Tratamiento de enfermedades genéticas de base hepática mediante terapia celular

Mula Rey N[1], Arahuetes RM[2], Cubero FJ[1], Codesal FJ[3], García Barrutia S[4], De Andrés S[1], Ortiz A[2], Cantarino H[2], Maganto P[1]

[1]Servicio de Cirugía Experimental. Hospital Universitario Puerta de Hierro
[2]Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense
[3]Departamento de Morfología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma
[4]Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad Complutense
Madrid

El pronóstico de muchas enfermedades ha cambiado en los últimos años debido a los grandes cambios que ha habido en el campo de los trasplantes y particularmente en el trasplante ortotópico de hígado (TOH)[1-2].

El TOH es una técnica de gran envergadura que está complicada por la existencia de diversos problemas, entre los cuales hay que destacar la falta de órganos de donantes, la necesidad absoluta que tienen los enfermos de usar fármacos inmunodepresores de forma crónica y los costes elevadísimos asociados con este tipo de tratamiento[3].

En los años 70 Rugstad[4] y Mukherjee y Krasner[5] fueron los primeros en trasplantar hepatocitos en ratas con una enfermedad genética de base hepática. El primero de los trabajos no tenía como objetivo el tratamiento de la enfermedad, sino el estudio de la función de las células trasplantadas; basándose en esto, el trabajo de Krasner comenzó a explorar el potencial terapéutico del trasplante. De esta manera, se abrió el campo del trasplante de hepatocitos como una posibilidad alternativa al trasplante ortotópico de hígado, encaminada a superar los grandes problemas de la falta de donantes y a reducir el tiempo de espera para trasplante de pacientes candidatos a trasplante de hígado, ya sea por fallo hepático agudo o por enfermedades metabólicas[6-19]. Asimismo, el interés por el uso de hepatocitos fetales ha ido en aumento en los últimos tiempos y diversos trabajos han demostrado que fragmentos fetales trasplantados en bazo se mantienen y proliferan[20,21] y los hepatocitos fetales aislados y trasplantados no sufren procesos de desdiferenciación, lo cual constituía una de sus grandes desventajas teóricas[22].

Numerosos estudios han demostrado las posibilidades del trasplante hepatocelular (THC) como soporte hepático en diversas situaciones y han contribuido a ampliar el conocimiento existente sobre diversas características de las células hepáticas, como su capacidad de regeneración, diferenciación y muchos de los mecanismos moleculares que determinan el comportamiento y evolución de los hepatocitos trasplantados[23-29].

El THC ofrece algunas ventajas considerables, cuando se compara con el trasplante ortotópico de hígado[30]:

- Es menos invasivo que el TOH y puede ser realizado con anestesia local.
- Se pueden emplear células procedentes de un donante para varios receptores y un solo receptor puede recibir células de varios donantes diferentes.
- Las células pueden ser criopreservadas, lo cual permite su uso en el momento adecuado, y pueden ser manipuladas genéticamente con más facilidad que un órgano completo.
- El uso de células permite, en determinados casos, el trasplante autólogo, es decir, el trasplante de células obtenidas del hígado del propio enfermo después de una manipulación genética *ex vivo*. Esta última estrategia parece permitir la corrección de deficiencias

enzimáticas y mejorar los síntomas de la enfermedad o incluso curar al enfermo[31].

La posibilidad de criopreservación es de gran interés[32-33], puesto que permitiría a los enfermos con una hepatitis fulminante ser trasplantados sin necesidad de esperar un donante, lo cual en ocasiones es causa de muerte. Los hepatocitos criopreservados y descongelados mantienen intacta su funcionalidad a pesar de la disminución de viabilidad ocasionada por estos procesos[34- 36].

Diferentes grupos de trabajo han demostrado que los hepatocitos aislados son capaces de sobrevivir en localizaciones anatómicas ectópicas, como el bazo, el tejido adiposo, pulmón y cavidad peritoneal[37-40]. Dentro de estas localizaciones, el bazo es considerado como una de las más adecuadas para el implante de hepatocitos desde los tempranos trabajos del grupo de Mito[41-43]. Es un órgano capaz de alojar un número relativamente grande de hepatocitos, su situación anatómica es adecuada ya que se encuentra en el eje esplenoportal y, en caso de rechazo, puede ser extirpado sin peligro para la vida del receptor. Los hepatocitos trasplantados en bazo, además, migran al hígado a través de la vena porta y una vez allí son capaces de entrar en el parénquima hepático y mantenerse en el mismo.

El THC se asocia con una morbi-mortalidad menor que el TOH y puede ser usado como un soporte temporal en casos de hepatitis fulminante y cirrosis, y como un soporte permanente en el caso de errores congénitos del metabolismo[22,44]. Así y todo, el THC tiene limitaciones como la mayoría de las medidas terapéuticas y cuestiones que deben ser dilucidadas, como el momento adecuado para la realización del trasplante y el número de células a implantar para que la medida sea realmente eficaz. Estas y otras preguntas relacionadas con la funcionalidad de las células, su capacidad de regeneración y la prevención de rechazo, son motivo de estudio por varios grupos de investigación. Así, es importante el establecimiento de técnicas y métodos para conseguir una supervivencia y funcionalidad óptima de los hepatocitos en su lugar de implante, y el estudio de THC en diferentes modelos de enfermedad con el fin de dilucidar las enfermedades en que se puede usar esta terapéutica y la consecución de fuentes alternativas de hepatocitos[45-49].

Como hemos señalado con anterioridad, uno de los principales campos de aplicación del THC será, con toda probabilidad, el tratamiento de enfermedades genéticas de base hepática. Existen varios modelos animales de enfermedades metabólicas hepáticas, de entre los cuales consideramos particularmente atractivos dos, ya que tienen un equivalente prácticamente idéntico en humanos: se trata de la rata analbuminémica Nagase (NAR) y de la rata hiperbilirrubinémica Gunn (GHR).

La NAR es una raza mutante de Sprague-Dawley. Es portadora de una mutación consistente en la deleción de 7 pares de bases de uno de los intrones del gen de la albúmina, cuyo resultado es la síntesis de un mRNA defectuoso. El animal es hipoalbuminémico, con valores de 0,004 g/dl en lugar de 3,5 g/dl en ratas normales. Es un modelo de hipoalbuminemia, una enfermedad poco frecuente, cuya prevalencia es menor de 1/1.000.000. Los síntomas de la enfermedad son hiperlipidemia, fatiga moderada y edemas. No es una enfermedad grave y se puede controlar mediante una dieta adecuada. El trasplante intraesplénico de hepatocitos, ya sean adultos o fetales, suministra la proteína que falta y corrige al menos en parte el déficit[22,42]. Además, se ha comprobado que ni los hepatocitos adultos ni los fetales se malignizan.

La GHR es un modelo experimental del síndrome de Crigler-Najjar[50]. Es una raza mutante de la Wistar y es portadora de una mutación puntual que consiste en la deleción de un residuo de guanosina en el exón IV, cuyo resultado es la falta de actividad bilirrubina-UDP-glucuronosil transferasa. Esto da lugar a la aparición de niveles séricos de bilirrubina muy elevados que pueden alcanzar los 20 mg/dl. El síndrome de Crigler-Najjar y el defecto en la GHR se heredan de forma autosómica recesiva, que en su

forma homocigota causa kernicterus y muerte temprana del paciente. La enzima que falta en este síndrome (la bilirrubina-UDP-glucuronosil transferasa) es detectable al final del periodo de gestación en la rata y alcanza los niveles adultos a partir de un mes de vida extrauterina[51]; es detectable el mRNA correspondiente a partir del día 13 de gestación[42].

El THC, tanto adultos como fetales, es capaz de suministrar la enzima y normalizar los niveles séricos de bilirrubina[52].

El comportamiento de los hepatocitos fetales y adultos trasplantados, en lo que se refiere a adaptación a su nuevo ambiente, presenta algunos matices interesantes y que pueden desempeñar cierto papel en cuanto a su aplicación terapéutica. Los hepatocitos fetales trasplantados no comienzan a expresar funciones específicas hepáticas inmediatamente después del trasplante, tal y como hacen los adultos; de esta manera, ambos tipos celulares expresan una funcionalidad máxima en momentos diferentes y también su patrón de expresión de diversos genes es diferente en el tiempo[22,42,52]. En ambos modelos experimentales, los hepatocitos trasplantados proliferan en su lugar de implante. Nuestro grupo ha estudiado este fenómeno mediante la determinación de la actividad de la enzima timidina-quinasa y la presencia de PCNA.

La timidina-quinasa es una enzima de la ruta de las pirimidinas que cataliza la fosforilación de timidina a timidina-5'-monofosfato. Su actividad y los niveles de mRNA varían dependiendo de la fase del ciclo celular en un número elevado de células de mamíferos. Bajo condiciones normales, no es detectable en fluidos extracelulares ni en plasma, mientras que cuando hay una proliferación celular muy activa sus concentraciones se elevan extraordinariamente.

El PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) es una proteína auxiliar de la DNA polimerasa delta y es expresado en la fase G1, a través de la fase S y durante la mitosis, e indica por tanto la situación proliferativa de la célula.

Los estudios realizados han demostrado que la tasa de proliferación de los hepatocitos trasplantados es baja; éste es un detalle de gran trascendencia en la aplicación terapéutica de la técnica, ya que para que funcione de manera óptima sería necesaria una elevada tasa de repoblación del hígado receptor por las células trasplantadas, para lo cual es esencial desarrollar un método que proporcione una ventaja selectiva de proliferación a las células trasplantadas con relación a las del hígado receptor[53-55].

Entre los métodos utilizados, merece cierta consideración el que emplea retrorsina y triyodotironina[56-59]. La retrorsina (RS) es un alcaloide de la familia de las pirrolicidinas que se une al DNA y se puede emplear para inhibir la capacidad de replicación de los hepatocitos del hígado del receptor[60]. Aunque en el campo de la práctica clínica el uso de la RS y de otros compuestos con el mismo efecto es peligroso, ya que pueden dar lugar a procesos tumorales, merece la pena explorar la posibilidad de inhibir la división de los hepatocitos huésped y provocar la de los trasplantados por los beneficios que se pueden desprender para el desarrollo de estrategias de uso clínico.

El uso de la hormona tiroidea T3 se basa en su efecto mitogénico sobre los hepatocitos y otros tipos celulares[61-67].

Otros dos puntos de máxima relevancia en este campo son el control del rechazo y la posibilidad de generar tolerancia inmunológica a los trasplantes. Los hepatocitos alogénicos provocan una respuesta similar a la observada con el TOH, es decir, las personas trasplantadas con hepatocitos necesitan terapia inmunosupresora de por vida[68-69] igual que cualquier otro trasplantado.

Es comprensible, por tanto, que la investigación encaminada a encontrar nuevos fármacos inmunosupresores es continua, aunque, por el momento, sólo ha tenido un éxito limitado. En la actualidad, se trabaja con diversas aproximaciones experimentales, entre las cuales merecen destacarse las que se basan en el papel que desempeña el timo en los procesos fisiológicos de rechazo y de generación de autotolerancia[70,71].

El timo es el órgano en el que células procedentes de la médula ósea se transforman en linfocitos T maduros, capaces de generar respuestas inmunes. Este ha sido el motivo de que diferentes grupos de investigadores estén explorando la posibilidad de inducir tolerancia inmunológica mediante la inyección intratímica de diferentes tipos celulares y antígenos[72-78].

Nuestro grupo ha estudiado el efecto del trasplante intratímico de hepatocitos alogénicos[79,80]. En estos estudios, el animal receptor fue la GHR y el donante, la rata Fisher 344. La inyección intratímica de 10 millones de hepatocitos provocó un aumento notable de la subpoblación linfocitaria CD4+, al tiempo que la subpoblación CD4+/CD8+ disminuía 72 horas después del trasplante. Estas mismas poblaciones CD4+ y CD4+/CD8+ no cambiaron en sangre periférica. Los hallazgos nos animaron a comprobar si se trataba de células y si aparecían poblaciones linfocitarias implicadas en procesos de regulación de autotolerancia. En efecto, pudimos determinar que las poblaciones CD4+ eran también linfocitos maduros CD3+ y CD25+, lo que indica que están implicadas en los fenómenos reguladores a los que hacíamos referencia. En este estudio pudimos comprobar que en un grupo de animales que fueron inmunodeprimidos 24 horas antes del trasplante intratímico, los hepatocitos sobrevivieron durante 6 semanas, tanto en los lóbulos tímicos como en los ganglios linfáticos adyacentes al timo. Este fenómeno no ocurrió en animales que no habían recibido ciclosporina A, previamente al implante.

TRASPLANTE DE HEPATOCITOS PARA LA CORRECCIÓN DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS. EXPERIENCIA CLÍNICA Y PERSPECTIVAS

Después de más de 20 años de trabajo experimental, el THC se está empezando a abrir paso en la clínica para el tratamiento de diferentes enfermedades del hígado[81,82] y la corrección de enfermedades hereditarias de base hepática mediante trasplante intrauterino de hepatocitos en diferentes estados de desarrollo. Los últimos estudios sugieren que el THC es prometedor para el tratamiento de pacientes con enfermedades hepáticas.

Los primeros THC con fines terapéuticos se realizaron en los años 70 y no fueron para tratar enfermedades hepáticas sino para el tratamiento de inmunodeficiencia grave y enfermedad de Fabry[83,84]. En estos casos, los hepatocitos se usaron como sustitutos de células de médula ósea.

En 1992, M. Mito y su grupo, pioneros en este campo, publicaron los datos referentes al THC en 10 pacientes con distintas enfermedades hepáticas[85,86]. Hubo claras pruebas de la supervivencia de las células en dos casos, pero en el resto resultó difícil demostrar la eficacia real del trasplante.

Hacia ese mismo tiempo, J. Wilson y su grupo utilizaron la técnica del THC para el tratamiento de varios pacientes con hipercolesterolemia familiar por falta de receptores de LDL[87,88]. Éste constituyó el primer protocolo de terapia génica dirigida al hígado, ya que los pacientes fueron sometidos a una hepatectomía parcial y sus propios hepatocitos fueron manipulados genéticamente y autotrasplantados. Este procedimiento demostró la falta de complicaciones que provoca el THC, pero la corrección metabólica fue modesta en todos los casos.

Otros investigadores han trasplantado hepatocitos alogénicos a pacientes con diversas enfermedades genéticas de base hepática, entre ellas déficit de ornitina-transcarbamilasa, deficiencia de alfa-1-antitripsina, enfermedades por almacenamiento de glucógeno, enfermedad de Refsum y síndrome de Crigler-Najjar de tipo[89-94].

Todos estos trabajos han demostrado que el THC constituye un procedimiento seguro cuyo resultado es la mejoría del paciente o la mejoría de diversos parámetros relacionados con la enfermedad. Así y todo, no cabe duda de que el trasplante de hepatocitos debe superar un número de problemas antes de convertirse en un procedimiento

de rutina. Como ya se ha visto, no está clara, por ejemplo, la cantidad necesaria de células ni el momento óptimo para el trasplante, dos parámetros de la máxima trascendencia.

En cualquier caso, no parece existir duda alguna sobre el potencial terapéutico de las diferentes modalidades de trasplante hepatocelular y terapia génica dirigida al hígado; otras técnicas, como el uso de células madre, también parecen abrirse paso en el campo del tratamiento de las enfermedades hepáticas[95,96].

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos de nuestro grupo, a los que se hace referencia en la presente revisión, han sido realizados gracias a la siguiente financiación: proyectos de investigación FIS 94/0313, FIS 97/00444-01 &02 y FIS 01/0001-01 y 02 del Instituto de Salud Carlos III, y CAM 08.6/0027.1/1998 y 08.6/0027.2 de la Comunidad Autónoma de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shneider BL. Pediatr Transplant 2002;6:25.
2. Kayler LK, Merion RM, Lee S. Pediatr Transplant 2002;6:295.
3. Thalheimer U, Capra F. Dig Dis Sci 2002;47:945.
4. Rugstad HE, Robinson SH, Yannoni C, Tashijian AJ Jr. Science 1970;170:553.
5. Mukherjee AB, Krasner J. Science 1973;182:68.
6. Bumgardner GL, Fasola C, Sutherland DE. Hepatology 1988;8:1158.
7. Strom S, Fisher R. Gastroenterology 2003;124:568.
8. Sutherland DER, Numata M, Matas AJ, et al. Surgery 1977;82:124.
9. Winkler M, Haller G, Oldhafer K, et al. Transplantation 1996;62:1063.
10. Vega ML, Cienfuegos JA, Benito C, et al. Transplant Proc 1992;24:2982.
11. Arkadopoulos N, Rozga J, Petrovic L, et al. En Mito M, Sawa M (Ed). Hepatocyte Transplantation. Karger Landes Systems. Basel, Freiburg, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney 98; 1997: 98.
12. Fisher RA, Bu D, Thompson M, et al. Cell Transplantation 2004;13:677.
13. Ambrosino G, Basso SMM, Varotto S, et al. Cell Transplantation 2003;2:43.
14. Chamuleau RAFM. En: Mito M, Sawa M (Ed). Hepatocyte Transplantation. Karger Landes Systems, Basel, Freiburg, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney; 1997: 159.
15. Eroles G, Maganto P, Pinedo I, et al. Eur Surg Res 1983;15:27.
16. Nozawa M, Kokudo N. En: Mito M, Sawa M (Ed). Hepatocyte Transplantation. Karger Landes Systems, Basel, Freiburg, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney; 1997: 181.
17. Onodera K, Ebata H, Sawa M, et al. Cell Transplantation 1994;3:S31.
18. Vroemen JPAM, Buurman WA, Heirwegh KPM, et al. Transplantation 1986;42:130.
19. David P, Alexandre E, Auder M, et al. Cell Transplantation 2001;10:80.
20. Ebata H, Mito M. Transplantation 1985;39:77.
21. Hagihara M, Shimura T, Takebe K, et al. Cell Transplantation 1994;3:283.
22. Sierra E, Maganto P, Codesal J, et al. Life Sciences 2000;67:2417.
23. Sutherland DER, Numata M, Matas AJ, et al. Surgery 1977;82:124.
24. Vroemen JPAM, Buurman WA, Heirwegh KPM, et al. Transplantation 1986;42:130.
25. Eroles G, Maganto P, Cienfuegos JA, et al. En: Soeters PB, Wilson JHP, Meijer AJ, Holm E (Ed). Advances in ammonia metabolism and hepatic encephalopathy. Elsevier Science Publishers, Amsterdam; 1988: 13.
26. Makowka L, Rotstein LE, Falk RE, et al. Surgery 1980;88:244.
27. Kusano M, Mito M. Gastroenterology 1982;82:616.
28. Maganto P, Traber PG, Rusnell C, et al. Hepatology 1990;11:585.
29. Maganto P. En: Mito M, Sawa M (Ed). Hepatocyte transplantation. Karger Landes Systems. Basel, Freiburg, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney; 1997: 34.
30. Grompe M. Hum Ce 1999;l12:171.
31. Grompe M. J Inherit Metab Dis 2001;24:231.
32. Fuller BJ. J Hepatol 1988;7:368.
33. Naik S, Santangini HA, Trenkler DM, et al. Cell Transplantation 1997;6:447.
34. Maganto P, Cienfuegos JA, Santamaría L, et al. Criobiology 1988;25:311.

BIBLIOGRAFÍA

35. Maganto P, Cienfuegos JA, Santamaría L, et al. J Surg Res 1990;48:24.
36. Soriano HE, Grompe MJ. Pediatr Gastroenterol Nutr 2002;35:S51.
37. Jirtle RL, Biles C, Michalopoulos G. Am J Pathol 1980;101:115.
38. Nagaki M, Kano T, Muto Y, Yamada T, et al. Gastroenterologia Japonica 1990;25:78.
39. Sandbichler P, Erhart R, Margreiter R. En: Mito M, Sawa M (Ed). Hepatocyte Transplantation. Karger Landes Systems, Basel, Freiburg, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney; 1997: 67.
40. Onodera K, Ebata H, Sawa M, et al. Transplantation Proceedings 1992;24:3006.
41. Mito M, Ebata H, Kusano M, et al. Transplant Proc 1979;9:585.
42. Mito M, Ebata H, Kusano M, et al. Transplantation 1979;28:499.
43. Kusano M, Mito M. Gastroenterology 1982;82:616.
44. Cubero FJ, Arza, E, Maganto P, et al. Dig Dis and Sc 2001:46:2762.
45. Malhi H, Gupta S. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2001;8:40.
46. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Hepatology 2000;32:11.
47. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Nat Med 2000;6:1229.
48. Strom S, Fisher R. Gastroenterology 2003;124:568.
49. David P, Alexandre E, Chenard-Neu MP, et al. Lab Anim 2002;36:158.
50. Ortiz A, Cantarino MH, Bustamante N, et al. Book of the 3rd FEPS Congress. Poujeol P, Petersen, O (Ed). 2003: 167.
51. Cubero FJ, Maganto P, Mula N, et al. Cell Proliferation 2005 (in press).
52. Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, et al. Nat Gene 1996;12:266.
53. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, et al. Science 1994;263:1149.
54. Gupta S, Gorla GR, Irani AN. J Hepatol 1999;30:162.
55. Chowdhury JR, Kondapalli R, Chowdhury NR. Adv Vet Sci Comp Med 1993;37:149.
56. Wilson JM. Nat Genet 1996;12:232.
57. Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, et al. Am J Pathol 1998;153:319.
58. Guo D, Fu T, Nelson JA, et al. Transplant 2002;73:1818.
59. Oren R, Dabeva MD, Karnezis AN, et al. Hepatol 1999;30:903.
60. Forbes SJ, Themis M, Alison MR, et al. Gene Therapy 1998;5: 552.
61. Francavilla A, Carr BI, Azzarone A, et al. Hepatology 1994;20:1237.
62. Columbano A, Shinozuka H. FASEB Journal 1996;10:1118.
63. Ohmura T, Katyal SL, Locker J. Cancer Research 1997;57:795.
64. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Science 1997;276:60.
65. Malik R, Mellor N, Selden C, Hodgson H. Hepatology 2003;37:79.
66. Maganto P, Cienfuegos JA, Santamaría LJ, et al. Eur Surg Res 1988;20(4):248.
67. Markus PM, Krause P, Fayyazi A, et al. Cell Transplantation 1997;6:77.
68. Fung JJ. Liver Transplantation and Surgery 1999;5:S90.
69. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. En: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. (Ed), Cellular and Molecular Immunology. WB Sanders Company; 1997: 400.
70. Posselt AM, Barker CF, Tomaszewski JE, et al. Science 1990;249:1293.
71. De Vries der Zwan A, van der Pol MA, Besseling AC, et al. Bone Marrow Transplant 1998;22:91.
72. Guerra N, Goettelfinger P, Lecerf F, et al. Transplant Immunol 2000;8:31.
73. Remuzzi G, Rossini M, Imberti O, et al. Lancet 1991;337:750.
74. Seo K, Imai Y, Imamura S, et al. Heart Lung Transplant 1993;12:S230.
75. Attavar P, Budhai L, Kim B, et al. Hepatology 1997;26:1287.
76. Naji A. Curr Opin Immunol 1996;8:704.
77. Mula N, Arza E, Cubero FJ, et al. J Hepatol 2002;36:271.
78. Mula N, Cubero FJ, Codesal, J, et al. Europ Surg Res 2003;35(3):285.
79. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, et al. Transplantation 1997;63:1148.
80. Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Sem Liver Dis 1999;19:39.
81. Aiuti F, Businco L, Fiorilli M, et al. Transplant Proc 1979;11:230.
82. Touraine J, Malick M, Traeger J, et al. Lancet 1979;1:1094.
83. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Transpl Proc 1992;24:3052.
84. Mito M, Kusano M. Cell Transplant 1993;2:65.
85. Mito M, Kusano M, Sawa M. Transplant Rev 1993;7:35.
86. Raper SE, Wilson JM. Cell Transplant 1993;2:401.
87. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al. Nat Genet 1994;6:335.
88. Horslen SP, McCowan TC, Guertzen TC, et al. Pediatrics 2003;111:1262.
89. Muraca M, Gerunda G, Neri O, et al. Lancet 2002;359:317.
90. Reyes J, Rubenstein WS, Mieles L, et al. Hepatology 1996;24:308.
91. Fox IJ, Roy Chowdhury JR, Kaufinann SS, et al. N Engl J Med 1998;338:1422.
92. Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, et al. Cell Transplantation 2005;14:151.
93. Sokal EM, Smets F, Bourgois A, et al. Transplantation 2003;76:735.
94. Horslen SP, Fox IJ. Transplantation 2004;77:1481.
95. Tosh D, Strain A. J Hepatol 2005;42:S75.