

PROGRESOS EN HEPATOLOGÍA

Posibilidades terapéuticas de las células madre en el tratamiento de las enfermedades hepáticas

Pau Sancho-Bru

Unidad de Hepatología, Hospital Clínic de Barcelona, Centro de Investigación Biológica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

Recibido el 8 de marzo de 2011; aceptado el 9 de marzo de 2011

Disponible en Internet el 2 de junio de 2011

PALABRAS CLAVE

Células madre;
Enfermedades
hepáticas;
Terapia celular

KEYWORDS

Stem cells;
Liver diseases;
Cell therapy

Resumen La terapia celular y el uso de células madre para el tratamiento de las enfermedades hepáticas está todavía en una fase temprana de investigación. No obstante, la diversidad de células madre en cuanto a su origen, características y potencial de diferenciación abre un amplio abanico de posibilidades para el tratamiento de las enfermedades hepáticas. En este artículo se describen los principales tipos de células madre y su potencial para el tratamiento de las hepatopatías, así como las principales estrategias terapéuticas que se están explorando para el tratamiento de enfermedades hepáticas mediante terapia celular. Además, se recogen los principales estudios preclínicos y clínicos que indican que las células madre pueden llegar a ser una buena alternativa terapéutica en diferentes enfermedades hepáticas.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Therapeutic possibilities of stem cells in the treatment of liver diseases

Abstract Cell therapy and the use of stem cells in the treatment of liver diseases is still in the research phase. Nevertheless, the diversity of stem cells in terms of their origin, characteristics and potential for differentiation provides a wide spectrum of possibilities for the treatment of liver diseases. The present article describes the main types of stem cells and their potential for the treatment of liver diseases, as well as the main therapeutic strategies that are currently being explored for the treatment of these diseases through cell therapy. In addition, the main preclinical and clinical studies suggesting that stem cells could become an effective therapeutic alternative in distinct liver diseases are discussed.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La terapia celular se refiere al tratamiento de enfermedades mediante el uso de células, ya sea a través de la sustitución celular o mediante la mejora del funcionamiento de un

órgano o tejido dañado. La aplicación de la terapia celular para el tratamiento de enfermedades hepáticas no es un concepto nuevo. La hipótesis que los hepatocitos pueden ser aislados y trasplantados para la corrección de una alteración metabólica o un daño hepático fue propuesta hace más de 30 años^{1,2}. No obstante, la experiencia clínica en el trasplante de hepatocitos se limita a algunos casos aislados o series cortas de pacientes, principalmente dirigidos al tratamiento de enfermedades metabólicas, hepatitis fulminantes, o para mantener la función hepática durante el tiempo de espera para el trasplante hepático³⁻⁶. El principal impedimento para el desarrollo de una terapia celular con hepatocitos adultos es la dificultad de obtención de un número suficiente de hepatocitos viables, los cuales sólo pueden ser obtenidos de hígados humanos en buen estado y por tanto aptos para el trasplante hepático. Además, los hepatocitos son difíciles de manipular, criopreservar y no pueden ser expandidos en cultivo. Otra aplicación de la terapia celular es el desarrollo de hígados artificiales, los cuales pueden llegar a ser una buena herramienta de soporte para el mantenimiento de la función hepática. No obstante, el desarrollo de estos dispositivos se ha visto también limitado por la falta de hepatocitos funcionales y de células estromales de soporte. Por estas razones se está realizando un importante esfuerzo para encontrar nuevas fuentes de hepatocitos para su utilización en terapia celular. Entre ellas, la más prometedora es la utilización de células madre para la diferenciación y obtención de hepatocitos⁷. Una fuente inagotable de hepatocitos como las células madre sería clave para el desarrollo de terapias celulares para aquellas patologías en las que los hepatocitos presentan alteraciones genéticas, pérdida de la capacidad regenerativa o que el parénquima resulta dañado hasta el punto de no poder mantener la función hepática. No obstante, gracias a la capacidad regenerativa del hígado, situaciones clínicas como la hepatitis fulminante pueden no necesitar de la administración exógena de hepatocitos, pero sí requerir la modulación del microambiente del hígado y la estimulación de la regeneración endógena. En este sentido, algunos tipos de células madre secretan gran cantidad de factores capaces de inducir regeneración tisular, angiogénesis o modulación local de la respuesta inflamatoria, y por tanto están siendo consideradas como biofármacos.

La diversidad de células madre en cuanto a su origen, características y potencia puede llegar a ofrecer un amplio abanico de posibilidades para el tratamiento de las enfermedades del hígado que va más allá de la generación de hepatocitos y su trasplante para la sustitución y regeneración del parénquima hepático o para la generación de hígados artificiales. Así pues, el trasplante de células madre puede ir dirigido a: a) el reemplazo de hepatocitos dañados o no funcionales, b) la promoción de la regeneración endógena del parénquima, y c) la modulación de la respuesta inflamatoria e inmunológica (fig. 1).

Células madre para repoblar el parénquima hepático dañado

Las células madre son células inmaduras con capacidad de autorrenovarse y por tanto de dar lugar al menos a una célula hija idéntica a la célula madre, y a la vez,

con capacidad de adquirir características de linaje celular, dando lugar a células adultas totalmente diferenciadas. Una tercera característica que una célula madre debe cumplir para poder ser utilizada en terapia celular es la capacidad de repoblar un tejido y participar en el funcionamiento del órgano. Diferentes tipos de células madre cumplen estos criterios, pero no todos ellos presentan las mismas características en cuanto su capacidad de autorrenovación y su potencia⁸. Las células pluripotentes (células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas) son aquellas capaces de generar células de las 3 hojas embrionarias y generar todos los tejidos adultos de un organismo. Las células multipotentes (células mesenquimatosas, hematopoyéticas, células madre neurales, etc.) pueden ser aisladas de tejidos adultos, y tienen capacidad de diferenciarse a un número más limitado de tipos celulares pero comprendiendo células de más de un linaje celular. Las células progenitoras (progenitoras endoteliales, musculares, etc.) son células adultas con una potencia restringida a uno o pocos tipos celulares de un mismo órgano y con una capacidad de autorrenovación reducida. Estas células en muchos casos corresponden a poblaciones de amplificación que participan en la regeneración del tejido (fig. 2).

Para que un tipo de célula madre sea un buen candidato para ser utilizado en terapia celular, idealmente debe cumplir características como: estar bien caracterizada, ser fácilmente cultivable y fácil de preservar, tener gran capacidad de expansión, buena capacidad de diferenciación a hepatocitos, tener un buen perfil de seguridad, ser inmunoprivilegiada, buena capacidad de integración en el órgano y a ser posible estimular la regeneración endógena del tejido. En la [tabla 1](#) se resumen las características de diferentes tipos celulares propuestos para ser utilizados en terapia celular.

La repoblación del parénquima hepático con células madre depende de una eficiente diferenciación a hepatocitos funcionales. La diferenciación a hepatocitos ha sido descrita a partir de prácticamente todos los tipos de células madre descritos^{7,9,10}. Indistintamente de su origen mesenquimatoso o endodérmico, o de su aislamiento a partir de órganos adultos o embrionarios, un gran número de publicaciones muestran su capacidad de adquirir un fenotipo «hepático». Un análisis crítico de estos estudios revela que en muchos casos esto se reduce a la adquisición de algunas de las características típicas de hepatocitos. En los últimos tiempos se ha puesto en cuestión si la presencia de algunas propiedades de hepatocitos cualifica una célula para ser designada como «hepatocito». La realidad es que la mayoría de publicaciones presentan una caracterización muy superficial de las células diferenciadas, y que estas distan mucho de tener las características funcionales de hepatocitos maduros. Para que una célula pueda ser considerada un hepatocito requiere la expresión génica y proteica de marcadores específicos de hepatocito, capacidad funcional de síntesis, almacenamiento y detoxificación, y finalmente que sea capaz de integrarse en el hígado ejerciendo funciones propias^{7,10}. Las diferentes características de las células usadas para la diferenciación de hepatocitos, la variedad de protocolos y la falta de estandarización de los criterios que definen una buena diferenciación hace que sea muy difícil identificar la mejor estrategia para la obtención de hepatocitos a partir de células madre. En el [anexo](#) al final del

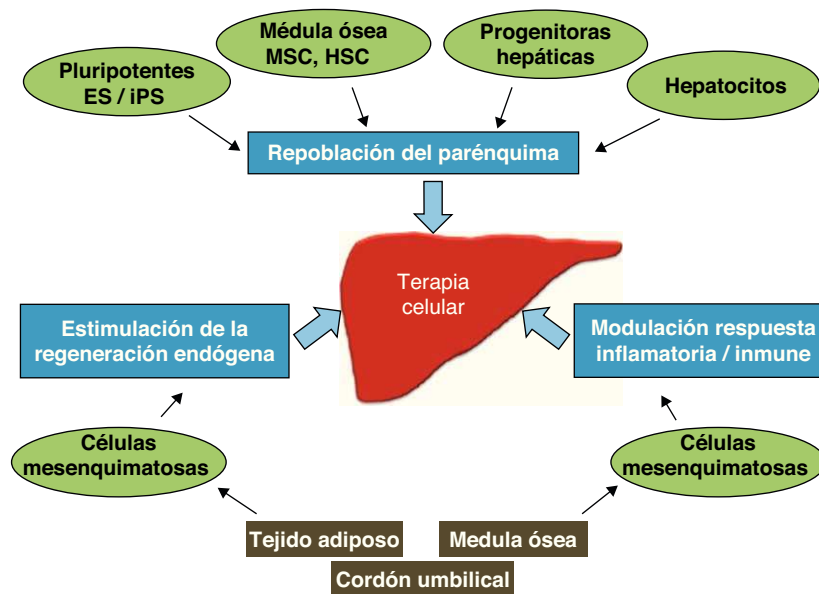


Figura 1 Terapia celular en enfermedades del hígado. La terapia celular puede abordarse a partir de 3 estrategias diferenciadas: en primer lugar, la sustitución o repoblación del parénquima hepático dañado. Estrategia en fase de experimentación preclínica que implica la diferenciación de las células madre y su integración funcional en el órgano. En segundo lugar, la estimulación de la regeneración hepática, explorada en casos clínicos mediante el uso de células mesenquimatosas las cuales promueven la estimulación y la proliferación de diferentes tipos celulares del hígado. En tercer lugar, la regulación de la respuesta inmunológica y inflamatoria mediante el trasplante de células mesenquimatosas, estrategia que se encuentra en fase de investigación clínica. ES: células embrionarias; iPS: células pluripotenciales inducidas; HSC: células hematopoyéticas; MSC: células mesenquimatosas.

artículo se describen los principales resultados obtenidos en la diferenciación de células madre a hepatocitos.

La experiencia adquirida con el trasplante de hepatocitos en diferentes enfermedades hepáticas, sobre todo en

errores del metabolismo, hace prever que muchos de los problemas detectados serán comunes para el trasplante de células madre. Estudios realizados en diferentes órganos señalan que es necesaria una amplia sustitución de las célu-

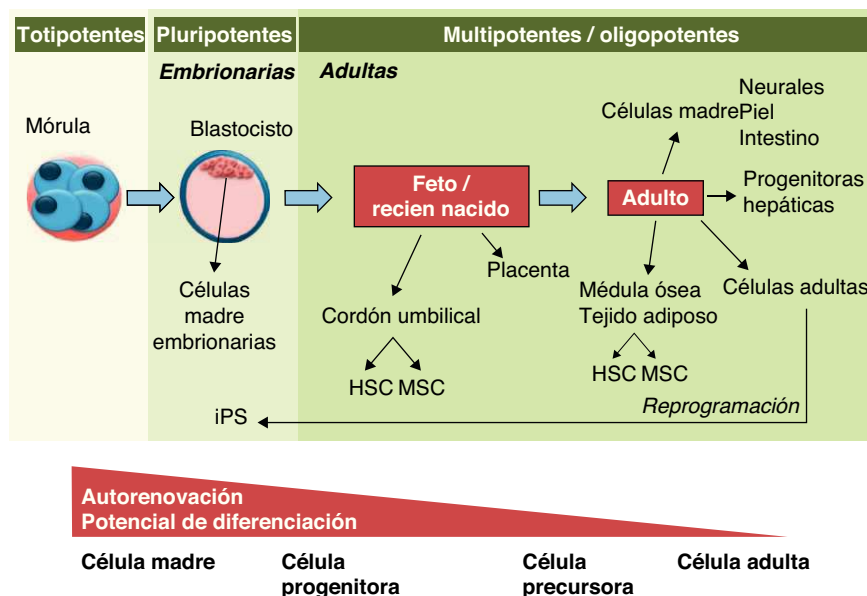


Figura 2 Capacidad de diferenciación y auto-renovación de las células madre. Las células madre pueden clasificarse según su potencia y capacidad de autorrenovación. Las células madre totipotentes tienen la capacidad de formar todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios; las pluripotenciales son capaces de dar lugar a células de las 3 líneas germinales; las células multipotentes pueden diferenciarse a células de más de una línea germinal; las oligopotentes tienen la capacidad de diferenciarse a más de un tipo celular de un mismo órgano. Finalmente, las células progenitoras son células ya determinadas las cuales presentan una capacidad de autorrenovación y diferenciación más restringida. HSC: células hematopoyéticas; MSC: células mesenquimatosas.

Tabla 1 Principales características de los tipos celulares candidatos a ser usados en terapia celular en enfermedades hepáticas

	Caracterización	Cultivo y preservación	Expansión	Diferenciación	Seguridad	Inmune privilegio	Integración	Efectos paracrinos	Movilizables
Hepatocitos	+++	-	-	+	+++	-	+++	NE	NA
Progenitoras hepáticas	+	++	+	++	NE	NE	+	NE	++
Mesenquimatosas/hematopoyéticas	+++	+++	++	+	+++	+++	+	+++	+++
Pluripotentes ES/iPS	+++	+++	+++	+++	.	+	+	NE	NA

NA: no aplicable; NE: no evaluado.

las del órgano dañado para la recuperación de su función, no obstante, el trasplante de hepatocitos ha demostrado que la sustitución de entre un 5 y un 15% del parénquima hepático con hepatocitos trasplantados es suficiente para la corrección o mejora de enfermedades metabólicas¹¹. Si bien una sustitución del 5% puede no revertir completamente un déficit metabólico, sí que puede convertir una enfermedad con un déficit total y alteraciones muy graves en una enfermedad tratable¹¹.

Debido a la gran capacidad regenerativa del hígado, para que una célula trasplantada pueda integrarse y proliferar en el hígado, son necesarias al menos 3 condiciones: 1) que haya «espacio», pérdida de parénquima hepático o daño hepatocitario; 2) que las células trasplantadas tengan una ventaja proliferativa respecto a los hepatocitos, y 3) que haya un ambiente idóneo para el mantenimiento o adquisición del fenotipo adecuado. La falta de espacio es un problema común en muchas de las enfermedades metabólicas del hígado, donde la alteración de un gen no comporta necesariamente el daño del parénquima. Estudios preclínicos en modelos animales han demostrado un mayor éxito en la terapia celular sustitutiva cuando el trasplante de hepatocitos era combinado con la aplicación de un daño en el parénquima, por ejemplo, la hepatectomía parcial, irradiación o isquemia de reperfusión en combinación con el bloqueo de la proliferación de los hepatocitos endógenos¹²⁻¹⁴. En la actualidad hay un amplio debate sobre las posibles maniobras aptas para ser utilizadas en pacientes para generar este espacio necesario, entre ellas, la isquemia reperfusión y la irradiación de parte del parénquima hepático son las que presentan una mayor viabilidad por su facilidad de ejecución y seguridad. La capacidad regenerativa del hígado es una de las principales causas de la pobre expansión de las células trasplantadas. Es por tanto necesario que las células trasplantadas tengan una ventaja proliferativa respecto a los hepatocitos endógenos para que tengan capacidad de repoblación del parénquima^{15,16}. La hepatitis fulminante o el fallo hepático por daño agudo sobre crónico son situaciones en las que hay una pérdida importante de parénquima hepático, y los hepatocitos presentan una marcada reducción de su capacidad proliferativa, y por tanto podrían ser buenas candidatas para ser tratadas con terapia celular. No obstante, el importante componente inflamatorio, con presencia de citocinas, factores de crecimiento y gran cantidad de radicales libres, hace que sea dudoso que las células trasplantadas den lugar a células sanas capaces de repoblar el hígado. En este sentido, diferentes grupos han levantado la voz de alarma advirtiendo que el trasplante de células mesenquimatosas en hígados cirróticos contribuye de manera muy pobre a la generación de hepatocitos pero da lugar a fibroblastos, pudiendo así contribuir a la fibrogenesis¹⁷.

La otra gran aplicación de los hepatocitos derivados de células madre para la terapia celular es el desarrollo de hígados artificiales. Estos son dispositivos mixtos que combinan componentes artificiales con un componente celular, normalmente hepatocitos. Los hígados artificiales han sido utilizados en ensayos clínicos como soporte a la función hepática en pacientes con fallo hepático^{18,19}. No obstante, los resultados obtenidos en estos estudios han sido dispares y en muchos casos no concluyentes o negativos. Los

malos resultados obtenidos son debidos principalmente a la variabilidad de los pacientes y enfermedades tratadas, y a la deficiente calidad del componente celular utilizado, hepatocitos porcinos o líneas tumorales¹⁸⁻²⁰. Una complicación añadida es la desdiferenciación y pérdida de función de los hepatocitos en estos dispositivos. En este sentido, se ha sugerido que el cocultivo de hepatocitos con células de origen mesenquimatoso permite la prolongación de la viabilidad y función del componente celular, pero esta estrategia no ha sido explorada en estudios con biorreactores de uso clínico. Es evidente que una fuente renovable de hepatocitos y células de soporte humanas permitirá la estandarización del componente celular en estos dispositivos facilitando su desarrollo y aplicación terapéutica.

Trasplante de células madre para estimular la regeneración hepática endógena

Es ampliamente aceptado que en la mayoría de enfermedades hepáticas, la restitución de la masa perdida del parénquima hepático se da gracias a la proliferación de los hepatocitos maduros, los cuales entran sincrónicamente en el ciclo celular para dar lugar a una respuesta proliferativa bien regulada. En circunstancias de daño hepático extremo y cuando los hepatocitos presentan una capacidad proliferativa disminuida, las células progenitoras hepáticas proliferan dando lugar a la reacción ductular contribuyendo a la generación de nuevos hepatocitos y colangiocitos²¹. El conocimiento de los mecanismos que controlan la capacidad regenerativa del hígado abre la posibilidad a la intervención en las principales vías implicadas en la proliferación de hepatocitos o células progenitoras en situaciones de daño²²⁻²⁴. En este sentido, la farmacología convencional nos ofrece la posibilidad de actuar sobre vías implicadas en la regeneración hepática, pero esta es claramente una estrategia reduccionista teniendo en cuenta que la regeneración hepática es un proceso complejo en el que intervienen multitud de estímulos, procesos y tipos celulares. Recientemente se ha sugerido que el trasplante de células madre (principalmente mesenquimatosas) puede ser una estrategia alternativa, ya que inducen un efecto pleiotrópico, actuando sobre la proliferación de los hepatocitos, pero también sobre células endoteliales, estrelladas y progenitoras, y a su vez teniendo un efecto modulador sobre la reacción inflamatoria necesaria para la regeneración hepática pero desfavorable para proliferación de los hepatocitos²⁵⁻²⁹.

En la actualidad las únicas células madre usadas en estudios clínicos para el tratamiento de las enfermedades hepáticas son las células madre derivadas de la médula ósea, cordón umbilical o células mesenquimatosas aisladas de tejido adiposo^{26,30}. La presencia de células derivadas del donante de la médula ósea en el hígado del receptor llevó a la creencia que estas podían dar lugar a hepatocitos mediante el fenómeno de transdiferenciación^{31,32}. No obstante, poco después fue demostrado que estas células derivaban de la fusión con hepatocitos y no de la diferenciación legítima de las células madre³³⁻³⁵. En la actualidad la generación de hepatocitos derivados de células de la médula ósea se ha excluido como proceso fisiológicamente relevante y sobre todo como alternativa clínicamente viable.

El daño hepático tanto agudo como crónico moviliza células de la médula ósea, las cuales migran a los focos de inflamación y participan en los procesos de remodelado tisular^{29,36,37}. Como se ha comentado anteriormente, estas células contribuyen principalmente a la formación de células de origen mesenquimatoso del hígado, y en raras ocasiones pueden dar lugar a hepatocitos^{17,38,39}. La participación de células de la médula ósea en la regeneración hepática sugiere que mediante la diferenciación a tipos celulares hepáticos o mediante la síntesis de factores solubles pueden promover la reparación tisular. Las células de la médula ósea pueden ser obtenidas mediante la aspiración directa, cultivadas y trasplantadas, o bien pueden ser movilizadas con G-CSF para promover su migración al hígado o ser obtenidas por aféresis^{40,41}. Ambas estrategias han sido utilizadas para la terapia celular en enfermedades hepáticas. Estudios en ratones han demostrado que el tratamiento con G-CSF aumenta el número de células de la médula ósea en el hígado, reduce el daño hepatocelular, mejora la función hepática y reduce la fibrosis en modelos animales de daño agudo y crónico⁴²⁻⁴⁴. En la actualidad diferentes ensayos han investigado la idoneidad y seguridad del uso de G-CSF en pacientes con cirrosis hepática⁴⁵. Todos los estudios se han realizado con pocos pacientes y por tanto tienen que ser valorarlos con cautela. Aunque la mayoría de estudios no evalúan la función hepática, la movilización de células de la médula ósea es segura en pacientes cirróticos y los resultados muestran que el tratamiento con G-CSF disminuye los niveles de transaminasas y baja la bilirrubina, indicando que podría desempeñar un papel en la protección frente al daño hepático y a la vez participar en la regeneración como ocurre en los modelos animales^{46,47}.

El trasplante de células derivadas de la médula ósea en modelos animales de regeneración y daño hepático se ha asociado a una mayor regeneración y una mejora de la función hepática. La promoción de la regeneración es debida a una multitud de factores: la estimulación de la proliferación y la disminución de la apoptosis de los hepatocitos, un aumento de la proliferación de células progenitoras, una disminución de la activación de las células estrelladas y por tanto una disminución de la deposición de matriz extracelular, y una modulación de la inflamación hepática^{25,27-29}. Además, en modelos de hepatitis fulminante, el trasplante de células mesenquimatosas (MSC) se asocia a una disminución de la mortalidad^{48,49}. Los mecanismos responsables de esta respuesta son ampliamente desconocidos. Además, pocos estudios han evaluado específicamente la distribución intrahepática de las células trasplantadas, su persistencia in vivo y su fenotipo después del trasplante. Pero la mayoría de estudios concluyen que las células mesenquimatosas (MSC) trasplantadas actuarían de manera paracrina, promoviendo la angiogénesis y por tanto la perfusión del hígado dañado, y mediante factores de crecimiento la proliferación y supervivencia de los hepatocitos. No obstante, algunos estudios son críticos con la utilización de MSC en procesos de fibrogénesis activa por la posible contribución de las células mesenquimatosas a la población de miofibroblastos del hígado y por tanto a la progresión de la fibrosis^{17,50}. Además, debido a la acción de las MSC sobre el sistema inmunitario y la síntesis de factores de crecimiento, algunos estudios han alertado que podrían promover el desarrollo de tumores, aunque en

ningún caso el trasplante de MSC se haya asociado a su aparición.

Los resultados positivos con el uso de células de la médula ósea para la estimulación de la regeneración hepática en modelos animales, sumado al excelente perfil de seguridad que presenta el trasplante de estas células, ha hecho que se haya pasado rápidamente a la fase de ensayos clínicos. Se ha sugerido el trasplante de MSC para promover la regeneración hepática en situaciones tan diferentes como el trasplante de donante vivo, el trasplante de hígados pequeños, las resecciones hepáticas o la hepatitis fulminante. Diferentes poblaciones de células de la médula ósea han sido utilizadas en ensayos de terapia celular, poblaciones mixtas de la médula ósea, células CD34+, CD133 o mesenquimatosas. El tratamiento con G-CSF y la infusión de células madre de la médula ósea en pacientes con cirrosis induce la mejora en la función hepática y la proliferación de células progenitoras del hígado, pero se desconoce la relevancia de este proceso ni su papel en la promoción de la regeneración hepática^{40,47,51,52}. Asimismo, el trasplante de MSC se ha demostrado seguro y eficaz en pacientes cirróticos para inducir una mejora en la función hepática o como adyuvante para pacientes que han recibido resección hepática⁵³⁻⁵⁵.

Trasplante de células madre para regular la respuesta inflamatoria-inmunitaria

Los efectos de las MSC son pleiotrópicos y por tanto es difícil discernir si sus efectos sobre la regeneración hepática son debidos a su acción paracrina induciendo la proliferación celular y la angiogénesis, o bien debido a su capacidad moduladora de la respuesta inmunológica y inflamatoria. Es evidente que en enfermedades con un fuerte componente inflamatorio, como la hepatitis fulminante, el trasplante de células mesenquimatosas tendrá un efecto dual ejerciendo un efecto sobre la respuesta inflamatoria pero también sobre la proliferación hepatocelular. Cabe destacar que las MSC son consideradas inmuno-privilegiadas, es decir, que no son rechazadas por el organismo receptor, permitiendo el trasplante de células con HLA diferente sin necesidad de inmunosupresión⁵⁶⁻⁵⁸.

Las MSC presentan características únicas en cuanto a su capacidad de regular la respuesta inmunológica e inflamatoria. Las MSC responden al daño hepático migrando a la zona con inflamación y ejerciendo una acción inmunomoduladora⁵⁶⁻⁵⁸. Estas regulan tanto la respuesta inmunitaria innata como adaptativa. Inducen la supresión de la capacidad citotóxica de las células *natural killers*^{59,60}, inhiben la maduración de monocitos y actúan sobre la capacidad de presentación de antígenos de las células dendríticas promoviendo un fenotipo regulador^{61,62}. Los efectos de las MSC sobre el sistema inmunitario adaptativo también son múltiples. Las MSC inhiben la proliferación de linfocitos T, promoviendo así un fenotipo antiinflamatorio^{63,64}. Además algunos estudios señalan que podrían reducir la citotoxicidad y la síntesis de citocinas en las células CD8⁶⁵. Estos efectos han estado extensamente estudiados in vitro, pero sus mecanismos son ampliamente desconocidos. No obstante, parece que el mecanismo es independiente del contacto y seguramente mediado por factores solubles^{58,66}.

En muchas situaciones clínicas el trasplante de MSC tendrá lugar en ambientes con una elevada respuesta inflamatoria, por ello es importante tener en cuenta los efectos de las diferentes sustancias inflamatorias sobre el fenotipo y la acción de las MSC. Por un lado, la presencia de interferón-gamma juntamente con cualquiera de las citocinas proinflamatorias TNF-alfa, IL-1 alfa o IL-1beta promueve la síntesis de óxido nítrico y la actividad inmunosupresora de las MSC⁶⁷, sugiriendo que es necesaria la estimulación de las MSC por sustancias inflamatorias para inducir un fenotipo inmunomodulador. No obstante, algunos estudios han demostrado que la activación de receptores TLR, y la acción de ligandos inflamatorios promueve su proliferación y secreción de citocinas, pudiendo adoptar un fenotipo proinflamatorio^{68,69}.

Se han realizado pocos ensayos clínicos hasta la fecha para la evaluación del efecto inmunomodulador de las MSC. La mayoría consisten en casos aislados o pequeños grupos de pacientes que han permitido evaluar la seguridad más que la eficacia del tratamiento con MSC. Entre ellos encontramos estudios en fase I destinados a evaluar el tratamiento de las MSC en la enfermedad de Crohn⁷⁰ o la esclerosis múltiple⁷¹. El tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped es quizá la única excepción. Le Blanc et al publicaron en 2008 el primer estudio clínico en fase II utilizando MSC autólogas y alogénicas para su tratamiento demostrando una respuesta en pacientes resistentes a esteroides con enfermedad aguda⁵⁷. No obstante, otros ensayos han aportado resultados dispares en cuanto a la respuesta al tratamiento⁷², incluidos aquellos realizados por la compañía Osiris Therapeutics.

Otro importante campo de posible aplicación de las MSC es la modulación de la reacción inflamatoria por infecciones bacterianas. Factores solubles sintetizados por las MSC como el péptido antimicrobiano LL-37 tienen un efecto antimicrobiano, reduciendo su crecimiento⁷³. Además el trasplante de MSC atenúa la inflamación y mejora la supervivencia en sepsis experimental por un mecanismo dependiente de la síntesis de prostaglandina-E2⁷⁴⁻⁷⁶.

Los resultados preliminares obtenidos en diferentes órganos sugieren que las MSC pueden tener un gran potencial para su uso en la modulación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria en diferentes enfermedades hepáticas. No obstante, pocos estudios evalúan estos efectos moduladores en hepatopatías. El trasplante de MSC está siendo evaluado en modelos animales de daño hepático crónico^{49,77,78} y en ensayos clínicos en hepatopatía crónica o insuficiencia hepática terminal, donde las MSC pueden ejercer un efecto sobre la regeneración hepática y la respuesta inflamatoria e inmunológica. A la espera de la publicación de los resultados de ensayos clínicos en el tratamiento de enfermedades hepáticas, en la página web www.clinicaltrials.gov encontramos un buen número de ensayos clínicos dirigidos a evaluar la eficacia de las células mesenquimatosas en el tratamiento de la cirrosis hepática, la falla hepática aguda, la hipercolesterolemia familiar o para promover la regeneración después de una resección hepática.

Consideraciones finales

Las posibilidades terapéuticas de las células madre para el tratamiento de las hepatopatías son múltiples. No obstante,

todavía falta recorrer un largo camino para que la terapia celular sea una realidad en la práctica clínica. Para ello es esencial determinar el perfil de seguridad de algunos tipos de células madre en cuanto a su capacidad de generar tumores, estudiar la estabilidad del fenotipo celular que vamos a trasplantar, y sobre todo conocer la función y los mecanismos de acción de estas células en el contexto de la enfermedad hepática. Además, la terapia celular no será una realidad hasta que todos los procesos implicados en el tratamiento estén estandarizados y validados. Esta estandarización es importante que tenga lugar a todos los niveles, empezando por la investigación básica, seguido de los estudios preclínicos y finalmente mediante ensayos clínicos bien controlados. Para que la terapia celular tenga éxito en el futuro, es importante 1) estandarizar el método de obtención, la caracterización y la manipulación de las células usadas para la terapia celular; 2) desarrollar modelos animales que reproduzcan fielmente las características de las enfermedades que se van a tratar; 3) estandarizar el método de administración y posibles maniobras necesarias para el trasplante celular; 4) identificar aquellos pacientes y enfermedades susceptibles de tratamiento; 5) definir los efectos y resultados deseados, y 6) diseñar ensayos clínicos bien controlados.

Financiación

Pau Sancho-Bru tiene una beca del Ministerio de Ciencia e Innovación, Juan de la Cierva (JCI-2009-03849).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el Centre Esther Koplowitz.

Anexo 1. Evidencias de que diferentes tipos de células madre pueden ser diferenciadas a hepatocitos

Células pluripotentes. Células madre embrionarias (ESC) y células pluripotenciales inducidas (iPS): Las células madre embrionarias ESC son células aisladas a partir del cultivo del embrioblasto^{79,80}. En condiciones in vitro pueden ser cultivadas indefinidamente e inducidas a diferenciarse a células de las 3 líneas embrionarias. Esto hace que sean una fuente inagotable de células, pero a su vez constituye el principal problema para su aplicación en terapia celular, ya que cuando son trasplantadas indiferenciadas forman teratomas. Recientemente se ha descrito la generación de células pluripotenciales inducidas (iPS). Mediante la expresión de un reducido número de factores de crecimiento implicados en el mantenimiento de la pluripotencialidad es posible generar células con características de células embrionarias a partir de cualquier célula adulta. Este descubrimiento ha abierto un importante campo de investigación, ya que estas células pueden ser obtenidas de pacientes y ser usadas como

modelos in vitro de enfermedades, y a su vez pueden llegar a permitir el autotrasplante, evitando el rechazo. Numerosos artículos describen la diferenciación de ESC e iPS a hepatocitos. Ambas pueden ser diferenciadas espontáneamente mediante la supresión de las condiciones de cultivo, o bien pueden ser estimuladas con sustancias que inducen su diferenciación a lo largo del desarrollo embrionario permitiendo obtener células con características fenotípicas y funcionales de hepatocitos⁸¹⁻⁸⁶. El trasplante de células diferenciadas en modelos animales de daño hepático ha permitido la identificación de hepatocitos funcionales, pero la eficiencia es muy baja y ningún estudio ha logrado revertir el fenotipo del modelo animal de daño hepático⁸⁷⁻⁹⁰.

Células mesenquimatosas y hematopoyéticas: La médula ósea contiene al menos 2 poblaciones de células madre, las células mesenquimatosas (MSC) y las hematopoyéticas (HSC). Las HSC son una pequeña subpoblación de células de la médula ósea (< 0,01%) con la capacidad de mantener la población de todos los tipos celulares de la sangre. La mayoría de estudios que han investigado la diferenciación de HSC a hepatocitos lo han hecho mediante el trasplante de poblaciones no purificadas de células de la médula ósea en modelos animales de daño hepático. No obstante, pocos estudios han investigado la diferenciación directa in vitro o excluyendo la fusión in vivo⁹¹⁻⁹³. Las MSC fueron inicialmente descritas como células de la médula ósea capaces de formar colonias y diferenciarse a tipos celulares mesenquimatosos. Principalmente han sido obtenidas de médula ósea, pero también de tejido adiposo⁹⁴, placenta⁹⁵, líquido amniótico⁹⁶, etc. Los criterios mínimos que definen una MSC son la expresión de CD105, CD73 y CD90, pero no CD45, CD34 o CD14⁹⁷, la adherencia en plástico y la capacidad de diferenciarse a adipocitos, condrocitos y osteoblastos⁹⁷. En los últimos años se ha descrito su capacidad de diferenciarse in vitro a células con algunas características de hepatocitos⁹⁸⁻¹⁰¹, y a integrarse en el parénquima hepático^{98,99} aunque con una eficiencia baja.

Progenitoras hepáticas: Las características fenotípicas y funcionales de las células progenitoras hepáticas no están bien definidas. Está aceptado que las células progenitoras se encuentran en los canales de Hering^{102,103} y son activadas cuando hay un daño hepático importante, principalmente cuando la capacidad replicativa de los hepatocitos está afectada y hay una pérdida importante del parénquima. Este activación se da en hepatitis fulminante, daño agudo sobre crónico y en menor medida en la cirrosis^{104,105}. Se asume que estas células proliferan y se diferencian dando lugar a hepatocitos y colangiocitos participando en la regeneración hepática. Aunque su fenotipo no está bien caracterizado, expresan marcadores descritos en otros tipos de células madre como CD133, CD44 y EpCAM, pero también marcadores hepatocitarios inmaduros como HNF4 y biliares como la queratina 7 y 9^{106,107}. Las características del nicho de las células progenitoras humanas, y los factores que gobiernan su proliferación y diferenciación son ampliamente desconocidos, pero es esperable que un mejor conocimiento de estos permita estimular la participación de las células progenitoras en la regeneración hepática y eventualmente que puedan ser utilizadas en terapia celular.

Bibliografía

- Demetriou AA, Whiting JF, Feldman D, Levenson SM, Chowdhury NR, Mosconi AD, et al. Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes. *Science*. 1986;233:1190-2.
- Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, et al. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science*. 1976;192:892-4.
- Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1998;338:1422-6.
- Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet*. 2002;359:317-8.
- Stephenne X, Najimi M, Sibille C, Nassogne MC, Smets F, Sokal EM. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology*. 2006;130:1317-23.
- Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation*. 2006;82:441-9.
- Sancho-Bru P, Najimi M, Caruso M, Pauwelyn K, Cantz T, Forbes S, et al. Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the process from bench to bedside? *Gut*. 2009;58:594-603.
- Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaillie CM. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:726-37.
- Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation*. 2010;79:65-73.
- Snykers S, de Kock J, Rogiers V, Vanhaecke T. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells*. 2009;27:577-605.
- Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis*. 1999;19:39-48.
- Koenig S, Yuan Q, Krause P, Christiansen H, Rave-Fraenk M, Kafert-Kasting S, et al. Regional transient portal ischemia and irradiation as preparative regimen for hepatocyte transplantation. *Cell Transplant*. 2011;20:303-11.
- Muraca M, Ferrareso C, Vilei MT, et al. Liver repopulation with bone marrow derived cells improves the metabolic disorder in the Gunn rat. *Gut*. 2007;56:1725-35.
- Yamanouchi K, Zhou H, Roy-Chowdhury N, Macaluso F, Liu L, Yamamoto T, et al. Hepatic irradiation augments engraftment of donor cells following hepatocyte transplantation. *Hepatology*. 2009;49:258-67.
- Grompe M. Therapeutic liver repopulation for the treatment of metabolic liver diseases. *Hum Cell*. 1999;12:171-80.
- Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol*. 1997;151:1273-80.
- di Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, Mareschi K, Rustichell D, Novo E, et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut*. 2008;57:223-31.
- Demetriou AA, Brown Jr RS, Busuttil RW, et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg*. 2004;239:660-7, discussion 667-670.
- Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, et al. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology*. 1996;24:1446-51.
- Kjaergard LL, Liu J, Als-Nielsen B, Gluud C. Artificial and bioartificial support systems for acute and acute-on-chronic liver failure: a systematic review. *JAMA*. 2003;289:217-22.
- Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*. 2009;137:466-81.
- Erker L, Grompe M. Signaling networks in hepatic oval cell activation. *Stem Cell Res*. 2007;1:90-102.
- Sanchez A, Fabregat I. Growth factor- and cytokine-driven pathways governing liver stemness and differentiation. *World J Gastroenterol*. 2010;16:5148-61.
- Zaret KS, Grompe M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science*. 2008;322:1490-4.
- Popp FC, Renner P, Eggenhofer E, Slowik P, Geissler EK, Piso P, et al. Mesenchymal stem cells as immunomodulators after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2009;15:1192-8.
- Souza BS, Nogueira RC, de Oliveira SA, et al. Current status of stem cell therapy for liver diseases. *Cell Transplant*. 2009;18:1261-79.
- Van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*. 2008;47:1634-43.
- Ishikawa T, Banas A, Hagiwara K, Iwaguro H, Ochiya T. Stem cells for hepatic regeneration: the role of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010;5:182-9.
- Chen Y, Xiang LX, Shao JZ, Pan RL, Wang YX, Dong XJ, et al. Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver. *J Cell Mol Med*. 2010;14:1494-508.
- Stutchfield BM, Forbes SJ, Wigmore SJ. Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease. *Liver Transpl*. 2010;16:827-36.
- Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*. 2000;406:257.
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*. 2000;31:235-40.
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. 2003;422:901-4.
- Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 2002;297:2256-9.
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al Dhalimy M, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003;422:897-901.
- Lemoli RM, Catani L, Talarico S, Loggi E, Gramenzi A, Baccarani U, et al. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells*. 2006;24:2817-25.
- De Silvestro G, Vicarioto M, Donadel C, Menegazzo M, Marson P, Corsini A. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology*. 2004;51:805-10.
- Li C, Kong Y, Wang H, Wang S, Yu H, Liu X, et al. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis. *J Hepatol*. 2009;50:1174-83.
- Chang YJ, Liu JW, Lin PC, et al. Mesenchymal stem cells facilitate recovery from chemically induced liver damage and decrease liver fibrosis. *Life Sci*. 2009;85:517-25.
- Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*. 2006;24:2292-8.

41. Lorenzini S, Isidori A, Catani L, et al. Stem cell mobilization and collection in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* May 2008;27:932-9.
42. Mark AL, Sun Z, Warren DS, Lonze BE, Knabel MK, Melville Williams GM, et al. Stem cell mobilization is life saving in an animal model of acute liver failure. *Ann Surg.* 2010;252:591-6.
43. Li N, Zhang L, Li H, Fang B. Human CD34+ cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor ameliorate radiation-induced liver damage in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1:22.
44. Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol.* 2005;33:108-19.
45. Gaia S, Smedile A, Omede P, et al. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol.* 2006;45:13-9.
46. Salama H, Zekri AR, Zern M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases. *Cell Transplant.* 2010;19:1475-86.
47. Spahr L, Lambert JF, Rubbia-Brandt L, et al. Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial. *Hepatology.* 2008;48:221-9.
48. Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One.* 2007;2:e941.
49. Yan Y, Xu W, Qian H, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo. *Liver Int.* 2009;29:356-65.
50. Dalakas E, Newsome PN, Boyle S, et al. Bone marrow stem cells contribute to alcohol liver fibrosis in humans. *Stem Cells Dev.* 2010;19:1417-25.
51. Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN, et al. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1952-8.
52. Kim JK, Park YN, Kim JS, et al. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant.* 2010;19:1237-46.
53. Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009;21:1199-205.
54. Ismail A, Fouad O, Abdelnasser A, Chowdhury A, Selim A. Stem cell therapy improves the outcome of liver resection in cirrhotics. *J Gastrointest Cancer.* 2010;41:17-23.
55. Am Esch 2nd JS, Knoefel WT, Klein M, et al. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells.* 2005;23:463-70.
56. Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol.* 2008;36:733-41.
57. Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371:1579-86.
58. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:726-36.
59. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* 2008;111:1327-33.
60. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006;107:1484-90.
61. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2005;105:4120-6.
62. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005;105:2214-9.
63. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105:1815-22.
64. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005;105:2821-7.
65. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107:367-72.
66. Crop M, Baan C, Weimar W, Hoogduijn M. Potential of mesenchymal stem cells as immune therapy in solid-organ transplantation. *Transpl Int.* 2009;22:365-76.
67. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 2008;2:141-50.
68. Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells.* 2008;26:99-107.
69. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, et al. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells.* 2008;26:279-89.
70. Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut.* 2010;59:1662-9.
71. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med.* 2007;10:459-66.
72. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:804-11.
73. Krasnodembkaya A, Song Y, Fang X, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells.* 2010;28:2229-38.
74. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* 2009;15:42-9. PMID: 2706487.
75. Gonzalez-Rey E, Anderson P, Gonzalez MA, Rico L, Buscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut.* 2009;58:929-39.
76. Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving

- survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:1047–57.
77. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, et al. Reactive bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1. *Mol Ther.* 2010;18:1857–64.
 78. Carvalho AB, Quintanilha LF, Dias JV, et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells.* 2008;26:1307–14.
 79. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292:154–6.
 80. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:7634–8.
 81. Jones EA, Tosh D, Wilson DI, Lindsay S, Forrester LM. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res.* 2002;272:15–22.
 82. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett.* 2001;497:15–9.
 83. Yamamoto H, Quinn G, Asari A, Yamanokuchi H, Teratani T, Terada M, et al. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology.* 2003;37:983–93.
 84. Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation.* 2004;72:230–8.
 85. Roelandt P, Pauwelyn KA, Sancho-Bru P, Subramanian K, Ordovas L, Vanuytsel K, et al. Human embryonic and rat adult stem cells with primitive endoderm-like phenotype can be fated to definitive endoderm, and finally hepatocyte-like cells. *PLoS One.* 2010; 5:e12101. PMID: 2920330.
 86. Sancho-Bru P, Roelandt P, Narain N, et al. Directed differentiation of murine-induced pluripotent stem cells to functional hepatocyte-like cells. *J Hepatol.* 2011;54:98–107.
 87. Heo J, Factor VM, Uren T, et al. Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver. *Hepatology.* 2006;44:1478–86.
 88. Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, et al. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology.* 2005;41:836–46.
 89. Yin Y, Lim YK, Salto-Tellez M, Ng SC, Lin CS, Lim SK. AFP(+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo. *Stem Cells.* 2002;20:338–46.
 90. Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology.* 2007;45:1229–39.
 91. Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, et al. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells.* 2003;21:98–104.
 92. Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol.* 2004;6:532–9.
 93. Almeida-Porada G, Porada CD, Chamberlain J, Torabi A, Zanjani ED. Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood.* 2004;104:2582–90.
 94. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology.* 2007;46:219–28.
 95. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells.* 2004;22:1338–45.
 96. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003;102:1548–9.
 97. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315–7.
 98. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut.* 2007;56:405–15.
 99. Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood.* 2005;106:756–63.
 100. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology.* 2004;40:1275–84.
 101. Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, et al. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298:24–30.
 102. Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene.* 2006;25:3818–22.
 103. Roskams T, Cassiman D, De Vos R, Libbrecht L. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;280:910–23.
 104. Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis.* 2003;23:385–96.
 105. Bird TG, Lorenzini S, Forbes SJ. Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res.* 2008;331:283–300.
 106. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, et al. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells.* 2006;24:2840–50.
 107. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med.* 2007;204:1973–87.