



EDITORIALES

Sistemas de soporte hepático extracorpóreo: un paso más hacia las técnicas de depuración integral

J. F. Avilés, M. Macía*,** y J. García*

Servicios de Aparato Digestivo, *Nefrología y **Unidad de Investigación del Hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria. Santa Cruz de Tenerife.

Durante los últimos años se ha extendido la utilización de diversas modalidades de terapia extracorpórea en varias especialidades. La capacidad de estos sistemas en otras enfermedades distintas a la insuficiencia renal está limitada por su falta de eficacia en la eliminación de las toxinas precisas. La experiencia alcanzada en aspectos técnicos en el campo de la diálisis^{1,2} ha potenciado la investigación y aplicación de diferentes sistemas de depuración extracorpórea en situaciones de ámbito multidisciplinario. Como paradigma de la aplicación de estas medidas terapéuticas hemos evaluado el estado actual del tratamiento de los pacientes que presentan fracaso hepático.

EL HÍGADO COMO RETO DE LOS SISTEMAS DE DEPURACIÓN

El hígado es un órgano complejo cuyas múltiples funciones pueden resumirse en tres: sintética, metabólica y excretora. En la insuficiencia hepática se produce una pérdida de estas funciones, pudiéndose llegar a una situación de insuficiencia terminal con muy mal pronóstico a corto plazo.

La insuficiencia hepática puede aparecer de forma aguda sobre un hígado normal, lo que denominamos fallo hepático agudo (FHA), de forma aguda sobre una hepatopatía crónica por ejemplo por una hemorragia digestiva, una sepsis o por diversos factores hepatotóxicos como infecciones virales superpuestas, toxicidad medicamentosa o alcohol (reagu-

dización de una hepatopatía crónica) y progresivamente en el contexto de una hepatopatía crónica descompensada de larga evolución.

La aproximación inicial al tratamiento de la insuficiencia hepática es el manejo de los elementos precipitantes junto al de las complicaciones, pero finalmente suele ser necesario realizar un trasplante hepático (THO). Sin embargo, hay situaciones en que el trasplante está contraindicado o bien el órgano no llega a tiempo. Además, tanto el FHA como la reagudización de la hepatopatía crónica son potencialmente reversibles, por lo que la existencia de mecanismos de soporte que permitan conseguir tiempo para que el hígado se regenere o se lleve a cabo el THO sería fundamental. Los sistemas de soporte hepático extracorpóreos (SSHE) podrían conseguir ese objetivo. De manera esquemática estos sistemas se pueden agrupar en dos tipos en función de la presencia de hepatocitos en su estructura. Por un lado los sistemas artificiales, sin elementos celulares y basados en métodos que permiten la eliminación de toxinas (adsorción, diálisis, plasmaseparación); y por otro, los sistemas bioartificiales, que incorporan hepatocitos de diversos orígenes.

SISTEMAS ARTIFICIALES

Las estrategias seguidas en la aplicación de sistemas artificiales como método de soporte y tratamiento en pacientes con insuficiencia hepática severa han sido múltiples y variadas. La aproximación a un método eficaz para el tratamiento de los pacientes con fallo hepático ha significado un largo período de 35 años de utilización de diversas técnicas de depuración extracorpórea con resultados que en gran parte han sido desalentadores³.

Se han utilizado diversas modalidades y esquemas de tratamiento extracorpóreo para alcanzar una de-

Correspondencia: Dr. Manuel Macía
Unidad de Investigación
Hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria
Carretera del Rosario, s/n.
38010 Santa Cruz de Tenerife
E-mail: mmacia25@hotmail.com

toxificación adecuada³. En general, estos sistemas tienen capacidad para eliminar un aceptable rango de toxinas y permitir el adecuado balance hidrosalino en las situaciones de fallo hepático. No obstante, cuando se analizan los resultados obtenidos para valorar sus posibles beneficios, estos se encuentran condicionados tanto por la limitación en el tipo de toxinas eliminadas, en concreto existen problemas con aquellas unidas a la albúmina, así como por la enorme heterogeneidad de los estudios realizados, lo que impide la comparación con tratamientos convencionales⁴. Con la aplicación de las técnicas referidas debemos mantener el equilibrio entre alcanzar la mayor supervivencia del paciente, junto a una reducción de los riesgos y efectos secundarios de la técnica empleada. De esta manera algunos sistemas que emplean la absorción de sustancias (carbón activado, resinas), muestran importantes efectos adversos, entre ellos la eliminación de alguna de las moléculas que intervienen en los procesos de regeneración hepática o la activación de fenómenos de bioincompatibilidad⁵.

Tras evaluar las evidencias disponibles sobre los intentos terapéuticos en esta área, podríamos destacar el clásico estudio realizado en el King's College de Londres⁶, donde se analizó el efecto de dos esquemas de hemoperfusión diaria frente al tratamiento convencional en un grupo relevante de pacientes con FHA. Los resultados mostraron que la supervivencia era similar entre todos los grupos e independientemente del empleo de hemoperfusión y su duración.

Las estrategias posteriores, estaban dirigidas hacia el desarrollo de sistemas que incorporen membranas con una capacidad selectiva para eliminar los tóxicos deseados, al mismo tiempo que eviten el contacto directo entre la sangre y el sorbente. El primer paso ha sido el desarrollo de membranas celulósicas especiales, con una permeabilidad similar a un dializador convencional, que se encuentran integradas en un sistema descrito como hemodiabsorción o unidad de diálisis hepática, consistente en una unidad de hemodiafiltración combinada con filtros con capacidad adsorbtiva⁷. Este sistema aprobado por la FDA desde 1997 (BioLogic-DT system), ha sido utilizado en pacientes con fallo hepático agudo y crónico reagudizado. Los resultados de los estudios prospectivos y randomizados muestran una mejoría tanto del estado neurológico como de la presión arterial media (PAM) y en alguno de ellos se observaba una recuperación de la función hepática⁷. A pesar de estos esperanzadores resultados, el equilibrio definitivo entre máxima eficacia y mínimos efectos secundarios se encuentra limitado por la incapacidad de esta nueva membrana para eliminar

los tóxicos unidos a la albúmina. De hecho, en el grupo de pacientes tratados mediante el BioLogic-DT se producía una elevación de los niveles de bilirrubina (BT) tras finalizar el tratamiento⁷, lo que resulta paradójico, ya que se trata de una de las sustancias utilizadas como marcador de la eliminación de estos compuestos^{4,8}.

El empleo de la plasmaféresis como método de alto rendimiento para conseguir la eliminación de compuestos unidos a la albúmina también ha sido utilizado en el tratamiento de diferentes complicaciones del fallo hepático. Aplicada como única forma de tratamiento extracorpóreo ha mostrado un efecto beneficioso sobre los parámetros hemodinámicos, produciendo un aumento de la PAM, tanto en pacientes con fallo agudo como crónico⁹. La combinación de esta técnica con otros sistemas de depuración, como la hemodiafiltración, parece mostrar mejores resultados¹⁰. En pacientes tratados mediante plasmaféresis y el BioLogic-DT, se observa una elevada eficacia en la eliminación de sustancias (BT, amonio, aminoácidos aromáticos, interleukina-1, etc.) junto a la obtención de posibles beneficios clínicos¹¹.

Sistema de diálisis con albúmina: MARS

Desde la publicación del primer trabajo sobre la aplicación clínica del sistema MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System) por Stange y Mintzner¹², hasta la actualidad¹³, el empleo del MARS se ha extendido de manera importante. El MARS es un método de tratamiento extracorpóreo que combina la hemodiafiltración convencional junto a un sistema de adsorción con albúmina. Los hechos diferenciadores de este sistema son: primero el empleo de una membrana capilar de alta permeabilidad (poro máximo de 50 kd), cuyas fibras están recubiertas de albúmina, que permite no sólo el aclaramiento de sustancias hidrosolubles, sino también y de manera característica la adsorción de moléculas unidas a la albúmina del paciente que posteriormente son transferidas a una solución de albúmina al 20%^{4,14}; y segundo, la capacidad de que esta solución de albúmina sea regenerada mediante la adsorción de las toxinas a unas columnas de carbón activado y resinas de intercambio iónico. Todo este proceso se produce sin modificaciones en la concentración plasmática de albúmina ni la pérdida de sustancias proteicas de mayor tamaño cuyas funciones son esenciales, como hormonas y factores de crecimiento⁴.

En la insuficiencia hepática avanzada con síndrome hepatorenal el MARS ha prolongado la super-

vivencia y mejorado la función renal de forma significativa respecto a un grupo control¹⁵, junto a un aumento de la PAM¹³. En pacientes con reagudización de la hepatopatía crónica produce un descenso de las cifras de BT, los ácidos biliares y el amonio, observándose una mejoría de la encefalopatía hepática y del grado de Child^{13,16}. Aunque la experiencia con el FHA es escasa se ha observado una mejoría de encefalopatía hepática y de algunos parámetros bioquímicos en los pacientes tratados con MARS¹³. Los efectos secundarios son escasos. Se ha descrito trombopenia y deterioro de la función renal^{13,16}.

Según los datos publicados, hasta la fecha el MARS ha sido empleado en 115 pacientes en 20 centros^{13,17} para el tratamiento de pacientes con enfermedad hepática severa, y ha mostrado interesantes resultados en diversas situaciones que van desde la hepatitis alcohólica¹⁷ y el síndrome hepatorenal¹⁸ hasta el prurito incoercible de origen colestásico¹⁹. Parece fundamental establecer criterios uniformes sobre su uso y dar respuesta a ciertos interrogantes. Hay varios estudios multicéntricos actualmente en desarrollo, que permitirán conocer los beneficios clínicos reales de este sistema, además de establecer las pautas de tratamiento más eficaces. Un estudio multicéntrico prospectivo y randomizado, realizado en un grupo de pacientes cirróticos con una reagudización de su hepatopatía muestra una supervivencia a los 30 días significativamente mayor en aquellos que recibían tratamiento con MARS además del tratamiento convencional¹⁷. Los beneficios adicionales alcanzados por estos pacientes incluían aumento de la PAM, disminución de la BT y mejoría de la encefalopatía de forma significativa, en ausencia de efectos adversos¹⁷. Estos interesantes resultados se encuentran condicionados por lo heterogéneo de los pacientes incluidos²⁰.

¿Porqué la albúmina?

Gran parte de la eficacia de estos sistemas de depuración que emplean la albúmina parece estar relacionada con su capacidad para eliminar de manera selectiva las sustancias unidas a ella⁴. Sabemos que la albúmina constituye la proteína soluble más abundante en los vertebrados y la que se encuentra en mayor concentración en plasma. Posee un peso molecular de 66,438 Da y una estructura tridimensional con regiones α -helicoidales, lo que le confiere una alta flexibilidad pudiendo cambiar su forma de manera rápida. Tiene una elevada carga eléctrica negativa, lo que condiciona su solubilidad y características hidrófilas⁸. La síntesis de albúmina

tiene lugar de manera fundamental en el hígado y posteriormente es secretada para realizar diversas funciones. La función que le confiere mayor importancia a esta proteína es su capacidad para transportar múltiples moléculas. Debido a su estructura y flexibilidad, la albúmina es capaz de interactuar con un amplio número de compuestos. Esta capacidad de unión es más intensa con sustancias orgánicas hidrofóbicas, carga aniónica y mediano tamaño (100-600 Da) como son los ácidos grasos de cadena larga, la hematina y la bilirrubina. Otras funciones de esta proteína incluyen su capacidad para actuar como lugar de almacenamiento de algunas sustancias y la disminución del efecto dañino de ciertos tóxicos junto a su posterior eliminación.

LOS SISTEMAS BIOARTIFICIALES

Los hígados bioartificiales se componen básicamente de tres partes: 1) los hepatocitos, que le darán la función; 2) un biorreactor, que es la estructura donde se situarán las células y que contiene una membrana que las separa del contacto con el plasma o la sangre del paciente, y 3) los agregados no biológicos^{21,22}.

Características de los sistemas bioartificiales

La elección de los hepatocitos es un aspecto crucial en el diseño de un SSHE. Pueden ser de tres tipos: humanos primarios, procedentes de líneas celulares humanas y xenogénicos. Los hepatocitos humanos primarios son teóricamente los más apropiados, aunque tienen grandes inconvenientes como su limitada oferta, la dificultad de su cultivo y que pierden sus funciones metabólicas diferenciadas muy rápidamente y no se multiplican²³. Las líneas celulares inmortalizadas de hepatocitos humanos pueden ser una fuente inagotable de células con lo que se facilitaría y abarataría enormemente su reposición en los biorreactores. Estas se dividen en líneas derivadas de tumores y en aquellas creadas inmortalizando hepatocitos humanos^{23,24}. Los hepatocitos xenogénicos habitualmente usados con los porcinos por sus características fisiológicas y metabólicas muy parecidas a las humanas, pero pueden presentar problemas de inmunogenicidad y de transmisión de infecciones. Hasta ahora no se han descrito problemas adversos inmunológicos tras el uso de biorreactores utilizando hepatocitos porcinos^{23,25,26}. Respecto a la transmisión de zoonosis existen protocolos estandarizados que se aplican a los cerdos donantes para asegurar que estén libres de múltiples patógenos. Un

problema adicional lo constituye el retrovirus endógeno porcino (PERV) que permanece integrado en el genoma porcino, pero no se han detectado evidencias de transmisión entre especies²⁷. Junto a la importancia del tipo celular utilizado, otro aspecto de interés lo constituye la masa crítica de hepatocitos necesarios para mantener la función hepática. Estudios animales apuntan a un 20-40% del peso hepático, lo que supondría en torno 150-400 g para un paciente de 70 kg^{23,28}.

El biorreactor es el soporte donde se situarán los hepatocitos, permitiendo su funcionalidad, nutrición, oxigenación, intercambio de sustancias tóxicas procedentes del paciente y el aporte de elementos sintetizados por los hepatocitos. Hay cuatro diseños fundamentales: fibra fenestrada, placa plana monocapa, lechos o andamios perfundidos y células encapsuladas o en suspensión²¹. El más empleado es el de fibra fenestrada, que consiste en una columna que contiene una colección de capilares de fibra a través de los cuales se bombea la sangre o el plasma del paciente. Los hepatocitos suelen estar situados en el espacio extracapilar. Las membranas semipermeables seleccionan el tamaño de las moléculas que se intercambiarán entre el paciente y el aparato. La mayoría de los diseños usan membranas que permiten el paso de la albúmina e impiden el de inmunoglobulinas, complemento o virus^{21,22}.

Ensayos clínicos

Los estudios clínicos más destacados se centran en dos sistemas, el HepatAssist 2000 y el ELAD. El primero se compone de 5 billones de hepatocitos porcinos criopreservados, aproximadamente unos 50 g, unidos a microtransportadores de dextrano cubiertos de colágeno que se sitúan en las caras externas de las fibras de un biorreactor de fibra fenestrada de polysulfona con unos poros de 0,15-0,20 micras y una superficie de 1,5 m². El plasma es separado de las células en un plasma separador, pasando luego por un reservorio, una columna de carbón activado (para detoxificar el plasma y evitar daños a los hepatocitos del sistema), un oxigenador y un calentador^{26,29}. El ELAD se compone de 200 g de células C3A (línea celular inmortalizada derivada del hepatoblastoma humano) sembradas en el espacio extracapilar de un biorreactor de fibra fenestrada de acetato de celulosa con una superficie funcional de 2 m² y límite de peso molecular de 70.000 kd^{24,30}.

Un número considerable de pacientes con FHA han sido tratados con el HepatAssist 2000 en estu-

dios no controlados observándose una mejoría de la función neurológica y un descenso de las transaminasas y la BT, sin que mejoraran otros parámetros de función hepática. La mayoría de los pacientes pudieron ser trasplantados con éxito sin observarse efectos indeseables de importancia^{25,26}. Sin embargo, su eficacia ha sido mínima en el tratamiento de la reagudización de la hepatopatía crónica²⁶. Se está llevando a cabo actualmente un estudio multicéntrico prospectivo, aleatorizado y controlado con este sistema. Los datos preliminares muestran una tendencia a un aumento de la supervivencia en los pacientes con FHA tratados con el HepatAssist 2000³¹. Con el ELAD se ha realizado un estudio controlado donde no se evidenció una mejoría significativa en la supervivencia, en la evolución de la encefalopatía y en los parámetros bioquímicos de los pacientes tratados. Tampoco con el ELAD se pusieron de manifiesto efectos adversos graves³⁰. Esta posible falta de eficacia podría en parte deberse a una supervivencia mayor de la prevista en el grupo control. Cabe pensar que con un número mayor de pacientes se podría mostrar la utilidad del ELAD de manera definitiva. En estos momentos se está llevando a cabo en Estados Unidos y el Reino Unido un estudio multicéntrico a mayor escala.

Perspectivas a medio y largo plazo

La innovación, tanto en la estructura de los módulos de cultivo y de los biorreactores como en las fuentes celulares es necesaria para desarrollar nuevos SSHE más potentes. Las investigaciones actuales se centran en el campo de los biorreactores, para que dispongan de matrices proteicas extracelulares y permitir una mejor oxigenación, polarización celular y ordenación trabecular de las células; en el de los cultivos celulares, con el empleo de factores de crecimiento reguladores, como el factor de crecimiento hepático y el factor de crecimiento epidérmico; y en el del cultivo con células no parenquimatosas^{22,23}. Otro problema al que se enfrentan estos sistemas es el de la excreción biliar, ya que los productos biliares pueden ser dañinos para las células y es posible que la ausencia de un sistema de excreción biliar reduzca la vida media o disminuya la eficacia de los sistemas actuales³².

Los recientes avances en las técnicas que emplean células madres abre la posibilidad de una nueva alternativa para conseguir hepatocitos plenamente funcionantes y seguros. Las células madres pluripotenciales embrionarias obtenidas de blastocitos humanos pueden ser una fuente potencial de hepatocitos porque son genéticamente normales y ca-

paces de replicación infinita³³. Se ha comprobado también que las células madres hematopoyéticas pueden diferenciarse en hepatocitos³⁴ e incluso se han conseguido aislar células progenitoras hepáticas, denominadas células madre hepáticas o células ovales³⁵.

CONCLUSIÓN

Es probable, aunque no hay certeza, que los sistemas actuales de depuración, más sofisticados, den mejores resultados que los sistemas clásicos. Por lo tanto habría que estudiar si es indispensable el uso de sistemas más caros y complejos que incluyan hepatocitos. Los factores que han limitado los estudios clínicos de hígados artificiales han sido el pequeño número de pacientes, la falta de randomización y controles, junto a su heterogeneidad y la falta de objetivos claros. No obstante, se puede sacar dos conclusiones. La primera es que son seguros, y la segunda es que ninguno ha demostrado un beneficio clínico inequívoco que le haya permitido destacar sobre los demás.

En definitiva, hay que avanzar mucho más en la comprensión de los mecanismos biológicos implicados en la insuficiencia hepática para que la base de los estudios sobre las diversas opciones terapéuticas esté bien definida. Debe seguir profundizándose en el estudio de las diversas líneas celulares y en la estructura de los biorreactores y deben diseñarse estudios clínicos controlados, randomizados, con muestras amplias para conseguir avances significativos en los próximos años. Debemos llegar a tener hígados artificiales con un buen nivel de coste-eficacia, que estén disponibles rápidamente, transportables y fáciles de usar por un equipo multidisciplinar, integrado por hepatólogos, nefrólogos, intensivistas, enfermeras especializadas, etc. El objetivo en un futuro será, en el caso de los FHA, mantener al paciente hasta que el hígado se regenere y si no se consigue, hacer un THO electivo. En las hepatopatías crónicas se busca algo similar a la diálisis renal. Tener SSHE suficientemente seguros y baratos para usarlos de forma intermitente, manteniendo a los pacientes en «diálisis hepática» todo el tiempo que sea necesario.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maduell F: ¿Sacamos todo el partido a la hemodiálisis? *Nefrología* 22: 223-224, 2002.
2. Vienken J, Sudhir B: Quo vadis diálisis membrana? *Artif Org* 26: 152-159, 2002.
3. Sussman NL, Lake JR: Treatment of hepatic failure-1996: current concepts and progress toward liver dialysis. *Am J Kidney Dis* 27: 605-621, 1996.
4. Sambit S, Jalan R, Williams R: Extracorporeal albumin dialysis in acute-on-chronic liver failure: will stand the test of time? *Hepatology* 36: 1014-1016, 2002.
5. Kramer L, Gendo A, Madl C y cols.: Biocompatibility of cuprophane charcoal-based detoxification device in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Am J Kidney Dis* 36: 1193-1200, 2000.
6. O'Grady JG, Gimson AE, O'Brien CJ, Pucknell A, Hughes RD, Williams R: Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 94: 1186-1192, 1988.
7. Ash SR, Blake DE, Carr DJ, Carter C, Howard T, Makowka L: Clinical effects of a sorbent suspension dialysis system in treatment of hepatic coma (the Biologic-DT). *Int J Artif Organs* 15: 151-161, 1992.
8. Peters T: All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. Academic Press Inc., Toronto, 1996.
9. Clemmensen JO, Larsen FS, Ejlersen E, Schiodt FV, Ott P, Hansen BA: Haemodynamic changes during high-volume plasmapheresis in patients with chronic and acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9: 55-60, 1997.
10. Yoshida M, Sekiyama K, Iwamura Y, Sugata F: Development of reliable artificial liver support (ALS)-plasma exchange in combination with hemodiafiltration using high-performance membranes. *Dig Dis Sci* 38: 469-476, 1993.
11. Ash SR: Extracorporeal blood detoxification by sorbents in treatment of hepatic encephalopathy. *Adv Ren Replace Ther* 9: 3-18, 2002.
12. Stange J, Mitzner S, Ramlow W, Schmidt R, Klinkmann H: Dialysis against an on line recycled albumin circle enables removal of proteins bound toxins. *Artif Organs* 17: 809-813, 1993.
13. Stange J, Hassanein TI, Mehta R, Mitzner S, Bartlett RH: The molecular adsorbent recycling system as a liver support system based on albumin dialysis: a summary of preclinical investigations, prospective, randomized, controlled trial, and clinical experience from 19 centers. *Artificial Organs* 26: 103-110, 2002.
14. Stange J, Mitzner S: A carrier-mediated transport of toxins in a hybrid membrane. Safety barrier between a patient blood and a bioartificial liver. *Int J Artif Organs* 19: 677-691, 1996.
15. Mitzner SR, Stange J, Klammt S y cols.: Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial. *Liver Transpl* 6: 277-286, 2000.
16. Avilés J, Macía M, Morales S y cols.: Eficacia de la diálisis con albúmina en el tratamiento de los pacientes con insuficiencia hepática avanzada: primera experiencia en España con el sistema MARS. *Nefrología* 21: 376-385, 2001.
17. Heemann U, Treichel U, Loock J y cols.: Albumin dialysis in cirrhosis with superimposed acute liver injury: a prospective, controlled study. *Hepatology* 36: 949-958, 2002.
18. Mullen KD: Treatment of hepatorenal syndrome: lessons for the MARS trials. *Hepatology* 35: 492-493, 2002.
19. Macía M, Avilés J, Navarro JF, Morales S, García J: Efficacy of molecular adsorbent recirculating system for the treatment of intractable pruritus in cholestasis. *Am J Med* (en prensa).
20. Kamath P: Is there life in MARS? *Hepatology* 36: 1017-1018, 2002.
21. Allen JW, Hassanein T, Bhatia SN: Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* 34: 447-455, 2001.
22. Strain AJ, Neuberger JM: A bioartificial liver-state of the art. *Science* 295: 1005-1009, 2002.
23. Tsiaoussis J, Newsome PN, Neson LJ, Hayes PC, Plevris JN: Which hepatocyte will it be? Hepatocyte choice for bioartificial liver support systems. *Liver Transplant* 7: 2-10, 2001.
24. Sussman NL, Ghong MG, Koussayer T, He D, Shang TA, Whisenand HH, Kelly JH: Reversal of fulminant hepatic failure

- using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* 16: 60-65, 1992.
25. Samuel D, Ichai P, Feray C y cols.: Neurological improvement during bioartificial liver sessions in patients with acute liver failure awaiting transplantation. *Transplantation* 73: 257-264, 2002.
 26. Watanabe FD, Mullon CJ-P, Hewitt W y cols.: Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial. *Ann Surg* 225: 484-494, 1997.
 27. Paradis K, Langford G, Long Z y cols.: Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 285: 1236-1241, 1999.
 28. Sussman NI, Kelly JH: Extracorporeal liver support cell-based therapy for the failing liver. *Am J Kidney Dis* 30: S66-S71, 1997.
 29. Rozga J, Williams F, Ro M, Neuzil DF: Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology* 17: 258-265, 1993.
 30. Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA y cols.: Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 24: 1446-1451, 1996.
 31. Stevens AC: An interim analysis of a phase II/III prospective randomized, multicenter, controlled trial of the Hepatassist Bioartificial Liver Support System for the treatment of fulminant hepatic failure. *Hepatology* 34: 299 A, 2001.
 32. Strain AJ: *Ex vivo* liver cell morphogenesis: one step nearer to the bioartificial liver? *Hepatology* 29: 288-289, 1999.
 33. Thomson JA, Itskovitz-Elder J, Shapiro SS y cols.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147, 1998.
 34. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M y cols.: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 6: 1229-1234, 2000.
 35. Suzuki A, Zheng YW, Kondo R y cols.: Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32: 1230-1239, 2000.