

Estado actual de la investigación con células madre

C. Garrido Colino

Pediatra EAP. Panaderas II. Área IX. Fuenlabrada. Madrid. España.

En los últimos años, los avances en la investigación con células madre han abierto un campo de esperanza para la curación de enfermedades y la medicina regenerativa. No es raro encontrar noticias en la prensa diaria o en otros medios de comunicación sobre este tema. En este artículo se pretenden aclarar algunos conceptos básicos en el campo de la investigación para entender la literatura médica referente a células madre, y aportar los datos y la bibliografía necesarios para una puesta al día sobre uno de los temas que más publicaciones generan en los últimos tiempos.

Palabras clave:

Célula madre embrionaria. Célula madre adulta. Medicina regenerativa. Terapia celular.

CURRENT CONCEPTS IN STEM CELL RESEARCH

In the last few years, advances in stem cell research have opened up new horizons in the treatment of human diseases and in regenerative medicine. It is not unusual to find news on stem cell research in newspapers and other media. This review describes some basic concepts in research needed to understand the medical literature on stem cells and to provide the information and bibliography necessary to be up to date in one of the subjects that has generated the greatest number of publications in the last few years.

Key words:

Embryonic stem cells. Adult stem cells. Regenerative medicine. Cell therapy.

INTRODUCCIÓN

La célula madre (*stem cell* en la literatura científica), se caracteriza por su capacidad de autorrenovarse, es decir, mantenerse en estado indiferenciado, y por su capacidad de generar un gran número de progenitores maduros¹⁻³.

La célula madre embrionaria o germinal, derivada de abortos fetales o bien del blastocisto en una etapa muy precoz de su división, posee pluripotencialidad o capacidad de diferenciarse hacia las tres capas germinales: en-

dodermo, ectodermo y mesodermo^{4,5}. Este descubrimiento, a principios de los años 1980, conmocionó a la comunidad científica y al público en general ante la promesa de nuevas terapias basadas en células madre como solución de enfermedades que afectan a órganos vitales: enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, diabetes, enfermedades genéticas, etc.⁶.

La capacidad de desarrollo de la célula madre embrionaria se ha demostrado en diferentes protocolos experimentales, empleando diferentes medios de cultivo⁷⁻⁹. Asimismo, en estudios *in vitro* se ha demostrado la diferenciación de esta célula a cardiomiocito, músculo esquelético y células neuronales¹⁰⁻¹².

Antes de la utilización de estas células en humanos, existen algunos puntos que aún necesitan ser aclarados por los investigadores¹³:

1. El desarrollo de métodos de diferenciación y aislamiento de poblaciones puras seleccionadas.
2. Demostrar que estas células no sean teratógenas, ya que es conocida la capacidad de la célula embrionaria de diferenciarse hacia teratomas o teratocarcinomas cuando se trasplanta fuera del útero.
3. Conocer la integración y funcionalidad de estas células tras el trasplante.
4. El problema de la incompatibilidad inmunológica entre donante y receptor.

En la actualidad, a pesar de las evidencias científicas, los problemas éticos y legales que plantea la investigación con embriones y abortos de fetos, hacen que sea necesario buscar nuevas alternativas para seguir investigando en el campo de las células madre.

Un nuevo campo de investigación, en el que pretende centrarse este artículo, surge al demostrarse que células procedentes de otros tejidos como la médula adulta, sangre de cordón umbilical y células de endotelio poseen cierta pluripotencialidad, en contra de lo que se creía previamente.

Correspondencia: Dra. C. Garrido Colino.
Santa Isabel, 1, 1.º D. 28012 Madrid. España.
Correo electrónico: cgcolino@teleline.es

Recibido en junio de 2003.

Aceptado para su publicación en julio de 2003.

PLASTICIDAD DE LA CÉLULA MADRE ADULTA

El término plasticidad hace referencia a la capacidad de algunas células adultas para generar progenitores apropiados cuando se las coloca en un nuevo tejido. Es decir, la célula madre adulta puede transdiferenciarse, cambiar su destino, alojarse por vía sanguínea en tejidos lejanos al que reside habitualmente y ser capaz de regenerar esos tejidos.

El microambiente, la matriz extracelular, los factores de crecimiento y la diferenciación desempeñan un papel clave en la función de la célula madre. Se ha demostrado que el nicho o microambiente controla muchas facetas de estas células, como su división, orientación y el tipo de división (simétrica o asimétrica)^{14,15}. Existen también estudios recientes que apoyan la teoría de que la transdiferenciación o plasticidad se debe a un fenómeno de fusión, lo que significa que el contacto célula-célula tendría un papel importante en la adquisición de un nuevo fenotipo celular^{16,17}.

Los criterios para establecer la plasticidad de una célula serían:

1. Demostrar que un gen, previamente silente y específico del nuevo tipo celular, se expresa en la célula de interés.
2. Demostrar que la célula está bien integrada en la estructura del nuevo tejido y es morfológicamente indistinguible de las células vecinas derivadas del huésped.
3. Realizar un ensayo funcional; es decir, demostrar la producción de una enzima deficiente u otra molécula específica de un órgano, en un animal genéticamente deficiente.

Como queda reflejado más adelante en la lectura de este artículo, se han descrito varios ejemplos de plasticidad en la literatura médica, pero el más evidente fue realizado por Clarke et al¹⁸ quienes demostraron que una célula adulta implantada en la cavidad amniótica de un embrión puede diferenciarse hacia las tres capas germinales.

FENOTIPO DE LA CÉLULA MADRE

Conocer el fenotipo de la célula madre es uno de los objetivos primordiales de los investigadores para su mejor identificación y aislamiento, ya que el porcentaje de estas células en los tejidos es muy pequeño; se habla de 1 de cada 10.000 células en médula ósea y un 5% en el músculo esquelético. Actualmente, los principales grupos de investigadores trabajan con células mesenquimatosas, hematopoyéticas y progenitores endoteliales.

El fenotipo de las células mesenquimatosas no se conoce aún bien tras su descubrimiento hace aproximadamente 30 años por Friedenstein¹⁹. Aproximadamente el 30% de un aspirado de médula ósea se consideran células mesenquimatosas. Estas células se han logrado expandir *in vitro* y diferenciarse a hueso, cartílago, tendón, músculo y grasa. Esto las hace atractivas para la ingeniería de tejidos y la terapia génica²⁰⁻²³.

En cuanto a los progenitores endoteliales aislados de la vena umbilical de cordones o vasos embrionarios, la mayoría de los grupos trabaja investigando su capacidad de diferenciarse a células cardíacas, lo que abre importantes perspectivas para los tratamientos de regeneración del miocardio²⁴⁻²⁷.

Sin embargo, la célula mejor conocida fenotípicamente por su uso desde hace años para el trasplante de médula es la célula madre hematopoyética²⁸. Habitualmente, un marcador de superficie, el antígeno CD34 se ha empleado para enumerar, aislar y manipular esta célula humana, porque los estudios en trasplante prueban que la repoblación medular puede llevarse a cabo tras selección de células CD34+. Otros marcadores ya conocidos de célula hematopoyética son el antígeno CD133 y el c-kit.

Avances recientes en el conocimiento de estas células describen nuevos marcadores como el factor de crecimiento vascular (KDR). Esto tiene su importancia porque Thomas et al²⁹ demuestran que la población CD34+, KDR+ está muy enriquecida en progenitores hematopoyéticos con gran capacidad de autorrenovarse, mientras que esta capacidad es menor en la población CD34+, KDR-.

Otro hallazgo de interés es el llevado a cabo por Zanjani et al³⁰. Durante años se había asumido que sólo las células que expresaban antígeno CD34 tenían actividad de células madre. Pero estos investigadores ponen en evidencia que poblaciones celulares Lin-, CD34- contienen células madre capaces de repoblar a largo plazo y diferenciarse a diferentes tejidos *in vivo*. Algunos experimentos realizados sugieren que las células CD34- podrían ser más primitivas que las CD34+. Las células CD34- encontradas entre la fracción de células Lin-, CD34-, CD38- representan una nueva población de células madre y confirman que el comportamiento de la célula madre hematopoyética es más complejo de lo que se creía previamente. Sin embargo, por el momento se desconoce el papel de esta célula madre CD34-.

Población SP

También ha sido posible aislar en médula ósea una población más pura de células madre, basándose en la capacidad de sus células para emitir fluorescencia con tinciones. Mediante el uso de un separador de células con fluorescencia activada (FACS) y la tinción de Hoechst 33342, se puede seleccionar una población celular que supone el 0,05% de la celularidad total de la médula. Esta población se conoce como *side population* (SP) en la literatura científica y se vio que tenía un fenotipo similar a la célula madre de médula adulta, por tanto la población SP tiene un considerable potencial de diferenciación e integración en otros órganos.

La caracterización de una nueva proteína resistente al cáncer de mama (BCRP), también llamada ABCG2, que es expresada por células madre hematopoyéticas Hoechst

SP/CD34- define una célula madre muy primitiva, en estado quiescente^{31,32}.

PLASTICIDAD DE LA CÉLULA MADRE HEMATOPOYÉTICA ADULTA

Las investigaciones de los últimos años apoyan la capacidad de la célula madre hematopoyética para diferenciarse a otros tejidos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Corazón

Las modalidades terapéuticas para el tratamiento del fallo cardíaco son limitadas e incluyen la terapia médica, los marcapasos y el trasplante. Este es el tratamiento de elección para los estadios finales de muchas enfermedades cardíacas, pero la disponibilidad de donantes es limitada y las complicaciones importantes. Por esta razón, los avances en la terapia con células madre podría proporcionar una fuente alternativa para el tratamiento de los cardiopatas³³. En este sentido, el reciente aislamiento y caracterización de una población de células madre hematopoyéticas purificadas (SP) es quizás el avance más prometedor, ya que estas células pueden diferenciarse a endotelio vascular, músculo y cardiomiocitos³⁴. Estudios realizados en ratas demuestran la regeneración de miocardio tras infarto provocado al ligar la coronaria y posterior inyección de células lin- ckit+ procedentes de médula de ratón en el tejido sano adyacente al daño

miocárdico. Tras 9 días se observa una banda de miocardio nuevo y regeneración vascular^{35,36}. Un estudio recién realizado por el grupo de Orlic también demuestra que esta capacidad de la célula hematopoyética de cambiar de destino no es una curiosidad biológica, sino una importante contribución a la reparación del miocardio *in vivo*³⁷. Sin embargo, es necesaria una cierta cautela hasta que las propiedades funcionales y electrofisiológicas de los cardiomiocitos derivados de estas células estén bien definidas y pueda conseguirse un número suficiente de células para un resultado terapéutico satisfactorio.

Sistema nervioso central

Dos conceptos en la biología del desarrollo han cambiado en los últimos años. El dogma de que las neuronas del cerebro adulto no regeneran cayó tras la evidencia del nacimiento de nuevas neuronas en el hipocampo y zona subventricular en roedores y seres humanos^{38,39}. El segundo principio, ya comentado a lo largo de este artículo, es la posibilidad de una célula de cambiar su destino.

Diferentes estudios experimentales resumen la capacidad de la célula adulta hematopoyética procedente de médula o sangre de cordón de diferenciarse *in vitro* e *in vivo* hacia microglia, oligodendroglia, astrocito o neurona (tablas 1 y 2). Todo ello abre nuevos caminos para el tratamiento de accidentes cerebrales y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson⁴⁶⁻⁴⁸.

TABLA 1. Diferenciación de células madre de médula ósea a líneas neurales *in vitro*

Población celular	Medio de cultivo	Marcador neural	Referencias
Células humanas de médula deplecionada de CD34+	DMEM + FBS + EGF + FGF	Nestina Betatubulina III	40,41
Células humanas de médula deplecionada de CD34+ Glicoforina A+	DMEM + FBS + EGF + PDGF	Betatubulina III Gal-c MAP Glutamato GFAP	42
Médula humana	α-MEM + FBS	NSE Vimentina	43

DMEM medio de Dulbecco's modificado; FBS: suero bobino fetal; EGF: factor de crecimiento epidérmico; FGF: factor de crecimiento de los fibroblastos; PDGF: factor de crecimiento plaquetario; Gal-c MAP: proteína asociada a túbulo; GFAP: proteína ácida glial fibrilar; NSE: enolasa específica de neurona.

TABLA 2. Diferenciación de células madre de médula hacia líneas neurales tras trasplante *in vivo*

Población celular	Marcador donante	Modelo animal	Marcador neural	Referencias
Médula de ratón	Cromosoma Y	Rata irradiada	Marcadores de microglia GFAP, Ag F4/80	44
Médula de ratón	Células GFAP+	Ratón irradiado	Betatubulina III NeuN, NF-H	45
Médula de ratón tratada con 5-fluorowacilo	BrdU	Ratón enfermo de Parkinson	Tirosina Hidrosilasa	46
Médula de rata pretratada con 5-fluorowacilo	BrdU	Ratón con accidente cerebral: células inyectadas en carótida	MAP-2, GFAP	47

BrdU: bromodesoxiuridina; GFAP: proteína ácida glial fibrilar; NeuN: proteína del núcleo específica de neurona; NF-H: neurofilamento; MAP-2: proteína asociada a microtúbulo.

Páncreas

El páncreas se compone de una porción exocrina, organizada en ácinos y ductos, y otra endocrina, compuesta por los islotes de Langerhans que albergan las células beta responsables de la homeostasia de la glucosa en plasma. La capacidad de replicación de la célula beta madura es limitada; de ahí la importancia de terapias de remplazamiento para la curación de la diabetes⁴⁹.

No se ha identificado de forma clara la célula madre pancreática adulta, aunque hay evidencias de su existencia y múltiples células se han considerado responsables de esta función, como las células madre que expresan nestina, un marcador de células madre neural, y las células ovales procedentes de médula ósea, ambas halladas en el interior de los islotes pancreáticos en ratas y seres humanos^{50,51}. Sin embargo, la mayoría de los trabajos sugieren que la principal fuente de progenitores pancreáticos son las células maduras de los propios ductos, que tienen una gran capacidad para expandirse, diferenciarse y regenerar páncreas tras pancreatectomía⁵²⁻⁵⁴.

Hígado

En el caso de este órgano es conocida su capacidad de regeneración, ya que después de una hepatectomía de hasta dos tercios, las células restantes son capaces de restaurar el número de células previo a la cirugía. Parece ser que el compartimento productor de células madre hepáticas, se encuentra en las ramas del árbol biliar intrahepático⁵⁵.

En cuanto a la capacidad de la médula ósea adulta para producir hepatocitos, dos grupos de estudio la han demostrado en seres humanos^{56,57}. Los hepatocitos encontrados en hígado derivados de la célula madre hematopoyética varían en función de si existe lesión hepática o no; es decir, son más numerosos si existe lesión hepática⁵⁸. Estos hallazgos tienen gran importancia en pediatría por la capacidad de células de médula ósea para curar enfermedades metabólicas como la tirosinemia tipo 1, lo que se ha logrado hasta el momento en experimentos realizados en ratones⁵⁹.

Riñón

No existe una zona reconocida que produzca células madre en el riñón. Diferentes estudios han demostrado que células de médula modifican la progresión de enfermedades renales como el síndrome de Goodpasture o la esclerosis glomerular mesangial^{60,61}.

Gastrointestinal

El recambio (*turnover*) de células epiteliales en el tracto gastrointestinal es un proceso que ocurre cada 2-7 días y aumenta tras lesión. Este proceso está regulado por una célula madre que en el tubo digestivo no está bien identificada, aunque existe acuerdo en que se localiza en las criptas intestinales y las glándulas gástricas⁶².

En cuanto al papel de la célula madre de médula ósea en el recambio normal y la regeneración de tejidos dañados gastrointestinales, algunos estudios realizados en pacientes trasplantados demuestran la presencia de miofibroblastos derivados de la célula madre hematopoyética en la lámina propia intestinal, y de células epiteliales en el tubo digestivo⁶³. El hallazgo de miofibroblastos derivados de médula ósea en intestino plantea la posibilidad de terapia génica para tratar la lámina propia dañada, evitando o tratando la formación de fibrosis en enfermedades como la de Crohn^{64,65}.

Músculo

La célula satélite, una célula mononuclear localizada entre el sarcolema y la lámina basal del músculo, es la célula capaz de dividirse y autorrenovarse para mantener la fibra muscular intacta^{66,67}. Esta célula representa un 5% de las células musculares⁶⁸.

Los experimentos *in vivo* se encaminan a conocer los marcadores de clones celulares capaces de regenerar músculo adulto, pero cuando se realizan trasplantes *in vivo* de estas células, sólo una minoría sobreviven y son capaces de regenerar^{69,70}. Esto cuestiona si las células obtenidas derivan de la célula satélite o de otras células del músculo esquelético. Por el momento se conocen pocos marcadores de la célula satélite, lo que impide contestar a esta cuestión.

Entre las células candidatas a regenerar músculo, están las procedentes de médula ósea, tanto la célula mesenquimatosas como la hematopoyética. Ferrari et al⁷¹ separan la médula en dos fracciones (células adherentes, mesenquimatosas y no adherentes, hematopoyéticas). Ambas implantan en músculo de ratón y ven que las dos contribuyen a la regeneración de fibras musculares⁷².

El grupo de Gussoni et al⁷³ utiliza poblaciones SP en ratones con distrofia muscular tipo Duchenne y observa que las células trasplantadas expresan distrofina, aunque en un número bajo. Este grupo ha sido capaz de seleccionar una población purificada de células madre que reside en el propio músculo.

Los experimentos en ratones consiguen un porcentaje muy bajo de fibras musculares que expresen distrofina^{74,75}.

Empleando modelos murinos y células mesenquimatosas de médula, el grupo de Reyes consigue una diferenciación a células miogénicas más importante en número.

Por el momento, el rechazo inmunológico de células de donante y el bajo número de células musculares obtenido, hace que la investigación con células de otros tejidos diferentes a la médula esté abierta.

Pulmón

En el árbol broncopulmonar se ha propuesto la existencia de célula madre a varios niveles: epitelio seudoestratificado de vía aérea proximal, bronquiolos y alvéolos.

La plasticidad de progenitores hematopoyéticos queda demostrada tras la inyección en recipientes femeninos de progenitores procedentes de donante masculino, y observar la producción de neumocitos⁶³.

También tras dañar el pulmón con bleomicina en ratones e infundir médula ósea se demuestra la presencia de neumocitos nuevos en pulmón⁷⁶.

Piel

La epidermis y los folículos capilares son un claro ejemplo de autorrenovación. En la epidermis la proliferación celular parte de la capa basal, y en el folículo también existe una porción con actividad de célula madre.

La plasticidad de la médula a este nivel queda demostrada en los estudios de Krause et al⁶³.

Hueso

La médula ósea contribuye a la formación de huesos largos en el ratón⁷⁷.

La mayoría de las investigaciones se centran en la curación de la osteogénesis imperfecta, una anomalía genética que altera la síntesis del colágeno. Se han realizado protocolos terapéuticos usando modelos de ratón con osteogénesis imperfecta, con mejoría en la composición del hueso^{78,79}. En los niños afectados, la sustitución de su médula por médula de donante mejora la enfermedad: aumenta la densidad ósea total, disminuyen las fracturas y el crecimiento se incrementa^{80,81}.

Conclusiones

Los avances en la investigación con células madre han sido grandes. Una célula madre no es necesariamente una célula específica, sino más bien una función que puede ser asumida por diferentes tipos celulares. La capacidad de una célula de funcionar como célula madre disminuye a medida que esa célula madura. En un contexto de daño tisular, señales presentes en el microambiente pueden lograr que células con baja capacidad de células madre se comporten como tal.

La plasticidad de estas células ha quedado demostrada sobre todo con la célula hematopoyética de médula adulta, lo que deja una puerta abierta para la curación de enfermedades degenerativas o incurables hasta el momento. Sin embargo, sin conocer el mecanismo molecular responsable de la plasticidad de la célula adulta, es difícil la aplicación clínica. La demostración de repoblación parcial de un órgano con células que se parecen a sus vecinas no es lo mismo que demostrar la competencia funcional de esas células.

Quedan por resolver muchas cuestiones, y aún debe esperarse para poder emplear con fines terapéuticos las células madre. Una etapa interesante sigue abierta para la investigación con la esperanza de conocer mejor y curar muchas enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mc Kay R. Stem cells in the nervous system. *Science* 1997;276:66-71.
2. Cordon MY, Blackett NM. Reconstruction of the hematopoietic system after stem cell transplantation. *Cell Transplant* 1998;7:339-44.
3. Scheffler B, Horn M, Blumcke I, Lywell EE, Coones D, Kukekov VG, et al. Marrow-mindedness: A perspective on neurogenesis. *Trends Neurosci* 1999;22:348-56.
4. Evans MS, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential stem from mouse embryos. *Nature* 1981;291:154-6.
5. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984;309:255-6.
6. Bishop AE, Buttery LDK, Polak JM. Embryonic stem cells. *J Pathol* 2002;197:424-9.
7. Wobus AM, Guan K, Jin S, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1525-39.
8. Doetschman TC, Eistetter HR, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985;87:27-45.
9. Wiles MV, Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem cells in culture. *Development* 1991;111:259-67.
10. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000;18:675-9.
11. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated *in vitro* from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 1994;75:233-44.
12. Guan K, Rohwedel J, Wobus AM. Embryonic stem cell differentiation model: Cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation *in vitro*. *Cytotechnology* 1999;30:211-26.
13. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Molecular Aspects of Medicine* 2001;22:149-64.
14. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The Evolving concept of a stem cell: Entity or Function? *Cell* 2001;105:829-41.
15. Malcon RA, Poulsan R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathology* 2002;197:419-23.
16. Ying Q, Nichols J, Evans EP, Smith EP. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002;416:540-8.
17. Tereda N, Hamazaki T, Oka M. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542-5.
18. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000;288:1660-3.
19. Friedenstein AJ. Osteogenic activity of transplanted epithelium. *Acta Anat* 1961;45:31-59.
20. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615-25.
21. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
22. Donald GP. Building a Consensus Regarding the Nature and Origin of Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Biochem* 2002;(Suppl 38):7-12.

23. Yuehua J, Balkrishna N, Jahagirdar R, Lee Reinhardt S, Robert E, Schwartz C, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.
24. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109:337-46.
25. Burger PE, Coetzee S, McKeehan WL, Kan M, Cook P, Fan Y, et al. Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells. *Blood* 2002;100:3527-35.
26. Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *PNAS* 2001;98:10733-8.
27. Yuri AR. Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-like Cells from Umbilical Cord. *Stem Cells* 2003;21:105-10.
28. Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J Pathol* 2002;197:430-40.
29. Thomas TE, Miller CL, Eaves CJ. Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. *Methods* 1999;17:202-18.
30. Zanjani ED, Almeida Porada G, Livingston AG, Porada CD, Ogawa M. Engraftment and multilineage expression of human bone marrow CD34⁺ cells *in vivo*. *Ann NY Acad Sci* 1999;872:220-31.
31. Bunting KD. ABC Transporters as Phenotypic Markers and Functional Regulators of Stem Cells. *Stem Cells* 2002;20:11-20.
32. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 2002;99:507-12.
33. Hughes S. Cardiac stem cells. *J Pathol* 2002;197:468-78.
34. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine SM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci* 2001;938:221-9.
35. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine SM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
36. Jackson KA, Majka SM, Wang H. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395-402.
37. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine SM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10344-9.
38. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998;4:1313-7.
39. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287:1433-9.
40. Sánchez-Ramos JR, Cardoso-Pelaez F, Song S. Differentiation of neuron-like cells from bone marrow stromal cells. *Mov Disord* 1998;13(Suppl):122.
41. Sánchez-Ramos JR, Song S, Cardoso-Pelaez F, Hazzi C, Stedford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 2000;164:247-56.
42. Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2001;938:231-5.
43. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. *In vitro* differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:148-52.
44. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4080-5.
45. Brazelton TR, Rossi FMV, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neural phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775-9.
46. Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001;316:67-70.
47. Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1311-9.
48. Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology* 2000;39:711-6.
49. Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cells. *J Pathol* 2002;197:519-26.
50. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001;50:521-33.
51. Reddy JK, Rao MS, Qureshi SA, Reddy MK, Scarpelli DG, Lalwani ND. Induction and origin of hepatocytes in rat pancreas. *J Cell Biol* 1984;98:2082-90.
52. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7999-8004.
53. Brockenbrough JS, Weir GC, Bonner-Weir S. Discordance of exocrine and endocrine growth after 90 % pancreatectomy in rats. *Diabetes* 1988;37:232-6.
54. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in human with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:102-10.
55. Theise N, Badve S, Saxena R. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:234-40.
56. Alison MR, Poulson R, Jeffery R. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
57. Theise N, Nimmakalayu M, Gardner R. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16.
58. Kleiberger W, Rothamel T, Glockner S, Flemming P, Lehmann U, Kreipe H. High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis. *Hepatology* 2002;35:110-6.
59. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nature Med* 2000;6:1229-34.
60. Yokoo T, Ohashi U, Shen J. Genetically modified bone marrow continuously supplies antiinflammatory cells and suppresses renal injury in mouse Goodpasture syndrome. *Blood* 2001;98:57-64.
61. Cornacchia G, Fomoni A, Plati AR. Glomerulosclerosis is transmitted by bone marrow-derived mesangial cell progenitors. *J Clin Invest* 2001;108:1649-56.
62. Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002;197:492-509.
63. Krause DS, Theise ND, Collector MI. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-77.
64. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich

- elements: Implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1999;10:384-98.
65. Targan SR, Hanauer SB, Van Deventer SJ. A Short-term study of chimeric monoclonal and mammary gland epithelium. *Am J Pathol* 1999;154:29-35.
 66. Lipton BH, Schultz E. Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. *Science* 1979;205:1292-4.
 67. Seale P, Sabourin LA, Gargis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax-7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000;102:777-86.
 68. Feldman JL, Stockdale FE. Temporal appearance of satellite cells during myogenesis. *Dev Biol* 1992;153:217-26.
 69. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamic of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 1999;144:1113-22.
 70. Beauchamp JR, Pagel CN, Partridge TA. A dual-marker system for quantitative studies of myoblast transplantation in the mouse. *Transplantation* 1997;63:1794-7.
 71. Ferrari G, Cusella de Angelis G, Coletta M. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-30.
 72. Partridge TA. The fantastic voyage of muscle progenitor cells. *Nature Med* 1998;4:554-5.
 73. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;401:390-4.
 74. Danko I, Chapman V, Wolff JA. The frequency of revertants in mdx mouse genetic model for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 1992;32:128-31.
 75. Richard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* 1996;11:312-24.
 76. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV. Bone marrow derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001;128:5181-8.
 77. Nilsson S, Dooner M, Weier H. Cells capable of bone production engraft from whole bone marrow transplants in nonablated mice. *J Exp Med* 1999;189:729-34.
 78. Pereira R, O'Hara M, Laptev A. Marrow stromal cells, a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1142-7.
 79. Pereira R, Halford K, O'Hara M. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:4857-61.
 80. Horwitz E, Prockop D, Fitzpatrick L, Koo W, Mars J, Brenner M. Osteogenesis imperfecta calls for caution. *Nature Med* 1999;5:466-7.
 81. Horwitz E, Prockop D, Fitzpatrick L, Koo W, Mars J, Brenner M. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Med* 1999;5:309-13.