

TRASPLANTE DE HEPATOCITOS AISLADOS

80

Valentín Cuervas-Mons

En el hígado adulto normal existen aproximadamente doscientos cincuenta mil millones de hepatocitos, que representan el sesenta por ciento de las células hepáticas y el ochenta por ciento del volumen del órgano. Se calcula que los hepatocitos realizan más de mil quinientas funciones diferentes, entre las que cabe destacar el metabolismo intermediario de los aminoácidos y los hidratos de carbono (mantenimiento de la glucemia), la síntesis y degradación de las proteínas (factores de la coagulación y proteínas de transporte, entre otros), el metabolismo, degradación y eliminación de diversas sustancias y la regulación del metabolismo de los lípidos y el colesterol. Esta diversidad de funciones explica por qué los sistemas de soporte hepático que no utilizan tejido hepático vivo, tales como hemodiálisis, plasmaféresis, exanguinotrasfusión o hemoperfusión a través de columnas absorbentes, tratamientos que eliminan transitoriamente las sustancias tóxicas que el hígado insuficiente no puede eliminar, pero que no suplen la función hepática de síntesis, no han sido útiles en situaciones de insuficiencia hepática aguda o crónica.

De los sistemas de soporte hepático que sí utilizan tejido hepático vivo, únicamente el trasplante hepático ha mejorado la supervivencia de los pacientes con insuficiencia hepática. Sin embargo, por razones de tipo médico o por escasez de órganos donantes, no se puede realizar en todos los candidatos potenciales. Cuando además de sustituir la función del hígado insuficiente se precisa corregir un defecto anatómico (p.e. en la atresia de vías biliares o en la colangitis esclerosante),

el trasplante hepático ortotópico es el tratamiento de elección. Sin embargo, existen otras situaciones en las que el aporte de células hepáticas aisladas podría ser suficiente. Tal es el caso de la insuficiencia hepática aguda grave o de las enzimopatías de origen hepático. Como posible alternativa al trasplante hepático ortotópico, en estas circunstancias, surge el trasplante de hepatocitos aislados, tratamiento potencialmente útil para cubrir los mismos objetivos, y técnicamente más sencillo. En este capítulo se resume el estado actual del trasplante de hepatocitos.

Aislamiento y Preparación de los Hepatocitos

Los hepatocitos se aíslan mediante la técnica de digestión enzimática con colagenasa, perfundida a través de la vena porta. En la rata se utiliza colagenasa a una concentración del 0.05% ^{1,2}, y se obtienen $1-5 \times 10^8$ células /rata (entre el 50% y el 75% del total de hepatocitos existentes), con una viabilidad celular del 85 al 95% y con una contaminación de células no parenquimatosas inferior al 3%. Los hepatocitos así aislados se pueden purificar más, utilizando Ficoll o Percoll. En el animal grande, el rendimiento de esta técnica es inferior que en la rata ³, siendo preciso aumentar la concentración de colagenasa (hasta el 0.15%) o el tiempo de perfusión con la misma ^{4,5}.

La técnica de digestión enzimática con colagenasa se ha utilizado para la obtención de hepatocitos humanos a partir de hígados de cadáver ⁶⁻⁸, piezas quirúrgicas ⁹ y muestras de biopsia ⁹, con excelentes resultados en cuanto a pureza y viabi-

lidad celular, pero con escaso rendimiento⁶⁻⁹. La técnica de aislamiento de hepatocitos humanos es casi idéntica a la utilizada en animales grandes, con algunas modificaciones. Utilizando colagenasa P (20 mg/dl) se pueden obtener 1×10^6 - 10^7 células / gramo de hígado, con una viabilidad del 90%⁸. Para obtener hepatocitos de segmentos hepáticos o de muestras de biopsia no se puede utilizar la técnica de perfusión intraportal, ya que si el segmento es pequeño no existe vaso de suficiente tamaño para insertar catéteres. En este caso se utiliza el método de multiperfusión, a través de agujas pinchadas en el parénquima hepático

Utilizando la solución de Wisconsin se pueden aislar hepatocitos funcionales a partir de hígados preservados durante veinticuatro horas¹⁰.

Funcionalismo de los Hepatocitos Aislados

Los hepatocitos aislados con la técnica de digestión enzimática con colagenasa conservan sus características ultraestructurales¹¹ y su capacidad metabólica¹², sintetizan albúmina, fibrinógeno y otras proteínas^{13,15}, ácidos grasos¹⁶, glucosa y urea¹⁷, captan derivados imidoacéticos¹⁸, y mantienen íntegra su capacidad de glucuronización^{18,19}, y otras funciones microsomaes durante seis horas después del aislamiento, mantenidos a temperatura ambiente.

Criopreservación

Los hepatocitos pueden ser criopreservados y posteriormente cultivados manteniendo características ultraestructurales y funcionales (capacidad microsomal de detoxificación de drogas) muy similares a las de las células recién aisladas²⁰. Mantenidos a -4°C mantienen su viabilidad durante 24 horas, y congelados a -20°C , -80°C ó -196°C mantienen su viabilidad durante períodos prolongados de tiempo. Durante la primera semana, la viabilidad de los hepatocitos es independiente de la temperatura de congelación. Un mes después de la congelación sólo son viables las células congeladas a -196°C .

Los hepatocitos congelados durante un mes a -196°C presentan irregularidades y deformaciones estructurales y ciertas anomalías funcionales, ya que tienen disminuida la función microsomal y no conjugan bilirrubina²¹. Similares resultados se han obtenido con hepatocitos de perro^{22,23}, y

humanos^{24,25}. Recientemente se ha descrito la criopreservación de hepatocitos humanos utilizando solución de Wisconsin, dimetilsulfóxido y suero fetal bovino, obteniendo una viabilidad de los hepatocitos criopreservados superior al 90%²⁶.

El lugar del Implante

Los hepatocitos se han implantado en tejido celular subcutáneo o músculo^{27,28}, cápsula renal²⁹, pulmón³⁰, páncreas³¹, hígado³²⁻³⁶, cavidad peritoneal³⁷⁻³⁹ y bazo^{3,40,41}, pero sólo los trasplantes realizados en hígado, bazo o peritoneo han sido útiles para corregir algún parámetro de funcionalismo hepático.

La inyección de hepatocitos por vía portal parece la más lógica y fisiológica por los siguientes motivos: (a) la interacción de los hepatocitos inyectados con las células no parenquimatosas del hígado receptor; (b) la irrigación portal con nutrientes, hormonas y algunos factores hepatotróficos, y (c) los factores de crecimiento hepático liberados localmente. Los hepatocitos trasplantados emigran a través de los sinusoides y se incorporan a las placas hepáticas, realizando unas conexiones estables y permanentes con el árbol biliar⁴². Sin embargo su uso ha tardado en ser aceptado por la existencia de complicaciones mortales como trombosis portal, infartos hepáticos y embolismo intrapulmonar de hepatocitos. La vena porta puede accederse a través de inyección en la vena mesentérica inferior, en la vena umbilical o a través de inyección intraesplénica.

El bazo se considera el mejor lugar para el implante de los hepatocitos⁴³, y es la localización utilizada más frecuentemente para el trasplante. Entre el 50-85% de los hepatocitos inyectados en bazo emigran al hígado a través de la vena esplénica y allí quedan en los lobulillos hepáticos⁴⁴. Menos del 1-3% van a los pulmones, y el restante 10-20% permanece en bazo⁴⁵, lo que origina las mismas complicaciones que cuando el trasplante se realiza por vía intraportal. Otro 3% de los hepatocitos inyectados dentro del bazo emigran al páncreas o al pulmón. El restante 10-45% de los hepatocitos inyectados en pulpa esplénica permanece allí. La estructura esponjosa del bazo y su sistema reticular fijan y dan soporte a las células inoculadas^{46,47}.

Los hepatocitos trasplantados en el bazo de rata en condiciones de histocompatibilidad con-

servan sus características histológicas^{4,18,43,48,49} ultraestructurales^{43,48,49} y funcionales^{18,43,48} y responden al estímulo del factor de crecimiento de los hepatocitos, aumentando la masa de células trasplantadas⁵⁰⁻⁵².

Ultraestructuralmente los hepatocitos trasplantados en bazo conservan todas sus organelas, tienen un polo biliar diferenciado y establecen uniones con desmosomas entre ellos^{43,50,53,54}. Además, conservan sus propiedades funcionales al menos un año después de realizado el trasplante, ya que sintetizan albúmina⁵⁵, conjugan bilirrubina⁵⁶, contienen glucógeno y lípidos⁵⁷, expresan albúmina⁵⁷ y varias enzimas, en particular glucosa-6-fosfatasa, lactato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa⁴⁹ y dos enzimas claves en el metabolismo de la urea, la carbamoil-fosfato sintetasa y la glutamina sintetasa⁵⁸, tienen actividad histoquímica ornitil-tras-carbamilasa⁵⁹ y glucosa-6-fosfatasa^{43,48,59} sintetizan principios inmediatos, conjugan bilirrubina, metabolizan amoniaco, conservan la función microsomal, transportan bromosulfotaleina y anti-pirina y captan radiofármacos hepatoespecíficos como el 99m-Tc-HIDA¹⁸⁻⁴⁸⁻⁶⁰. La captación de 99m-Tc-HIDA es de gran valor, pues permite el seguimiento funcional de los hepatocitos trasplantados^{61,62}.

La cavidad peritoneal no es un lugar muy adecuado para realizar el trasplante, ya que es muy difícil la evaluación histológica y funcional de los hepatocitos allí trasplantados. Recientemente se han utilizado hepatocitos microencapsulados, fijados a una matriz de dextrano o de dextrocolágeno, que cuando se implantan en la cavidad peritoneal corrigen la hiperbilirrubinemia de la rata Jun⁶³, sintetizan albúmina cuando se implantan en ratas Nagase analbuminémicas⁶⁴ y se mantienen histológica y funcionalmente viables al menos durante ocho semanas después del trasplante⁶³.

Utilidad del Trasplante de Hepatocitos en Modelos Experimentales de Enfermedad Hepática

Los hepatocitos trasplantados pueden desarrollar todas las funciones que tiene el hígado sano⁶⁵. El trasplante de hepatocitos se ha utilizado con éxito en diferentes modelos experimentales de insuficiencia hepática aguda grave, de insuficien-

cia hepática crónica y en metabolopatías de origen hepático. En estas últimas situaciones tanto en alotrasplante de células normales como auto-trasplante de hepatocitos modificados genéticamente *ex vivo*.

La primera demostración de que el trasplante de hepatocitos aumenta significativamente la supervivencia de ratas con insuficiencia hepática aguda grave fue realizada por Sutherland y cols⁶⁶ en 1977. Desde entonces varios grupos de autores han confirmado estos resultados, utilizando diferentes modelos quirúrgicos^{3,40} o farmacológicos de insuficiencia hepática aguda³³⁻³⁸. La diferente supervivencias alcanzada en los diferentes trabajos depende de la localización del trasplante^{22,56-58}, de la dosis de hepatocitos administrada⁶⁷, del intervalo de tiempo existente entre la lesión hepática y el trasplante⁴⁰, y de la barrera de histocompatibilidad entre las células trasplantadas y el animal receptor. Los mejores resultados se obtienen con el trasplante intraesplénico o intraportal, y los peores con el trasplante intraperitoneal^{33,36,41}. Existen datos experimentales que sugieren que los hepatocitos trasplantados en bazo o por vía intraportal además de aportar funciones hepáticas deficitarias a los animales con insuficiencia hepática aguda grave, pueden facilitar la proliferación y la función del hígado nativo remanente⁶⁸.

El trasplante de hepatocitos en bazo mejora la capacidad funcional del hígado cirrótico, ya que normaliza el tiempo de protrombina y mejora parámetros de función microsomal como el aclaramiento de dimetilaminopirina de ratas cirróticas⁶⁹, y aumenta los niveles de albúmina⁷⁰ y prolonga la supervivencia de perros con cirrosis experimental⁷¹. Además, el trasplante de hepatocitos aislados mejora el grado de encefalopatía y disminuye los niveles de glutamina en un modelo quirúrgico de encefalopatía hepática inducida mediante anastomosis porto-cava latero-lateral⁷².

El trasplante de hepatocitos ha sido útil en la corrección de varios modelos de trastornos metabólicos de origen hepático:

(a) disminuye los niveles de bilirrubina en la rata Gunn homocigota, una mutante hiperbilirrubinémica de la raza Wistar, carente del enzima UDP-glucuroniltransferasa, y que presenta una hiperbilirrubinemia indirecta congénita⁷³⁻⁷⁶.

(b) disminuye los niveles de bilirrubina en ratas mutantes hiperbilirrubinémicas Eizai con de-

fecto canalicular en el transporte de aniones orgánicos y ácidos biliares glucuronizados, un modelo animal de síndrome de Dubin-Johnson humano ⁴².

(c) aumenta significativamente los niveles de albúmina sérica en la rata Nagase analbuminémica ^{63,64,77,78}.

(d) disminuye los niveles de colesterol en conejos Watanabe con hipercolesterolemia por déficit de receptores de baja densidad (LDL colesterol), bien con alotrasplante de hepatocitos sanos ^{79,81} o por autotrasplante de hepatocitos deficitarios a los que se les ha manipulado "ex vivo" con el gen normal ^{82,83}. El trasplante alogénico de hepatocitos en conejos Watanabe, no sólo disminuye de manera importante y mantenida los niveles de colesterol LDL, sino que también, si se realiza en una época temprana de la vida puede prevenir el desarrollo de arteriosclerosis y sus complicaciones ⁸⁴.

(e) corrige también la tirosinemia en el ratón ⁸⁵.

(f) disminuye el contenido de cobre en hígado y disminuye el riesgo de fallo hepático en ratas Long-Evans cinnamon, que son un modelo natural animal de enfermedad de Wilson ⁸⁶.

(g) mejora temporalmente la biosíntesis de ácido ascórbico, en ratas con déficit congénito del mismo ^{87,88}, y el trastorno del metabolismo de las purinas en el perro dálmata, por defecto del enzima uricasa, un enzima que se encuentra mayoritariamente en hígado ^{89,90}.

Dosis Celular

No se conoce cuál es la dosis ideal de hepatocitos para el tratamiento de la hepatitis fulminante o de las metabolopatías. Por vía intraportal se pueden administrar hasta 1×10^8 células/kilogramo de peso. Dosis mayores se asocian con un riesgo muy elevado de trombosis portal y de embolismo pulmonar ⁹¹. En la mayoría de los trabajos realizados en rata se trasplantan 1×10^7 hepatocitos, lo que representa el 2% de la cantidad de hepatocitos existentes en el hígado de una rata. Con esta mínima masa hepática se obtienen unos resultados sorprendentes: (a) un aumento en los niveles de albúmina en ratas analbuminémicas hasta un 60% del valor normal ⁷⁸; (b) una disminución del 20% en los niveles de colesterol en co-

nejos hipercolesterolémicos Watanabe ⁹²; (c) una disminución del 50% en la cifra de bilirrubina directa en ratas EHBR Eizai hiperbilirubinémicas ⁴² y (d) un aumento la supervivencia en la insuficiencia hepática aguda grave. Estos datos indican que los hepatocitos trasplantados, por motivos no conocidos, mejoran las funciones hepáticas en una proporción superior a la que cabría esperar por su número.

El Problema del Rechazo

El trasplante de hepatocitos, independientemente del lugar donde se realice, se comporta como un injerto libre, de un modo similar al alotrasplante de piel en cuanto a inmunogenicidad se refiere, y se rechaza rápidamente cuando se trasplanta en contra de una barrera de histocompatibilidad mayor ^{32,62,70,93}. Además, el rechazo de estos hepatocitos es difícil de controlar con protocolos efectivos en la prevención del rechazo del injerto de órgano sólido. De hecho, el alotrasplante de hepatocitos en bazo se rechaza entre el cuarto y el quinto día postrasplante si no se utiliza medicación inmunosupresora, y entre el séptimo y el decimocuarto día postrasplante si se utiliza azatioprina asociada a esteroides ⁶². De un modo particular, la ciclosporina no evita el rechazo de los hepatocitos trasplantados en bazo cuando se administra por vía oral a dosis de 15 mg/kg ⁷⁴. Con dosis elevadas de ciclosporina (30 mg/kg p.o) es posible mantener a los hepatocitos por lo menos 6 semanas después del trasplante, sin embargo en estos casos puede existir toxicidad renal. No se tiene experiencia con los nuevos inmunosupresores tacrolimus, micofenolato mofetil, rapamicina, etc. en el trasplante de hepatocitos.

Existen procedimientos, como el cultivo de los hepatocitos, el tratamiento con anticuerpos contra las células dendríticas o contra los antígenos de clase II, la irradiación (ultravioleta o gamma) y la criopreservación, que reducen la inmunogenicidad de los hepatocitos aislados. La radiación ultravioleta causa alteraciones en la membrana celular que disminuye la presentación antigénica y la liberación de citoquinas, sin afectar el funcionamiento de los hepatocitos ⁹⁴. La criopreservación puede ser beneficiosa para reducir la inmunogenicidad de la suspensión de hepatocitos, tal vez por la mayor sensibilidad de las células pasajeras presentadoras de antígenos a los procesos de con-

gelación y calentado del proceso de criopreservación⁹⁵. La encapsulación de los hepatocitos en membranas biocompatibles también es eficaz para evitar el rechazo⁹⁶.

Complicaciones

La trombosis portal es la complicación más frecuente de la inyección intraportal de hepatocitos. En pacientes esto podría originar hemorragia por varices esofágicas o fallo hepático agudo, como se ha descrito con el trasplante intraportal de islotes pancreáticos^{97,98}.

La inyección directa de la suspensión de los hepatocitos en bazo puede originar hemorragia esplénica incontrolable, infarto esplénico, trombosis portal^{99,100} y coagulación intravascular diseminada⁹⁹, y embolización de hepatocitos en hígado y pulmón de hepatocitos en ratas con derivaciones portosistémicas¹⁰¹.

Experiencia Clínica

Los prometedores resultados obtenidos con el trasplante de hepatocitos en animales, han estimulado su utilización en pacientes con insuficiencia hepática aguda grave¹⁰²⁻¹⁰⁴, en pacientes con cirrosis¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ y en enfermos con metabolopatías¹⁰⁷⁻¹⁰⁸.

Se ha realizado alotrasplante en bazo de hepatocitos humanos de grupo sanguíneo idéntico en seis pacientes en lista de espera para trasplante hepático ortotópico por hepatitis fulminante o por hepatopatía crónica por virus C¹⁰³. Tras el trasplante, la presión intracraneal disminuyó un 43%, la presión de perfusión cerebral aumentó un 125% y el amonio plasmático disminuyó un 67%. Tres de los seis pacientes sobrevivieron tras el trasplante de hepatocitos y pudieron recibir un trasplante hepático ortotópico entre 2 y 10 días del trasplante de hepatocitos.

En Japón se ha utilizado el autotrasplante de hepatocitos en 10 pacientes con insuficiencia hepática crónica¹⁰⁵⁻¹⁰⁶. Los hepatocitos se obtuvieron a partir de una lobectomía parcial y se autotrasplantaron en bazo. Tras unos días de seguimiento, mejoró la encefalopatía, y las funciones sintéticas y detoxificadoras del hígado. No se ha comunicado la evolución a largo plazo de estos pacientes.

Utilizando el trasplante de hepatocitos como terapia génica *ex vivo*, se ha conseguido disminuir los niveles de colesterol de baja densidad (colesterol-LDL) en un paciente con hipercolesterolemia familiar por déficit de receptores de lipoproteínas de baja densidad¹⁰⁷⁻¹⁰⁸.

Futuro Clínico del Trasplante de Hepatocitos

El trasplante de hepatocitos tiene las siguientes ventajas sobre el trasplante de todo el hígado: (a) es una cirugía más sencilla, ya que no precisa anastomosis vasculares, (b) es posible realizar manipulación genética y trasplante autólogo, sin inmunosupresores, (c) se pueden realizar varios trasplantes a partir de un único donante, (d) la inmunomodulación es más sencilla, y (5) las células se pueden mantener congeladas, lo que permitirá crear bancos de células.

El trasplante alogénico de hepatocitos humanos está dificultado por la escasez de donantes para el aislamiento de los mismos, ya que los hígados existentes se utilizan para trasplante de órgano, entero o parcial. Para que el trasplante de hepatocitos llegue a ser clínicamente útil, será preciso resolver una serie de problemas, tales como: (a) mejorar el rendimiento de la técnica de aislamiento de hepatocitos; (b) perfeccionar las técnicas de mantenimiento de los mismos, mediante cultivo o criopreservación; (c) identificar qué tipo de hepatocitos (frescos, cultivados o criopreservados, fetales o de adulto) es el más eficaz; (d) desarrollar nuevas pautas de profilaxis del rechazo, mediante modulación de la inmunogenicidad de los hepatocitos, inducción de un estado de tolerancia en el receptor, pretratamiento de los hepatocitos con radiaciones ultravioleta etc.). Si estos problemas se superan, el trasplante de hepatocitos puede ser el tratamiento de elección en enzimopatías de origen hepático en las que el defecto metabólico no produce enfermedad hepática, tales como hipercolesterolemia por déficit de receptores de LDL colesterol, ya que puede aportar el enzima deficitario sin tantos riesgos como el trasplante hepático. El trasplante de hepatocitos puede ser también un buen tratamiento en las etapas precoces de enzimopatías de origen hepático y que causan enfermedad hepática, como la tirosinemia o la enfermedad de Wilson, ya que al aportar el enzima deficitario metabolizaría *in situ* el sustrato acumulado, evitando que el hígado

do pueda ser dañado. En estas enfermedades el hígado tiene, al menos en fases iniciales, una función hepatocelular adecuada a excepción del déficit enzimático.

El alotrasplante de hepatocitos podría utilizarse, también, como tratamiento de la insuficiencia hepática aguda grave, en sustitución del trasplante hepático ortotópico o para mejorar el estado neurológico y permitir realizar el trasplante en mejores condiciones,

El trasplante de hepatocitos también podría utilizarse para mejorar la función hepática en los pacientes con hepatopatía crónica no candidatos a trasplante hepático, o en aquellos enfermos que sí son candidatos al trasplante, para mejorar la función hepática previa al trasplante, o para mantenerlos vivos durante los períodos de espera para un retraspante.

El número de donantes no sería un factor limitante en la utilización clínica del trasplante de hepatocitos, ya que no se precisarían todas las células de un hígado para corregir déficits enzimáticos ni para tratar la insuficiencia hepática aguda grave. Además las células se podrían obtener de segmentos hepáticos resecados por traumatismo hepático o por tumores hepáticos benignos

Por lo tanto, si se perfecciona la metodología para obtener mayor número de hepatocitos por gramo de tejido, un solo donante podrá servir para varios receptores. La posibilidad de mantener los hepatocitos conservados durante períodos de tiempo mediante criopreservación añade un aliciente más al trasplante de hepatocitos. Entre las ventajas potenciales que este hecho reportaría se incluye la formación de bancos celulares que permitirían disponer en cualquier momento de hepatocitos del mismo grupo sanguíneo para trasplante cuando la situación clínica lo precise. Si estos problemas se resuelven, el trasplante de hepatocitos puede ser una realidad clínica durante los próximos años.

BIBLIOGRAFIA

1. Berry M. N; Friend D. J: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969, 43:506-520
2. Seglen P. O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Cell Biol* 1976, 18:29-83
3. Sommer B. G.; Sutherland D. E. R.; Simmons R. L.; Najarian J. S.: Hepatocellular transplantation for experimental acute liver failure in dogs. *Surg Forum* 1979, 30:279-281

4. Kasai S.; Sawa M.; Kondah K; Ebata H.; Mito M: Intrasplenic hepatocyte transplantation in mammals. *Transplant Proc* 1987, 19:992-994
5. Nordlinger B, Bowman ME, Wang SR, Ballet F, Verthier N, Infante HR. High-yield preparation of porcine hepatocytes for a long survival after transplantation in the spleen. *Eur Surg Res*, 1985, 17:377-382
6. Guguen-Guillouzo C; Campio J. P.; Brissot P; Glaise D.; Lannoois B.; Bourel M; et al: High yield preparation of isolated human adult hepatocyte by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Intern Res* 1982, 6:625-628,
7. Houssin D; Capron M; Celier C.; Creseil T; Demaugre F; Beaune P: Evaluation of isolated human hepatocytes. *Life Sciences*, 1983, 33:1805-1809
8. Dorko K, Freeswick PD, Nussler AK, Bartoli F, Cicalese L, Bardsley BA, Tzakis A. A new technique for isolation and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation. *Cell Transplant* 1994, 5:387-395
9. Miyazaki K; Takaki R.; Nakayama F; Yamauchi S; Koga A; Todo S.: Isolation and primary culture of adult human hepatocytes. *Cell Tissue Res*, 1981, 218:113-21
10. Mancini A, Ceriello, Mezza E, Pettinato G, Scala D, Bracco A, et al. Survival, proliferation and function of rat hepatocytes isolated from livers preserved in University of Wisconsin solution when transplanted into spleen. *Transplantation* 1994, 5:144-146
11. Pellin P: Características ultraestructurales de los hepatocitos aislados. *Patologia* 1977, 10, 165:170,
12. Howard R. B.; Pesch L. A.: Respiratory activity of intact isolated parenchymal cells from rat liver. *J Cell Biol*, 1968, 24:3105-3109
13. East A. G.; Louis L. N.; Hoffenberg R.: Albumin synthesis by isolated rat liver cells. *Exp Cell Res* 1973. 76:41-46
14. Weigand K.; Otto I.: Secretion of serum albumin by enzymatically isolated rat liver cells. *FEBS Lett* 1974, 46:127-129
15. Crane L. J.; Miller D. L.: Synthesis and secretion of fibrinogen and albumin by isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1974, 60:1269-1277
16. Ontko J. A.: Metabolism of free fatty acids in isolated liver cells. *J Biol Chem* 1972, 247:1788-1800,
17. Meyer A. J.; Boon L.; Woerkam von G. M.: Control of urea synthesis by pH in isolated rat hepatocytes. *J Hepatol* 1987, 4(suppl 1):5532
18. Woods R. J.; Fuller B. J; Attenburrow V. D.; Nutt L. H.; Hobbs K. E. F.: Functional assessment of hepatocytes after transplantation into rat spleen. *Transplantation* 1982, 33:123-126
19. Woods R. J.; Parbhoo S. T.: An explanation for the reduction in bilirubin levels in congenitally jaundiced Gunn rats after transplantation of isolated hepatocytes. *Eur Surg Res* 1981, 13:278-284,
20. De Loecker R, Fuller B, Gruwez J, De Loecker W. The effects of cryopreservation on membrane integrity, membrane transport and protein synthesis in rat hepatocytes. *Cryobiology* 1990, 27:14-152.
21. Inaba T; Makowka L; Rotstein L.; Mahora W. A.; Falk R. E.; Phillips M. J.: Aminopyrine metabolism in cryopreserved isolated rat hepatocytes. *Canad J Physiol Pharmacol* 1981, 59:408-411
22. Powis G, Santone KS, Melder DC, Thomas L, Moore DJ, Wilkie TJ. Cryopreservation of rat and dog hepatocytes for studies of xenobiotic metabolism and activation. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 1987, 15:826-832
23. Kasai S, Mito M. Large-scale cryopreservation of isolated dog hepatocytes. *Cryobiology* 1993, 30:1-11
24. Chesne C, Guyomard C, Fautrel A, Pullain MG, Freemard B, De Jong H, et al. Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and hu-

- man beings after cryopreservation. *Hepatology* 1993, 18:406-414,
25. Moshage HJ, Rijntjes PJM, Hafkenscheid JCM, Roelofs HMJ, Yap SH. Primary culture of cryopreserved adult human hepatocytes on homologous extracellular matrix and the influence of monocytic products on albumin synthesis. *J Hepatol* 1988, 7:34-44
 26. Adams RM, Wang M, Crane AM, Brow B, Darlington GJ, Ledley FD. Effective cryopreservation and long term storage of primary human hepatocytes with recovery of viability, differentiation and replicative potential. *Cell Transplantation* 1995, 4:579-585
 27. Sereviratne R. D: Transplantation of a lobe of liver in the rat. *J Pathol Bacteriol* 1955, 70:271-273
 28. Jirtle R. L.; Biles C.; Michalopoulos G: Morphologic and histochemical analysis of hepatocytes transplanted into syngeneic hosts. *Ann J Pathol* 1980, 101:115
 29. Searle R. F.; Flaks B: A technique for liver transplantation in the inbred mouse. *Transplantation* 1976, 22:256-260
 30. Selden AC, Gupti S, Johnstone R, Hodgson HJT. The pulmonary bed as a site for implantation of isolated liver cells in inbred rats. *Transplantation* 1984, 38:81-83
 31. Mazzoni G.; Di Martino C.; Scarpelli F.; Cristini F.; Citosella G.; Martini M. E.: Liver autotransplantation into the pancreas. *Transplantation* 1982, 34:108-109
 32. Groth G. C.; Arborgh B.; Bjorken C.; Sundbergh B; Lundgren G.: Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyl transferase deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 1977, 9:313-316
 33. Makowka L; Falk R. E; Rotstein L. E, et al: Reversal of experimental acute hepatic failure in the rat. *J Surg Res* 1980, 29:479-487,
 34. Makowka L.; Rotstein L. E.; Falk R. E.; Falk J. A.; Zulk R.; Langer B.; et al.: Allogeneic and xenogeneic hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 1981, 13:855-859,
 35. Numata M.; Sutherland D. E. R.; Matas A. J.; Simmons R. L.; Najarian J. S.: Allogeneic liver cell transplantation for experimental acute hepatic failure. *Surg Forum* 1977, 28:307-309,
 36. Sommer B. G.; Sutherland D. E. R.; Matas A. J.; Simmons R. L.; Najarian J. S.: Hepatocellular transplantation for treatment of D-Galactosamine induced acute liver failure in rats. *Transplant Proc* 1979, 11:578-584
 37. Makowka L.; Rotstein L. E; Falk R. E. et al Reversal of toxic and anoxic induced hepatic failure by syngeneic, allogeneic and xenogeneic hepatocyte transplantation. *Surgery* 1980, 88, 244-253
 38. Makowka L.; Rotstein L. E.; Falk R. E. et al: Studies into the mechanism of reversal of experimental acute hepatic failure by hepatocyte transplantation. *Can J Surg* 1980, 24:39:44,
 39. Matas A. J.; Sutherland D. E. R.; Steffes M. W.; Mauer S. M.; Lowe A.; Simmons R. L.; et al.: Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science* 1976, 192:892-894
 40. Cuervas-Mons V; Cienfuegos J. A.; Maganto P., Golitsin A, Eroles G, Castillo-Olivares J, et al: Time related efficacy of liver cell isografts in fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1984, 38:23-25
 41. Minato M.; Houssin D.; Demma I.; Morin J, Gigou M, Szekeley AM, et al: Transplantation of hepatocyte for treatment of surgically induced hepatic failure in the rat. *Eur Sur Res.* 1984, 16:162-169
 42. Hamaguchi H, Yamaguchi Y, Goto M, Misumi M, Hisama N, Miyanari N, et al. Hepatic biliary transport after hepatocyte transplantation in the Eizai hyperbilirubinemic rats. *Hepatology* 1994, 20:220-224.
 43. Mito M.; Ebata H.; Kusano M.; Onishi T.; Hiratsuko M.; Saito T: Studies on ectopic liver utilizing hepatocyte transplantation into the rat spleen. *Transplant Proc* 1979, 11:585-591,
 44. Gupta S, Aragona E, Vemuru RP, Bhargava KK, Burk RD, Chowdhury JR. Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implication for gene therapy and liver repopulation. *Hepatology* 1991, 14:144-149
 45. Gupta S, Lee-C B, Vemuru RP, Bhargava KK. Indium-labeling of hepatocytes for analyzing biodistribution of transplanted cells. *Hepatology* 1994, 19:750-757
 46. Darby H.; Gupta S, Johnstone R, Selden C, Hodgson HJ. Observation on rat spleen reticulum during the development of syngeneic hepatocellular implants. *Br J Exp Path* 1986, 67:329-339,
 47. Nordlinger B, Wang SR, Bouma ME, Verthier N, Hillan Delelo R, et al. Can hepatocytes proliferate when transplanted into the spleen. *Eur Surg Res* 1987, 19:381-387,
 48. Cuervas-Mons V; Cienfuegos J. A.; Maganto P; Rodriguez V. Eroles G.; Pinedo L.; et al.: Long-term term evaluation of isolated syngeneic hepatocytes transplanted into the normal rat spleen by the Tc-99m-HIDA scintigraphy. *Transplantation* 1985, 39:87-90,
 49. Racine L, Scoazec JY, Verthier N, Bernuau D, Feldmann G. Morphological aspects of hepatocytes transplanted into the spleen. *Transplantation* 1994, 5:129-135,
 50. Ebata H.; Kusano M.; Onishi T.; Saito T.; Mito M: Liver regeneration utilizing isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Surg Forum*, 1978, 29:338-340
 51. Kato K, Onodera K, Sawa M, Imai M, Kawahara T, Kasai, et al. Effect of hepatocyte growth factor on the proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in rats. *Biochem & Biophys Res Comm* 1996, 222:101-106
 52. Hillan K. J.; Burt A. D.; George W. D.; Bradley J. A.: Transplantation of isolated hepatocytes into animals with experimental liver injury. *J. Hepatol* 1987, 5(suppl 1):144.
 53. Lee G.; Medhne D.; Finkelstein S.; Totematsu M.; Makowka L.; Farber E.: Transplantation of hepatocytes from normal and preneoplastic livers into spleens of syngeneic host rats. *Transplantation* 1983, 36:218-221,
 54. Kusano M. Mito M.: Observations on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterology*, 1982, 82:616-628
 55. Maganto P, Traber PG, Rusnell C, Dobbins WO, Keren D, Gumucio JJ. Long-term maintenance of the adult pattern of liver specific expression of P-450b, P-450e, albumin and alpha-fetoprotein genes in intrasplenically transplanted hepatocytes. *Hepatology* 1990, 11:585-592,
 56. Vroemen JPAM, Blanckaert N, Buurman WA, Heirwegh KPM, Kootstra G. Treatment of enzyme deficiency by hepatocyte transplantation in rats. *tr:J Surg Res* 1985, 39:267-275,
 57. Mito M, Ebata H, Kusano M, Onishi T, Saito T, Sakamoto S. Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Transplantation*, 1979, 28:499-505
 58. Lamers W, Been W, Charles R, Moorman FM. Hepatocytes explanted in the spleen preferentially express carbamoylphosphatase synthetase rather than glutamine synthetase. *Hepatology* 1990, 12:701-709
 59. Maganto P; Cienfuegos J. A.; Santamar?a L. Eroles G.; Andres S.; Castillo-Olivares J. L. Municio A. M.: Hepatocyte transplantation. Possible treatment for urea cycle enzymatic defects. *J Hepatol* 1987 4(suppl 1):30
 60. Panis Y, Puts JP, Ballet F, Perrin E, Delelo R, Verthier N, et al. The isolated perfused rat spleen. An original method for studying the function of hepatocytes transplanted into the spleen. *Transplantation* 1990, 49:756-759
 61. Vroemen J. P; Buurman W. A.; van der Linden C. J., Heirwegh KP, Schutte B, Coenegracht J, et al: Recent developments in experimental hepatocyte transplantation. *Transplant Proc*, 1987, 19:3927-3929

62. Cuervas-Mons V.; Cantón T.; Escandón J, Nieto J, Ramos J, Menéndez J, et al: Monitoring of the rejection of intrasplenic hepatocyte allografts and xenografts. in the rat using technetium 99m-imidoacetic acid scanning. *Transplant Proc* 1987, 19:3850-3851
63. Demetriou A. A.; Whiting J, Levenson SM, Chowdhury NR, Schechner R, Michalski S. et al: New method of hepatocyte transplantation and extracorporeal liver support. *Ann Surg* 1986, 204:259-271
64. Demetriou AA, Whiting JF, Feldman D, Levenson SM, Chowdhury NR, Moscioni AD, et al. Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes. *Science* 1986, 233:1190-1192,
65. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994, 263:1149-1152
66. Sutherland D. E. R.; Matas A. J.; Steffes M. W.; Simmons R. L. Najarian J. S.: Transplantation of liver cells in an animal model of congenital enzyme deficiency disease: the Gunn rat. *Transplant Proc* 1977. 9:317-318,
67. Nieto J. A., Cantón T., Gonzalez Quintela A., Cuervas-Mons V.: Influence of the cellular dose in the effectiveness of hepatocellular transplantation in experimental liver disease. *J Hepatol* 1988, 7 (suppl 1): 65,
68. Eguchi S, Kamlot A, Ljubimova J, Hewitt WR, Lebow LT, Demetriou AA, et al. Hepatocyte transplantation facilitates liver regeneration in rats with fulminant hepatic failure. *Surg Forum* 1996, 47:445-448
69. - Eroles G.; Maganto P. Pinedo I. et al: Development of an experimental model of cirrhosis and its treatment by syngeneic hepatocyte transplantation into the rat spleen. *Eur Surg Res* 1983, 15(supl 1):27,
70. Martín J.; Cuervas-Mons V.; Colás A.; Diz M.; Tormo J.: Intrasplenic hepatocellular transplantation as a hepatic support measure in cirrhotic dogs: preliminary results. *Transplant Proc* 1987, 19:3930-3931,.
71. Martin J., Colás A., Diz M., Cuervas-Mons V.: Allograft transplantation of hepatocytes into spleen prolongs survival in cirrhotic dogs and improves their albumin levels. *Transplant Proc* 1989 21:3520.
72. Ribeiro J, Nordlinger B, Ballet F, Cynober L, Boudray-Lucas C, Baudrimont M, et al. Intrasplenic hepatocellular transplantation corrects hepatic encephalopathy in portacaval shunted rats. *Hepatology*, 1992, 15:12-17
73. Rugstad H. E.; Robinson S. H.; Yanuoni C.; Tashjian A. H. Jr.: Transfer of bilirubin uridine diphosphate glucuronyl-transferase to enzyme deficient rats. *Science*, 1970, 170:553
74. Cantón T.; Cuervas-Mons V.; Nieto J.; Chafer M.; Gea T.; Castillo-Olivares J. L.; et al.: Effect of intrasplenic hepatocellular transplantation in homozygous Gunn rat using cyclosporine as immunosuppressor. *Transplant Proc* 1987, 19: 3852-3853
75. Sebrow O; Gacmartan Z.; Orlandi E; Chewdhury R.; Arias I. M.: Replacement of hepatocyte UDP-glucuronyl transferase activity in homozygous Gunn rats. *Gastroenterology* 1980 78:1332.
76. Holzman MD, Rozga J, Neuzil DE, Griffin D, Moscioni AD, Demetriou AA. Selective intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic and Gunn rats. *Transplantation* 1993, 55:1213-1219.
77. Holzman MD, Rozga J, Moscioni AD, et al. Selective intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic and Gunn rats. *Transplantation* 1993, 55:1213-1219
78. Moscioni AD, Rozga J, Chen S, Naim A, Scott HS, Demetriou AA. Long-term correction of albumin levels in the Nagase analbuminemic rat: repopulation of the liver by transplanted normal hepatocytes under a regenerative response. *Cell Transplant* 1996, 5:499-503
79. Wang J, Pollak R, Bartholomew A. Sustained reduction of serum cholesterol levels following allotransplantation of parenchymal hepatocytes in Watanabe rabbits. *Trans Proc*, 1991 23:894-895
80. Wiederkehhr JC, Kondos GT, Pollak R. Hepatocyte transplantation for the low-density lipoprotein receptor-deficient state: a study in the Watanabe rabbit. *Transplantation* 1990, 50:466-471
81. Wilson JM, Chowdhury NR, Chowdhury JR et al. Transplantation of allogeneic hepatocytes into LDL-receptor deficient rabbits leads to transient improvement in hypercholesterolemia. *Clin Biotechnol* 1991, 3:21-26.
82. Wilson JM, Chowdhury JR. Prospects for gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Mol Biol Med* 1990, 7:223-232,
83. Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, Chowdhury JN, Baker JR Jr, Wilson JM. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* 1991, 254:1802-1805,
84. Eguchi S, Rozga J, Lebow LT, Chen SC, Wang CC, Rosenthal R, et al. Treatment of hypercholesterolemia in the Watanabe rabbit using allogeneic hepatocellular transplantation under a regeneration stimulus. *Transplantation* 1996, 62:1-6
85. Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, et al. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinemia type 1. *Nature genet* 1996, 12:266-273
86. Yoshida Y, Tokusashi Y, Lee GH, Ogawa K. Intrasplenic transplantation of normal hepatocytes prevents Wilson's disease in Long-Evans cinnamon rats. *Gastroenterology* 1996, 111:1654-1660
87. Onodera K, Kasai S, Kato K, Nakazawa F, Mito M, et al. Long-term effect of intrasplenic hepatocyte transplantation in congenitally ascorbic acid biosynthetic enzyme-deficient rats. *Cell Transplant* 1995, 4(suppl 1):41-43
88. Nakazawa F, Onodera K, Kato K, Sawa M, Kino Y, Imai M, et al. Multilocational hepatocyte transplantation for treatment of congenital ascorbic acid deficiency rats. *Cell Transplant* 1996, 5(suppl 1):23-25
89. Kocken JM, Borel Rinkes IHM, Bijma AM. Correction of an inborn error of metabolims by intraportal hepatocyte transplantation in a dog model. *Transplantation* 1996, 62:358-364
90. Benedetti E, Kirby JP, Asolati M, Blanchard J, Ward MG, Williams R, et al. Intrasplenic hepatocyte transplantation in dalmatian dogs with and without cyclosporine immunosuppression. *Transplantation* 1997, 63:1206-1209
91. Peeter MJ, Lieber A, Perkins J et al. Method of multiple portal vein infusion in mice: quantitation of adenovirus-mediated hepatic gene transfer. *Biotechniques* 1996, 20:278-285
92. Weiderkehr JC, Kondos GT, Pollak R. Hepatocyte transplantation for the low density lipoprotein receptor-deficient state: a study in the Watabane rabbit. *Transplantation* 1990, 50:466-476
93. Gupta S, Chowdhury RN, Jagtiani R, Gustin K, Aragona E, Shafritz DA, et al. A novel system for transplantation of isolated hepatocytes utilizing HbsAg producing transgenic donor cells. *Transplantation* 1990, 50:472-475
94. Habibullah CM, Ayesa Q, Khan AA, Naithani R, Lahiri S. Xenotransplantation of UV-B irradiated hepatocytes. Survival and immune response. *Transplantation* 1995, 59:1495-1497
95. Karrer F, Bilir B, Gill R, Ostrowska A, Stegall M, Wachs M, et al. Cryopreserved hepatocytes are poor stimulators of in vivo cytotoxicity. *Abstracts International Transplant Society, Barcelona* 1996, 452.
96. Roger V, Balladur P, Honiger J, Baudrimont D, Delelo R, Robert A et al. Internal bioartificial liver with xenogeneic hepatocytes prevents death from acute liver failure. *Ann Surgery* 1998, 228:1-8

97. Mehigan DG, Bell WR, Zuidema GD, Eggleston JC, Cameron JL. Disseminated intravascular coagulation and portal hypertension following pancreatic islet autotransplantation. *Ann Surg* 1980, 191:287-293
98. Walsh TJ, Eggleston JC, Cameron JC. Portal hypertension, hepatic infarction and liver failure complicating pancreatic islet transplantation. *Surgery* 1982, 91:485-488
99. Cienfuegos J. A.; Cuervas-Mons V; Maganto P et al. Hipertensión portal y coagulación intravascular diseminada: complicaciones no descritas del trasplante hepatocelular en bazo. *Rev Quir Esp* 1985, 12:159-162
100. Rosenthal R, Chen SC, Hewitt W, Wang CC, Eguchi S, Geller S, et al. Techniques for intrasplenic hepatocyte transplantation in the large animal model. *Surg Endoscopy* 1996, 10:1075-1079
101. Nieto J. A, Escandón J, Betancor C, Ramos J, Cantón T, Cuervas-Mons V: Evidence that temporary complete occlusion of splenic vessels prevents massive embolization and sudden death associated with intrasplenic hepatocellular transplantation. *Transplantation* 1989. 47:449-450
102. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994, 58:951-952
103. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplant in terminal liver failure. *Transplantation* 1997, 63:1148-1154
104. Bilir B, Durham JD, Kristal J et al. Transjugular intraportal transplantation of cryopreserved human hepatocytes in a patient with acute liver failure (abstract). *Hepatology* 1996, 24:728
105. Mito M, Kusano M, Sawa M. Hepatocyte transplantation for hepatic failure. *Transplantation Reviews* 1993, 73:5-43,
106. Mito M, Kusano M. Hepatocyte transplantation in man. *Cell Transplantation* 1993, 2:65-74.
107. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Natur Genet*, 1994, 6:335-341
108. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ3rd, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nature Med* 1995, 1:1148-1154