

Facultad de Medicina

Universidad de Zaragoza



Células madre hepáticas: tipos, caracterización e implicaciones.

Liver stem cells: types, characterization and implications.

Pilar García Santos

Directora: Dra. Estela Solanas Villacampa

Zaragoza, 2 junio de 2016.

ÍNDICE:

1. Resumen	2
1.1 Resumen en español.....	2
1.2 Resumen en inglés.....	2
2. Introducción.....	3
3. Células madre: definición, tipos, ejemplos.....	4
3.1 Definición de célula madre.....	4
3.2 Tipos de células madre.....	5
3.2.1 Según plasticidad.....	5
3.2.2 Según origen:	5
3.2.2.1 Células madre embrionarias (ESC).....	7
3.2.2.2 iPS “Induced pluripotent stem cells”.....	8
3.2.2.3 Células madre adultas (ASC).....	9
4. Fuentes de células madre adultas.....	10
4.1 Médula ósea.....	10
4.1.1 Células madre mesenquimales.....	10
4.1.2 Células madre hematopoyéticas.....	11
4.1.3 SP “Side population”.....	12
4.1.4 MAPC “Multipotent adult progenitor cells”.....	12
4.1.5 Mecanismos de acción de las BM-SC en el restablecimiento del tejido hepático.....	13
4.1.5.1 Otros mecanismos de acción de las HSC.....	13
5. Progenitores celulares intra-hepáticos. Células ovas.....	14
5.1 Aplicaciones de las células progenitoras hepáticas / células ovas.....	17
6. Células madre del cáncer (CSC, del inglés, Cancer stem cells) y su relación con el nicho celular.....	18
7. Terapia celular con varios tipos y fuentes de SC.....	19
7.1 Terapia celular con células madre mesenquimales.....	19
7.2 Terapia celular con SP “Side population”	20
7.3 Terapia celular con células madre hematopoyéticas.....	20
7.4 Terapia celular con MAPC “Multipotent adult stem cells”.....	21
8. Regeneración celular hepática después de un daño.....	22
9. Conclusiones.....	24
10. Referencias bibliográficas.....	25

1. RESUMEN

1.1 RESUMEN EN ESPAÑOL

El espectacular interés generado por las células madre durante los últimos años ha conducido al descubrimiento de nuevas propiedades de estas células. El objetivo de este trabajo de revisión bibliográfica ha sido sintetizar la clasificación de los distintos tipos de células madre que participan en la homeostasis hepática, indagar en las características de cada una de ellas y exponer sus distintas aplicaciones terapéuticas. Se han revisado también los mecanismos de acción que ejercen en los distintos procesos regenerativos tras un daño, las diferentes señales de diferenciación hacia hepatocitos o células biliares y los marcadores que expresan los progenitores celulares hepáticos. Dentro de las células madre hepáticas, las células progenitoras hepáticas existen en un pequeño porcentaje en el hígado adulto sano, se dividen rápidamente pero su potencial de linaje es limitado y constituyen la progenie de células madre. Por su parte, las células madre hematopoyéticas se autorrenuevan, son multipotentes (pueden diferenciarse a muchos linajes celulares distintos) e incluso se pueden trasplantar de forma seriada.

1.2 RESUMEN EN INGLÉS

The amazing interest generated by the stem cells for the last years has led to the discovery of new characteristics of these cells. The aim of this work of literature review was to synthesize the classification of different types of stem cells, investigate the features of each one of them, present its distinct therapeutic applications and as they are involved, which are the action mechanisms that practice in the different regenerative processes after damage and explain the dissimilar signals of differentiation to hepatocytes or biliary cells and the markers that express the intrahepatic cellular progenitors or oval cells.

There is a small percentage of the progenitor cells in the healthy adult liver, they are quickly divided but their lineage potential is limited and they are the stem cell progeny. The hematopoietic stem cells are self-renewing, multipotent (can be differentiated into many different cellular lineages) and even they can be transplanted in a mass-produced form.

Palabras clave: hígado; célula madre; progenitores hepáticos; células madre hematopoyéticas; células madre mesenquimales.

2. INTRODUCCIÓN:

Algunos tipos de células madre adultas poseen una evidente potencialidad, ya que son capaces de diferenciarse a células de diferentes linajes, asemejando la potencialidad de las células embrionarias. Esto formula nuevas perspectivas para tratar enfermedades con células madre adultas, lo que se opone a la idea inicial de que sólo eran competentes las células embrionarias. Además la experimentación con células madre embrionarias posee varios inconvenientes: en primer lugar es un evidente problema ético, existe una baja disponibilidad y la posterior respuesta inmune de rechazo por parte del receptor.

A pesar de la alta capacidad regenerativa del hígado, se dan situaciones en las que esta es insuficiente o el daño existente impide la proliferación de los hepatocitos, como puede ocurrir en condiciones de enfermedad hepática crónica o por senescencia replicativa de la mayoría de los hepatocitos. En estas situaciones se activa una vía alternativa en la que los actores principales son las células progenitoras hepáticas. La existencia real de células progenitoras hepáticas se cuestionó durante muchos años debido a la capacidad que presentan los hepatocitos y los colangiocitos, por separado, de proliferar tras un daño hepático. Las primeras células encontradas fueron unas células situadas en los canales de Hering, y que por su núcleo ovalado se denominaron células ovales. Las células ovales se consideran hoy día células progenitoras bipotenciales, es decir, dan lugar a células parenquimatosas (hepatocitos) y a células del epitelio biliar (colangiocitos). En cambio, se suele utilizar el término “célula intermedia hepatobiliar” para referirse a las células progenitoras hepáticas humanas. Otros términos también usados para referirse a estas células son: células progenitoras ductulares, células ductulares atípicas y células progenitoras hepáticas peri-ductulares. La realización de numerosos estudios en ratas y la aplicación de técnicas de biología celular en distintos grados de enfermedad hepática están ayudando a descubrir más particularidades del comportamiento de estas células.

3. Células madre: definición, tipos, ejemplos.

3.1 Definición de célula madre

Las células madre o SC (del inglés: stem cells) son células indiferenciadas capaces de multiplicarse en número con una división asimétrica, en la cual una de las células hijas conserva las características genotípicas y fenotípicas de las SC, mientras que la otra célula hija puede diferenciarse hacia un tipo celular determinado (Figura 1).

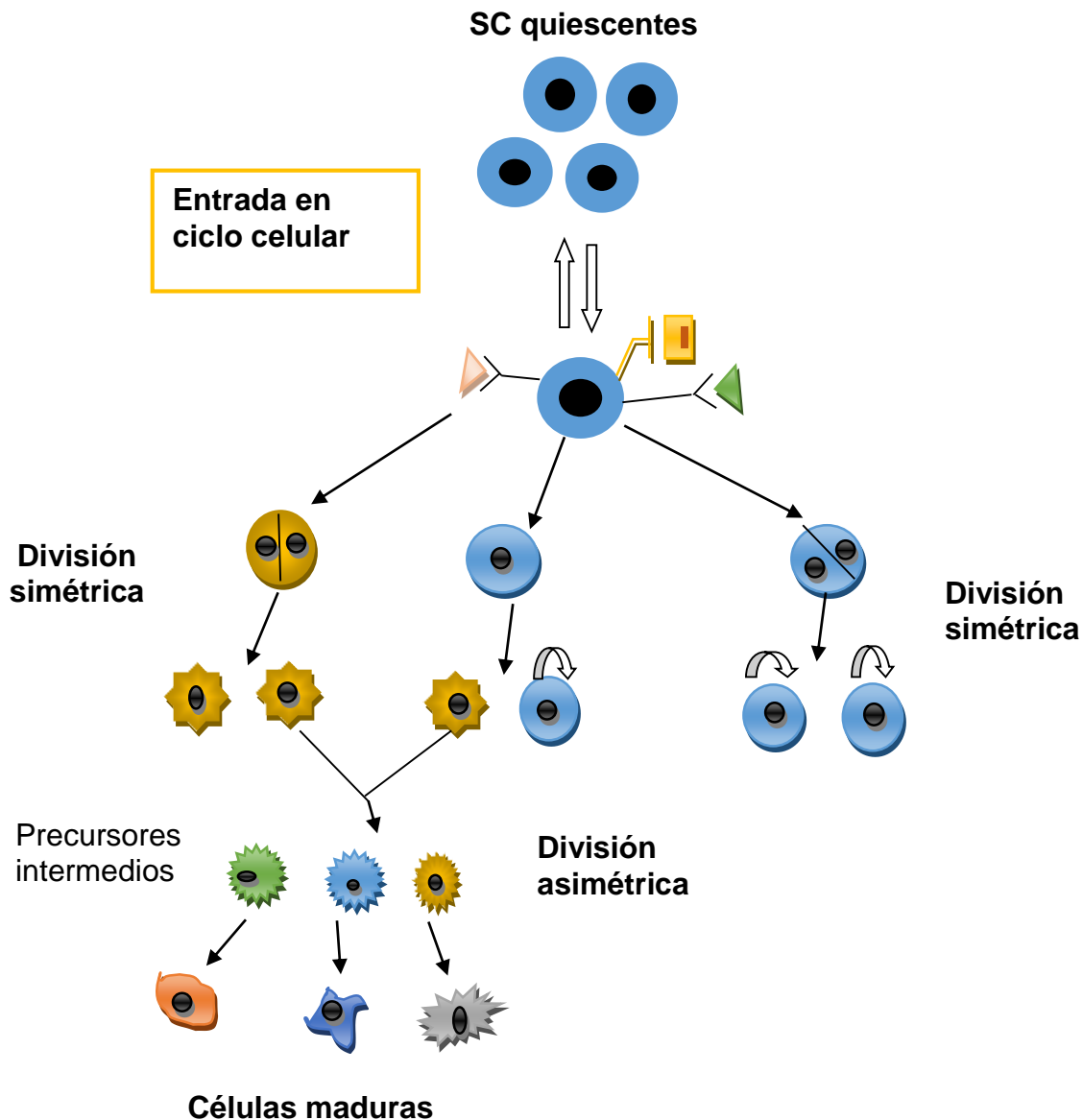


Figura 1. Proceso de división celular en las células madre. Las células madre tienen la capacidad de dividirse de forma simétrica, multiplicando su número, y de forma asimétrica, diferenciándose una progenie celular determinada.

En la división celular típica, de la célula progenitora se generan dos células hijas idénticas entre sí (división simétrica). A continuación, las células hijas pueden evolucionar por diferentes vías, continuando unas líneas características de diferenciación o manteniendo su potencial inicial. Si existe un correcto vínculo entre la tasa de proliferación y diferenciación se permite en gran parte de tejidos establecer un control homeostático de su tamaño y forma, eludiendo de esta manera a un descontrolado crecimiento celular que da lugar a tumores. Esta capacidad de mantenimiento de sí mismas (en inglés, *self-renewal*) consigue controlar de manera rigurosa el número de SC que existe en un órgano concreto. No todas las SC son capaces de crear un tejido a la vez, un gran porcentaje de ellas se encuentra en estado de reposo o de quiescencia, lo cual las beneficia de resultar agredidas tanto física como químicamente, además de evitar el envejecimiento celular. Cuando se dan unas condiciones de cultivo adecuadas, las SC poseen una capacidad “ilimitada” de dividirse, mientras que las células somáticas se dividen de una manera limitada, y terminan muriendo. También poseen la capacidad de generar varios linajes celulares: células del riñón, cerebro, músculo, hígado, corazón, etc. (Votteler y col., 2010) (Figura 2).

3.2 Tipos de células madre

3.2.1-Según su plasticidad

Según su plasticidad o capacidad de diferenciar a distintos tipos de células maduras, las células madre pueden ser:

- Totipotentes: pueden originar un individuo completo.
- Pluripotentes: pueden originar células de las tres capas embrionarias. (Figura 3)
- Multipotentes: pueden originar células de su capa embrionaria.
- Unipotentes: sólo pueden diferenciarse a un único tipo celular.

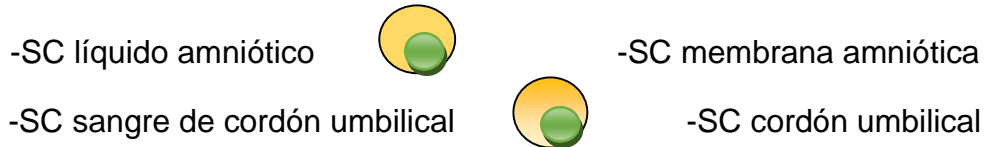
3.2.2 -Según su origen:

Según su origen podemos encontrar células madre:

- Células madre embrionarias (ESC, del inglés, Embryonic stem cells)
- iPS (del inglés, Induced pluripotent stem cells)

- Células madre adultas (ASC, del inglés, Adult stem cells)

Tejidos extraembrionarios:



Tejidos embrionarios o adultos:

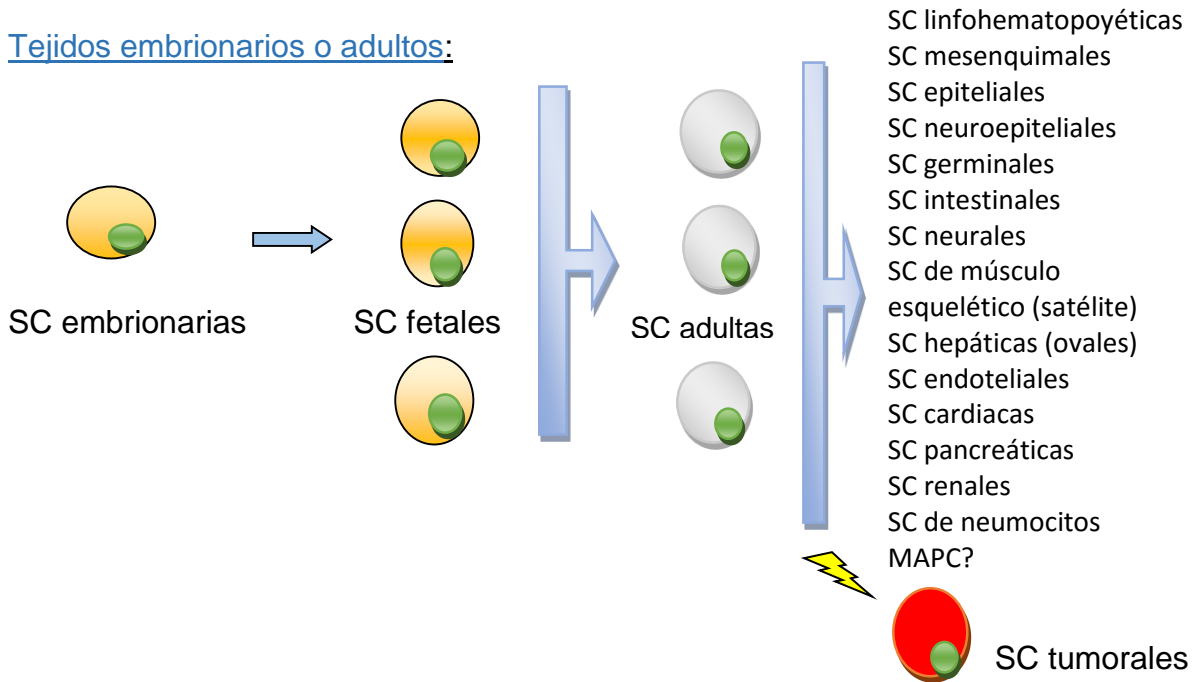


Figura 2. Células madre. Origen, ontogénesis y tipos.

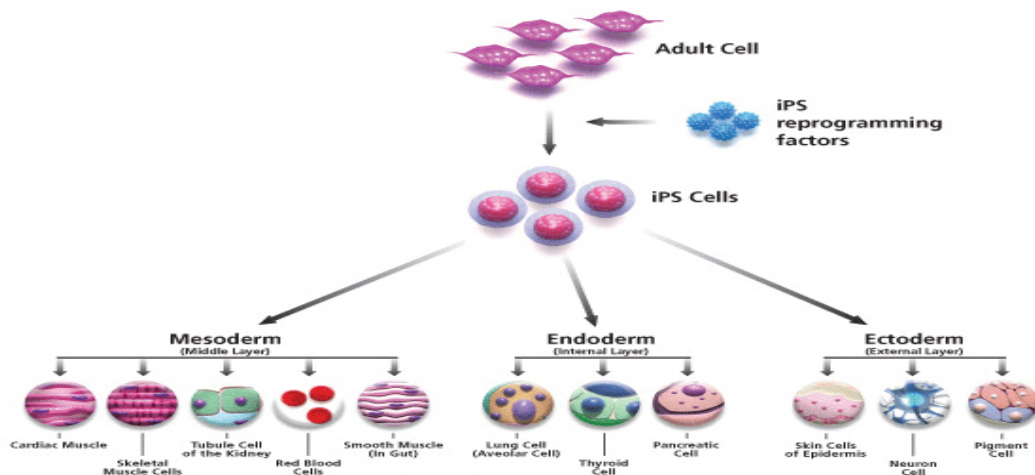


Figura 3. Clasificación de las células de las tres hojas embrionarias generadas por las iPS.

3.2.2.1 Células madre embrionarias (ESC):

Se localizan en la masa celular interna del blastocisto embrionario. Las ESC tienen competencia para originar cualquier tipo de célula somática e incluso un organismo íntegro, es decir son totipotentes (Figura 4), lo que las convierte en células que podrían ser capaces de regenerar tejidos u órganos afectados.

Ya en la década de los 80 se establecieron y caracterizaron por primera vez líneas celulares embrionarias de ratón, observando su capacidad totipotencial (Martín y col., 1981).

Thomson y colaboradores en 1998 y posteriormente el grupo de Reubinoff en el año 2000 consiguieron las primeras líneas de ESC humanas.

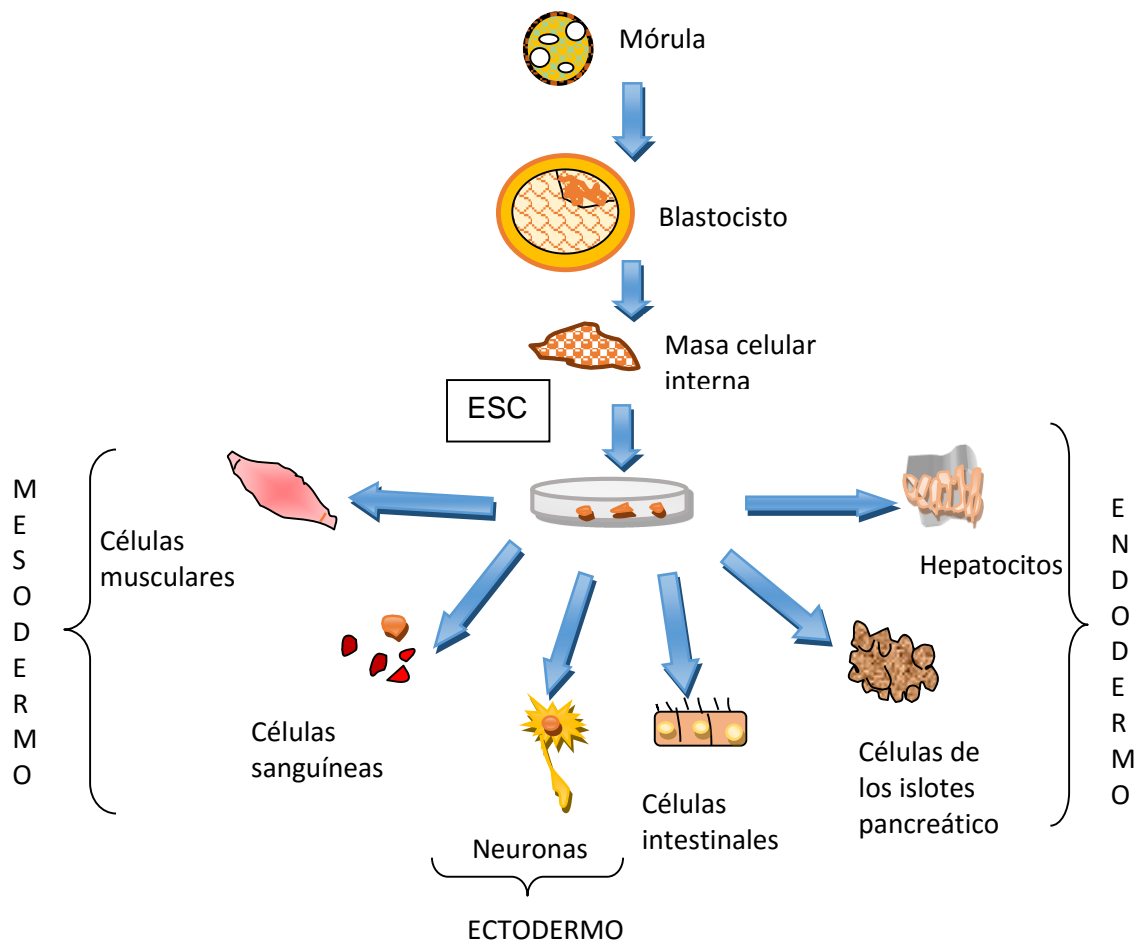


Figura 4. Las ESC aisladas y cultivadas desde la masa celular interna del blastocisto embrionario pueden dar origen a cualquier tipo de células adultas de cualquiera de las tres hojas embrionarias.

La activación de factores de transcripción como Oct-4, Sox-2, GATA-4/6 y SSEA1 hacen que las ESC posean una gran capacidad autorrenovadora. (Boiani y col., 2005).

El uso de ESC en terapia celular presenta los siguientes inconvenientes: bajo número de obtención, generación de tumores e inmunogenicidad en el alotrasplante. (Draper y col., 2004).

En un estudio donde se trasplantaron ESC en ratones deficientes para la enzima fumarilacetoacetato hidrolasa se comprobó la integración de las ESC en el parénquima hepático. Además estas proliferaron y reemplazaron los hepatocitos deficientes obteniendo de esta forma una regeneración hepática. (Heo y col., 2011).

Gracias a la activación de factores de transcripción como: BMP-4 (del inglés, *Bone morphogenetic protein*) (Gouon-Evans y col., 2006), HNF-4 alfa (del inglés, *Hepatocyte nuclear factor 4 alfa*) (Takayama y col., 2012) y HNF-3 beta (del inglés, *Hepatocyte nuclear factor 3 beta*) (Ishizaka y col., 2002) se consiguió la diferenciación de ESC hacia hepatocitos en estudios *in vitro* (Pauwelyn y col., 2011) e *in vivo* (Yin y col., 2002). Estos hepatocitos expresaron marcadores génicos y proteicos propios de hepatocitos maduros como albúmina, alfa1-antitripsina, alfafetoproteína, citoqueratina -8 y/o citoqueratina-18 además de ejecutar funciones determinadas como secretar albúmina, producir LDL (del inglés, *Low density lipoprotein*), el almacenaje de glucógeno y/o la inducción de la actividad citocromo P450. (Duan y col., 2010).

3.2.2.2 iPS “Induced pluripotent stem cells

Las iPS consisten en células somáticas maduras que se han reprogramado obteniendo un estado pluripotente semejante al embrionario a través de la expresión de factores de transcripción Oct-3/4, Sox-2, Klf-4 y cMyc (Takahashi y col., 2007) (Figura 5).

El Dr. Yamanaka, premiado con el premio Nobel de Medicina en 2012 obtuvo las primeras iPS desde fibroblastos de ratón (Takahashi y col., 2006); así como desde fibroblastos humanos (Takahashi y col., 2007).

Las iPS constituyen una verdadera innovación en terapia celular y medicina regenerativa, ya que se pueden manipular como ESC pero sin el impedimento legal y ético que la obtención de estas conlleva. Además, al poderse obtener del propio individuo no generarían rechazo inmunológico.

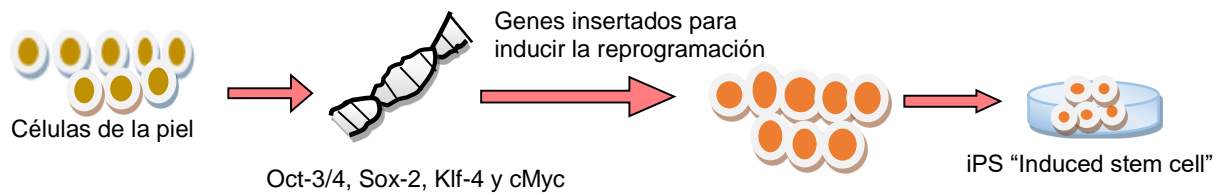


Figura 5. Obtención de iPS desde células de la piel.

Se ha demostrado que las iPS pueden dar lugar a hepatocitos *in vitro* en presencia de citoquinas como HGF (del inglés, *Hepatocyte growth factor*), FGF-4 (del inglés, *Fibroblast growth factor-4*), oncostatina M (OSM) y dexametasona. (Behbaham y col., 2011). Estos hepatocitos diferenciados tienen la competencia para poder expresar genes hepatoespecíficos entre los que predominan: HNF-4 alfa (del inglés, *Hepatocyte nuclear factor-4 α*), alfa-fetoproteína, y albúmina, además de poseer cierta actividad funcional, ya que tienen la capacidad de acumular glucógeno y fabricar LDL. (Si-Tayeb y col., 2010).

Se han aislado fibroblastos para crear iPS de pacientes con enfermedad congénita hepática como el déficit en alfa1-antitripsina, glucogenosis tipo 1a o enfermedad de Von Gierke, hipercolesterolemia familiar, síndrome de CriglerNajjar y/o tirosinemia hereditaria tipo I, conteniendo el genotipo específico de cada enfermedad. También se pueden crear líneas celulares a partir de iPS para estudiar la posible causa de la desregulación metabólica en estas enfermedades. (Rashid y col., 2010). Por otro lado, las iPS pueden ser la clave para la investigación en biología del desarrollo ya que engloban la memoria epigenética del tejido donante. (Kim y col., 2010).

No todo son ventajas con las iPS, ya que se deben mejorar los vehículos víricos que se necesitan para la transformación celular. Estos penetran en la célula diana gracias a los factores de transcripción; pero su utilización podría resultar muy peligrosa para su uso en humanos debido a la posibilidad de integración de ADN viral en el genoma receptor (Si-Tayeb y col. 2010).

3.2.2.3 Células madre adultas

Las ASC son poblaciones celulares pequeñas multipotenciales, que se localizan en varios nichos o ubicaciones del organismo como son: médula ósea, tejido adiposo, sangre del cordón umbilical, hígado, tejido nervioso, epidermis, endotelio, músculo, pulpa dentaria, etc. Forman un conjunto de

células instauradas en un tejido concreto y que en caso de envejecimiento o lesión de este, salen de su nicho y sustituyen las células dañadas (Stocum y col., 2001); esto se conoce como “Movilización celular”. Las ASC permanecen en un estado quiescente, pero en el momento que se produce un daño en el tejido éstas activan su división y diferenciación a células somáticas de cualquiera de las tres hojas embrionarias. El microambiente que exista en el nicho donde se localizan las ASC determinará el equilibrio entre el estado de quiescencia, auto-renovación, movilidad y diferenciación hacia las distintas células somáticas. (Votteler y col., 2010).

4. Fuentes de ASC

4.1 Médula ósea

La MO es un tejido esponjoso localizado en el canal medular de los huesos largos y en el interior de huesos planos como el esternón, costillas, cráneo y pelvis. Existen dos tipos de MO: amarilla y roja.

La MO amarilla se localiza en la diáfisis de los huesos largos, está formada esencialmente por tejido adiposo.

La MO roja se localiza en los huesos planos y en la epífisis de los huesos largos. En ella tiene lugar la hematopoyesis, que es el proceso que da origen a las células del sistema sanguíneo.

En el organismo la MO constituye uno de los reservorios principales de ASC. Las BM-SC (del inglés, *Bone marrow stem cells*) son utilizadas en medicina regenerativa ya que se obtienen del propio paciente y con técnicas no muy invasivas. Al tratarse de un trasplante autólogo su uso no genera rechazo inmunológico.

Existen 4 tipos de BM-SC en la MO roja:

- Mesenquimales (MSC, del inglés, *Mesenchymal stem cells*)
- Hematopoyéticas (HSC, del inglés, *Hematopoietic stem cells*)
- SP (del inglés, Side population)
- MAPC (del inglés, Multipotent adult progenitor cells)

4.1.1 Células madre mesenquimales

Las MSC fueron halladas en 1974 por Friedenstein y col. Componen el 1% de las células de la MO, se localizan en el estroma medular, sangre del cordón umbilical, tejido adiposo y sangre periférica.

Sirven de soporte para las HSC aportándoles un microambiente apropiado para llevar a cabo la hematopoyesis. Presentan una elevada plasticidad y capacidad proliferativa, son células fibroblastoides. Pueden dar origen a numerosas células maduras: condrocitos, hepatocitos, adipocitos, cardiomiocitos, células musculares, etc. (Saulnier y col., 2009).

Las MSC poseen capacidad para modular el sistema inmunológico, ya que en su superficie no existen moléculas de HLA, por lo que son muy utilizadas en medicina regenerativa. (Yi y col., 2012). Además son capaces de inhibir y neutralizar a linfocitos B, T, células NK y células dendríticas a través del IFN-*gamma* (Krampera y col., 2006).

Se ha observado que MSC cultivadas en medio con las citoquinas: HGF (del inglés *Hepatocyte growth factor*), FGF-b (del inglés *Fibroblast growth factor*), EGF (del inglés, *Epidermal growth factor*) y factores como nicotinamida, dexametasona, e ITS (insulina-transferrina-selenio) hace que se diferencien a hepatocitos. (Lee y col., 2004). La activación de factores de transcripción como HNF- 3 β (Ishii y col., 2008) y c/EBP- α (del inglés, *CCAAT enhancer binding proteins*) (Smink y col., 2012) son claves en el proceso de diferenciación hacia hepatocitos. Estos hepatocitos expresan marcadores específicos como albúmina, citoqueratina 18, alfa-fetoproteína, glucosa-6-fosfato y HNF-4 α . También pueden almacenar glucógeno y producir urea (Stock y col., 2008). Otros estudios han demostrado que hepatocitos obtenidos a partir de MSC presentan actividad enzimática hepática como la del citocromo P450 (Snykers y col., 2011).

4.1.2 Células madre hematopoyéticas

Se localizan en: superficie del hueso, endotelio sinusoidal, sangre del cordón umbilical, placenta, y sangre periférica. Son la población de SC más abundante en la MO formando del 1 al 3 % del total celular. Tienen como función la hematopoyesis.

En humanos presentan un inmunofenotipo particular de antígenos de superficie que son CD45+, CD34+, CD133+/- , CD117+, Lin - y CD38 low/- (Wilson y col., 2006).

Existen kits comerciales inmunomagnéticos que pueden aislar HSC gracias al reconocimiento de los marcadores de superficie. Se obtienen pocas HSC con capacidad para originar células de las tres hojas embrionarias, pero se favorece su proliferación en cultivo gracias al tratamiento con citoquinas como tromboeritropoyetina (TPO), Flt3-L (Flt-3-ligando), FGF-a, SCF (del inglés, *Stem cell factor*), VEGF (del inglés, *Vascular endothelial growth factor*), IL-6

(del inglés, *Interleukin-6*), IL-3 (del inglés, *Interleukin-3*) y G-CSF (del inglés, *Granulocyte-colony stem factor*). (Sorrentino y col., 2004).

4.1.3 SP “Side population”

Representan sólo el 0.02% siendo el grupo más minoritario de la MO. Se localizan en sangre periférica, endometrio, piel, córnea, pulmón, riñón, músculo esquelético, sangre del cordón umbilical, etc. (Guo y col., 2003).

Las SP fueron descubiertas por su capacidad para eliminar el citofluorocromo *Hoechst 33342* gracias a dos transportadores de membrana: ABCG2 y glicoproteína P (Eaker y col., 2004).

Presentan el inmunofenotipo de superficie: CD34- (Sales-Pardo y col., 2006) además de ser también CD34+ (Josefsen y col., 2011) y CD133+ (Zhou y col., 2011).

Las SP tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* a hepatocitos gracias a citoquinas como HGF y EGF, e insulina y dexametasona. Los hepatocitos resultantes presentaban una alta actividad del citocromo P450, un citoplasma granuloso y se localizaron elevados niveles de albúmina, CK-18, α 1-antitripsina y HepPar +. (Hussain y col., 2005).

4.1.4 MAPC “Multipotent adult progenitor cells”

Las MAPC constituyen solo el 0.1% de células en la MO, aunque se localizan también en el cerebro y en el músculo (Jiang y col., 2002).

Poseen una morfología muy parecida a las MSC, aunque biológicamente tienen más en común con las ESC. Tienen una enorme capacidad de proliferación gracias a factores de transcripción: GATA-4, Sox17, Fox-a2, Oct-4 y HNF-4 α que son propios de las ESC. A largo plazo presentan una fuerte estabilidad genética gracias a que son células telomerasa positivas, además de tener una alta plasticidad y tener la capacidad de diferenciación a células somáticas pertenecientes a cualquiera de las tres hojas embrionarias. (Ulloa- Montoya y col., 2007)

Las MAPC son aisladas como células negativas para CD45 y Glicoforina A (Gly-A) gracias a técnicas de marcaje inmunomagnético o también llamado *sorting*. Además se describen como células negativas para: CD19, CD117, CD34, CD44, CD3, MHC-I, MHC-II, CD45 y Glicoforina A (Gly-A) (Reyes y col., 2001).

4.1.5 Mecanismos de acción de las BM-SC en el restablecimiento del tejido hepático

Se demostró la capacidad de diferenciación de las HSC a hepatocitos *in vitro* junto a diversas citoquinas como FGF-a, SCF y FGF-b. Estos hepatocitos manifestaban elevados niveles de expresión de genes y proteínas como albúmina, CK-18, CK-19 y α -FP (Wagers y col., 2002; Fiegel y col., 2003; Jang y col., 2004; Mentheny y col., 2004; Sato y col., 2005; Khurana y col., 2007) que promueven e intervienen en la regeneración hepática (Saji y col., 2004; Harris y col., 2004) o provocan una acción anti-fibrótica o pro-angiogénica (Wagers y col., 2004; Houlihan y col., 2008;). Aunque este proceso de diferenciación a hepatocitos se ha puesto en duda, ya que se cree que las HSC lo que hacen es fusionarse con los hepatocitos residentes en el parénquima hepático (Körbling y col., 2002; Camargo y col., 2004). Esta fusión se piensa que se produce espontáneamente entre los citoplasmas celulares, núcleos o ambos a la vez (Theise y col., 2000; Terada y col., 2002). Las células formadas presentan propiedades fisiológicas de las células parenquimatosas y la actividad potencial de las BM-SC (Vassilopoulos y col., 2003; Quintana-Bustamante y col., 2006).

4.1.5.1 Otros mecanismos de acción de las HSC

Existen estudios que afirman que mediante la secreción paracrina de citoquinas y/o factores de crecimiento, las HSC se encargan de activar la entrada en ciclo de las distintas células del parénquima hepático. Se cree que podrían actuar sobre las HPC / OC (Células progenitoras intrahepáticas/células ovales) o sobre los hepatocitos (Kuo y col., 2008).

En un estudio en ratas se observó un fallo hepático fulminante tras la administración de D-Galactosamina, un tóxico hepatoespecífico. Se llevó a cabo un tratamiento con MSC-CM (*Conditional Medium- Mesenchymal stem cells*) el cual aumentó la supervivencia y protección de los hepatocitos. Hubo una disminución de la infiltración leucocitaria y el análisis molecular de este MSC-CM mostró que poseía un alto contenido en quimioquinas las cuales están vinculadas con una mayor supervivencia celular (Parekkadan y col., 2007). Se ha demostrado que MSC-CM favorece la proliferación de hepatocitos y por tanto tiene un papel regenerativo en el hígado (Van Poll y col., 2008; Du y col., 2013).

Característicamente las MAPC son células altamente pluripotenciales capaces de diferenciarse a numerosas células somáticas (Jiang y col., 2002). Tanto en ensayos *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado su competencia para originar

hepatocitos (Schwartz y col., 2002). Al diferenciarse poseen actividad citocromo P450, producen LDL y almacenan glucógeno. Gracias a factores de transcripción como HGF y FGF-4 generan células binucleadas con marcadores hepatoespecíficos como albúmina, CK-19, α -FP y CK-18 (Schwartz y col., 2002).

Una posible utilidad de las MAPC es como sustituto de fármacos inmunosupresores en pacientes trasplantados, ya que estas consiguen disminuir el rechazo inmunológico impidiendo la activación y proliferación de las células T (Jacobs y col., 2012).

5. Progenitores celulares intra-hepáticos. Células ovas.

En el parénquima hepático existe una población determinada de ASC. En humanos se denominan progenitores celulares intra-hepáticos (HPC, del inglés, *Hepatic progenitor cells*) y en modelos murinos se designan como células ovas (OC, del inglés, *Oval cells*) porque su núcleo es ovoideo y la proporción núcleo/citoplasma es alta. Son células inmaduras de pequeño tamaño (10 μ m), basófilas.

En 1958 fueron halladas en ratones por Leduc y Wilson. En 1978, Shinozuka y col. también las describieron en hígado de ratas.

Las HPC/OC se han localizado en los canales de Hering de la red de canálculos biliares hepáticos (Bird y col., 2008). Estos se ubican en la región periportal del lobulillo hepático (Fellous y col., 2009).

Cuando el hígado es sometido a un daño crónico o a una lesión aguda, estas se activan y pueden proliferar a hepatocitos y colangiocitos, esto se conoce como reacción ductular (Roskams y col., 2004). Mientras no existe deterioro, estas se mantienen en estado quiescente. Se cree que la cantidad de HPC/OC es directamente proporcional a la gravedad de la lesión (Lowe y col., 1999). Además de la bipotencialidad de estas células (Figura 6), también se ha descrito su capacidad de formar linajes celulares no hepáticos como epitelio intestinal y células pancreáticas (Zheng y Taniguchi, 2003; Knight y col., 2005).

Las HPC/OC poseen un fenotipo intermedio entre el de hepatocitos y el de colangiocitos, ya que expresan simultáneamente marcadores de ambos tipos celulares como citoqueratinas 8 y 18, albúmina, y c-Met (Hepatocyte Growth Factor Receptor) propios de hepatocitos y CK-7 y CK-19 típicos marcadores de colangiocitos (Bird y col., 2008) (Figura 7). Estas células se asocian con el

fenotipo de hepatoblastos fetales inmaduros, como lo muestra el hecho de que expresen AFP (Alfafetoproteína), expresada en la embriogénesis hepática y Dlk (Delta-like protein), marcador de hepatoblastos (Tanimizu y col., 2004; Nierhoff y col., 2005). Además, expresan N-CAM y cromogranina que son marcadores de células neuroepiteliales, implicadas en adhesión y en procesos de secreción, respectivamente; así como algunos marcadores de superficie hematopoyéticos como CD90, Sca-1 (stem cell antigen 1), CD34 y CD133 (Knittel y col., 1996; Crosby y col., 2001; Dezso y col., 2007; Dudas y col., 2007; Dudas y col., 2009; Van Hul y col., 2009). También hay que destacar que entre los distintos modelos murinos (rata y ratón) de inducción de células progenitoras hepáticas existen diferencias en cuanto a la expresión de algunos marcadores. Las células ovas de rata son más positivas para AFP que las de ratón (Factor y col., 1990; Jelnes y col., 2007). Por tanto, las células ovas de rata recuerdan más a los hepatoblastos fetales que sus equivalentes en ratón. Estas expresan marcadores como CD34+, CD45+, CD117+ y Sca-1 (Petersen y col., 2003). Además, las células ovas de rata son positivas para OV6 y las de ratón no, aunque estas últimas sí que expresan otros marcadores de células biliares como CK-19 y A6 (Factor y col., 1990) y tienen la capacidad además de expulsar *Hoeschst* 33342 a través del transportador ABCG2 al igual que las SP (Shimano y col., 2003).

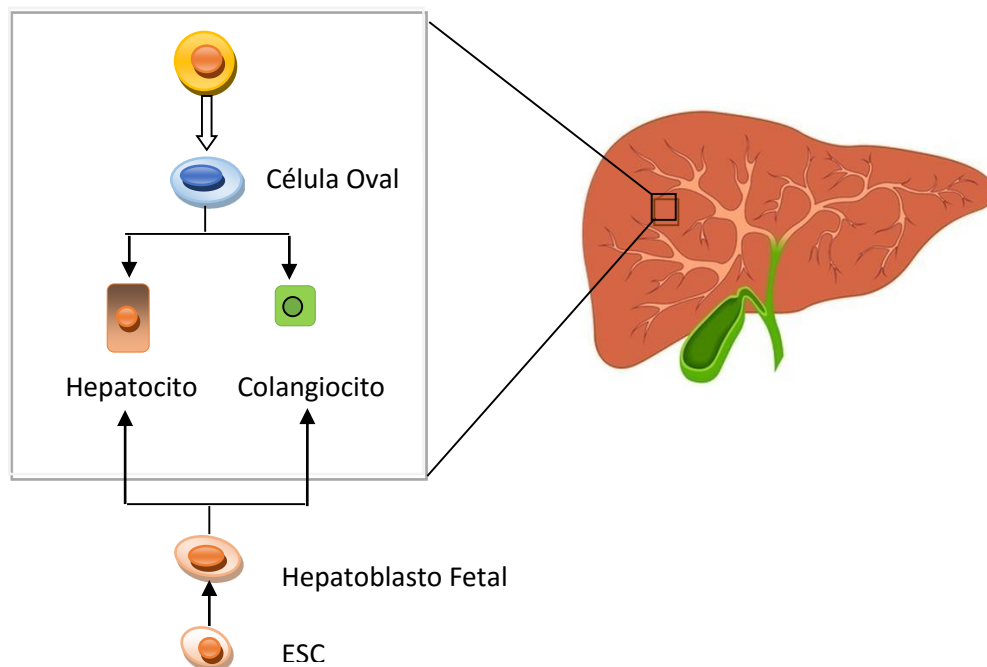


Figura 6. Bipotencialidad de las células progenitoras intrahepáticas / Células ovas.

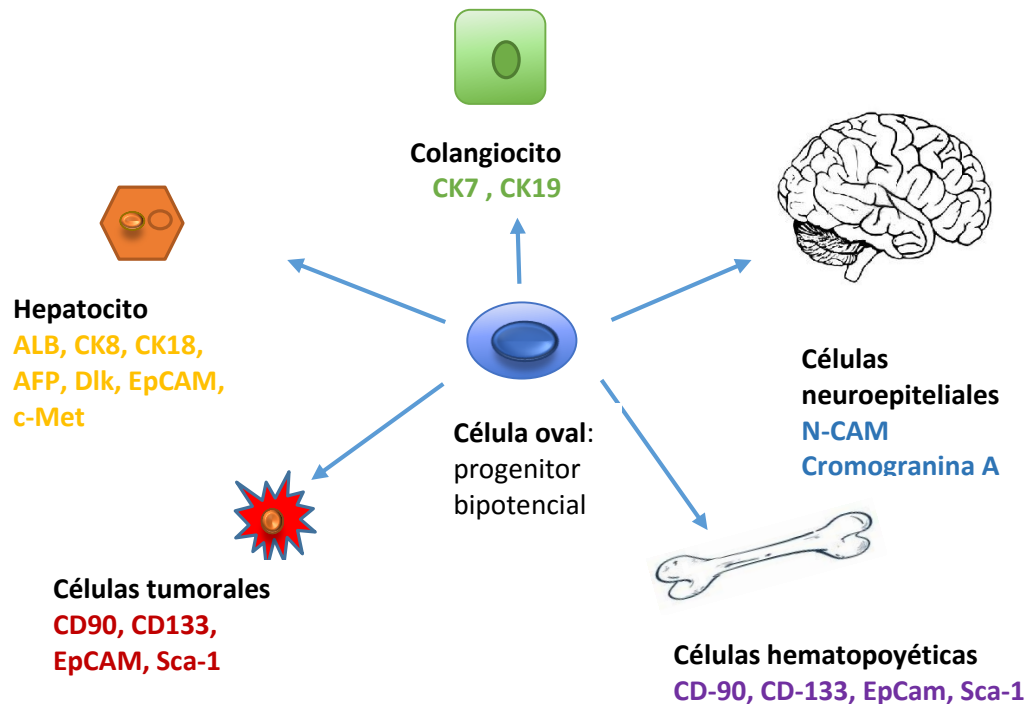


Figura 7. Principales marcadores celulares expresados en las células ovales.

En modelos murinos se induce la activación y expansión de las HPC/OV mediante la exposición a diversos agentes químicos y carcinogénicos, aplicados individualmente o combinados con tratamiento quirúrgico con una hepatectomía parcial. Los modelos más utilizados en ratones son el daño hepático producido por una dieta deficiente en colina y suplementada con etionina (dieta CDE) o una dieta suplementada con 3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidro-colina (dieta DDC) (Akhurst et al., 2001; Wang et al., 2003). Estas toxinas bloquean la mitosis de los hepatocitos o provocan daño hepático con la consiguiente muerte de los hepatocitos. Esto produce estrés oxidativo crónico y/o inflamación que activa una potente respuesta regenerativa en el hígado para reparar el parénquima hepático dañado. Tras su activación, las células sufren una intensa proliferación y a continuación son capaces de migrar por el parénquima hepático para diferenciarse a hepatocitos (Alison y col., 2009). A todo este proceso se le conoce como “respuesta de la célula oval” o “reacción de la célula oval”. Las células ovales tienen cuatro fases de respuesta regenerativa (activación, proliferación, migración y diferenciación) y estas fases están controladas por muchos factores de crecimiento y citoquinas que se expresan en el lugar del daño o que llegan al hígado a través del sistema

circulatorio como son: TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*), Lt β (*lymphotoxin beta*), IFN- γ (*interferon gamma*) y la IL-6 (Erker y Grompe, 2007). Otras señales reguladoras son la quimioquina SDF-1 (*Stromal cell-derived factor 1*); factores de crecimiento como el HGF, el TGF- α (*Transforming Growth Factor-alpha*), el EGF y el TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*), este último actuando como factor inhibitor capaz de contrarrestar la respuesta regenerativa; y la vía canónica Wnt/ β -catenina (Hu y col., 2007; Apte y col., 2008; Yang y col., 2008; Itoh y col., 2009). En este sentido, uno de los campos de investigación en desarrollo en los últimos años ha sido dilucidar los factores que determinan la activación diferencial de las dos respuestas regenerativas, la clásica y primaria, mediada por los hepatocitos; y la secundaria, mediada por las células ovas. Posteriormente a estos estudios realizados en roedores, se ha descrito una respuesta análoga a la respuesta de la célula oval en humanos, concretamente en situaciones patológicas que cursan con fibrosis e inflamación, como hepatitis viral crónica, cirrosis, colestasis, hígado graso y diferentes tipos de cáncer hepático (Libbrecht and Roskams, 2002; Roskams y col., 2003; Roskams y col., 2006). La intensidad de la respuesta, aquí denominada “reacción ductular”, al igual que ocurre en roedores, es mayor cuanto mayor es el daño hepático y más severa es la fibrosis y la inflamación hepática (Lowe y col., 1999; Libbrecht y col., 2000; Roskams y col., 2003). Dado que la identidad precisa de las células que participan en dicha respuesta se desconoce, a las células progenitoras de origen humano se les denomina “célula intermedia hepatobiliar” también se las conoce como células progenitoras ductulares, células ductulares atípicas y células progenitoras hepáticas periductulares.

5.1 Aplicaciones de las células progenitoras hepáticas/ células ovas

Las HPC/OC se presentan como una posible alternativa terapéutica al trasplante hepático. Experimentos realizados en ratones con fallo hepático han demostrado la capacidad de las células ovas para integrarse en el parénquima hepático, diferenciarse a hepatocitos y repoblar el hígado, aunque la eficiencia de repoblación difiere mucho en función del modelo murino utilizado (Oertel y Shafritz, 2008). El trasplante de estas células constituye una prometedora herramienta terapéutica para diversas enfermedades hepáticas (Sandhu y col., 2001) ya que presenta ventajas como la elevada tasa de proliferación y la fácil manipulación *in vitro* de las células, un menor tamaño que aumentaría la eficiencia de integración y, además, una mayor accesibilidad habiéndose obtenido de un hígado de individuos adultos. Además, pueden obtenerse células madre/progenitoras de otros tejidos como piel, tejido adiposo, médula ósea y cordón umbilical que pueden ser dirigidas hacia el linaje

hepático (Cantz y col., 2008). Esta última opción resulta ventajosa de cara a evitar las terapias de inmunosupresión y, además, evitar la posibilidad de rechazo. Por otro lado, el conocimiento de las señales que regulan la regeneración de las HPC/OC resulta especialmente interesante como estrategia para impulsar la capacidad regenerativa de las células endógenas y aumentar así la eficacia del proceso, en lugar de realizar un trasplante. Esto posee gran importancia si se tiene en cuenta que estas células recorren un largo camino desde su trasplante hasta su diferenciación a hepatocitos funcionales, y que el entorno de un hígado dañado puede causar alteraciones en el destino final de estas células y por tanto en el desenlace del proceso regenerativo. De hecho, una de las principales dudas sobre la posible aplicación de las HPC/OC en terapia es la asociación que se ha establecido por algunos autores entre la expansión prolongada de estas células y el agravamiento del proceso fibrótico (Kuramitsu y col., 2013). Además, las HPC/OC son susceptibles de formaciones tumorales en un ambiente hepático tóxico (Steinberg y col., 1994). Todo esto revela la necesidad de descubrir los mecanismos de señalización que regulan el comportamiento de las HPC/OC, así como el mecanismo por el cual una célula progenitora puede sufrir un proceso de transformación, lo que es fundamental para poder diseñar terapias seguras y efectivas.

6. Células madre del cáncer (CSC, del inglés, *Cancer stem cells*) y su relación con el nicho celular.

Existe una interconexión entre la biología de las ASC y el cáncer. Precisamente, las ASC podrían estar implicadas en la aparición, crecimiento y expansión del HCC (Zhang y col., 2010). Las ASC se localizan dentro de nichos especializados (Figura 8) que permiten su auto-renovación, proliferación, diferenciación y migración de acuerdo con las necesidades del organismo. En el nicho que alberga a las ASC en condiciones normales se instaura un equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación hacia células maduras específicas que han sufrido un daño específico o han envejecido. Las CSC son ASC que han sido expuestas a tóxicos o sustancias mutagénicas, sufren un importante desequilibrio fisiológico que da lugar a un incremento proliferativo muy alto (Burkert y col., 2006; Wu y col., 2008;).

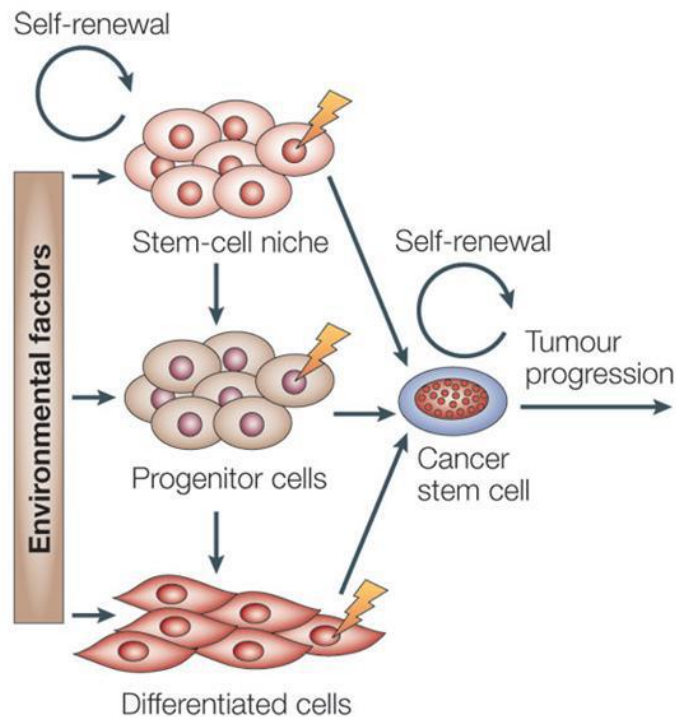


Figura 8. El nicho en el cual se alojan las células madre puede resultar clave en el proceso de formación de las CSC. (Publicada por Nature Publishing Group. Nature Review/Cancer.)

También se han realizado investigaciones para determinar cuál es el inmunofenotipo de las CSC que participan en el HCC con el propósito de desarrollar tratamientos capaces de detener la progresión de formaciones tumorales. (Marquardt y col., 2012; Darini y col., 2012)

Mayoritariamente las CSC se han identificado como células CD133+, pero además se ha demostrado que expresan otros marcadores en superficie como CD29, CD34, CD44, CD49, CD90 y CD117, los cuales se expresan además en células madre (Ma y col., 2007; Tomuleasa y col., 2010).

7. Terapia celular hepática con varios tipos y fuentes de SC.

7.1 Terapia celular con células madre mesenquimales

Las MSC poseen un gran potencial de multiplicación, propiedades inmunomoduladoras y una gran plasticidad para diferenciarse a cualquier tipo celular adulto. Las MSC no poseen moléculas de HLA en la membrana

plasmática y pueden inhibir la acción de células dendríticas y células T (Yagi y col., 2010).

Se piensa que las MSC de MO podrían ser la población celular con mayor potencialidad para regenerar el hígado (Cho y col., 2009).

La capacidad de las MSC para frenar el sistema inmunológico se ha demostrado en procesos como inflamación severa, daños por isquemia o en trasplante hepático ortotópico, lo cual puede ser clave para evitar los rechazos inmunológicos (Popp y col., 2009). Se cree que este control inmunológico es debido a que las MSC estimulan la liberación de IL-10, elemento fundamental en la restauración del normal funcionamiento hepático (Zhao y col., 2012).

Otros estudios vinculan la potencialidad terapéutica de las MSC con un aumento en la expresión de MMP-9 y MMP-13 (Rabani y col., 2010) o gracias a un mecanismo anti-oxidativo en las células parenquimatosas hepáticas (Cho y col., 2012).

7.2 Terapia celular con SP “Side population”

Las SP constituyen una población de BM-SC que han demostrado efectividad en regenerar el hígado en varios modelos experimentales de daño hepático (Abe y col., 2003). En otro estudio se trasplantaron células SP de un ratón macho a ratones hembra que habían recibido una dieta deficiente en colina y en estas fueron detectadas en el parénquima células SP positivas para el cromosoma Y, por lo que se mostró que procedían de la MO del donante. La función de estas células SP era la de facilitar y promover la regeneración hepática (Wulf y col., 2003). A pesar de ello existe una limitación para el uso terapéutico debido al escaso número de las que se dispone.

7.3 Terapia celular con células madre hematopoyéticas

Se ha experimentado con ratones que poseían un déficit enzimático, tirosinemia tipo I (FAH^{-/-}) a los que se trasplantó HSC lograron una normalidad en la actividad bioquímica. Las HSC conseguían llegar al hígado y diferenciarse a células parenquimatosas., careciendo de déficit enzimático y resultando FAH^{+/+} (Lagasse y col., 2000). También se estudió en ratones con hígados cirróticos obteniendo resultados semejantes, es decir, al introducir células CD133⁺ o CD34⁺ se evitó el avance de la cirrosis (Takami y col., 2012).

En un estudio se realizó una hepatectomía derecha y una embolización portal a pacientes con metástasis hepática y estos recibieron una infusión de células CD133⁺. Estas células lograron una regeneración rápida al aumentar el

volumen de lóbulos izquierdos del hígado (Fürst., 2007). También se demostró que la infusión autóloga de células CD133+ o CD34+ en pacientes cirróticos redujo los niveles de transaminasas, albúmina y bilirrubina (Salama y col., 2010).

Un gran inconveniente que tiene esta población celular es que se encuentran en muy bajo porcentaje tanto en sangre periférica como en MO, aunque es posible multiplicarlas en cultivo junto con citoquinas y con otros procesos de aféresis *in vivo* con G-CSF (Factor de crecimiento de las colonias de granulocitos). Aunque es cierto que tras este proceso pierdan cierto grado de plasticidad.

Contrariamente a lo demostrado, en otro estudio la infusión de células CD34+ a través de la arteria hepática en pacientes cirróticos, no logró recuperar su actividad funcional. Se piensa que fue debido a una inadecuada vía de infusión, a una concentración baja de células en el trasplante o incluso porque el grado de cirrosis era irreversible (Mohamadnejad y col., 2007).

7.4 Terapia celular con MAPC “Multipotent adult stem cells”

Se han realizado estudios en los que se empleó una infusión de estas células obtenidas a partir de un único aspirado de médula ósea y se cultivaron con suero bovino fetal inactivado por calor y factores de crecimiento EGF y PDGF (del inglés, *Platelet derived growth factor*), en pacientes con trasplante hepático ortotópico consiguiendo evitar el rechazo inmunológico agudo debido a las propiedades inmunomoduladoras de las MAPC, reduciendo además la isquemia de la vía biliar y el síndrome hepatorenal (Popp y col., 2011). Presentan enormes ventajas como son la capacidad inmunomoduladora y una gran plasticidad celular; pero al igual que las SP, constituyen una minoría, resultando una desventaja en la aplicación terapéutica.

8. Regeneración celular hepática después de un daño

Tras una hepatectomía parcial o lesión tóxica activa de hepatocitos; las BEC (células epiteliales biliares), son capaces de regenerarse por auto-duplicación en todos los vertebrados estudiados. (Figura 10-A).

En ratones se ha demostrado que tras lesiones por tóxicos existe una contribución de hepatocitos y BEC, dando lugar a células progenitoras y células ovoides (Williams y col., 2014). (Figura 10-B).

El trabajo de Kordes y col. (2014) sugiere que después de una lesión tóxica en la rata, las HSC se unen a las BEC como una potencial fuente de células progenitoras. La diferenciación de los hepatocitos hacia las BEC se ha observado en la rata después de la ligadura del conducto biliar, junto con un tratamiento previo de diamilina toxina biliar de metileno (DAPM) (Michalopoulos y col., 2005). (Figura 10-C).

La activación de las BEC a un estado progenitor se ha observado tras daños y el 95% de pérdida de hepatocitos en el hígado del pez cebra (Choi y col., 2014). (Figura 10-D).

El hígado humano puede recuperarse tras una insuficiencia hepática fulminante que puede causar hasta el 80% de pérdida de hepatocitos. Se observa una fuerte reacción ductular, con 30% de las células que expresan marcadores de BEC y linajes de hepatocitos. Las BEC parecen estar involucradas en el proceso de regeneración; sin embargo, no se ha podido comprobar por el momento si las BEC generan los hepatocitos. Son necesarios más estudios para entender si este proceso ocurre tras una diferenciación directa o tras la generación de una célula progenitora. (Hattoum y col., 2013). (Figura 10-E).

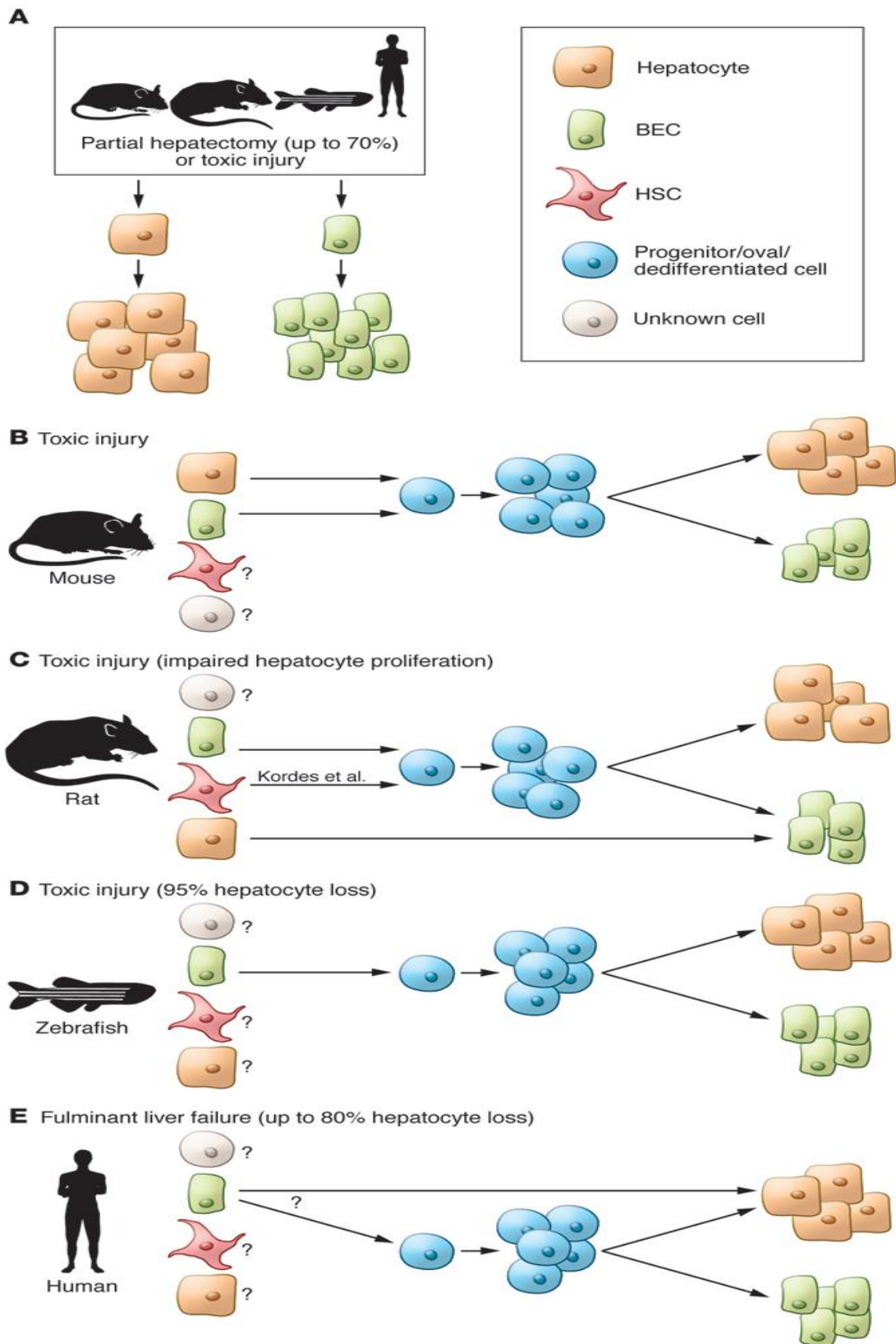


Figura 10. Representación esquemática de las células regeneradas en el hígado después de un daño.

(Publicada por Hindley y col., *J Clin Invest.* 2014; 124(12):5099–5102.)

9. Conclusiones:

Las células madre del hígado están compuestas por los propios hepatocitos, las células ovales, las células de la médula ósea y los hepatoblastos. Las células diferenciadas hepáticas, las células madres residentes potenciales e incluso las células madre de la médula ósea se pueden diferenciar, activar o reclutar, respectivamente, para reparar el hígado dañado.

El concepto de la transformación bidireccional y la plasticidad celular se definen como potencialmente importantes no solo para la reparación tisular sino también para la tumorigénesis.

Durante el desarrollo embrionario son los hepatoblastos los que dan origen a los dos linajes epiteliales hepáticos: el hepatocítico y el colangiocítico. Las células ovales se originan en asociación con el sistema biliar intrahepático, formado por hepatoblastos localizados en las cercanías del espacio portal. En el hígado adulto, los hepatocitos y los colangiocitos pueden replicarse. Las células ovales suponen una reserva bipotencial capaz de generar hepatocitos y colangiocitos.

Existen evidencias surgidas de numerosos estudios que demuestran que las células ovales (progenia temprana del compartimento de células madre hepáticas) son más primitivas y menos diferenciadas que los hepatocitos o las células del epitelio biliar y las diversas opciones de diferenciación que poseen, están firmemente establecidas. Por tanto, las células ovales muestran una potencialidad más elevada que los hepatocitos al estar clasificadas entre las células madre, ya que están menos diferenciadas, demuestran capacidad proliferativa y presentan múltiples opciones de diferenciación, entre las que se incluyen los hepatocitos y las células del epitelio biliar.

El conocimiento de los mecanismos de la transdiferenciación es la clave para el uso de las células madre en la repoblación y regeneración de órganos. Las demostraciones experimentales más importantes de la generación de hepatocitos a partir de células madre de la médula ósea, son la producción de hepatocitos en cultivo a partir de células madre multipotentes adultas y la repoblación de hígados de ratones por trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC). En cultivo, las células madre multipotentes adultas pueden diferenciarse en células de linajes mesodérmicos, ectodérmicos y endodérmicos. Una célula madre multipotente adulta inyectada en un blastocisto contribuye a la formación de todos los tejidos somáticos.

Así, las células madre multipotentes adultas humanas, o de roedores cuando se cultivan en presencia de distintos factores de crecimiento, se diferencian a hepatocitos maduros, con todas sus propiedades funcionales.

10. Referencias bibliográficas

1. Abe, S., Lauby, G., Boyer, C. y col. Transplanted BM and BM side population cells contribute progeny to the lung and liver in irradiated mice. *Cytotherapy* 2003; 5,523–533.
2. Akhurst, B., Croager, E.J., Farley-Roche, C.A y col. A modified choline-deficient, thionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *Hepatology* 2001; 34:519-522.
3. Alison, M.R., Islam, S., Lim, S y col. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J. Pathol.* 2009; 217:282-298.
4. Apte, U., Thompson M.D., Cui, S. y col. Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology* 2008; 47:288-295.
5. Behbahan, I. S. y col. New approaches in the differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells toward hepatocytes. *Stem Cell Rev.* 2011; 7,748–759
6. Bird, T. G., Lorenzini, S., Forbes, S. J. Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res.* 2008; 331, 283–300.
7. Boiani, M., Schöler, H. R. Regulatory networks in embryoderived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; 6, 872–884.
8. Burkert, J., Wright, N. A., Alison, M. R. Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J. Pathol.* 2006; 209, 287–297.
9. Camargo, F. D., Finegold, M., Goodell, M. A. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J. Clin. Invest.* 2004; 113, 1266–1270.
10. Cantz, T., Manns M.P., Ott, M. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res.* 2008; 331:271-282.
11. Cho, K.A. y col. Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biol. Int.* 2009; 33, 772–777.
12. Cho, K.A., Woo, S.Y., Seoh, J.Y., y col. Mesenchymal stem cells restore CCl4-induced liver injury by an antioxidative process. *Cell Biol. Int.* 2012; doi:10.1042/CBI20110634
13. Choi, M.G y col. Extensive conversion of hepatic biliary epithelial cells to hepatocytes after near total loss of hepatocytes in zebrafish. *Gastroenterology.* 2014; 146 (3):776–788.
14. Crosby, H. A., Kelly, D. A., Strain, A. J. y col. Human hepatic stem like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 2001; 120, 534–544.
15. Darini, C. Y. y col. Self-renewal gene tracking to identify tumourinitiating cells associated with metastatic potential. *Oncogene* 2012; **31**, 2438–2449.
16. Dezso, K., Jelnes P., Laszlo V., y col. Thy-1 is expressed in hepatic myofibroblasts and not oval cells in stem cell-mediated liver regeneration. *Am. J. Pathol.* 2007; 171:1529- 1537.
17. Draper, J. S., Moore, H. D., Ruban, L. N. y col. Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.*, 2004; 325–336.
18. Du, Z. y col. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. *J. Surg. Res.* 2013; doi: 10.1016/j.jss.2013.02.009
19. Duan, Y. y col. Differentiation and characterization of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 2010; **28**, 674–686.
20. Dudas, J., Mansuroglu, T., Batusic, D. y col. Thy-1 is an in vivo and in vitro marker of liver myofibroblasts. *Cell Tissue Res.* 2007; 329:503- 514.

21. Dudas, J., Mansuroglu, T., Batusic, D. y col. Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury. *Histochem. Cell Biol.* 2009; 131:115-127.
22. Eaker, S. S., Hawley, T. S., Ramezani, A. y col. Detection and enrichment of hematopoietic stem cells by side population phenotype. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* 2004; **263**, 161–180.
23. Erker, L., Grompe, M. Signaling networks in hepatic oval cell activation. *Stem Cell Res.* 2007; 1:90-102.
24. Factor, V.M., Radaeva S.A, Thorgeirsson S.S y col. Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am. J. Pathol.*, 1994; 145, pp. 409–422
25. Fellous, T. G. y col. Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology*. Baltim. Md 2009; 49, 1655–1663.
26. Fiegel, H. C. y col. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* Dayt. Ohio 2003; 21, 98–104.
27. Friedenstein, A. J. y col. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 1974; 2, 83–92.
28. Fürst, G. y col. Portal Vein Embolization and Autologous CD133+ Bone Marrow Stem Cells for Liver Regeneration: Initial Experience¹. *Radiology* 2007; **243**, 171–179.
29. Gouon-Evans, V. y col. BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell derived definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24, 1402–1411.
30. Guo, Y., Follo, M., Geiger, K. y col. Side-population cells from different precursor compartments. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2003; **12**, 71–82.
31. Harris, R. G. y col. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 2004; **305**, 90–93.
32. Hattoum, D. y col. Expression of hepatocyte epidermal growth factor receptor, FAS and glypican 3 in EpCAM positive regenerative clusters of hepatocytes, cholangiocytes, and progenitor cells in human liver failure. *Hum Pathol.* 2013; 44(5):743–749.
33. Heo, J. y col. Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver. *Hepatology*. Baltim. Md 2006; 44, 1478–1486.
34. Hindley, M. y col., *J Clin Invest.* 2014; 124(12):5099–5102.
35. Hoi, R. y col., *Cell Cycle* 10:15, 2423-2427; August 1, 2011; Landes Bioscience.
36. Houlihan, D. D., Newsome, P. N. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology* 2008; **135**, 438–450.
37. Hu, M., Kurobe, M., Jeong, Y.J, y col. Wnt/beta-catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 133:1579-1591.
38. Hussain, S. Z. y col. Side population cells derived from adult human liver generate hepatocyte-like cells in vitro. *Dig. Dis. Sci.* 2005; **50**, 1755–1763.
39. Ishii, K. y col. Hepatic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta. *Hepatology*. Baltim. Md 2008; 48, 597–606.
40. Itoh, T., Kamiya, Y., Okabe, M. y col. Inducible expression of Wnt genes during adult hepatic stem/progenitor cell response. *FEBS Lett.* 2009; 583:777-781.
41. Ishizaka, S. y col. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2002; 16, 1444–1446.
42. Jacobs, S. A. y col. Human multipotent adult progenitor cells are non-immunogenic and exert potent immunomodulatory effects on alloreactive T cell responses. *Cell Transplant.* 2012; doi:10.3727/096368912X657369

43. Jang, Y.Y., Collector, M. I., Baylin, S. B. y col. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat. Cell Biol.* 2004; **6**, 532–539.
44. Jelnes P., Santoni-Rugiu E, Rasmussen y col. Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration. *Hepatology.* 2007; Jun;45(6):1462-70.
45. Josefsen, D. y col. Side population cells in highly enriched CD34- positive cells from peripheral blood progenitor cells identify an immature subtype of hematopoietic progenitor cells but do not predict time to engraftment in patients treated with high-dose therapy. *Eur. J. Haematol.* 2011; **87**, 494–502.
46. Jiang, Y. y col. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 2002; **30**, 896–904.
47. Jiang, Y. y col. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; **418**, 41–49.
48. Kuramitsu, K., Sverdlov, D.Y., Liu, S.B y col. Failure of fibrotic liver regeneration in mice is linked to a severe fibrogenic response driven by hepatic progenitor cell activation. *Am. J. Pathol.* 2013; 183:182- 194.
49. Kim, K.S. y col. Induced pluripotent stem (iPS) cells and their future in psychiatry. *Neuropsychopharmacology* 2010; **35**, 346–348.
50. Körbling, M. y col. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N. Engl. J. Med.* 2002; **346**, 738–746.
51. Khurana, S., Mukhopadhyay, A. y col. Characterization of the Potential Subpopulation of Bone Marrow Cells Involved in the Repair of Injured Liver Tissue. *Stem Cells* 2007; **25**, 1439–1447.
52. Knight, B., Matthews, V.B., Olynyk, J.K. y col. Jekyll and Hyde: evolving perspectives on the function and potential of the adult liver progenitor (oval) cell. *Bioessays* 2005; 27:1192-1202.
53. Knittel, T., Aurisch, S., Neubauer, K. y col. Celltype-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. *Am. J. Pathol.* 1996; 149:449-462.
54. Kordes, R. y col. Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. *J Clin Invest.* 2014; 124(12):5503–5515.
55. Krampera, M. y col. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006; **6**, 435–441.
56. Kuo, T. K. y col. Stem Cell Therapy for Liver Disease: Parameters Governing the Success of Using Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Gastroenterology* 2008; **134**, 2111–2121.e3.
57. Lagasse, E. y col. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 2000; **6**, 1229–1234.
58. Leduc, E. H., Wilson, J.W. y col. Injury to liver cells in carbon tetrachloride poisoning; histochemical changes induced by carbon tetrachloride in mouse liver protected by sulfaguanidine. *Ama Arch. Pathol.* 1958; **65**, 147–157.
59. Lee, K.D. y col. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology. Baltim. Md* 2004; **40**, 1275–1284.
60. Libbrecht, L., Roskams, T. y col. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2002; 13:389-396.
61. Lowes, K. N., Brennan, B. A., Yeoh, G. C. y col. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity *Am J Pathol.* 1999; Feb; 154(2):537-41.
62. Ma, S. y col. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; **132**, 2542–2556.

63. Marquardt, J. U., Galle, P. R., Teufel, A. y col. Molecular diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma (HCC): an emerging field for advanced technologies. *J. Hepatol.* 2012; **56**, 267–275.
64. Martin, G.R. y col. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; Dec; **78**(12): 7634–7638.
65. Menthena, A. y col. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells Dayt. Ohio* 2004; **22**, 1049–1061.
66. Michalopoulos, L. y col. Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology.* 2005; **41**(3):535–544.
67. Mohamadnejad, M. y col. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J. Gastroenterol. Wjg* 2007; **13**, 3359– 3363.
68. Nierhoff, D., Ogawa, A., Oertel, M., Chen, Y.-Q. y col. Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity. *Hepatol. Baltim. Md* 2005; **42**, 130–139.
69. Oertel, M., Shafritz, D.A. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; **1782**:61–74.
70. Parekkadan, B. y col. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *Plos One* 2007; **2**, e941.
71. Pauwelyn, K. y col. Culture of mouse embryonic stem cells with serum but without exogenous growth factors is sufficient to generate functional hepatocyte-like cells. *Plos One* 2011; **6**, e23096.
72. Petersen, B. E. y col. Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatol. Baltim. Md* 2003; **37**, 632–640.
73. Popp, F. C. y col. Mesenchymal stem cells as immunomodulators after liver transplantation. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 2009; **15**, 1192–1198.
74. Popp, F. C. y col. Safety and feasibility of third-party multipotent adult progenitor cells for immunomodulation therapy after liver transplantation--a phase I study (MISOT-I). *J. Transl. Med.* 2011; **9**, 124.
75. Quintana-Bustamante, O. y col. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatol. Baltim. Md* 2006; **43**, 108–116.
76. Rabani, V. y col. Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. *Cell Biol. Int.* 2010; **34**, 601–605.
77. Rashid, S. T. y col. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* 2010; **120**, 3127–3136.
78. Reyes, M. y col. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; **98**, 2615–2625.
79. Roskams, T. y col. Progenitor cell involvement in cirrhotic human liver diseases: from controversy to consensus. *J. Hepatol.* 2003; **39**:431-434.
80. Roskams, T. A. y col. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatol. Baltim. Md* 2004; **39**, 1739–1745.
81. Roskams, T. y col. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 2006; **25**:3818- 3822.
82. Saji, Y. y col. Basic fibroblast growth factor promotes the transdifferentiation of mouse bone marrow cells into hepatic lineage cells via multiple liver-enriched transcription factors. *J. Hepatol.* 2004; **41**, 545–550.

83. Salama, H. y col. Autologous CD34+ and CD133+ stem cells transplantation in patients with end stage liver disease. *World J. Gastroenterol. Wjg* 2010; **16**, 5297–5305.
84. Sales-Pardo, I. y col. Flow cytometry of the Side Population: tips & tricks. *Cell. Oncol. Off. J. Int. Soc. Cell. Oncol.* 2006; **28**, 37–53.
85. Sandhu, J.S., Petkov, P.M., Dabeva, M.D. y col. Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells. *Am. J. Pathol.* 2001; **159**:1323-1334.
86. Sato, Y. y col. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005; **106**, 756–763.
87. Saulnier, N. y col. Mesenchymal stromal cells multipotency and plasticity: induction toward the hepatic lineage. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2009; **13 Suppl 1**, 71–78.
88. Schwartz, R. E. y col. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* 2002; **109**, 1291–1302.
89. Shimano, K. y col. Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1 *Am J Pathol.* 2003; Jul; **163**(1):3-9.
90. Shinozuka, H., Lombardi, B., Sell, S. y col. Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet. *Cancer Res.* 1978; **38**, 1092–1098.
91. Si-Tayeb, K. y col. Highly Efficient Generation of Human Hepatocyte-like Cells from Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology. Baltim. Md* 2010; **51**, 297–305.
92. Si-Tayeb, K. y col. Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *Bmc Dev. Biol.* 2010; **10**, 81.
93. Smink, J. J., Leutz, A. y col. Instruction of mesenchymal cell fate by the transcription factor C/EBP β . *Gene* 2012; **497**, 10–17.
94. Snykers, S., De Kock, J., Tamara, V. y col. Hepatic differentiation of mesenchymal stem cells: in vitro strategies. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* 2011; **698**, 305–314.
95. Sorrentino, B. P. Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; **4**, 878–888.
96. Steinberg, P., Steinbrecher, R., Radaeva, S. y col. Oval cell lines OC/CDE 6 and OC/CDE 22 give rise to cholangiocellular and undifferentiated carcinomas after transformation. *Lab Invest* 1994; **71**:700- 709.
97. Stock, P. y col. Hepatocytes derived from adult stem cells. *Transplant. Proc.* 2008; **40**, 620–623.
98. Stocum, D. L. y col. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 2001; **9**, 429–442.
99. Takahashi, K., Yamanaka, S. y col. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**, 663–676.
100. Takahashi, K. y col. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**, 861–872.
101. Takami, T., Terai, S., Sakaida, I. y col. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discov. Med.* 2012; **14**, 7–12.
102. Takayama, K. y col. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther* 2012; **20**, 127–137.
103. Tanimizu, N., Tsujimura, T., Takahide, K. y col. Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the oval cell compartment of rat liver. *Gene Expr. Patterns.* 2004; **5**:209-218.
104. Terada, N. y col. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; **416**, 542–545.

105. Theise, N. D. y col. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*. *Baltim. Md* 2000; **31**, 235–240.
106. Tomuleasa, C. y col. Isolation and characterization of hepatic cancer cells with stem-like properties from hepatocellular carcinoma. *J. Gastrointest. Liver Dis. Jgld* 2010; **19**, 61–67.
107. Ulloa-Montoya, F. y col. Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol.* 2007; **8**, R163.
108. Van Hul, N.K., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C. y col. Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology* 2009; 49:1625-1635.
109. Van Poll, D. y col. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*. *Baltim. Md* 2008; **47**, 1634–1643.
110. Vassilopoulos, G., Russell, D. W. y col. Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003; **13**, 480–485.
111. Votteler, M., Kluger, P. J., Walles, H. y col. Stem cell microenvironments--unveiling the secret of how stem cell fate is defined. *Macromol. Biosci.* 2010; **10**, 1302–1315.
112. Wagers, A. J., Sherwood, R. I., Christensen, J. L. y col. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; **297**, 2256–2259.
113. Wagers, A. J., Weissman, I. L y col. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell* 2004; **116**, 639–648.
114. Wang, X., Foster, M., Al-Dhalimy, M. y col. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 Suppl 2003; 1:11881-11888.
115. Williams y col. Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology*. 2014; 146(2):349–356.
116. Wilson, A., Trumpp, A. y col. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; **6**, 93–106.
117. Wu, X.-Z. y col. Origin of cancer stem cells: the role of self-renewal and differentiation. *Ann. Surg. Oncol.* 2008; **15**, 407–414.
118. Wulf, G. G., Luo, K.-L., Jackson, K. A., y col. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 2003; **88**, 368–378.
119. Yagi, H. y col. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* 2010; **19**, 667–679.
120. Yang, W., Yan, H.X., Chen, L. y col. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res.* 2008; 68:4287-4295.
121. Yi, T., Song, S. U. y col. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch. Pharm. Res.* 2012; **35**, 213–221.
122. Yin, Y. y col. AFP (+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo. *Stem Cells Dayt. Ohio* 2002; **20**, 338–346.
123. Zhang, N. y col. Characterization of a stem-like population in hepatocellular carcinoma MHCC97 cells. *Oncol. Rep.* 2010; **23**, 827– 831.
124. Zhao, W. y col. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. *World J. Gastroenterol. Wjg* 2012; **18**, 1048–1058.
125. Zheng, Y.W., Taniguchi, H. y col. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin. Liver Dis.* 2003; 23:337-348.
126. Zhou, J. y col. Side population rather than CD133 (+) cells distinguishes enriched tumorigenicity in hTERT-immortalized primary prostate cancer cells. *Mol. Cancer* 2011; 10

