con una velocidad de captación del O<sub>2</sub> mayor que la obtenida con la HTK, sin mostrar diferencia con el CONTROL (Carnevale ME, 2019).

Sumando los resultados recabados, la solución de preservación BGP sería capaz de mantener la integridad de membrana y prevenir el daño por preservación/I/R de mejor manera que las soluciones comerciales.

Este hallazgo del consumo de O<sub>2</sub> de los hepatocitos en suspensión coincide con la actividad mitocondrial dilucidada por la prueba del MTT (en suspensión y en cultivo) para el caso de los hepatocitos PH, pero no coincide con los resultados obtenidos para los hepatocitos CRIO. El estado reciente post criopreservación en que se realiza la prueba en suspensión del consumo de O<sub>2</sub> no sería suficiente para evidenciar el deterioro mitocondrial de los hepatocitos, el cual se visibiliza con la prueba del MTT en suspensión, que si bien es una prueba rápida requiere de una incubación de más de una hora en normotermia, y con la prueba del MTT en cultivo.

#### 5.4 Trasplante celular. Estudio *in vivo*

En los objetivos anteriores se dilucidó la performance de la BGP tanto en PH como en criopreservación con pruebas *in vitro* en suspensión y en cultivo. Como último paso, se optó por estudiar como respondían estas células preservadas con BGP en un modelo *in vivo*. La utilización del trasplante celular permite comprobar directamente en un animal receptor la migración y la integración de las células sometidas a las distintas etapas experimentales de esta Tesis Doctoral.

Los hepatocitos preservados en BGP, en hipotermia y criopreservados con el protocolo optimizado, fueron trasplantados por inyección en el bazo en ratas sanas. Se trasplantaron  $(10.1 \pm 3.3)$ ,  $(8.2 \pm 2.0)$  y  $(6.3 \pm 1.9) \cdot 10^6$  de células en los grupos experimentales CONTROL (n=6), PH (n=3) y CRIO (n=4), respectivamente. Antes de analizar los trasplantes, se corroboró que no exista diferencia estadística significativa en dicho número de células trasplantadas en los grupos ( $p > 0.05$ ).

Los animales fueron vigilados minuciosamente luego de la intervención y se observó una completa recuperación luego del efecto de la anestesia (comportamiento normal, comían, bebían y se movilizaban sin dificultad) sin complicaciones post operatorias hasta el momento del sacrificio. Transcurrido el tiempo experimental, los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras tanto de hígado como de bazo. Durante la cirugía se verificó que la anatomía abdominal del animal sea normal y que no presente reacciones inflamatorias. Se montaron secciones de tejido sobre portaobjetos y se les realizó la tinción H-E. Se escogieron áreas al azar y se fotografiaron bajo microscopio.

A continuación se muestran ejemplos de microfotografías de la histología de hígado y bazo de ratas receptoras de trasplante celular a 24 h: **Figura 33** hepatocitos CONTROL, **Figura 34** hepatocitos preservados en hipotermia 24 h y **Figura 35** hepatocitos criopreservados con BGP. Los cortes se fotografiaron en 10 X y en 40 X en campo claro, donde se corroboró la histología de ambos órganos. Se observó la tinción hematoxilina (coloración de los núcleos en color violáceo) y eosina (contraste citoplasmático y componentes extracelulares en tonalidades rosadas) y se corroboró la no presencia de infiltración de células de la cascada inflamatoria. También se muestran a continuación las respectivas fotos de campo claro sacadas en fluorescencia, que permiten reconocer las

células trasplantadas marcadas de los hepatocitos nativos. En las mismas se analizó la migración desde el bazo y la inserción de los hepatocitos en el hígado receptor.

En línea con observaciones previas, después de la administración intraesplénica, se detectaron hepatocitos en las ramas de la vena porta y, 3 h después, se observaron algunas células entrando en sinusoides (Mediavilla *et al.*, 2006). El injerto describe el proceso mediante el cual los hepatocitos trasplantados se trasladan desde el espacio sinusoidal a las placas hepáticas receptoras después de la rotura del endotelio sinusoidal y se integran en el parénquima hepático del huésped. Este proceso ocurre poco después de la entrega vascular de hepatocitos en el hígado nativo y puede durar unos días, pero sigue siendo relativamente ineficaz con una pérdida potencial de más del 70 % de las células infundidas (Soltys *et al.*, 2017).

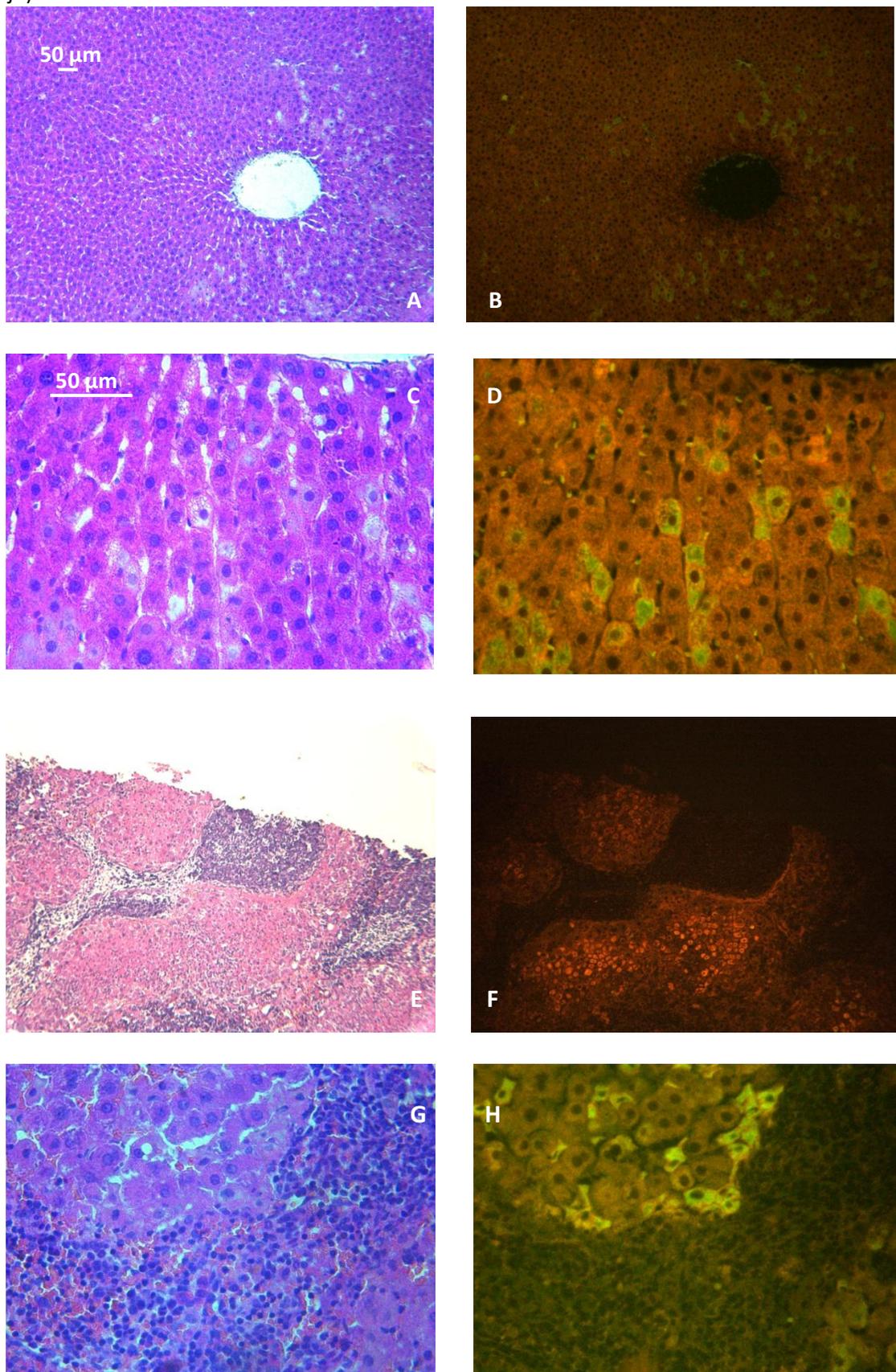
A las 24 h de la inyección los hepatocitos marcados se localizaron en el parénquima hepático. En algunas zonas, aún no están bien dispuestos en las trabéculas hepatocitarias, presentando una pequeña perturbación de la arquitectura morfológica normal del tejido. Por su parte, las observaciones en el bazo muestran que a las 24 h los hepatocitos se encuentran dispersos en la pulpa roja.

A las 48 h del trasplante, los hepatocitos se muestran más ordenados en las trabéculas hepatocitarias del hígado, donde la integración es total y se vuelven indistinguibles del parénquima endógeno bajo microscopía óptica en campo claro. En el caso del bazo, a las 48 h los hepatocitos se disponen con mayor organización alrededor de la pulpa blanca (no se muestran imágenes a las 48 h).

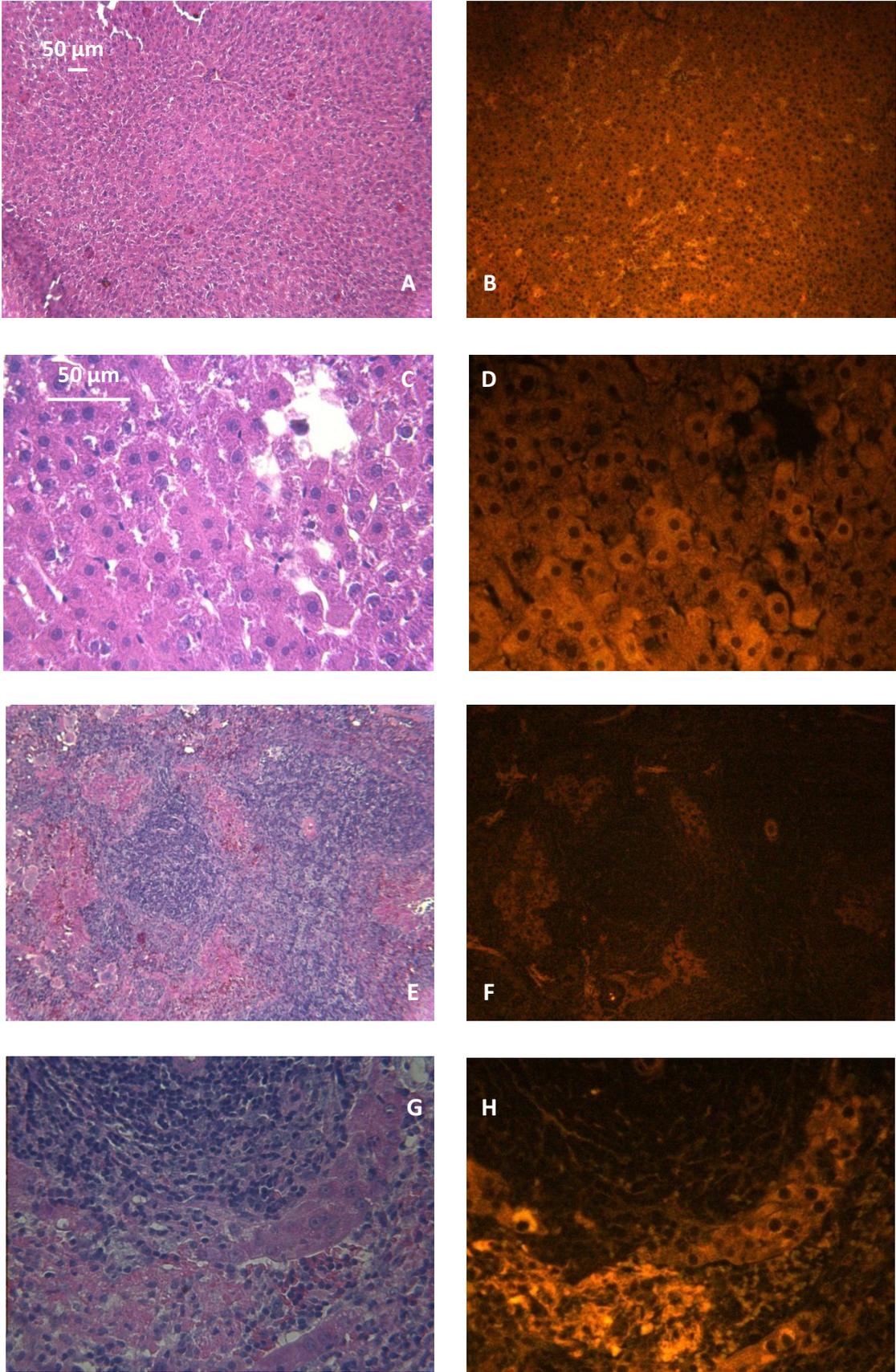
Sobre las fotos de cortes del hígado en 40 X a las 24 h del trasplante, se determinaron los porcentajes de zona con marca, correspondiente a los hepatocitos que fueron trasplantados, migrado del bazo al hígado e insertado en el órgano. El área marcada obtenida de los trasplantes fue de  $(28.2 \pm 8.2)$ ,  $(22.3 \pm 5.5)$  y  $(19.9 \pm 6.7)$  % indicado como (media  $\pm$  SD) para los grupos CONTROL (n=6), PH (n=3) y CRIO (n=4) respectivamente. No se halló diferencia significativa ( $p=0.23$ ) entre el área marcada de sendos grupos.

En resumen, la distribución espacial y temporal de los hepatocitos luego de ser trasplantados fue coincidente con estudios anteriores (Mediavilla *et al.*, 2006), y resultó comparable entre los grupos experimentales de hepatocitos frescos y preservados (CRIO y PH) con BGP.

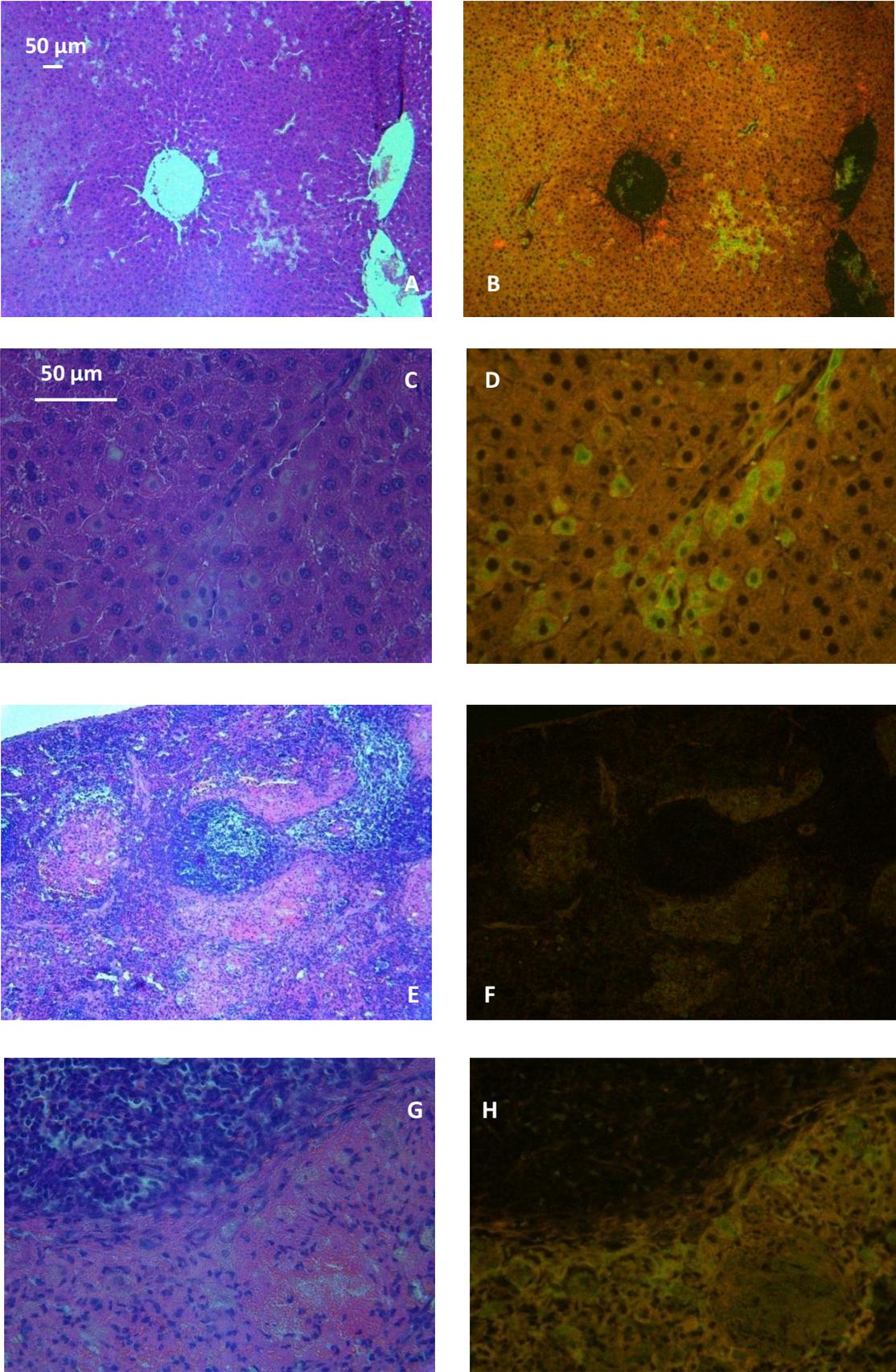
**Figura 33.** Fotografías de la histología de trasplantes 24 h de hepatocitos CONTROL. Tinción H-E en campo claro (izquierda) y fluorescencia (derecha) de hígado (a-d) y bazo (e-h) en 10 X (arriba) y 40 X (abajo).



**Figura 34.** Fotografías de la histología de trasplantes 24 h con hepatocitos PH. Tinción H-E en campo claro (izquierda) y fluorescencia (derecha) de hígado (a-d) y bazo (e-h) en 10 X (arriba) y 40 X (abajo).



**Figura 35.** Fotografías de la histología de trasplantes 24 h con hepatocitos CRIO. Tinción H-E en campo claro (izquierda) y fluorescencia (derecha) de hígado (a-d) y bazo (e-h) en 10 X (arriba) y 40 X (abajo).



Como se mencionó, una de las principales desventajas del uso de hepatocitos primarios es su eliminación por parte del sistema inmune, lo que la convierte en una terapia temporal para el paciente (Iansante *et al.*, 2018). A pesar de ello, se sabe que los hepatocitos donantes tienen una ventaja de crecimiento selectivo sobre los nativos. Una vez que los hepatocitos se disponen en los sinusoides hepáticos, son necesarios los estímulos regenerativos para permitir que los hepatocitos del donante proliferen y repoblen el parénquima (Soltys *et al.*, 2017). En este trabajo, si bien no se aplicaron estímulos regenerativos, las observaciones demostrarían que los hepatocitos no fueron reconocidos como cuerpos extraños debido a la ausencia de señales inflamatorias, y de ser eliminados, la preservación en BGP no influiría negativamente en el proceso ya que tuvieron un comportamiento similar al CONTROL.

Duret y colaboradores trasplantaron por inyección intraesplénica hepatocitos humanos PH en soluciones de preservación IGL-1 y HTS-FRS, con resultados comparables en suspensión y en cultivo que la UW. Vieron que pueden injertarse y reparar el hígado en un modelo de ratón con injuria hepática hasta 9 semanas después de la inyección (Duret *et al.*, 2015). La limitación del modelo experimental de trasplante en rata sana usado en esta Tesis es que no permite determinar si los hepatocitos conservan su función y son capaces de restaurar algún trastorno. A pesar de ello, se pudo corroborar que las células preservadas con BGP tanto en hipotermia como criopreservadas, con una performance comparable a la HTK y la UWm en las pruebas en suspensión, conservan sus facultades de migración e inserción, comportándose de modo similar que las células CONTROL.

Otra limitación de la terapia celular es la escasez de órganos para la obtención de hepatocitos para trasplante. Para solventarla, está en auge la investigación en las fuentes alternativas como las células madre (Nicolas *et al.*, 2016; Pareja *et al.*, 2017). Como ventaja, tienen la capacidad de proliferación ilimitada y potencial para evitar el sistema inmunológico (Pareja *et al.*, 2020). Sin embargo, siguen siendo de preferencia el uso de hepatocitos humanos completamente diferenciados, debido a que se minimiza la preocupación por la transformación cancerosa y su escasa capacidad para funcionar como hepatocitos humanos primarios (Soltys *et al.*, 2017). Debido a esto, los avances en la terapia celular de hepatocitos primarios tienen un gran potencial en la capacidad de aliviar la carga que enfrenta el trasplante de órganos sólidos y posiblemente, se conviertan en una opción viable a largo plazo, más allá de ser una terapia puente o de rescate (Anderson & Zarrinpar, 2018).

## 6) CONCLUSIONES

Las terapias alternativas surgen a fin de subsanar la falta de órganos para trasplante, y la preservación es una rama de soporte fundamental en esta área. Este trabajo se abocó en el caso particular de la preservación de hepatocitos para la terapia celular. En el presente, no hay un acuerdo universal sobre la solución idónea para su preservación hipotérmica y criopreservación, así como tampoco existe una estandarización en el protocolo óptimo de este último procedimiento. A partir de la problemática planteada surge como objetivo de la presente Tesis el análisis de la nueva solución BGP en la PH y en la CRIO de hepatocitos aislados de rata, y su validación frente a las soluciones comerciales HTK y UWm.

En el presente trabajo se logró la integración del estudio de la preservación hipotérmica y la criopreservación, dos ramas de la preservación que, en general, se suelen estudiar como procesos independientes. Se utilizó un mismo sistema de estudio, hepatocitos de rata aislados, bajo ambas condiciones de preservación, las cuales se evaluaron con las mismas técnicas. Este es un primer paso para avanzar sobre estudios integrales sobre sendos sistemas, que proporcionen información de calidad y de retroalimentación.

En la búsqueda de una solución ideal, sumada a la eficacia resulta fundamental su costo. Se analizó el costo de la nueva solución compleja BGP. En cuanto a este punto, se corroboró que la formulación de la solución BGP tiene un menor costo que las soluciones comerciales tradicionales HTK y UWm. Se presenta como una solución nacional factible de elaboración en cualquier laboratorio o farmacia certificada para tal fin, cuyos componentes son de fácil y libre acceso.

Se estudió la performance de la BGP en PH. La BGP tiene un rendimiento similar a las soluciones comerciales UWm y HTK en la preservación hipotérmica de hepatocitos aislados de rata y otorga mayor protección que un medio de cultivo convencional, comprobado por medio de pruebas funcionales y de viabilidad en suspensión. Dichas células responden de manera similar a las células CONTROL en cultivo y conservan tanto la adhesión como la metabolización.

Se estudió la performance de la BGP en la CRIO. Este trabajo sentó sus bases en el paradigma estándar de la criopreservación utilizando la nueva solución compleja BGP. Hoy en día, además de soluciones de preservación, el mercado ofrece dispositivos para enfriamiento que son poco exactos y rígidos. Frente a estas falencias, en esta investigación se elaboró un protocolo optimizado de criopreservación por enfriamiento lento para el sistema particular en estudio, a través de pruebas experimentales y de un modelado teórico. Como es sabido, un proceso de criopreservación no es universal, por eso es de gran interés contar con un protocolo y un sistema de enfriamiento, flexibles como los presentados, que se pueden adaptar y aplicar a cada situación particular (ACP, tipo celular) de otros sistemas. Las condiciones establecidas para el protocolo optimizado se describen a continuación:

- En cuanto a la velocidad de enfriamiento se aconseja el uso de la velocidad 4.3 °C/min debido a la optimización del balance tiempo/costo (la viabilidad y funcionalidad de las tres velocidades probadas otorgaron resultados similares).
- El estudio de carga y descarga del DMSO determinó que resultan favorables los procesos en un paso por goteo por varios factores: hay utilización de menor volumen de solución, llevan menor tiempo de operación, tienen menor tiempo de exposición al DMSO y otorgan buen rendimiento respecto a los demás protocolos. El modelado matemático avaló que no existe shock osmótico aún en las condiciones extremas de agregado y remoción (un paso) lo que refuerza dicha elección. Con el modelado también se dilucidó que el tiempo de equilibrado del DMSO óptimo es cuatro minutos.

Una conclusión interesante se desprende del uso del modelado matemático. El mismo, además de ser usado para un objetivo particular de esta Tesis, resulta una herramienta fundamental para el estudio futuro de otros sistemas. Un modelo *in silico* como el presentado permite la prueba de diversas variables con predicciones que otorgan un ahorro de tiempo y gastos en estudios experimentales.

Además, se analizó la performance de la BGP frente a las soluciones comerciales, bajo el protocolo optimizado. El uso de la BGP para la criopreservación otorgó resultados comparables con las soluciones comerciales UWm y HTK, corroborado por pruebas de viabilidad y funcionalidad en suspensión. Además se observó un buen rendimiento de la HTK, una solución no empleada para este objetivo, ampliamente difundida, ya validada y más económica que la UWm. Las células criopreservadas con las tres soluciones, en términos generales, no difirieron del CONTROL, pero sí se vieron más comprometidas concluida la

hora de *rewarming*. Las células criopreservadas con BGP conservaron la morfología en cultivo, si bien disminuyeron su capacidad de adherencia y metabolización respecto al CONTROL.

Finalmente, se estudió la respuesta de las células preservadas en BGP en un modelo *in vivo*. Las células preservadas con BGP en PH y CRIO respondieron de igual forma que los hepatocitos frescos al ser trasplantados en ratas sanas. La preservación en BGP mantiene la capacidad de los hepatocitos de migración e injerto en dicho modelo.

A modo de conclusión final:

En este trabajo de Tesis Doctoral se validó el uso de una solución de autoría nacional denominada BGP, para la preservación hipotérmica y la criopreservación de hepatocitos aislados de rata destinados al trasplante experimental. Se obtuvieron resultados comparables con soluciones comerciales, UWm y HTK, en pruebas *in vitro*, en suspensión y en cultivo. Como prueba final, se observó una buena respuesta de las células preservadas en BGP en un modelo de trasplante *in vivo*. Adicionalmente, se constituyó un protocolo optimizado de criopreservación.

Sumado a los hallazgos de la performance de la solución en estudio, se destacan dos características de la BGP: es más económica que las soluciones disponibles en el mercado en cuanto a componentes y se la postula como una solución versátil, probada tanto en la preservación de hepatocitos aislados como en la preservación (estática y dinámica) de órganos enteros destinados a trasplante.

Por último, los hepatocitos primarios no solo se utilizan en la clínica para el tratamiento de la insuficiencia hepática sino también en varias ramas biológicas, como los estudios experimentales *in vitro* de disposición y toxicidad de xenobióticos. Aunque el mercado ofrece *pooles* de hepatocitos, los mismos no son adecuados para un estudio que debe contar con células de un individuo particular. Es por ello, que esta investigación y los avances aquí obtenidos es pos de un objetivo particular, a fin de obtener una mayor disponibilidad y recuperación de hepatocitos primarios, contribuyen además a todas estas disciplinas.

## 7) BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abrahamse, S. L., Van Runnard Heimel, P., Hartman, R. J., Chamuleau, R. A. F. M., & Van Gulik, T. M. (2003). Induction of necrosis and DNA fragmentation during hypothermic preservation of hepatocytes in UW, HTK, and celsior solutions. *Cell Transplantation*, 12(1), 59–68.
- 2) Adam, R., Karam, V., Cailliez, V., O Grady, J. G., Mirza, D., Cherqui, D., Klempnauer, J., Salizzoni, M., Pratschke, J., Jamieson, N., Hidalgo, E., Paul, A., Andujar, R. L., Lerut, J., Fisher, L., Boudjema, K., Fondevila, C., Soubrane, O., Bachellier, P., ... Duvoux, C. (2018). Annual Report of the European Liver Transplant Registry (ELTR) - 50-year evolution of liver transplantation. *Transplant International*, 31(12), 1293–1317.
- 3) Administración de Recursos y Salud (HRSA, Marzo 2020). *La falta de órganos continúa*. <https://donaciondeorganos.gov>.
- 4) Aghdaie, M. H., Azarpira, N., Shamsaeefar, A., Motazedian, N., Kaviani, M., Esfandiari, E., Golbabapour, S., Nikeghbalian, S., Kazemi, K., Salahi, H., Malek-Hosseini, S. A., & Geramizadeh, B. (2020). Effects of Different Cold Preservation Solutions on the Functions of Cultured Isolated Human Hepatocytes. *International Journal of Organ Transplantation Medicine*, 11(1), 15
- 5) Alshamsi, F., Alshammari, K., Belley-Cote, E., Dionne, J., Albrahim, T., Albudoor, B., ... & Alhazzani, W. (2020). Extracorporeal liver support in patients with liver failure: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Intensive care medicine*, 46(1), 1-16.
- 6) American Cancer Society (Diciembre 2020). Terapia de embolización para el cáncer de hígado. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-higado/tratamiento/terapia-de-embolicacion.html>.
- 7) An, L., Chang, S., Hu, Y., Li, Y., Xu, B., Zhang, F., Yang, L., Presicce, G. A., & Du, F. (2015). Efficient cryopreservation of mouse embryos by modified droplet vitrification (MDV). *Cryobiology*, 71(1), 70–76.
- 8) Anaya Prado, R. & Toledo Pereyra, L. (2014). *PRESERVACION HEPÁTICA*.
- 9) Anderson, T. N., & Zarrinpar, A. (2018). Hepatocyte transplantation: past efforts, current technology, and future expansion of therapeutic potential. *Journal of Surgical Research*, 226, 48-55.
- 10) Awan, M., Buriak, I., Fleck, R., Fuller, B., Goltsev, A., Kerby, J., Lowdell, M., Mericka, P., Petrenko, A., Petrenko, Y., Rogulska, O., Stolzing, A., & Stacey, G. N. (2020). Dimethyl sulfoxide: A central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative Medicine*, 15(3), 1463–1491.
- 11) Bakhach, J. (2009). The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*, 5(3), 119–126.
- 12) Barahman, M., Asp, P., Roy-Chowdhury, N., Kinkhabwala, M., Roy-Chowdhury, J., Kabarriti, R., & Guha, C. (2019). Hepatocyte Transplantation: Quo Vadis? *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 103(4), 922–934.
- 13) Barros Schelotto, P., Leindoire, J., Duek, F., Gil, L., & Imventarza, O. (2008). *Asociación Argentina de Cirugía | 79º Congreso Argentino de Cirugía*. [http://aac.org.ar/congreso79/tl\\_cirhepato/32.htm](http://aac.org.ar/congreso79/tl_cirhepato/32.htm)
- 14) Baust, J. M., Corwin, W., Snyder, K. K., Van Buskirk, R., & Baust, J. G. (2016). Cryopreservation: evolution of molecular based strategies. *Biobanking and cryopreservation of stem cells*, 13–29.
- 15) Belzer, F. O., & Southard, J. H. (1988). Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*, 45(4), 673-676.
- 16) Benson, J. D. (2021). Mathematical Modeling and Optimization of Cryopreservation in Single Cells. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (pp. 129-172). Humana, New York, NY.
- 17) Berghe, T. V., Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D. V., Takahashi, N., & Vandenabeele, P. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods*, 61(2), 117-129.
- 18) Best, B. P. (2015). Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research*, 18(5), 422–436.

- 19) Bhogal, R. H., Weston, C. J., Velduis, S., G. D. Leuvenink, H., Reynolds, G. M., Davies, S., Nyguet-Thin, L., Alfaifi, M., Shepard, E. L., Boteon, Y., Wallace, L., Oo, Y. H., Adams, D. H., Mirza, D. F., Mergental, H., Muirhead, G., Stephenson, B. T. F., & Afford, S. C. (2018). The Reactive Oxygen Species-Mitophagy Signaling Pathway Regulates Liver Endothelial Cell Survival During Ischemia/Reperfusion Injury. *Liver Transplantation*, 24(10), 1437–1452.
- 20) Biolifesolutions (Marzo, 2021). *Hypothermosol® Freeze Media*. <https://www.biolifesolutions.com/product/hypothermosol-frs/>.
- 21) Boerr, E., Anders, M., Mella, J., Quiñonez, E., Goldaracena, N., Orozco, F., McCormack, L., & Mastai, R. (2013). Análisis del coste del trasplante hepático en un hospital de la comunidad: Su relación con el Model for End-stage Liver Disease, un índice pronóstico que prioriza al paciente más grave. *Gastroenterología y Hepatología*, 36(1), 1–6.
- 22) Bretschneider, H., Hübner, G., Knoll, D., Lohr, B., Nordbeck, H., & Spieckermann, P. G. (1975). Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. *The Journal of cardiovascular surgery*, 16(3), 241-260.
- 23) Buskirk, R. G. Van, Baust, J. M., Snyder, K. K., Mathew, A. J., & Baust, J. G. (2004). Hypothermic storage and cryopreservation. *BioProcess International*, November, 42–49.
- 24) Cardoso, L., Moreira, L., Pinto, M. A., Henriques-Pons, A., & Alves, L. A. (2018). Domino Hepatocyte Transplantation: A Therapeutic Alternative for the Treatment of Acute Liver Failure. *Canadian journal of gastroenterology and hepatology*, 2018.
- 25) Carnevale, M. E. (2019). *Desarrollo de metodologías para el rescate de órganos de donantes a corazón parado. La perfusión hipotérmica y su posible aplicación al trasplante hepático*. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Rosario.
- 26) Carnevale, M. E., Lausada, N., Juan de Paz, L., Stringa, P., Machuca, M., Rumbo, M., Guibert, E. E., Tiribelli, C., Gondolesi, G. E., & Rodriguez, J. V. (2019). The Novel N, N-bis-2-Hydroxyethyl-2-Aminoethanesulfonic Acid–Gluconate–Polyethylene Glycol–Hypothermic Machine Perfusion Solution Improves Static Cold Storage and Reduces Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Liver Transplant. *Liver Transplantation*, 25(9), 1375–1386.
- 27) Cassim, S., Raymond, V. A., Lapierre, P., & Bilodeau, M. (2017). From in vivo to in vitro: Major metabolic alterations take place in hepatocytes during and following isolation. *PLoS ONE*, 12(12).
- 28) Chew, S. A., Moscato, S., George, S., Azimi, B., & Danti, S. (2019). Liver cancer: current and future trends using biomaterials. *Cancers*, 11(12), 2026.
- 29) Chow-shi-yée, M., Grondin, M., Ouellet, F., & Averill-Bates, D. A. (2020). Control of stress-induced apoptosis by freezing tolerance-associated wheat proteins during cryopreservation of rat hepatocytes. *Cell Stress and Chaperones*, 25(6), 869–886.
- 30) Contreras, A. G., McCormack, L., Andraus, W., de Souza M Fernandes, E., Fernandes, E. de S. M., Requejo, A. S., Jarufe, N., Dib, M., Carrasco, F., Harguindeguy, M., Garbanzo, J. P., Serpa, F., Gimenez, A., Villaroel, R., & Vera, A. (2020). Current status of liver transplantation in Latin America. *International Journal of Surgery*, 82, 14-21
- 31) Coppin, L., Sokal, E., & Stephenne, X. (2017). Hepatocyte transplantation in children. In *Hepatocyte Transplantation* (pp. 295-315). Humana Press, New York, NY.
- 32) Córdova, J., Rossano-García, A., & García-Covarrubias, L. (2013). El inicio de un programa de trasplante hepático en el Hospital General de México. *Rev Mex Traspl.*, 2(2), 58–63.
- 33) Corral, A., Balcerzyk, M., Gallardo, M., Amorim, C. A., Parrado-Gallego, Á., & Risco, R. (2018). An optimized controlled rate slow cooling protocol for bovine ovarian tissue cryopreservation by means of X-ray computed tomography. *Theriogenology*, 119, 183-188.
- 34) da Fonseca Cardoso, L. M., Pinto, M. A., Pons, A. H., & Alves, L. A. (2017). Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy. *Cryobiology*, 78, 15-21
- 35) Dar, W. A., Sullivan, E., Bynon, J. S., Eltzschig, H., & Ju, C. (2019). Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: cellular and molecular mechanisms. *Liver International*, 39(5), 788-801
- 36) de Vries, R. J., Banik, P. D., Nagpal, S., Weng, L., Ozer, S., van Gulik, T. M., ... & Uygun, K. (2019). Bulk Droplet Vitrification for Primary Hepatocyte Preservation. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (152).

- 37) Dhawan, A., Chaijitraruch, N., Fitzpatrick, E., Bansal, S., Filippi, C., Lehec, S. C., Heaton, N. D., Kane, P., Verma, A., Hughes, R. D., & Mitry, R. R. (2020). Alginate microencapsulated human hepatocytes for the treatment of acute liver failure in children. *Journal of Hepatology*, 72(5), 877–884.
- 38) Donato, M. T., Bolonio, M., Cabezas, E., Pelechá, M., Pareja, E., Domènech, A., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., & Tolosa, L. (2020). Improved in vivo efficacy of clinical-grade cryopreserved human hepatocytes in mice with acute liver failure. *Cytotherapy*, 22(2), 114–121.
- 39) Donato, M. T., Lahoz, A., Montero, S., Bonora, A., Pareja, E., Mir, J., Castell, J. V., & Gómez-Lechón, M. J. (2008). Functional assessment of the quality of human hepatocyte preparations for cell transplantation. *Cell Transplantation*, 17(10–11), 1211–1219.
- 40) Duret, C., Moreno, D., Balasiddaiah, A., Roux, S., Briolotti, P., Raulet, E., Herrero, A., Ramet, H., Biron-Andreani, C., Gerbal-Chaloin, S., Ramos, J., Navarro, F., Hardwigsen, J., Maurel, P., Aldabe, R., & Daujat-Chavanieu, M. (2015). Cold Preservation of Human Adult Hepatocytes for Liver Cell Therapy. *Cell Transplantation*, 24(12), 2541–2555.
- 41) Fuller, B. J., Froghi, F., & Davidson, B. (2018). Organ preservation solutions: linking pharmacology to survival for the donor organ pathway. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 23(3), 361–368.
- 42) Fuller, B. J., Petrenko, A. Y., Rodriguez, J. V., Somov, A. Y., Balaban, C. L., & Guibert, E. E. (2016). Biopreservation of hepatocytes: Current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. *Cryo-Letters*, 37(4), 432–452.
- 43) Fuller, B. J., Petrenko, A., & Guibert, E. (2019). Human organs come out of the deep cold. *Nature Biotechnology*, 37(10), 1127–1128.
- 44) Gramignoli, R., Dorko, K., Tahan, V., Skvorak, K. J., Ellis, E., Jorns, C., Ericzon, B.-G., Fox, I. J., & Strom, S. C. (2014). Hypothermic storage of human hepatocytes for transplantation. *Cell Transplantation*, 23(9), 1143–1151.
- 45) Grisham, J. W. (2009). Organizational Principles of the Liver. In *The Liver: Biology and Pathobiology: Fifth Edition* (pp. 1–15). John Wiley & Sons, Ltd.
- 46) Gurruchaga, H., Saenz del Burgo, L., Hernandez, R. M., Orive, G., Selden, C., Fuller, B., Ciriza, J., & Pedraz, J. L. (2018). Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. In *Journal of Controlled Release*, 281, 119–138.
- 47) Guts, A. K., Frolova, Yu. V., Páutova, L. A. (2013). Métodos matemáticos en la sociología. Editorial URSS Moscú.
- 48) Hernández Ramírez, P. (2017). ARTÍCULO DE REVISIÓN ¿Es realmente útil el tratamiento con la terapia celular regenerativa? Is it really useful the treatment with regenerative cell therapy? In *Revista Cubana de Hematología, Inmunol y Hemoter*, 33(1), 1–13.
- 49) Hubel, A. (1997). Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfusion Medicine Reviews*, 11(3), 224–233.
- 50) Hunt, C. J. (2017). Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling. *Stem Cell Banking*, 41–77.
- 51) Iansante, V., Mitry, R. R., Filippi, C., Fitzpatrick, E., & Dhawan, A. (2018). Human hepatocyte transplantation for liver disease: Current status and future perspectives. In *Pediatric Research*, 83(1–2), 232–240.
- 52) Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI, Febrero 2021). *Estadística del trasplante*. <https://www.argentina.gob.ar/salud/incucaí>.
- 53) Janßen, H., Janßen, P. H. E., & Broelsch, C. E. (2003). Celsior solution compared with University of Wisconsin solution (UW) and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) in the protection of human hepatocytes against ischemia-reperfusion injury. *Transplant International*, 16(7), 515–522.
- 54) Jia, Z., Chen, Q., & Qin, H. (2012). Ischemia-induced apoptosis of intestinal epithelial cells correlates with altered integrin distribution and disassembly of F-actin triggered by calcium overload. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- 55) Jing, L., Yao, L., Zhao, M., Peng, L. P., & Liu, M. (2018). Organ preservation: from the past to the future. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(5), 845–857
- 56) John Morris, G., & Acton, E. (2013). Controlled ice nucleation in cryopreservation - A review. *Cryobiology*, 66(2), 85–92.

- 57) Jitraruch, S., Dhawan, A., Hughes, R. D., Filippi, C., Lehec, S. C., Glover, L., & Mitry, R. R. (2017). Cryopreservation of Hepatocyte Microbeads for Clinical Transplantation. *Cell Transplantation*, 26(8), 1341–1354.
- 58) Juan De Paz, L., Robert, M. C., Graf, D. A., Guibert, E. E., & Rodriguez, J. V. (2015). DESIGN OF A SIMPLE SLOW COOLING DEVICE FOR CRYOPRESERVATION OF SMALL BIOLOGICAL SAMPLES. *CryoLetters*, 36(6), 363-371.
- 59) Karlsson, J. O. M., & Toner, M. (1996). Long-term storage of tissues by cryopreservation: Critical issues. *Biomaterials*, 17(3), 243–256.
- 60) Kashuba Benson, C. M., Benson, J. D., Critser, J. K. (2008). An improved cryopreservation method for a mouse embryonic stem cell line. *Cryobiology*, 56:120–130
- 61) Katarey, D., & Jalan, R. (2020). Update on extracorporeal liver support. *Current opinion in critical care*, 26(2), 180-185.
- 62) Kedem, O., & Katchalsky, A. (1958). Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 27(C), 229–246.
- 63) Keros, V., & Fuller, B. J. (2021). Cryopreservation of Mammalian Oocytes: Slow Cooling and Vitrification as Successful Methods for Cryogenic Storage. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (pp. 437-454). Humana, New York, NY.
- 64) Khan, Z., & Strom, S. C. (2017). Hepatocyte transplantation in special populations: Clinical use in children. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1506, pp. 3–16). Humana Press Inc.
- 65) Latchana, N. (2015). Preservation solutions used during abdominal transplantation: Current status and outcomes. *World Journal of Transplantation*, 5(4), 154.
- 66) Lee, C., Dhawan, A., Iansante, V., Filippi, C., Mitry, R., Tang, J., Walker, S., Fernandez DaCosta, R., Sinha, S., Hughes, R. D., Koulmanda, M., & Fitzpatrick, E. (2019). Improving engraftment of hepatocyte transplantation using alpha-1 antitrypsin as an immune modulator. *Journal of Molecular Medicine*, 97(4), 563–577.
- 67) Li, Y., Chen, H. S., Shaheen, M., Joo, D. J., Amiot, B. P., Rinaldo, P., & Nyberg, S. L. (2019). Cold storage of porcine hepatocyte spheroids for spheroid bioartificial liver. *Xenotransplantation*, 26(4), e12512.
- 68) Lovelock, J. E. (1954). The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *The Biochemical Journal*, 56(2), 265–270.
- 69) Lovelock, J., Nature, M. B., & 1959, U. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature.Com*. <https://www.nature.com/articles/1831394a0>
- 70) Mamprin, M. E., Vega, F., & Rodriguez, J. V. (2005). Adenosine 5'triphosphate transport and accumulation during the cold preservation of rat hepatocytes in University of Wisconsin solution. *World Journal of Gastroenterology*, 11(13), 1957–1964.
- 71) Mandolino, C., Dolores Pizarro, M., Quintana, A. B., Rodríguez, J. V, & Mamprin, M. E. (2011). Hypothermic preservation of rat liver microorgans (LMOs) in bes-gluconate solution. Protective effects of polyethyleneglycol (PEG) on total water content and functional viability. In *Annals of Hepatology*, 10(2), 196–206.
- 72) Mangus, R. S., Fridell, J. A., Vianna, R. M., Milgrom, M. A., Chestovich, P., Chihara, R. K., & Tector, A. J. (2008). Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in extended criteria liver donors. *Liver Transplantation*, 14(3), 365–373.
- 73) Marquez-Curtis, L. A., McGann, L. E., & Elliott, J. A. (2017). Expansion and cryopreservation of porcine and human corneal endothelial cells. *Cryobiology*, 77, 1-13
- 74) Marsh, D. C., Lindell, S. L., Fox, L. E., Belzer, F. O., & Southard, J. H. (1989). Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling. *Cryobiology*, 26(6), 524–534.
- 75) Martínez Castillo, J., Bächler, J. P., Moisan, F., Torres, J., Duarte, I., Pérez, R. M., Benítez, C., Arrese, M., Domínguez, P., Guerra, J. F., & Jarufe, N. (2014). ¿Influye el medio de preservación del injerto en los resultados y costos del trasplante hepático de donante fallecido? Comparación de dos soluciones de preservación. *Revista Medica de Chile*, 142(10), 1229–1237.
- 76) MAZUR, P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of General Physiology*, 47(2), 347–369.
- 77) Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of*

- Physiology*, 247(3 Pt 1), 0–4.
- 78) Mazur, Peter, & Cole, K. W. (1989). Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology*, 26(1), 1–29.
- 79) Mediavilla, M. G., Krapp, A., Carrillo, N., Rodríguez, J. V., Tiribelli, C., & Guibert, E. E. (2006). Efficient cold transfection of pea ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase into rat hepatocytes. *Journal of Gene Medicine*, 8(3), 306–313.
- 80) Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2018). Tipos celulares HEPATOCITO. *Atlas de Histología Vegetal y Animal*, 1–8.
- 81) Menasché, P., Termignon, J. L., Pradier, F., Grousset, C., Mouas, C., Alberici, G., Weiss, M., Piwnica, A., & Bloch, G. (1994). Experimental evaluation of celsior, a new heart preservation solution. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 8(4), 207–213.
- 82) Mikulic, D., & Mrzljak, A. (2020). Liver transplantation and aging. *World Journal of Transplantation*, 10(9), 256.
- 83) Mohr, A., Brockmann, J. G., & Becker, F. (2020). HTK-N: Modified Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate Solution—A Promising New Tool in Solid Organ Preservation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6468
- 84) Nagy, P., Thorgeirsson, S. S., & Grisham, J. W. (2020). Organizational Principles of the Liver. *The Liver: Biology and Pathobiology*, 1-13.
- 85) Nicolas, C. T., Hickey, R. D., Allen, K. L., Du, Z., Guthman, R. M., Kaiser, R. A., Amiot, B., Bansal, A., Pandey, M. K., Suksanpaisan, L., DeGrado, T. R., Nyberg, S. L., & Lillegard, J. B. (2018). Hepatocyte spheroids as an alternative to single cells for transplantation after ex vivo gene therapy in mice and pig models. *Surgery (United States)*, 164(3), 473–481.
- 86) Nicolas, C. T., Wang, Y., & Nyberg, S. L. (2016). Cell therapy in chronic liver disease. In *Current Opinion in Gastroenterology*, 32(3), 189–194.
- 87) Organización Mundial de la Salud (OMS, Diciembre 2019). *Causas de muerte en el mundo*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- 88) Ostrowska, A., Gu, K., Bode, D. C., & Van Buskirk, R. G. (2009). Hypothermic storage of isolated human hepatocytes: A comparison between University of Wisconsin solution and a hypothermosol platform. *Archives of Toxicology*, 83(5), 493–502.
- 89) Pareja E., Gómez-Lechón M.J., Tolosa L. (2017) Alternative Cell Sources to Adult Hepatocytes for Hepatic Cell Therapy. In *Hepatocyte Transplantation* (pp. 17-42). Humana Press, New York, NY.
- 90) Pareja, E., Gómez-Lechón, M. J., & Tolosa, L. (2020). Induced pluripotent stem cells for the treatment of liver diseases: challenges and perspectives from a clinical viewpoint. *Annals of translational medicine*, 8(8), 566.
- 91) Pareja, E., Gomez-Lechon, M. J., Cortes, M., Bonora-Centelles, A., Castell, J. V., & Mir, J. (2013). Human hepatocyte transplantation in patients with hepatic failure awaiting a graft. *European Surgical Research*, 50(3–4), 273–281.
- 92) Pareja, Eugenia, Cortés, M., Gómez-Lechón, M. J., Maupoey, J., San Juan, F., López, R., & Mir, J. (2014). Current Status and Future Perspectives of Hepatocyte Transplantation. *Cirugía Española (English Edition)*, 92(2), 74–81.
- 93) Parsons, R. F., & Guarrera, J. V. (2014). Preservation solutions for static cold storage of abdominal allografts: Which is best? In *Current Opinion in Organ Transplantation*, 19(2), 100–107.
- 94) Pascucci, F., Carnevale, M. E., Balaban, C. L., Mamprin, M. E., Guibert, E. E., & Rodríguez, J. V. (2012). 55. Evaluation of a new solution for hypothermic machine perfusion (HMP) of the liver. I – Composition and physicochemical parameters. *Cryobiology*, 65(3), 357.
- 95) Petrenko, A., Carnevale, M., Somov, A., Osorio, J., Rodríguez, J., Guibert, E., ... & Froghi, F. (2019). Organ preservation into the 2020s: the era of dynamic intervention. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(3), 151-172.
- 96) Pless-Petig, G., & Rauen, U. (2018). Serum-Free Cryopreservation of Primary Rat Hepatocytes in a Modified Cold Storage Solution: Improvement of Cell Attachment and Function. *Biopreservation and Biobanking*, 16(4), 285–295.

- 97) Pless-Petig, G., Walter, B., Bienholz, A., & Rauen, U. (2017). Mitochondrial Impairment as a Key Factor for the Lack of Attachment after Cold Storage of Hepatocyte Suspensions. *Cell Transplantation*, 26(12), 1855–1867.
- 98) Polge, C., Smith, A., Nature, A. P., & 1949, U. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.Com*. <https://www.nature.com/articles/164666a0>
- 99) Puts, C. F., Berendsen, T. A., Bruinsma, B. G., Ozer, S., Luitje, M., Usta, O. B., ... & Uygun, K. (2015). Polyethylene glycol protects primary hepatocytes during supercooling preservation. *Cryobiology*, 71(1), 125-129.
- 100) Ribes-Koninckx, C., Ibars, E. P., Agrasot, M. Á. C., Bonora-Centelles, A., Miquel, B. P., Carbó, J. J. V., Aliaga, E. D., Pallardó, J. M., Gómez-Lechón, M. J., & Castell, J. V. (2012). Clinical outcome of hepatocyte transplantation in four pediatric patients with inherited metabolic diseases. *Cell Transplantation*, 21(10), 2267–2282.
- 101) Robinson, J., & Cooper, J. M. (1970). Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Analytical Biochemistry*, 33(2), 390–399.
- 102) Seglen, P. O. (1976). Preparation of Isolated Rat Liver Cells. *Methods in Cell Biology*, 13(C), 29–83.
- 103) Shannon, R., & Johannes, J. D. (1976). Systems simulation: the art and science. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics.*, 6(10), 723-724.
- 104) Sibulesky, L. (2013). Anatomía normal del hígado. *Clinical Liver Disease*, 2(S4), S61Š-S63Š.
- 105) Sigot, V., Mediavilla, M. G., Furno, G., Rodríguez, J. V., & Guibert, E. E. (2004). A simple and effective method to improve intrasplenic rat hepatocyte transplantation. *Cell Transplantation*, 13(7–8), 775–781.
- 106) Sigot, V., Pellegrino, J. M., Guibert, E. E., & Rodriguez, J. V. (2011). A modular perfused chamber for low- and normal-temperature microscopy of living cells. *BioTechniques*, 50(4), 251–254.
- 107) Smets, F. N., Chen, Y., Wang, L. J., & Soriano, H. E. (2002). Loss of cell anchorage triggers apoptosis (anoikis) in primary mouse hepatocytes. *Molecular genetics and metabolism*, 75(4), 344-352.
- 108) Soares, R. O., Losada, D. M., Jordani, M. C., Évora, P., & Castro-e-Silva, O. (2019). Ischemia/reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies. *International journal of molecular sciences*, 20(20), 5034.
- 109) Soltys, K. A., Setoyama, K., Tafaleng, E. N., Soto Gutiérrez, A., Fong, J., Fukumitsu, K., Nishikawa, T., Nagaya, M., Sada, R., Haberman, K., Gramignoli, R., Dorko, K., Tahan, V., Dreyzin, A., Baskin, K., Crowley, J. J., Quader, M. A., Deutsch, M., Ashokkumar, C., ... Fox, I. J. (2017). Host conditioning and rejection monitoring in hepatocyte transplantation in humans. *Journal of Hepatology*, 66(5), 987–1000.
- 110) Sosef, M. N., Baust, J. M., Sugimachi, K., Fowler, A., Tompkins, R. G., & Toner, M. (2005). Cryopreservation of isolated primary rat hepatocytes: Enhanced survival and long-term hepatospecific function. *Annals of Surgery*, 241(1), 125–133.
- 111) Southard, M.D, J. H., & Belzer, M.D, F. O. (1995). ORGAN PRESERVATION. *Annual Review of Medicine*, 46(1), 235–247.
- 112) Spindler, R., Wolkers, W. F., & Glasmacher, B. (2011). Dimethyl sulfoxide and ethylene glycol promote membrane phase change during cryopreservation. *Cryo-Letters*, 32(2), 148–157.
- 113) Squires, J. E., Soltys, K. A., McKiernan, P., Squires, R. H., Strom, S. C., Fox, I. J., & Soto-Gutierrez, A. (2017). Clinical Hepatocyte Transplantation: What Is Next? *Current Transplantation Reports*, 4(4), 280–289.
- 114) Stefanovich, P., Ezzell, R., & Sheehan, S. (1995). Effects of hypothermia on the function, membrane integrity, and cytoskeletal structure of hepatocytes. *Cryobiology*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224085710395>
- 115) Stéphane, X., Najimi, M., & Sokal, E. M. (2010). Hepatocyte cryopreservation: Is it time to change the strategy? *World Journal of Gastroenterology*, 16(1), 1–14.
- 116) Stewart, Z. A. (2015). UW Solution: Still the “Gold Standard” for Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 15(2), 295–296. <https://doi.org/10.1111/ajt.13062>
- 117) Sun, M., Jin, H., Sun, X., Huang, S., Zhang, F., & Guo, Z. (2018). Free radical damage in ischemia reperfusion injury: un obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy. *Oxidative*

*Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

- 118) Szilágyi, Á. L., Mátrai, P., Hegyi, P., Tuboly, E., Pécz, D., Garami, A., Solymár, M., Pétervári, E., Balaskó, M., Veres, G., Czopf, L., Wobbe, B., Szabó, D., Wagner, J., & Hartmann, P. (2018). Compared efficacy of preservation solutions on the outcome of liver transplantation: Meta-analysis. *World journal of gastroenterology*, 24(16), 1812–1824.
- 119) Terry, C., Dhawan, A., Mitry, R. R., Lehec, S. C., & Hughes, R. D. (2010). Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation. *Liver Transplantation*, 16(2), 229–237.
- 120) Tolosa, L., Pareja-Ibars, E., Teresa Donato, M., Cortés, M., López, S., Jiménez, N., Mir, J., Castell, J. V., & Gómez-Lechón, M. J. (2014). Neonatal livers: A source for the isolation of good-performing hepatocytes for cell transplantation. *Cell Transplantation*, 23(10), 1229–1242.
- 121) Upadhy, G. A., & Strasberg, S. M. (2000). Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in university of wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology*, 31(5), 1115–1122.
- 122) Van Buskirk, R. G., Snyder, K. K., Baust, J. G., Mathew, A. J., & Baust, J. M. (2005). *Cryopreservation: It's Not Just About Cell Yield*. www.biolifesolutions.
- 123) Villegas-Serrano, Y. E., Aguilar-Vega, L., Martha Pérez-Armendáriz, E., & Zurabian, R. (2017). *Linajes madurativos de las células que regeneran al hígado* (Vol. 60).
- 124) Weng, L., Ellett, F., Edd, J., Wong, K. H. K., Uygun, K., Irimia, D., Stott, S. L., & Toner, M. (2017). A highly-occupied, single-cell trapping microarray for determination of cell membrane permeability. *Lab on a Chip*, 17(23), 4077–4088.
- 125) Weng, L., Stott, S. L., & Toner, M. (2019). Exploring Dynamics and Structure of Biomolecules, Cryoprotectants, and Water Using Molecular Dynamics Simulations: Implications for Biostabilization and Biopreservation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 21(1), 1–31.
- 126) Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation*, 30.
- 127) Zaouali, M. A., Bejaoui, M., Calvo, M., Folch-Puy, E., Pantazi, E., Pasut, G., ... & Roselló-Catafau, J. (2014). Polyethylene glycol rinse solution: an effective way to prevent ischemia-reperfusion injury. *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), 16203
- 128) Zhang, S., Zhou, K., Luo, X., Li, L., Tu, H. C., Sehgal, A., Nguyen, L. H., Zhang, Y., Gopal, P., Tarlow, B. D., Siegwart, D. J., & Zhu, H. (2018). The Polyploid State Plays a Tumor-Suppressive Role in the Liver. *Developmental Cell*, 44(4), 447-459.e5.