

Células madre del tejido adiposo: plasticidad hepática

Ana Bonora-Centelles^{a,b}, José Vicente Castell^{a,b,c} y María José Gómez-Lechón^{a,b}

^aUnidad de Hepatología Experimental. Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe. Valencia. España.

^bCIBERehd. FIS. España.

^cDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia. Valencia. España.

RESUMEN

Actualmente el único tratamiento efectivo para las enfermedades hepáticas en estadio terminal es el trasplante de hígado. El número de pacientes en lista de espera aumenta considerablemente cada año, dando lugar a una mayor desproporción entre la oferta y la demanda de un hígado sano. El conocimiento y el posible uso de las células madre ha despertado un gran interés en el campo de la hepatología, haciendo de ellas una de las alternativas más prometedoras a corto plazo. La terapia celular hepática permitiría suplir al hígado de células sanas capaces de llevar a cabo las funciones que las células dañadas no son capaces de desarrollar. Observaciones recientes han puesto de manifiesto la capacidad de las células madre de diferenciarse hacia diferentes linajes celulares. La diferenciación hepática de células madre adultas de diversos orígenes ha dado resultados muy prometedores. El tejido adiposo contiene en el individuo adulto un reservorio de células madre capaces de ser inducidas y diferenciadas hacia diferentes estirpes celulares, presentando un elevado grado de plasticidad celular. La abundancia de este tejido y su fácil accesibilidad hacen de él una prometedora fuente de células madre adultas para su uso en terapia celular hepática. Se presenta una revisión de los avances obtenidos en la diferenciación de células madre procedentes del tejido adiposo hacia células de fenotipo hepático y sus posibles aplicaciones como un método terapéutico con la finalidad de mantener la función hepática del paciente durante el período de espera hasta recibir el trasplante, o para facilitar la regeneración hepática en casos de fallo hepático fulminante, y para el tratamiento de pacientes con metabolopatías congénitas.

ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS: HEPATIC PLASTICITY

Currently, the only effective treatment for end-stage liver disease is liver transplantation. The number of patients on the waiting list increases considerably each year, giving rise to a wide imbalance between supply and demand for healthy livers. Knowledge of stem cells and their possible use have awakened great interest in the field of hepatology, these cells being one of the most promising short-term alternatives. Hepatic stem cell therapy consists of the implantation of healthy cells capable of performing the functions that damaged cells are unable to carry out. Recent observations indicate that several stem cells can differentiate into distinct cell lineages. Hepatic differentiation of adult stem cells from several origins has yielded highly promising results. Adipose tissue in adults contains a reservoir of stem cells that can be induced and differentiated into different types of cells, showing a high degree of plasticity. Because of its abundance and easy access, adipose tissue is a promising source of adult stem cells for hepatic stem cell therapy. The present article reviews the progress made in the differentiation of adult stem cells from adipose tissue into cells with hepatic phenotype. We also discuss the potential application of this technique as a therapy for temporary metabolic support in patients with end-stage liver failure awaiting whole organ transplantation, as a method to support liver function and facilitate regeneration of the native liver in cases of fulminant hepatic failure, and as a treatment in patients with genetic metabolic defects in vital liver functions.

Correspondencia: Dra. M.J. Gómez-Lechón.
Unidad de Hepatología Experimental.
Centro de Investigación Hospital Universitario La Fe.
Avda. Campanar, 21. 46009 Valencia. España.
Correo electrónico: gomez_mjo@gva.es

Recibido el 25-7-2007; aceptado para su publicación el 5-10-2007.

INTRODUCCIÓN

El trasplante hepático es, actualmente, el único tratamiento efectivo existente para las enfermedades hepáticas en estadio terminal. A pesar del incremento constante del número de trasplantes hepáticos realizados, el número de pacientes en lista de espera aumenta cada año y, por tanto,

también se incrementa el tiempo de espera y el número de pacientes que fallecen sin llegar a ser trasplantados. Para paliar estos problemas y aumentar el número de trasplantes, se han utilizado varias estrategias. Utilizar injertos procedentes de donantes que hace pocos años no se consideraban aceptables, como los donantes de más de 80 años de edad¹, la extracción de órganos a donantes en paro cardíaco², la división del hígado donante (*split*), que permite obtener injertos para dos receptores³, el trasplante a partir de un donante vivo⁴, y finalmente el xenotrasplante (el trasplante de un órgano de otra especie animal), que es teóricamente una solución prometedora ante la escasez de órganos. Sin embargo, aún no ha sido posible controlar la respuesta inmunitaria celular en el rechazo de los xenoinjertos y la respuesta inmunitaria humoral. Por tanto, teniendo en cuenta que las enfermedades hepáticas afectan aproximadamente a un 17,5% de la población mundial⁵, parece justificado plantearse nuevas alternativas al trasplante alogénico de hígado. Actualmente, la terapia celular se considera una prometedora estrategia complementaria al trasplante de órgano sólido. En principio, las células sanas utilizadas deberían suplir las funciones que las células o tejidos lesionados ya no son capaces de llevar a cabo.

La función normal de los tejidos requiere que el índice de la pérdida celular (apoptosis^{6,7}) sea correspondido por el índice de su renovación. Dado el agotamiento celular continuo, que ocurre con el tiempo, cuando la pérdida excede la reparación, lo que sobreviene conduce eventualmente a una disminución en la función y, en última instancia, al fallo del órgano. La finalidad de cualquier tratamiento ante una pérdida de función o fallo orgánico es sustituir o reparar la función de células o tejidos lesionados.

Dentro del área de la hepatología, el trasplante celular debería permitir la corrección de enfermedades hepáticas (metabolopatías hereditarias, hepatopatías virales, hepatopatías tóxicas), así como el mantenimiento de la función hepática en pacientes que se encuentran en lista de espera⁸⁻¹⁰.

FUENTES CELULARES PARA TERAPIA CELULAR HEPÁTICA

En los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo al desarrollo y la caracterización de modelos celulares que puedan constituir una alternativa a los hepatocitos humanos. Entre las diferentes aproximaciones experimentales, cabe destacar el uso de células derivadas de hepatoblastomas naturales, como las HepG2. Sin embargo, estas células carecen de la expresión de funciones hepáticas, articularmente del citocromo P450, sistema enzimático encargado del metabolismo de fármacos en el hígado y, por tanto, no parecen ser una alternativa al uso de hepatocitos^{11,12}. La inmortalización de los hepatocitos humanos es otra opción; sin embargo, a pesar de los avances, las células resultantes no manifiestan los rasgos fenotípicos deseables¹³⁻¹⁶. El uso de células hepáticas procedentes de otras especies para xenotrasplante es otra posibilidad; en cambio, esta alternativa no está exenta de dificultades, y también arrastra el problema del mantenimiento de un trata-

miento inmunosupresor, así como las complicaciones relacionadas con el rechazo^{17,18}.

El trasplante celular a partir de hepatocitos adultos aislados de órganos enteros descartados para implante se ha aplicado con éxito en el caso de determinadas metabolopatías congénitas. Así, se ha descrito la recuperación de las funciones hepáticas, específicamente la función deficitaria por el trastorno metabólico, en casos puntuales (déficit de alfa-1-antitripsina, déficit de UDP-glucuronosiltransferasa o síndrome de Crigler-Najjar tipo I, trastorno del almacenamiento de glucógeno por déficit de glucosa-6-fosfatasa o enfermedad del almacenamiento del glucógeno tipo Ia y en el caso de la enfermedad de Refsum infantil o error del metabolismo de los peroxisomas)^{10,19-23}. Son muchas las ventajas del trasplante celular hepático frente al trasplante alogénico. Sin embargo, hay limitaciones en la utilización de hepatocitos humanos adultos, ya que se constata un déficit de hígados descartados para trasplante alogénico pero útiles para el aislamiento de hepatocitos viables. Así, los órganos ideales para la obtención de hepatocitos humanos viables son los que se utilizan para el implante de órgano sólido²⁴. En estos momentos, las únicas fuentes de hepatocitos para trasplante celular son los órganos descartados para el implante, el tejido hepático redundante resultante de los procedimientos de reducción hepática para trasplante infantil²⁵, y el tejido sobrante tras los procedimientos de partición hepática (*split*)²⁶. Dada esta limitación, los problemas a los que nos enfrentamos son los derivados de la calidad y la cantidad del tejido hepático disponible. La esteatosis, principal motivo de exclusión de los injertos para implante, supone un descenso drástico en la capacidad del método de digestión enzimática para la obtención de hepatocitos humanos viables. Hay evidencias recientes de que los hepatocitos esteatóticos no son suficientemente activos desde el punto de vista de su repertorio metabólico para suplir otras funciones deficitarias^{27,28}. Son necesarios nuevos métodos que permitan recuperar los hepatocitos humanos viables a partir de los hígados grasos²⁵. El desfase de tiempo entre el momento de la obtención de hepatocitos (momento de la donación) y su utilización (injerto en un receptor adecuado) hace que se pierda gran cantidad de recursos, debido a la falta de optimización de los métodos de crioconservación de los hepatocitos²⁹.

La terapia celular basada en la utilización de células madre es una nueva y prometedora alternativa. Estudios recientes realizados en animales indican la utilización de las llamadas células ovas del hígado y células hepáticas troncales, que parecen tener la capacidad de proliferar y diferenciarse a hepatocitos³⁰. Se han utilizado también hepatocitos fetales y células troncales fetales sin demostrar que sean capaces de restaurar la función hepática normal³¹. Finalmente, despiertan gran interés los precursores pluripotentes como fuente potencial para el trasplante celular a distintos órganos. Un ejemplo de ello es el uso de células mesenquimales adultas derivadas de la médula ósea para la repoblación hepática mostrada en modelos animales^{32,33}.

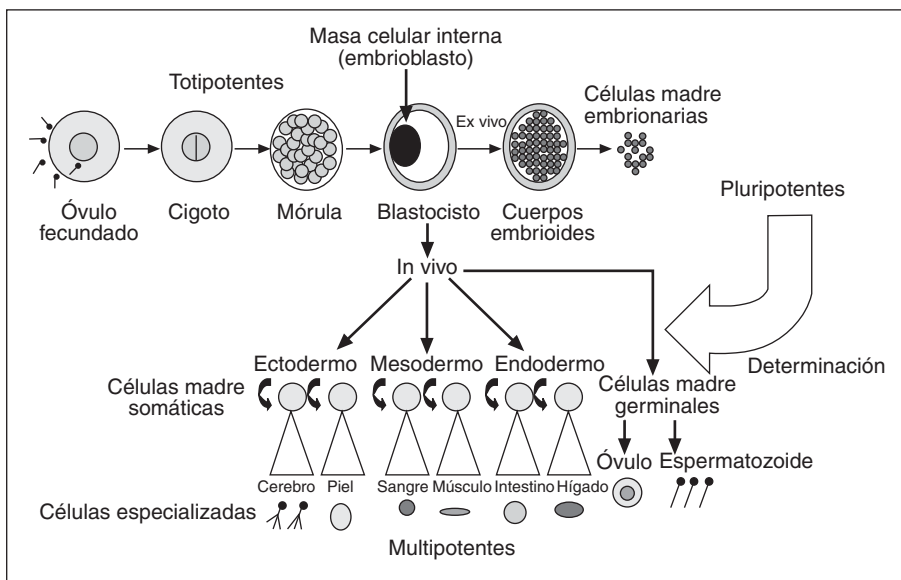


Fig. 1. Embriogénesis humana: potencial y grado de diferenciación. (Modificado de Hernández Ramírez y Dorticós Bales⁸³.)

TERAPIA CELULAR BASADA EN LA UTILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE

La investigación con células madre constituye actualmente uno de los campos más fascinantes de la biología moderna, no sólo en términos del entendimiento de los factores que determinan el desarrollo embrionario, sino también en términos de la búsqueda de mecanismos que provocan el reemplazamiento de células dañadas por células sanas en un organismo adulto. Una de las principales características de las células madre es su capacidad de dar lugar a cada uno de los tipos celulares especializados, proceso denominado «diferenciación». En este proceso de diferenciación intervienen tanto las señales internas controladas por genes intracelulares como externas, que incluyen sustancias químicas secretadas por otras células, el contacto físico de unas células con otras y ciertas moléculas del microentorno.

Por célula madre, o troncales, se entiende cualquier célula que tiene la doble capacidad de dividirse ilimitadamente y de dar lugar a diferentes tipos de células especializadas. De acuerdo con esta segunda capacidad, las células troncales pueden ser totipotentes, pluripotentes y multipotentes en relación con su mayor o menor grado o potencial para diferenciarse, tal como se definen a continuación. La totipotencia es la capacidad funcional de una célula para dar lugar a un individuo completo tras un proceso de desarrollo normal. La pluripotencia es la capacidad funcional de una célula para dar lugar a cualquier estirpe celular, pero no a un embrión completo. La multipotencia se define como la capacidad de generar células, capacidad funcional de una célula para dar lugar a alguno, pero no a todos, los linajes celulares. Las células troncales multipotentes están presentes en los tejidos u órganos adultos y tienen una capacidad limitada de reactivar su programa genético en respuesta a determinados estímulos exógenos³⁴. Atendiendo a su ori-

gen, hay varias clases de células troncales (embrionarias, germinales embrionarias, adultas). Las células troncales adultas se obtienen de tejidos adultos. Se trata de células indiferenciadas capaces de autorrenovarse para lograr el mantenimiento de una reserva funcional y de diferenciarse hacia tipos celulares, no sólo de su tejido originario sino también hacia otras estirpes celulares³⁵⁻⁴¹. De este modo, las células madre adultas dejan de considerarse multipotentes para ser consideradas células pluripotentes. Este mayor potencial de diferenciación permite hablar en términos de plasticidad celular, capacidad de una célula madre adulta de un tejido específico para dar lugar a un tipo celular especializado diferente del de su origen embrionario^{41,42} (fig. 1).

CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ADULTAS

La médula ósea se considera la fuente de células troncales adultas más prometedora. Se han descrito diferentes tipos de células madre en la médula ósea: hematopoyéticas (HSC)³⁴, mesenquimales (MSC)⁴³, *side population cells* (SPC)⁴⁴ y células progenitoras adultas multipotenciales (MAPC)⁴⁵.

Las MSC, también llamadas células madre estromales, constituyen un modelo muy útil en aplicaciones clínicas para un número de enfermedades, tanto en terapia regenerativa como en terapia génica. En los últimos años se han descrito distintos marcadores de superficie que han permitido identificar y aislar células MSC, como SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, CD106 y CD120a^{43,46}. Las MSC no expresan antígenos de superficie típicos de las HSC, como CD34, CD45 o CD14^{43,47}. Algunos experimentos recientes han demostrado que las MSC son capaces de diferenciarse in vitro a tejidos mesodérmicos funcionales, como osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos⁴⁵, y a otros tipos ce-

lulares derivados de otras hojas embrionarias, como hepatocitos^{43,45,48-51}.

De forma casi continua aparecen nuevos estudios en los que se aíslan células mesenquimales a partir de tejidos adultos con capacidad multipotencial.

El tejido adiposo es altamente complejo, formado por adipocitos maduros, preadipocitos, fibroblastos, células del músculo liso vascular, células endoteliales, monocitos, macrófagos y linfocitos. La fracción celular de la estroma vascular del tejido adiposo ha despertado recientemente un gran interés en la investigación con células madre^{52,53}. Estudios recientes han identificado una población de células madre en la estroma adiposa (*adipose derived stem cells* [ADSC])^{52,53}. Se ha demostrado que las células madre derivadas del tejido adiposo tienen características similares a las de la médula ósea in vitro e in vivo, de forma que el tejido adiposo podría ser una fuente ideal de células madre autólogas para el trasplante celular³⁹⁻⁴¹. El tejido adiposo, como la médula ósea, deriva del mesénquima embrionario, pero, a diferencia de ésta, su estroma se puede aislar en gran cantidad con facilidad y con la mínima molestia para el paciente. Estas células poseen mayor capacidad proliferativa que las células mesenquimales de la médula ósea⁴⁰. Además, son capaces de ser inducidas a transdiferenciarse hacia diferentes tejidos: condrocitos, adipocitos, osteoblastos, miocitos y células endoteliales^{41,54-56}.

En definitiva, poseen ventajas objetivas para constituir una buena fuente alternativa de células adultas autólogas para la terapia celular. El éxito observado en la diferenciación de ADSC en diferentes linajes mesenquimales genera un gran interés en su uso para la diferenciación hepática³⁵⁻³⁸.

TEJIDO ADIPOSO: FUENTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

No está claro cuál es el tipo de tejido que da origen a las células adiposas, pero se sabe que todas las células adiposas se originan por un proceso de diferenciación a partir de células mesenquimales primitivas. Hay dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco, también llamado unilocular, por contener sólo una gota central de lípidos, y el tejido adiposo marrón, o también denominado multilocular, por contener varias gotas de lípidos. El origen de ambos tipos de tejidos no es el mismo. El tejido adiposo blanco comienza a desarrollarse en el quinto mes de vida fetal en los islotes grasos. El proceso se inicia con la aparición en el tejido conectivo de invaginaciones vasculares de lóbulos de adipocitos. Los fibroblastos incluidos en los lóbulos comienzan a acumular lípidos hasta alcanzar la morfología característica del adipocito maduro⁵⁷. En las células mesenquimales típicas aparecen gradualmente más gotas grasas haciendo a las células más redondeadas. Finalmente, estas gotas se fusionan en una gran vacuola central haciendo al núcleo cada vez más excéntrico. Durante el desarrollo del tejido adiposo podemos hablar de adipoblasto, célula pluripotencial que se replica activamente y que puede dar lugar al preadipocito, célula predestinada a diferenciarse hasta llegar a ser adipocito y, finalmente,

adipocito, célula de morfología típica madura con la correspondiente maquinaria enzimática para la acumulación y movilización de triglicéridos⁵⁸. Las células adiposas totalmente diferenciadas no sufren más procesos mitóticos y tras el nacimiento sólo se forman nuevas células adiposas a partir de células mesenquimales indiferenciadas. El tejido adiposo marrón se origina a partir de células mesenquimales indiferenciadas, pero el proceso es distinto. Primero las células se asemejan a las epiteliales y el tejido se hace lobulado, empiezan a aparecer gotas de lípidos en las células, convirtiendo al tejido en multilocular.

El tejido adiposo presenta una gran habilidad para llevar a cabo cambios de volumen durante la vida de un individuo. Estos cambios pueden producirse por un crecimiento hipertrófico, es decir, por un aumento de tamaño de cada una de sus células adiposas como consecuencia de la acumulación intracelular de lípidos, o por un crecimiento hiperplásico, resultado de la generación de nuevos adipocitos por división de células mesenquimales indiferenciadas^{59,60}. Se ha observado que estos cambios están mediados por poblaciones celulares progenitoras incluidas en el propio tejido adiposo, concretamente en la fracción celular comprendida en la estroma vascular, fracción denominada células madre (progenitoras) derivadas de tejido adiposo (ADSC). El tejido adiposo presenta un elevado grado de plasticidad. Esta plasticidad se define como la capacidad de una célula madre adulta de un tejido específico para generar un tipo celular especializado diferente del de su origen embrionario. Para poder evaluar la plasticidad in vitro deben cumplirse unos criterios mínimos, como la capacidad de autorrenovación, la diferenciación morfológica y funcional hacia tipos celulares de su origen embrionario y, por lo menos, a un tipo celular de diferente linaje⁶¹. Las ADSC son células pluripotenciales que se replican continuamente, su morfología bajo ciertas condiciones de inducción pasa de ser fusiforme a adoptar otras formas características de otros tipos celulares (p. ej., poligonal en el caso de la diferenciación hacia fenotipo hepático), y son capaces de dar lugar a preadipocitos que posteriormente se diferenciarán hasta dar lugar a adipocitos adultos y, finalmente, pueden ser conducidas hacia una diferenciación condrogénica, osteogénica, miogénica, endotelial y, como se ha mostrado recientemente, hepática^{35-38,41,54-56}.

Todas estas propiedades hacen de las ADSC una fuente alternativa de células adultas autólogas para terapia celular hepática. La posibilidad de obtener estas células del propio paciente evitaría los problemas derivados del rechazo y el tratamiento inmunosupresor, ya que se trataría de una terapia autóloga. Todo ello hace de las ADSC una herramienta muy útil en el desarrollo de un modelo celular diferenciado próximo al hepatocito humano adulto, tanto para terapia celular hepática como para los estudios de toxicología clínica.

DIFERENCIACIÓN DE LAS ADSC HACIA FENOTIPO HEPÁTICO

Aunque el número de estudios realizados sobre la potencial capacidad de las ADSC para diferenciarse a fenotipos

hepáticos adultos es todavía muy reducido, los resultados son muy prometedores, ya que las ADSC alcanzan un grado significativo de expresión de funciones propias del hepatocito³⁵⁻³⁸. La inducción de esta diferenciación *in vitro* se basa en el desarrollo de protocolos que tratan de reproducir el proceso de desarrollo y diferenciación del hígado, teniendo en cuenta los factores de crecimiento, las citocinas y las hormonas que están implicados.

El desarrollo hepático embrionario se produce en múltiples estadios rigidos por factores hormonales, así como por interacciones celulares y matriz-celular⁶². Por tanto, se trata de un proceso gradual condicionado por múltiples señales extracelulares e intracelulares perfectamente ubicadas en el tiempo. El hígado adulto deriva del endodermo⁶³. La especificación hepática a partir del endodermo depende fundamentalmente de dos rutas de señalización⁶³⁻⁶⁵. A partir del mesodermo cardíaco se induce una fuerte respuesta morfogenética en el endodermo por medio de factores de crecimiento fibroblásticos (FGF)⁶³⁻⁶⁵. Por otra parte, las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), secretadas a partir del mesénquima del septo transversal, son necesarias junto con los FGF del mesodermo cardíaco para inducir al endodermo ventral hacia el hígado (hepatoblasto)⁶³⁻⁶⁷ (fig. 2A). En la formación del hígado adulto a partir del hepatoblasto, otros factores de crecimiento tienen su protagonismo. El factor de crecimiento hepático (HGF), involucrado en la regeneración hepática tras una lesión tisular, también regula la expresión de los marcadores de diferenciación hepáticos en presencia de glucocorticoides (p. ej., dexametasona)^{65,68,69}. En la maduración y la diferenciación terminal, desempeñan un papel muy importante la oncostatina (OSM)⁷⁰⁻⁷², los glucocorticoides, una elevada densidad celular⁶⁹ y la matriz extracelular (ECM)⁷³. La OSM estimula la expresión de marcadores de diferenciación hepáticos, induce cambios morfológicos y regula múltiples funciones específicas del hígado. Los glucocorticoides son fundamentales para la maduración hepática, mientras que la OSM incrementa los efectos de éstos; la OSM sola no induce fenotipos diferenciados, sino que es absolutamente imprescindible la presencia de una concentración fisiológica de glucocorticoides (dexametasona) para que la OSM ejerza sus acciones y efectos; por ello, la inducción de la maduración hepática requiere OSM y dexametasona⁷⁰. La adherencia celular a la ECM es de vital importancia para el correcto desarrollo tisular. Los componentes moleculares de la matriz extracelular (colágenos, glucoproteínas y proteoglicanos) están físicamente interconectados con las proteínas del citoesqueleto, a través de los receptores de membrana, como las integrinas; estas interacciones mecánicas son importantes en la determinación de la forma celular. Los factores proteínicos asociados con la ECM, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), también están implicados en la diferenciación celular inducida por la matriz. Así pues, la ECM debe actuar sobre la diferenciación por distintas rutas de señalización^{74,75} (fig. 2B).

Se sabe que la diferenciación y otros procesos celulares básicos están influidos por interacciones humorales, inter-

celulares y matriz-celular; sin embargo, el principal mecanismo responsable de la diversidad fenotípica es la expresión de un *set* de genes específicos para cada tipo celular. La diferente expresión genética entre tipos celulares está determinada, en la mayoría de los casos, por una regulación transcripcional mediada por una combinación específica de factores de transcripción⁷⁶. Diversos estudios indican que la expresión específica de genes típicamente hepáticos requiere la unión de múltiples y distintos factores de transcripción abundantes en el hígado (*liver-enriched transcription factor* [LETf]) a regiones reguladoras, lo que permite la activación transcripcional de los genes necesarios para llevar a cabo las funciones típicamente hepáticas⁷⁷. Sin embargo, la regulación de la transcripción no sólo depende de la activación por factores de transcripción, sino que hay una gran cantidad de corre reguladores que desempeñan un papel clave en muchos procesos biológicos, incluidos los programas de diferenciación celular^{77,78} (fig. 3).

El análisis por citometría de flujo muestra que las células ADSC recién obtenidas en estado indiferenciado expresan antígenos de superficie, marcadores de células madre mesenquimales humanas (CD13⁺, CD90⁺ [Thy1] y CD105⁺ [endoglina]); en cambio, son negativas para el marcador hematopoyético (CD45⁻). En algunos estudios³⁸ se realiza una selección de la población CD105⁺; sin embargo, otros autores no lo han considerado necesario, dado que el 95% de las ADSC que obtienen son CD105⁺, lo que muestra además la coexpresión del otro marcador mesenquimal, CD90 (Thy1)³⁶. Además, como se muestra en la tabla I, no se observan cambios significativos en la expresión de ambos antígenos de membrana entre las células obtenidas de lipoaspirados de distintos donantes³⁶.

Hasta el momento, se han desarrollado diferentes protocolos *in vitro* para conseguir la diferenciación hepática de ADSC. Una de las propuestas se basa en el tratamiento de las células durante 3-4 semanas con un «cóctel» de factores que parecen ser críticos para inducir el fenotipo hepático, compuesto por dimetil sulfóxido (DMSO), HGF y OSM³⁵ (fig. 4A). Otras propuestas se basan en el tratamiento secuencial con factores exógenos. Uno de los protocolos consta de un período de acondicionamiento de las células de 2 días, durante los cuales se cultivan con medio complementado con EGF y FGF. A continuación las células se mantienen durante 7 días en un medio complementado con HGF y nicotinamida (etapa de diferenciación) y, finalmente, las células se cultivan de 7 a 21 días con medio complementado con OSM, dexametasona e ITS Premix (insulina, transferrina y selenio) (etapa de maduración)³⁶. Paralelamente, se ha investigado el tratamiento con HGF durante un período más prolongado³⁷ (fig. 4B). Este segundo protocolo dio como resultado un mayor grado de diferenciación, en el que se obtuvieron unos niveles de expresión de genes hepáticos mayores que con el protocolo anterior. Otro estudio publicado recientemente también utiliza un protocolo secuencial para inducir la diferenciación hepática, que consiste en mantener las células adiposas en un medio de cultivo basal que contiene hidrocortisona EGF, insulina y dexametasona al

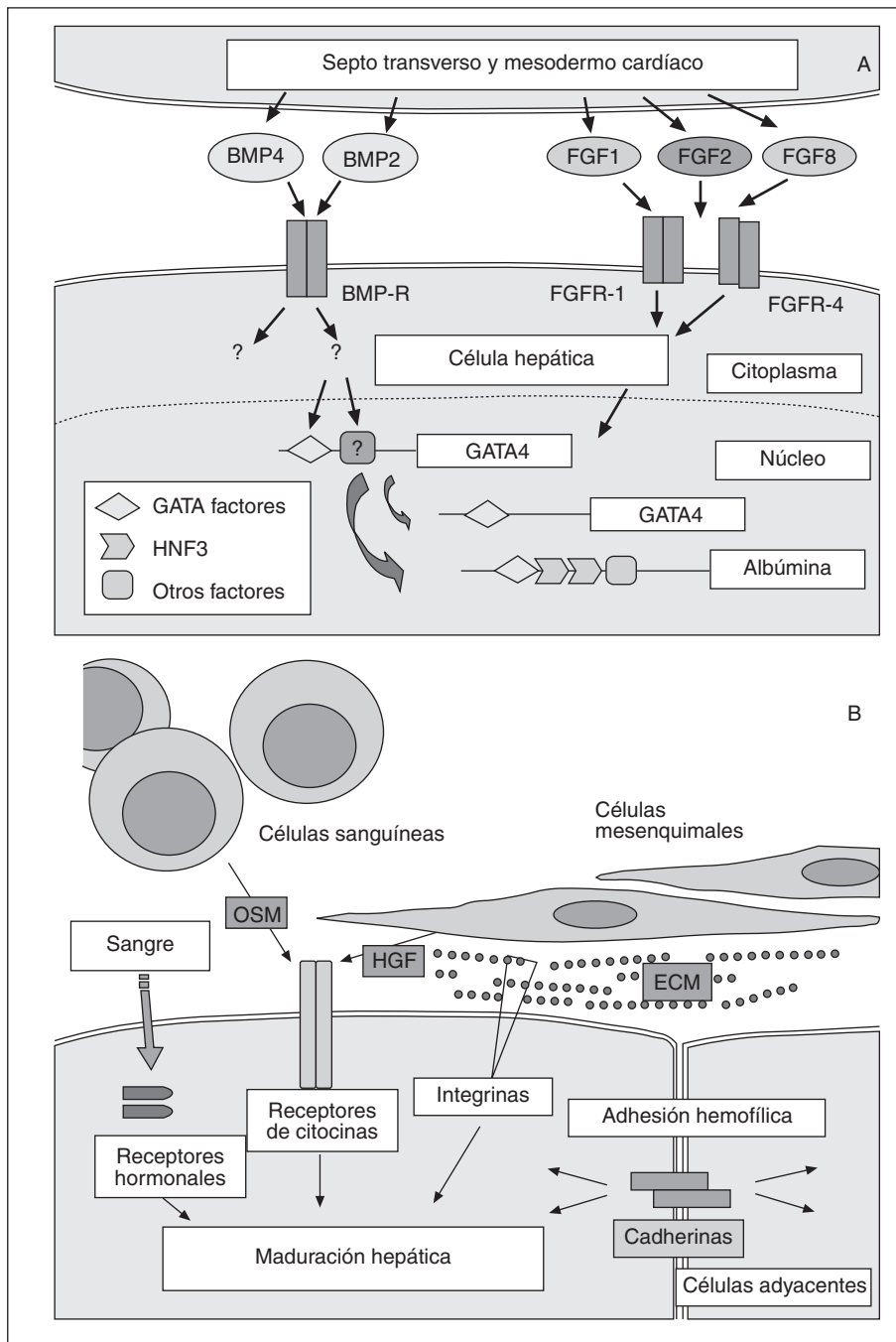


Fig. 2. Diferenciación hepática. A: posible modelo de la especificación temprana hepática. B: rutas promotoras de los estadios terminales del desarrollo hepático. (Modificado de Haynesworth et al⁴⁶.)

que se añade HGF, FGF1 y FGF4 durante 3 semanas (etapa de diferenciación). Durante las 2 semanas siguientes las células se mantienen en el mismo medio, pero en este caso complementado con OSM y dexametasona a mayor concentración (etapa de maduración) (fig. 4C)³⁸. En todos los estudios realizados, la morfología celular pasa de formas fusiformes en estado indiferenciado a adoptar formas poligonales características de los hepatocitos, al final del período de diferenciación. La caracterización funcional dio como resultado un aumento creciente de la expresión de marcadores hepáticos, como

albúmina, alfafetoproteína³⁵⁻³⁸ (fig. 5A y C), proteínas de membrana (CK18)³⁸, captación de LDL³⁸, enzimas de biotransformación, CYP 3A4 y 2E1^{36,38} (fig. 5C), y factores de transcripción abundantes en hígado, HNF4 α y C/EBP β ^{36,37} (fig. 5C), así como una disminución en la expresión de marcadores mesenquimales, como el Thy1 (CD90)^{36,37} (fig. 5C). La expresión de albúmina y alfafetoproteína se confirmó por inmunohistoquímica^{35,36}. Tras inducir la diferenciación, se observa un incremento en la producción de urea dependiente del tiempo^{35,38}, no detectable en las células desdiferenciadas^{35,38} (fig. 5B). Respec-

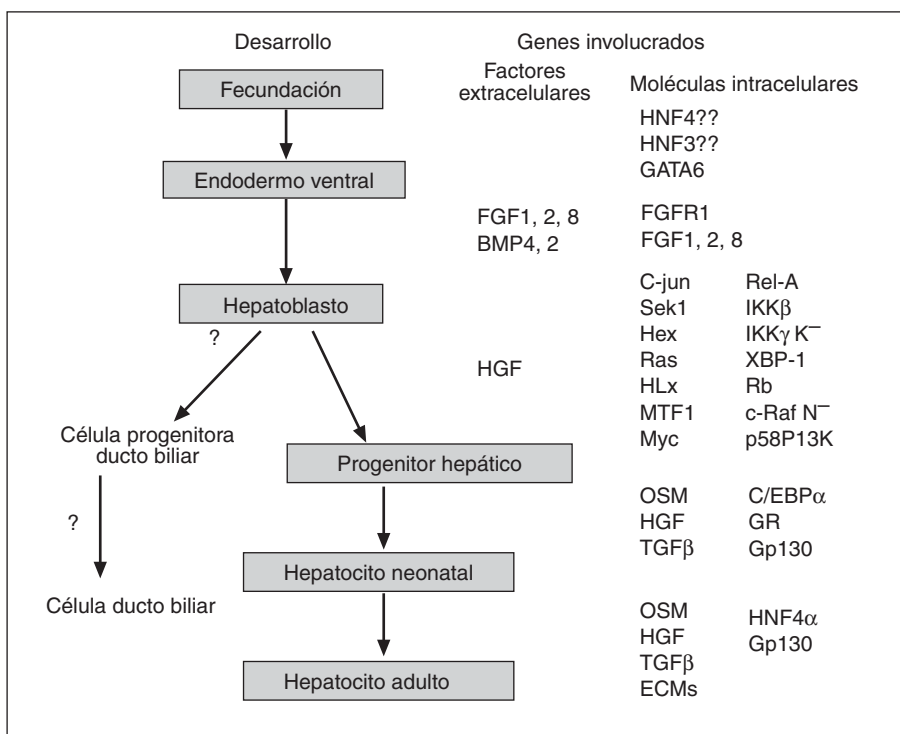


Fig. 3. Moléculas extracelulares e intracelulares implicadas en el desarrollo hepático. (Modificado de Haynesworth et al⁴⁶.)

to a la capacidad de biotransformación de las ADSC diferenciadas, determinada por la expresión de isoenzimas del citocromo P450, CYP3A4 y CYP2E1, se observó un incremento significativo, que mostraba niveles de expresión muy superiores a los obtenidos en la línea celular del hepatoma humano HepG2³⁶. Si bien estas células con fenotipo fetal expresan genes característicos de hepatocitos fetales, como la albúmina⁷⁹, expresan valores muy bajos o formas no activas de determinados factores de transcripción hepáticos, cuyo resultado son unos valores bajos o indetectables de expresión de marcadores hepáticos, particularmente de enzimas de biotransformación (sistema P450)³⁶. Sin embargo, la expresión del factor de transcripción hepático C/EBPβ aumenta considerablemente durante el proceso de diferenciación de las células ADSC (fig. 5C), así como el HNF4α³⁶. Mediante la utilización de vectores de expresión adenovirales, se ha mostrado que ambos factores de transcripción C/EBPβ y HNF4 desempeñan un papel clave en la regulación del proceso de diferenciación^{36,80} (fig. 6). Diversos estudios recientes demuestran que muchos de los LETF conocidos están implicados en el control de la expresión de los genes CYP en el hígado^{81,82}. Diversos estudios también demuestran que tanto la expresión de los LETF como la de los genes CYP están estrechamente asociadas al estado diferenciado del hepatocito.

Estos trabajos muestran que la transdiferenciación hepática de las ADSC origina células funcionales y trasplantables. En cuanto a la funcionalidad, si bien los valores de expresión de los marcadores hepáticos alcanzados distan de los encontrados en el hígado, muestran una gran proximidad a los valores observados en los hepatocitos adultos

TABLA I. Expresión de CD90 y CD105 en ADSC tras el cultivo primario

Donante	ADSC			
	CD90 ⁺		CD105 ⁺	
	Células positivas (%)	Fluorescencia media	Células positivas (%)	Fluorescencia media
1	99,88	8.623,91	93,92	211,55
2	99,83	5.467,01	99,83	1.118,22
3	99,82	6.157,88	99,08	1.089,24
4	99,89	6.830,06	97,79	758,79
5	99,78	7.495,60	99,70	2.025,79
6	99,81	8.052,66	99,54	1.510,95
7	98,83	8.878,06	99,35	1.298,27
8	91,14	5.123,70	73,52	203,77
Media	98,62	7.078,61	95,34	1.027,07
DE	3,04	1.418,10	9,03	624,75

ADSC: *adipose derived stem cells* (células madre en la estroma adiposa); DE: desviación estándar. Modificado de Talens-Visconti et al³⁶.

en cultivo primario y son muy superiores a los descritos en hepatoblastomas humanos. Un aspecto muy importante para asegurar el éxito del trasplante es su capacidad para implantarse o quedar retenidas en el hígado receptor. En relación con ello, se ha descrito que las células diferenciadas NOD/SCID in vitro implantadas en ratones desnudos con fallo hepático agudo inducido por CCl₄, se incorporan directamente en el hígado, confirmado por la inmunotinción de albúmina humana en el hígado del ratón. Todo ello pone de manifiesto el extraordinario potencial hepatogénico y terapéutico de las ADSC^{35,38} para el trasplante celular.

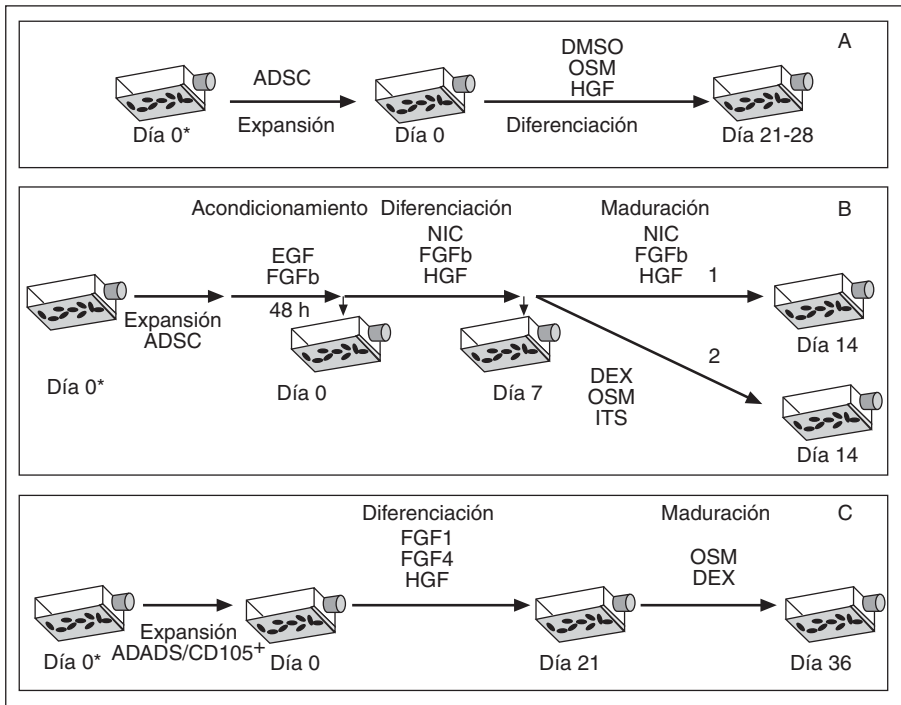


Fig. 4. Protocolos de diferenciación hepática, A³⁵, B³⁷, C³⁸. En todos ellos, el cambio de medio se efectúa cada 48 h y la retirada del suero se realiza el día 0. En el protocolo A y C el suero utilizado procede de bovino fetal, mientras que el utilizado en la etapa de expansión del protocolo B es de procedencia humana.

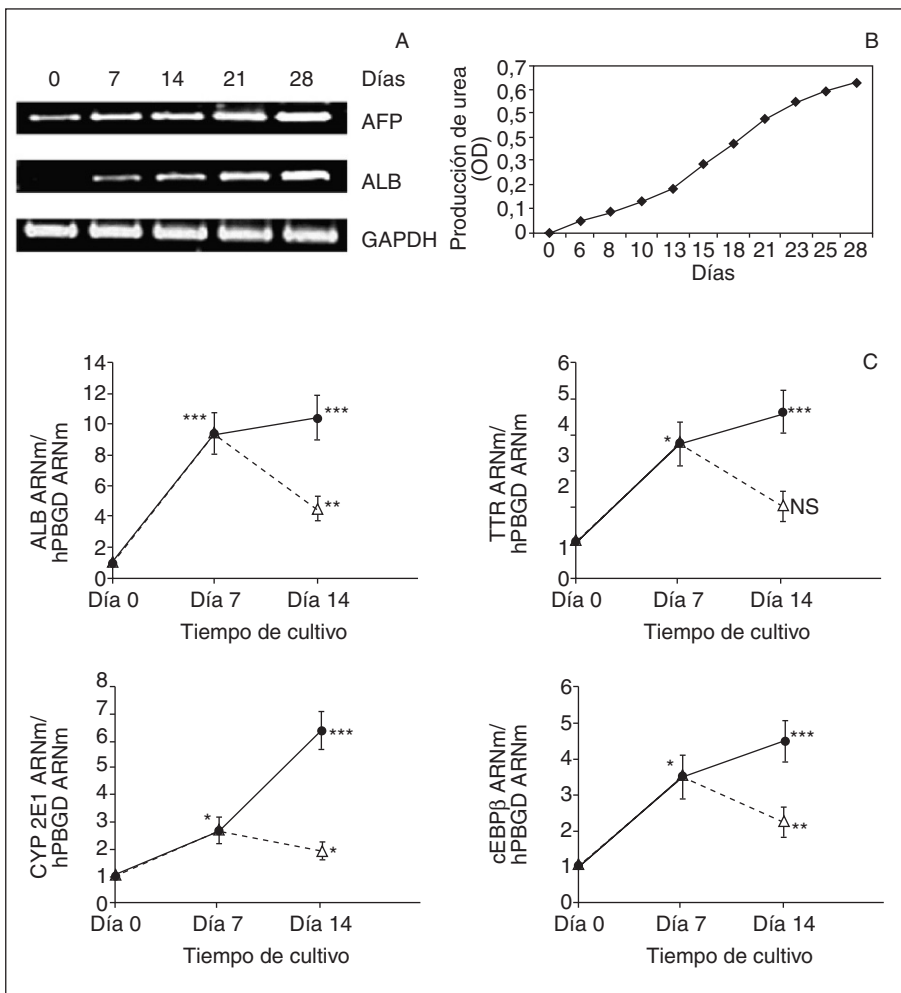


Fig. 5. Caracterización funcional de células madre en la estroma adiposa (ADSC) diferenciadas en hepatocitos. A. gel de electroforesis que muestra los resultados de RT-PCR para 3 marcadores hepáticos. (Modificado de Seo et al³⁵.) B. producción de urea por ADSC cultivadas con HGF, OSM y DMSO. La producción de urea fue cuantificada a 492 nm con un espectrofotómetro en 4 muestras diferentes. (Modificado de Seo et al³⁵.) C. análisis de la expresión de ARNm de 4 marcadores hepáticos por RT-PCR determinados en distintos períodos del protocolo de diferenciación, protocolo 1 (círculo negro) y protocolo 2 (triángulo blanco). Resultados normalizados con hPBGD. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. (Modificado de Talens-Visconti et al³⁷.)

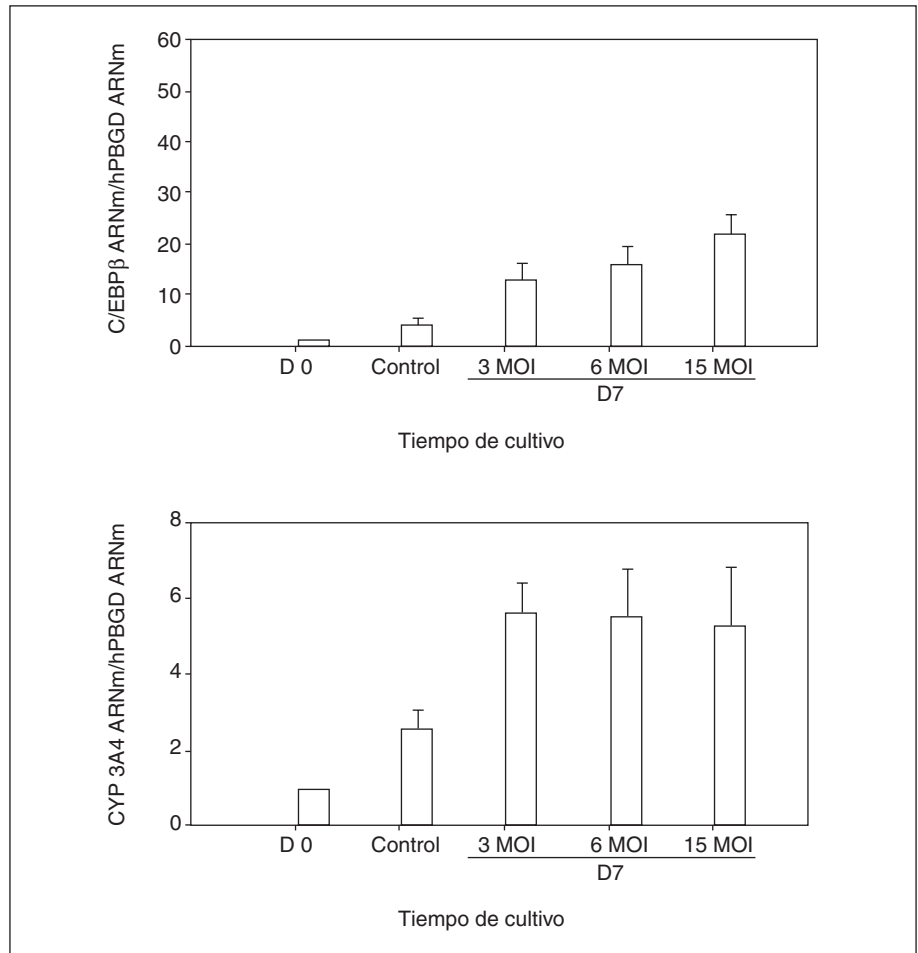


Fig. 6. Evaluación del factor de transcripción C/EBPβ en la diferenciación de células madre en la estroma adiposa (ADSC) hacia fenotipo hepático. La transducción adenoviral causa un aumento dosis-dependiente en los valores de ARNm C/EBPβ determinado por RT-PCR. Paralelamente, se observa una regulación positiva del CYP3A4, marcador hepático, y negativa para el Thyl, marcador de células mesenquimales. Los controles no fueron transducidos. (Modificado de Talens-Visconti et al³⁶.)

PERSPECTIVAS DE FUTURO

Los resultados obtenidos recientemente con las células progenitoras adultas derivadas de tejido adiposo despiertan un gran interés. Poseen ventajas objetivas para constituir una buena fuente alternativa de células adultas autólogas. La terapia celular autóloga evitaría complicaciones y costosos tratamientos de supresión del sistema inmunológico para prevenir rechazos o las contaminaciones provenientes de un donador. Por otra parte, la posibilidad de crioconservación de estas células sin pérdida de funcionalidad incrementaría su disponibilidad.

La obtención de células de fenotipo hepático derivadas de procesos de diferenciación in vitro de células progenitoras adultas de tejido adiposo confirma aún más, si cabe, el elevado grado de plasticidad de este tipo celular y su posibilidad de dar lugar a estirpes celulares, no sólo originadas a partir del mesodermo, sino también del endodermo y el ectodermo.

El gran conocimiento que se ha alcanzado sobre las funciones celulares y su regulación hace que el método de trasplante celular se presente con una gran posibilidad de éxito con los conocimientos médicos actuales (a diferencia del xenotrasplante o la terapia génica). Esto lo con-

vierte en una opción con posibles resultados a corto plazo. Sin embargo, la disponibilidad de este recurso celular requiere una optimización del protocolo de diferenciación y un mayor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que controlan la transdiferenciación a hepatocitos.

Los modelos celulares hepáticos existentes en la actualidad no poseen las características necesarias para cubrir las necesidades de estudio en farmacotoxicología y biomedicina. El establecimiento de un modelo celular hepático diferenciado tendría gran utilidad en estudios de metabolismo y toxicidad de medicamentos, en estudios de fisiopatología hepática, en aplicaciones clínicas, como el biorreactor hepático, o como fuente de recursos para la terapia celular. Los modelos celulares actuales presentan en común una desdiferenciación y una pérdida de funciones características del hígado, como la biotransformación de xenobióticos. Por tanto, las perspectivas de futuro derivadas de la obtención de células de fenotipo hepático a partir de ADSC son muchas, ya que no sólo se trata de un recurso abundante de células para terapia celular, sino que a su vez supone el establecimiento de un nuevo modelo celular diferenciado útil para estudios de toxicidad y metabolismo de fármacos.

Sin embargo, muchos son los factores involucrados en la organogénesis hepática, cuyo papel no se ha explorado todavía. Por ello, en el futuro próximo uno de los objetivos debe ser perfeccionar y optimizar el protocolo de diferenciación actual, investigando el efecto de otros factores que pudieran estar involucrados en la diferenciación (BMP-2, BMP-4, activina A)^{66,67}. Por otra parte, los componentes de la matriz extracelular, como el colágeno o la fibronectina, también desempeñan un papel clave en la organogénesis del hígado^{74,75}. Es de interés investigar su contribución en la transdiferenciación in vitro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda prestada por la fundación ALIVE y la Unión Europea (Proyectos LSHB-CT-2004-504761, LSHB-CT-2004-512051 y LSSB-CT-2005-037499).

BIBLIOGRAFÍA

- Gayowski T, Marino IR, Singh N, Doyle H, Wagener M, Fung JJ, et al. Orthotopic liver transplantation in high-risk patients: risk factors associated with mortality and infectious morbidity. *Transplantation*. 1998;65:499-504.
- Sánchez-Fructuoso AI, Marque M, Prats D, Conesa J, Calvo N, Pérez-Contín MJ, et al. Victims of cardiac arrest occurring outside the hospital: a source of transplantable kidneys. *Ann Intern Med*. 2006;145:157-64.
- Azoulay D, Hargreaves GM, Bismuth H. Impact of surgery on liver transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2000;5:57-63.
- Marcos A, Fisher RA, Ham JM, Shiffman ML, Sanyal AJ, Luketic VAC, et al. Right lobe living donor liver transplantation. *Transplantation*. 1999;68:798-803.
- Bellentani S, Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *J Hepatol*. 2001;35:531-7.
- Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev*. 2004;84:411-430.
- Longthorne VL, Williams GT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *The EMBO J*. 1997;16:3805-12.
- Fox IJ, Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation. *Am J Transplantation*. 2004;4 Suppl 6:7-13.
- Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation*. 2006;82:441-9.
- Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*. 1997;63:559-69.
- Jover R, Bort R, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett*. 1998;431:227-30.
- Rodríguez-Antona C, Donato MT, Boobis A, Edwards RJ, Watts PS, Castell JV, et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica*. 2002;32:505-20.
- Isom HC, Woodworth CD, Meng Y, Kreider J, Miller T, Mengel L. Introduction of the ras oncogene transforms a simian virus 40-immortalized hepatocyte cell line without loss of expression of albumin and other liver-specific genes. *Cancer Res*. 1992;52:940-8.
- Ourlin JC, Vilarem MJ, Daujat M, Harricane MC, Domergue J, Joyeux H, et al. Lipid-mediated transfection of normal adult human hepatocytes in primary culture. *An Biochem*. 1997;247:34-44.
- Fischbach M, Cao HW, Díez IM, Tsaconas C, Alouani S, Montandon F, et al. Maintenance of liver function in long term culture of hepatocytes following in vitro or in vivo Ha-rasEJ transfection. *Cell Biol Toxicol*. 1991;7:327-45.
- Castell JV, Jover R, Bort R, Gómez-Lechón MJ. COST B1 European Symposium on the prediction of drug metabolism in man: progress and problems. En: Boobis AR, Kremers P, Pelkonen O, Pithan K, editors. Brussels: Office for Official Publications of the European Community; 1999. p. 77-92.
- Nagata H, Ito M, Cai J, Edge AS, Platt JL, Fox IJ. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. *Gastroenterology*. 2003;124:422-31.
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. 2003;422:901-04.
- Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, Guariso G, Franchin E, Miotto D, et al. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell Transplant*. 2005;14:151-571.
- Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, et al. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics*. 2003;111:1262-7.
- Sokal EM, Smets F, Bourgeois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, et al. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation*. 2003;76:735-38.
- Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1. *Lancet*. 2002;359:317-8.
- Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation*. 2004;78:1812-4.
- Serralta A, Donato MT, Orbis F, Castell JV, Mir J, Gómez-Lechón MJ. Functionality of cultured human hepatocytes from elective samples, cadaveric grafts and hepatectomies. *Tox In Vit*. 2003;17:769-74.
- Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A. Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Semin Cell Develop Biol*. 2002;13:463-7.
- Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, et al. One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation*. 2003;77:1614-6.
- Donato MT, Lahoz A, Jiménez N, Pérez G, Serralta A, Mir J, et al. Effects of steatosis on P450 enzymes: potential impact on clinical and experimental applications of human hepatocytes isolated from fat liver grafts. *Drug Metab Disp*. 2006;34:1556-62.
- Nocito A, El-Badry AM, Clavien PA. When is steatosis too much for transplantation? *J Hepatol*. 2006;45:494-9.
- Mitry RR, Hughes RD, Aw MM, et al. Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function. *Cell Transplant*. 2003;12:69-74.
- Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev*. 2003;120:117-30.
- Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, et al. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells*. 2003;21:217-27.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418:41-9.
- Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol*. 2004;10:2818-22.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:387-403.
- Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *BBRC*. 2005;258:64.
- Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, et al. Differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow into hepatic lineage. *Tox In Vit*. 2006;21:324-9.
- Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol*. 2006;12:5834-45.

38. Banas A, Teretani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn GM, et al. Adipose Tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*. 2007;46:219-28.
39. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Org*. 2003;174:101-9.
40. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14:311-24.
41. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28.
42. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res*. 2006;312:727-36.
43. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
44. Asakura A, Seale P, Giris-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 2002;159:123-34.
45. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418:41-9.
46. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992;13:69-80.
47. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol*. 2001;29:244-55.
48. Devine SM. Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic? *J Cell Biochem*. 2002;38 Suppl:73-9.
49. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000;290:1779-82.
50. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*. 2001;226:507-20.
51. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276:71-4.
52. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24:150-4.
53. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells: basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25:818-27.
54. Safford KM, Hicok KC, Safford SC, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;294:371-9.
55. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose-derived stem cells. *Circulation*. 2004;20:349-55.
56. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;10:656-63.
57. Hausman GJ, Richardson RL. Cellular and vascular development in immature rat adipose tissue. *J Lipid Res*. 1983;24:522-32.
58. Hausman GJ. Anatomical and enzyme histochemical differentiation of adipose tissue. *Int J Obes*. 1985;9 Suppl 1:1-6.
59. Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, et al. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10730-5.
60. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*. 2001;2:239-54.
61. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*. 2002;12:502-8.
62. Hata S, Namae M, Nishina H. Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Develop Growth Differ*. 2007;49:163-70.
63. Zaret KS. Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev*. 2000;92:83-8.
64. Zaret KS. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Gen Dev*. 2001;11:568-74.
65. Kinoshita T, Miyajima A. Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Act*. 2002;1592:303-12.
66. Duncan SA, Watt AJ. BMPs on the road to hepatogenesis. *Gen Dev*. 2001;15:1879-84.
67. Rossi JM, Dunn NR, Hogan LM, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Gen Dev*. 2001;15:1998-2009.
68. Wang PP, Wang JH, Yan ZP, Hu MY, Lau GK, Tat Fan S, et al. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *BBRC*. 2004;320:712-6.
69. Heng BC, Yu H, Yin Y, Lim SG, Cao T. Factors influencing stem cells differentiation into the hepatic lineage in vitro. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20:975-87.
70. Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, et al. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp 130 signal transducer. *EMBO J*. 1999;18:2127-36.
71. Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, Kamiya A, Mukoyama Y, Hara T. Role of oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000;11:177-83.
72. Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett*. 2001;492:90-4.
73. DiPersio CM, Jackson DA, Zaret KS. The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology. *Mol Cell Biol*. 1991;11:4405-14.
74. Haralson MA, Hassell JR. *Extracellular Matrix. A practical approach*. New York: Oxford University Press; 1995. p. 261-87.
75. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Triggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*. 1982;21:6188-93.
76. Nagy P, Bisgaard HC, Thorgeirsson SS. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *J Cell Biol*. 1994;126:223-33.
77. Costa RH, Kalinichenko VV, Holterman AX, Wang X. Transcription factors in liver development, differentiation and regeneration. *Hepatology*. 2003;38:1331-47.
78. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor co-regulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*. 1999;20:321-44.
79. Rollier A, DiPersio CM, Cereghini S, Stevens K, Tronche F, Zaret K, et al. Regulation of albumin gene expression in hepatoma cells of fetal phenotype: dominant inhibition of HNF1 function and role of ubiquitous transcription factors. *Mol Biol Cell*. 1993;4:59-69.
80. Martínez-Jiménez CP, Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Jover R. Underexpressed coactivators PGC1-alpha and SRC1 impair hepatocyte nuclear factor 4 alpha function and promote dedifferentiation in human hepatoma cells. *J Biol Chem*. 2006;281:29840-9.
81. Jover R, Bort R, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: a study using adenovirus-mediated antisense targeting. *Hepatology*. 2001;33:668-75.
82. Jover R, Bort R, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *Faseb J*. 2002;16:1799-801.
83. Hernández Ramírez P, Dorticós Balea E. Medicina Regenerativa: células madre embrionarias y adultas. *Rev Cubana Hematología*. 2004;20:3.