

CELLULE STAMINALI: introduzione

Le cellule sono i mattoni elementari di tutti gli organismi viventi e ciascuna di esse può originare solo da una cellula preesistente. La cellula uovo fecondata, d'altra parte, è in grado di dar origine per successive tappe proliferative e differenziative (eventi di *commitment*) ad un organismo pluricellulare con oltre 1×10^4 miliardi di cellule. Anche successivamente alla nascita e per tutto il corso della vita adulta, tessuti ed organi riescono a provvedere alla propria omeostasi, sostituendo le cellule che vanno incontro a degenerazione, per eventi di apoptosi o necrosi. La capacità dell'embrione di creare le diverse tipologie cellulari specifiche di ciascun tessuto od organo e la capacità dei tessuti adulti di rigenerarsi nel corso della vita è dovuta alla presenza di *cellule staminali*. Già agli inizi del 1900, era riconosciuto tra gli studiosi che *cellule indifferenziate* erano in grado di rigenerare non solo i tessuti danneggiati, ma anche quelli sottoposti a perdita fisiologica. Gli istologi concordavano sull'esistenza di tre tipologie tissutali: tessuti a rinnovo, stabili e perenni. Tra i tessuti a rinnovo emergevano il sangue e gli epitelii, continuamente rigenerati nel corso della vita dell'organismo. Per i tessuti stabili, come ossa e muscoli, la rigenerazione era ritenuta possibile, ma solo a seguito di specifici stimoli, necessari per lo *shift* cellulare da una fase di quiescenza ad una di ripresa del ciclo mitotico. Tra i tessuti considerati perenni figurava il tessuto nervoso, per il quale era impensabile una rigenerazione. Oggi, d'altro canto, tra i ricercatori si fa strada, sempre più, l'idea che possa esistere un *pool* di staminali nella quasi totalità dei distretti tissutali differenziati, compreso il sistema nervoso. Le staminali (*Stem Cells* o *SCs*) sono cellule indifferenziate, definite *uncommitted* e dotate di capacità di autorinno. Seguendo specifici *pathways* molecolari, possono dar vita a diverse tipologie cellulari. Le *SCs* svolgono due ruoli fondamentali: intervengono durante lo sviluppo embrionale e l'accrescimento, producendo le

cellule che costituiscono l'individuo adulto; danno vita alle *cellule di sostituzione*, quando, ad esempio, i tessuti sono gravemente danneggiati.

La riserva delle cellule staminali

Uno degli aspetti più "intriganti" della fisiologia delle *SCs* concerne la regolazione dinamica del loro compartimento cellulare, ovvero i meccanismi che permettono il mantenimento del *pool* di cellule staminali. La capacità di autorinnovarsi sottintende la possibilità, per una singola cellula o per un'intera popolazione cellulare, di perpetuare se stessa indefinitamente o almeno per tutta la durata della vita dell'organismo, in cui essa risiede. Nei vertebrati il numero di staminali all'interno di un determinato compartimento è regolato a livello cellulare. Questo avviene poiché le cellule staminali sono in grado di effettuare divisioni simmetriche: per ogni cellula madre staminale che dà vita a due figlie in grado di differenziare, vi è un'altra madre staminale che origina due nuove figlie staminali. Ha luogo, in questo modo, una divisione simmetrica espansiva, in cui le due cellule figlie risultano identiche alla madre e tra di loro. Esse sono, dunque, cellule *uncommitted* con elevata capacità replicativa. Contemporaneamente un'altra madre staminale, presente nel medesimo *pool*, inizia una divisione simmetrica differenziativa, per cui le due cellule figlie risultano identiche tra loro, ma diverse dalla madre. Esse sono cellule dal fenotipo intermedio, parzialmente differenziate, note come progenitori o precursori. I progenitori possono dividersi, anch'essi numerose volte, ma non possono più farlo indefinitamente (*perdita della staminalità*) e prima o poi tutta la loro progenie differenzierà in un solo o in più tipi cellulari specializzati. L'automantenimento è ottenuto grazie allo stabilirsi di un perfetto equilibrio numerico tra i due tipi di divisione simmetrica, che hanno luogo a livello di popolazione cellulare e nel suo insieme.

Questo sistema permette di far sì che il numero di staminali si mantenga costante alla fine di ogni generazione cellulare, in quanto, viene generato un numero di *SCs* pari a quello che si è diviso. Offre, inoltre, l'enorme vantaggio

di poter aumentare o diminuire il numero di cellule staminali all'interno di un tessuto o di un organo, qualora risulti necessario. Molecole diffusibili, liberate da cellule presenti in un tessuto danneggiato ed alterazioni nel complesso meccanismo di comunicazione intercellulare possono indurre un cambiamento nel bilancio tra divisioni espansive e differenziative, favorendo le prime e producendo un temporaneo incremento nel numero di *SCs*. Nel caso in cui il numero di staminali tenda, invece, ad aumentare per eventi di tipo patologico, l'equilibrio tra divisioni proliferative e differenziative si sposta in favore delle seconde ed il numero di *SCs* tende progressivamente a diminuire. In entrambe le situazioni appena descritte, non appena i segnali di emergenza si esauriscono, la popolazione staminale ritorna all'equilibrio stazionario, tipico di situazioni fisiologiche. In numerosi studi, tuttavia, è stata accertata l'esistenza anche di un secondo meccanismo replicativo, detto di divisione asimmetrica. In questo caso, da ciascuna madre staminale, originano due cellule figlie fenotipicamente differenti: una determinata a differenziare (*progenitore*), l'altra in grado di ricostituire il *pool* di staminali. Tutti i meccanismi di divisione, appena descritti, risultano essenziali sia per il mantenimento della riserva staminale che per rispondere alle esigenze di amplificare o ridurre la differenziazione cellulare, in risposta a richieste fisiologiche o patologiche. Ad oggi, purtroppo, le conoscenze riguardanti i *fattori intrinseci ed estrinseci* che controllano la biologia di una cellula staminale, ovvero, l'autorinnovamento, il mantenimento dello stato *uncommitted*, la possibilità di intraprendere divisioni simmetriche o asimmetriche, sono ancora piuttosto limitate. Ancora meno si è fatta luce, sui *pathways* molecolari coinvolti negli eventi di *commitment*. I *progenitori di transito* sono cellule più differenziate rispetto alle staminali e che mantengono la capacità di proliferare per un numero predeterminato di cicli mitotici, generando alla fine un elevato numero di cellule *committed*. Tale meccanismo consente la produzione di un consistente numero di cellule mature,

a fronte di un numero di divisioni delle staminali più ridotto. In questo modo, il patrimonio genetico delle *SCs* risulta protetto dal rischio di mutazioni, che potrebbero accumularsi durante la replicazione del DNA, che ha luogo nella fase S di ogni ciclo mitotico. Il *commitment* cellulare può, allora, approssimativamente considerarsi, come un processo di graduale restringimento delle potenzialità replicative e differenziative. Tutti gli eventi di specializzazione dei progenitori, così come l'*uncommitment* e l'auto-rinnovamento delle *SCs*, sono controllati *geneticamente* ed *epigeneticamente*, per cui dipendono da meccanismi molecolari in grado di accendere o spegnere specifici gruppi di geni, secondo complicate sequenze ed interferenze. A livello di genoma cellulare, solo gli *Housekeeping genes* restano sempre accesi, al fine di mantenere la vitalità cellulare. Di questi aspetti, come già anticipato, si conosce ancora poco e soprattutto non si conosce quale influenza abbia, realmente, l'ambiente esterno. In sintesi, potremmo affermare che una staminale è definita da 3 aspetti fondamentali:

- mantenimento della capacità di dividersi per un tempo indefinito;
- mantenimento dello stato *uncommitted*;
- sensibilità a stimoli in grado di innescarne la replicazione ed indurla a differenziare in un citotipo particolare.

Classificazione delle cellule staminali

A seconda della loro potenzialità differenziativa le staminali si distinguono in:

- Totipotenti: dividendosi, generano un progenitore in grado di differenziarsi in qualsiasi tipo cellulare.
- Pluripotenti o Multipotenti: dividendosi, generano un progenitore in grado di differenziarsi in alcuni citotipi.
- Unipotenti: dividendosi, generano un progenitore in grado di differenziarsi in un solo tipo cellulare.

La cellula staminale totipotente è lo zigote, frutto della fusione dello spermatozoo e dell'ovocita, che è in grado di assumere l'identità di tutte le cellule dell'organismo, nessuna esclusa; le staminali pluripotenti possono dare origine a svariate tipologie cellulari, provenienti anche da foglietti germinativi differenti; le multipotenti sono capaci di differenziarsi in più tipi cellulari, in genere, di analoga derivazione embrionale; infine le unipotenti sono cellule indirizzabili verso un solo citotipo. Le *Stem Cells* si classificano anche secondo la loro provenienza, come cellule staminali embrionali o *ESCs (Embryonic Stem Cells)* e staminali adulte o *ASCs (Adult Stem Cells)*. Questa definizione è tuttavia imprecisa, perché tra le *ASCs* sono comprese, oltre le staminali somatiche, proprie dei tessuti dell'organismo adulto, anche le staminali fetali (*Fetal Stem Cells o FSCs*) e quelle neonatali (*Neonatal Stem Cells o NSCs*). Queste ultime risiedono nel cordone ombelicale, mentre le *FSCs* sono rinvenibili negli abbozzi degli organi fetali, dato l'importante ruolo che assolvono nella formazione e specializzazione di tessuti ed organi, fino al completamento dello sviluppo. Le staminali embrionali ed adulte, nonché quelle fetali e neonatali, possono essere isolate dalla propria sede di appartenenza e poste in coltura. Lo scopo è quello di comprenderne tutte le caratteristiche biomolecolari, affinché possano essere presto impiegate per la cura di patologie degenerative. Nell'embrione post-impianto è da ricordare, inoltre, la presenza di un tipo particolare di staminali situate nella cresta gonadica, le *Primordial Germ Cells o PGCs*. Esse fanno la loro comparsa nell'embrione di topo ed in quello umano, rispettivamente alla I ed alla III settimana di sviluppo e precedono la formazione delle cellule *EG (Embryonic Germ)*, le quali a loro volta, produrranno spermatozoi o uova. Le cellule *EG* possono essere isolate dagli embrioni umani, intorno alla V-X settimana di sviluppo e poste in coltura; esse, tuttavia, si prestano più difficilmente all'uso clinico rispetto alle staminali embrionali ed adulte, soprattutto, per problemi di *imprinting* genico.

Cellule staminali embrionali

Poco dopo la fecondazione, lo zigote si divide in 2 cellule figlie, che, a loro volta, si *segmentano* ripetutamente, fino a formare una sorta di struttura a grappolo, definita *morula*. Allo stadio di 16-32 cellule, nella morula si forma una cavità, detta *blastocela*; in questa fase dello sviluppo, l'embrione è definito *blastocisti*. Al IV-V giorno dalla fecondazione, la distribuzione delle cellule risulta non essere più uniforme: la blastocisti mostra un sottile strato cellulare esterno, il *trofoblasto*, che racchiude, a sua volta, un piccolo gruppo eccentrico di cellule, la massa cellulare interna o embrioblasto. Quest'ultimo darà vita all'embrione propriamente detto e successivamente al feto, mentre dal trofoblasto origineranno la parte embrionale della placenta ed il cordone ombelicale, senza i quali non potrebbe avvenire l'impianto nella parete uterina (XIV giorno dopo la fecondazione) e le restanti fasi dello sviluppo. Le cellule dell'embrioblasto sono comunemente definite *Embryonic Stem Cells (ESC)*. Esse si caratterizzano per essere *totipotenti*, in quanto capaci di generare tutti i tipi cellulari e quindi tutti i tessuti, che saranno presenti, poi, nell'individuo adulto. Dopo circa una settimana dalla fecondazione, nella massa cellulare interna si verificano cambiamenti morfologici che determinano la formazione del *disco embrionale*. Si tratta di un piano cellulare circolare e bilaminare, costituito dall'*epiblasto*, uno spesso strato di cellule cilindriche e dall'*ipoblasto* o *endoderma primario*, formato da piccole cellule cubiche. Con la gastrulazione, le cellule dell'ipoblasto si suddividono in 3 gruppi *pluripotenti*, che si dispongono, a loro volta, in quelli che vengono definiti "i 3 foglietti germinativi": ectoderma, mesoderma ed endoderma. L'ectoderma sarà coinvolto nella formazione dell'epidermide e dei suoi annessi (capelli, peli, unghie, ghiandole sebacee e sudoripare), di alcune mucose, del sistema nervoso, di alcuni organi sensoriali (placodi otici ed ottici). Il mesoderma genererà il tessuto connettivo, i muscoli, lo scheletro, il cuore, il sangue, i vasi

sanguigni e linfatici, i reni, parte delle vie genitali. L'endoderma produrrà il fegato, l'intestino, i polmoni e parte delle vie urinarie. Man mano che lo sviluppo embrionale avanza e tocca le fasi terminali, il *pool* di staminali conservatosi in ciascuno dei distretti tissutali specializzati, mostra una capacità differenziativa più limitata rispetto alle cellule pluripotenti dei 3 foglietti germinativi. Questa riserva di staminali *multipotenti* (o talvolta unipotenti), rappresenta quella tipicamente ritrovata nei tessuti dell'organismo adulto. Per ottenere una coltura di *ESCs*, è importante rimuovere microchirurgicamente la parte esterna della blastocisti al fine di prelevare la restante parte interna, costituita in genere da poche decine di cellule. Un vantaggio proprio delle *ESCs* è dato dalla peculiare capacità di replicarsi *in vitro* per lunghi periodi, rimanendo sostanzialmente indifferenziate. Queste cellule, tuttavia, una volta innestate in topi immunocompromessi mostrano la tendenza a produrre teratomi.

Cellule staminali adulte o somatiche

Le staminali adulte sono cellule immature e prevalentemente multipotenti, nonostante talune mostrino caratteristiche di pluripotenza. Esse provvedono, di norma, al mantenimento dei tessuti di provenienza ed alla loro eventuale riparazione, sostituendo le cellule danneggiate o morte per invecchiamento, disfunzioni e danni ossidativi. Anche una staminale somatica è in grado di replicare se stessa per un lungo periodo ed è capace di generare progenitori, atti a differenziare in cellule mature e specializzate. E' quasi del tutto sconosciuto il meccanismo molecolare in grado di bloccare lo stato differenziativo delle *ASCs* nel corso dello sviluppo. Di certo, gli intensi rapporti esistenti con il circostante microambiente, fatto di contatti cellula-cellula, contatti cellula-matrice, rilascio e diffusione di mitogeni, contribuiscono ad alimentare complessi processi di trasduzione del segnale, che finiscono col modulare l'espressione di specifici *clusters* genici.

L'attivazione di taluni geni potrebbe risultare necessaria per favorire, ad esempio, la ripresa del ciclo mitotico da parte della staminale; un tipo particolare di *silencing* potrebbe, invece, essere coinvolto nelle tappe di differenziamento delle cellule progenitrici. Attualmente, il solo condizionamento significativo circa l'uso terapeutico delle *ASCs* è rappresentato dalle problematiche di isolamento; tali cellule sono, difatti, molto rare rispetto alla cellularità tissutale complessiva.

Plasticità delle cellule staminali somatiche

Circa le staminali adulte, uno degli aspetti più interessanti ed affascinanti riguarda la valutazione delle *capacità plastiche*, che consentono loro di trasformarsi in uno o più citotipi. Un dogma fondamentale della biologia prevedeva che il potenziale di sviluppo delle staminali somatiche fosse ristretto, esclusivamente, alla produzione di cellule specializzate per il tessuto od organo di appartenenza. Le possibilità di terapie cellulari basate sulle *ASCs* sono state, di conseguenza, a lungo considerate una semplice utopia. Numerosi studi suggeriscono, in realtà, che le staminali adulte sono dotate di un potenziale differenziativo più ampio del previsto. Queste cellule sarebbero "*committed, but not restricted*", ovvero, parzialmente determinate, ma non strettamente vincolate, verso un unico destino. Isolando una *ASC* dal suo contesto fisiologico, questa, dividendosi in coltura, dà origine a cellule del tessuto di provenienza. In questo contesto è determinata. Se, però, la stessa cellula somatica viene posta in condizioni particolari ed è opportunamente stimolata, la sua capacità di differenziarsi in cellule diverse da quelle del tessuto d'appartenenza, in un certo qual modo, si "risveglia". In quest'ottica, la ragione per cui una staminale di un certo tessuto generi, preferenzialmente, progenie di quel tessuto, potrebbe attribuirsi al fatto che le cellule circostanti la *istruiscono* in tal senso, producendo dei segnali che impediscono ai progenitori di acquisire un fenotipo indesiderato.

L'aspetto più interessante della plasticità riguarda, però, la cosiddetta *transdifferenziazione*. È noto, da tempo, che nell'organismo esistono cellule staminali, che pur risiedendo in un organo, sono in grado di dar vita, anche, a cellule di altri organi; si è sempre ritenuto, tuttavia, che esistesse una chiara limitazione per gli eventi di *commitment*, legata, soprattutto, alla derivazione embrionale delle *ASCs*. Durante le prime settimane dello sviluppo dell'embrione, come già ricordato, le cellule dell'ipoblasto danno origine ai tre foglietti germinativi. Ogni foglietto si differenzia ulteriormente e le cellule staminali che lo costituiscono e che sono, in un certo senso, già *ASCs*, vengono "programmate" per dare origine solo ad alcuni stipiti cellulari e non ad altri. Si pensava che questo vincolo fosse molto stretto e che, per esempio, le staminali mesenchimali potessero produrre solo cellule di tessuti provenienti dal medesimo foglietto germinativo (mesoderma) come osso, tessuto adiposo, ma non neuroni o epatociti, che rivelano origini embrionali differenti. Il midollo osseo rappresenta l'organo emopoietico per eccellenza; in esso è contenuta una popolazione di cellule staminali, di derivazione mesodermica, note come *HSCs* o *Hematopoietic Stem Cells*. Questa classe di *ASCs* è responsabile della produzione dei precursori linfoidi e mieloidi, la cui comparsa precede la formazione di tutti gli elementi figurati del sangue. Dai progenitori linfoidi originano i linfociti B, i linfociti T ed in ultimo i linfociti NK. Le cellule progenitrici mieloidi maturano, invece, in seguito a sofisticati processi citodifferenziativi, in eritrociti, neutrofili, monociti, basofili, eosinofili, macrofagi e megacariociti. Le *HSCs* possono essere facilmente isolate dal midollo osseo, poste in piastra e trattate come colture in sospensione. Molteplici sono i marcatori di superficie impiegabili per la loro caratterizzazione fenotipica, primo fra tutti la glicoproteina sialomucina o CD-34. All'interno della popolazione generale delle cellule CD34⁺, è possibile distinguere sottopopolazioni a differente stadio maturativo, mediante la contemporanea ricerca di altri antigeni di superficie. Il CD-38 ed il CD-133,

ad esempio, identificano una categoria di cellule a grado intermedio di staminalità, mentre il *subset* CD34⁺/CD38⁻ definisce una popolazione più primitiva. Altri marcatori, fortemente espressi su linee già *committed*, sono rappresentati dal CD-14, CD-33, CD-45, CD-71, HLA-DR e CD-45RA. In numerosi studi è stato dimostrato che le staminali ematopoietiche sono capaci di transdifferenziare in svariati citotipi, sia *in vitro* che *in vivo*; di recente, sono state impiegate, con buoni risultati, nella terapia cellulare sperimentale, al fine di realizzare la rigenerazione di cellule epatiche. Come le staminali ematopoietiche, anche quelle cerebrali posseggono la proprietà di transdifferenziare, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Le *Neuronal Stem Cells (NSCs)*, in particolari condizioni di crescita, danno origine sia a cellule del sistema nervoso, quali neuroni, astrociti ed oligodendrociti, sia a mioblasti, ad osteoblasti ed a progenitori ematici.

Possibili applicazioni cliniche delle ASCs

Nell'adulto le staminali somatiche colonizzano diversi distretti tissutali differenziati, quali gli epiteli, il fegato, i muscoli striati, il sistema nervoso centrale, il midollo osseo. Date le potenzialità e la versatilità delle ASCs, gli sforzi degli studiosi sono attualmente rivolti ad un loro possibile impiego terapeutico per la cura delle malattie degenerative. L'obiettivo delle ricerche consiste nell'individuare il modo di ripristinare i tessuti e le cellule che a causa dei processi patogenetici, sono stati gravemente danneggiati. In questo contesto, molte delle speranze sono state riposte nelle staminali residenti nel midollo osseo.

Potenzialità delle staminali residenti nel midollo osseo

Nel midollo osseo, al di fuori delle *Hematopoietic Stem Cells*, è possibile rilevare la presenza di una seconda popolazione cellulare, le *Bone Marrow Stromal Stem Cells* o *BMSSCs*.

I marcatori che caratterizzano fenotipicamente queste cellule allo stadio più precoce del differenziamento, sono il CD-34, il CD-117, lo STRO-1, il CD-133, CD-90. Le *BMSSCs* sono cellule che *in vitro* proliferano, crescono e differenziano aderendo al fondo della piastra; se opportunamente indotte, sono in grado di generare progenitori atti a differenziare in cellule di svariati connettivi. Numerosi studi hanno, difatti, messo in risalto la capacità delle *BMSSCs* di maturare in osteoblasti, condrociti, cellule muscolari, adipociti e tenociti. Il termine *Marrow Stem Cells* è recente; inizialmente e per un lungo periodo, queste cellule multipotenti sono state identificate come *Colony Forming Unit-Fibroblasts* o *Marrow Stromal Fibroblasts*. Le *Bone Marrow Stromal Stem Cells* sia murine che umane, possiedono apprezzabili doti plastiche e clonogeniche ed in più, mostrano una spiccata capacità di risposta agli stimoli, sia *in vitro* che *in vivo*. Non a caso, nei modelli animali con massivi danni tissutali è stato sperimentalmente riscontrato un notevole aumento della concentrazione sierica dello "*Stromal Derived Factor-1a*" (anche noto come *STRO-1*), una chemochina in grado di interagire con il recettore *CXCR4* presente sul plasmalemma delle *BMSSCs*. *STRO-1* funge da chemioattrattore, regolando la mobilizzazione in circolo delle *Bone Marrow Stem Cells* ed il loro specifico indirizzamento al sito di danno tissutale (31). Una volta giunte a destinazione, le *BMSSCs* sembrano provvedere efficientemente a tutti i fenomeni riparativi. È bene ricordare che il midollo osseo è la sede anche di precursori, aventi potenzialità simili a quelle dell'angioblasto embrionale; queste cellule, note come *Endothelial Progenitor Cells* o *EPCs*, sono in grado di proliferare e differenziare in endotelio maturi. Recenti studi suggeriscono che le *EPCs* agiscono migliorando la funzionalità dei tessuti che abbiano ricevuto un danno ischemico, mediante l'induzione e la modulazione dell'angiogenesi. La prima dettagliata descrizione dell'isolamento di precursori endoteliali risale al 1997. Molti dei marcatori che caratterizzano le *EPCs* sono comuni a quelli delle cellule staminali emopoietiche: CD-34, CD-133 e VEGF-R₂.

Il passaggio delle *Endothelial Progenitor Cells* dal midollo osseo al circolo sanguigno è segnato da una diminuzione nell'espressione del CD-133 e da una persistente positività per il CD-34 ed il VEGF-R₂. La successiva acquisizione della negatività per il CD-133 e per il CD-34, segna un ulteriore *step* differenziativo, fino alle cellule endoteliali mature, caratterizzate dall'espressione del CD-54, del CD-31/PECAM-1, VE-Caderina e vWF (*von Willebrand Factor*). Il ruolo dei precursori endoteliali consiste nella rigenerazione o nel riparo di strutture vascolari e tessuti extravascolari. L'infarto acuto del miocardio, ad esempio, è associato al rapido incremento di *EPCs* circolanti. Anche i traumi vascolari, come l'impianto di *by-pass* coronarici, sembrano indurre una rapida mobilitazione di queste cellule. Le *Bone Marrow Stromal Stem Cells*, analogamente alle *Hematopoietic Stem Cells*, hanno da subito suscitato l'interesse dei ricercatori, grazie alle loro indiscutibili potenzialità clonogeniche e differenziative. La letteratura scientifica continua ancora oggi a riservare molto spazio allo studio di queste cellule, perché possano esserne al meglio comprese le caratteristiche biologiche e molecolari, in modo da renderle disponibili per eventuali scopi terapeutici. Promettenti in tal senso, sono anche le *Endothelial Progenitor Cells*, per le quali restano però ancora da chiarire il ruolo fisiologico e le capacità plastiche.

BIBLIOGRAFIA

Alvarez-Buylla, A., and Lois, C. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells* 13, 263-272,1995.

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88:287-298, 1997.

Watt FM, Hogan BL. Out of Eden. Stem cells and their niches. *Science* 287:1427-1430, 2000.

Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* 51:914-926, 1995.

Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ et al. Adult stem cell plasticity. *J Pathol.* 197: 441-456,2002.

Clarke D, Johansson C, Wilbertz k et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science.*193: 281-287, 2000.

Zon, L.I. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 86, 2876-2891, 1995.

Bonnet D. Haemopoietic stem cells. *Journal of pathology.*197: 430-440, 2002.

Zipori, D. The renewal and differentiation of hemopoietic stem cells. *FASEB J.* 6, 2691-2697, 1992.

Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 35-7,1994.

Lagasse E., Connors H., Al Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L., Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6: 1229-1234, 2000.

Reynolds, B.A., and Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 255, 1707-1710, 1992.

Stemple, D.L., and Anderson, D.J. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*. 71, 973-985, 1992.

Clarke DL., Johansson CB., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlstrom H.. Generalized potential of adult neuronal stem cells. *Science*. 288(5471):1660-3, 2000.

Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283:534-537, 1999.

Slack J.M. Stem Cells in Epithelial Tissues. *Science*. 287: 1431-1433, 2000.

Sell, S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res*. 50:3811-3815, 1990.

Sell S. Liver Stem Cells. *Mod Pathol*. 7:105-112, 1994.

Jackson K, Mi T, Goodell M Hemopoietic potential for stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci* 96: 14482-14486, 1999.

Seale, P., Rudnicki, M.A. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev. Biol*. 2000; 218: 115-124.

Conget PA & Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology*, 181: 67-73, 1999.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265-272, 1998.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530, 1998.

Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 21:429-435, 1994.

Owen M. Marrow stromal stem cells. *Journal of Cell Science (Suppl)*, 10:63-76, 1988.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276: 71-74, 1997.

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kappor N, Meyers P, Chiareri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56:289-301, 1980.

Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, van Vliet E, Brakelvan Peer KM, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol* 13:237-243, 1985.

Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 14:700-709, 1999.

Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 284: 143-147, 1999.

Kucia M, Ratajczak J, Reza R, et al. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis*. 2004 Jan-Feb; 32 (1):52-7.

Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial Progenitor Cells Isolation and characterization. *TCM* .5: 201-206, 2003.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 275: 964-967, 1997.

Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 103: 2776-2779, 2001.

Gill M, Dias S, Hattori K. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2+AC133+ endothelial precursor cells. *Circ Res* . 88: 167-174, 2001.