



# Células Troncales, Nicho y Biomateriales

Citlalli Regalado Santiago, Elisa Tamariz.

Recibido: 26-01-2015

Aceptado: 06-04-2015

## RESUMEN

Las células troncales (CT) se caracterizan por poseer un amplio potencial de diferenciación y de proliferación, y tienen un papel primordial en la homeostasis y regeneración tisular. Aunque son una prometedora fuente de células para terapias de sustitución celular y regeneración tras un daño o enfermedad; su uso es todavía restringido ya que hay que contemplar diversos factores como la supervivencia, la integración tisular, la diferenciación específica y la funcionalidad. Una parte determinante para llevarlas a la medicina regenerativa es comprender su biología y el nicho o microambiente en el que se encuentran *in vivo*. El nicho está constituido por células, proteínas y componentes de matriz extracelular que interactúan con las CT, y puede determinar el estado indiferenciado o la diferenciación hacia fenotipos específicos. En años recientes, el uso de modelos *in vitro* que simulan diversos componentes del nicho han permitido comenzar a comprender el papel de los factores que lo integran, e incluso diseñar modelos artificiales que recapitulen las condiciones de un microambiente. En ese sentido los biomateriales son una alternativa que permite incorporar diferentes características físicas y químicas que se ha observado modular a las CT y favorecen su manipulación. En el presente trabajo se revisan algunas de las estrategias utilizadas para el diseño de biomateriales con el fin de mimetizar el microambiente de las CT y regular su biología, así como el impacto que a futuro pueden tener en terapias de regeneración tisular con CT.

Palabras claves: Células troncales, biomateriales, microambiente

## ABSTRACT

Stem cells (SC) are characterized by their extensive potential of proliferation and differentiation, as well as their major role in homeostasis and tissue regeneration. In spite of SC are a promising source of cell replacement therapies and regeneration after injury or disease; its use is still limited because there are several issues that need to be taken into account, such as survival, tissue integration, specific differentiation and functionality. To consider them part of regenerative medicine it is imperative to understand their biology and niche or microenvironment found *in vivo*. The niche is constituted by cells, proteins and extracellular matrix which interact with the SC and may determine the undifferentiated or differentiation state into specific phenotypes. Furthermore, in recent years, the use of *in vitro* models that simulate various components of the niche have helped to begin to understand the role of factors that compose it, and even to design artificial models that recapitulate the conditions of a microenvironment. In that sense, biomaterials are an alternative to incorporate different physical and chemical properties that have been observed to modulate SC and to improve its manipulation. In this paper we review some of the strategies used for designing biomaterials in order to mimic the microenvironment of SC and to regulate their biology as well as the impact it may have in the future of tissue regeneration therapy with SC.

Keywords: stem cells, biomaterials, microenvironment.

## Características de las células troncales

Las células troncales (CT) se caracterizan por poseer dos capacidades funcionales: 1) la auto-renovación de su población, que se refiere a la habilidad de las CT de dar lugar a una célula idéntica que mantiene las características troncales de la población, y 2) la potencialidad de generar diversos tipos celulares diferenciados y completamente funcionales, a partir de células hijas que pierden sus características troncales<sup>1,2,3</sup>. Durante el desarrollo embrionario, y a medida que transcurre el tiempo de vida de un organismo adulto, la capacidad de auto-renovación y la potencialidad de diferenciación de las CT son diferentes. En ese sentido, si nos referimos a la ontogenia de la CT tenemos que el cigoto fertilizado es la CT totipotente que dará origen a un organismo completo y al trofoblasto (que derivará en la placenta)<sup>4</sup>; capacidad que se mantendrá solo hasta el estadio de división de 8 células de la mórlula<sup>5</sup>. Subsecuentemente en el proceso de desarrollo se dará origen al blastocisto, conformado en su estructura interna por una población de células denominadas troncales embrionarias (CTE) con características pluripotentes, que generan las tres capas germinales embrionarias (mesodermo, ectodermo y endodermo), y por lo tanto son capaces de dar lugar a todas las células de un organismo completo, aunque a diferencia de la célula totipotencial no pueden formar el trofoblasto<sup>2,5,6,7</sup>.

La transición de las CT pluripotentes hacia un estado multipotente se refleja en la subsecuente formación de las capas germinales del endodermo, mesodermo y ectodermo. De este modo, las CT multipotentes se caracterizan por generar tipos celulares procedentes de una única capa germinal embrionaria, es decir, el endodermo origina células que conforman órganos internos como el hígado, páncreas, pulmón e intestinos<sup>8</sup>; el mesodermo o capa germinal media es responsable en la generación del tejido hematopoyético, muscular y óseo, mientras que el ectodermo dará lugar a tejidos como el nervioso, la epidermis, la córnea y la glándula mamaria<sup>2,8</sup>.

Posterior a la etapa de organogénesis y en la edad adulta, las CT multipotenciales se establecerán permanentemente en zonas específicas de los tejidos del organismo adulto, aunque en una proporción muy limitada (aproximadamente del 1 al 2% de la totalidad celular), y con una tasa de proliferación relativamente baja en condiciones fisiológicas, pero que en presencia de un estímulo pueden proliferar activamente<sup>9</sup>. Las CT pueden generar, por medio de la división asimétrica, células troncales multipotentes y células progenitoras o también conocidas como células de amplificación transitoria (CAT)<sup>2,3</sup>. Esta última población se define por su capacidad para proliferar de manera controlada por un periodo limitado de tiempo antes de expresar un fenotipo diferenciado<sup>10</sup>. Entre las poblaciones troncales que se han descrito en el organismo

adulto, particularmente en médula ósea, se encuentran las CT hematopoyéticas que dan lugar a las células del linaje mieloide y linfoide, y las CT mesenquimales (CTM), cuya capacidad de diferenciación abarca múltiples linajes como el adipogénico, y el osteogénico, responsables de la diferenciación a células del tejido adiposo y del hueso respectivamente<sup>[11]Zhang, 2012 #2029]</sup><sup>11</sup>. Estudios recientes han encontrado que las CTM en condiciones *in vitro* tienen también la capacidad de diferenciarse hacia células que dan lugar al tejido hepático<sup>12</sup> e incluso al tejido neural<sup>13</sup>. Otra población de CT adultas que se han encontrado entre la lámina basal y el sarcolema de las fibras del músculo son las CT satélites, que en condiciones fisiológicas se mantienen como una población troncal quiescente, pero que en determinadas condiciones como el ejercicio físico, se activan dando lugar a los progenitores miogénicos que eventualmente se diferencian a nuevas fibras que integran el músculo<sup>14,15,16</sup>. {11\, #2029}

Por otra parte, se ha descrito una población que tiene la propiedad de retener el marcaje con compuestos fluorescentes o radioactivos gracias a su baja frecuencia de división celular, y a la que se ha denominado LRC (labelling retaining cells), esta población se ha identificado como CT en diferentes tipos de epitelios<sup>9,17,18</sup>. En el epitelio intestinal se ha descrito la presencia de LRC en la cripta intestinal<sup>19</sup>, en el epitelio corneal reside una población troncal en un área conocida como *limbus*, mientras que en la epidermis las CT residen en la zona interfolicular, en la base del folículo piloso y en las glándulas sebáceas; esto epitelios comparten la característica de tener una alta tasa de recambio celular<sup>17,20,21</sup>. Otro de los órganos importantes donde radica una población de CT es el cerebro. En el sistema nervioso adulto, los precursores neurales, término que engloba a una población de CT y CAT, o también llamadas precursores neurales, están presentes en la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo, dos regiones importantes donde se lleva a cabo la formación de nuevas neuronas en un proceso conocido como neurogénesis<sup>22</sup>.

El balance entre el mantenimiento del estado indiferenciado y relativamente quiescente, y la activación de la proliferación y la diferenciación de las CT, son influenciados por diversos factores o estímulos presentes en regiones específicas que integran lo que ahora se reconoce como el microambiente o nicho de las CT, y que está presente tanto en el embrión como en el organismo adulto.

## La importancia del nicho en la biología de las células troncales

La localización de las CT en los diferentes tejidos ha sido una tarea ardua, actualmente se reconoce que la zona donde se localizan conforma un microambiente con características celulares, químicas y físicas definidas, y que compone lo que se ha llamado nicho. El término "nicho" fue originalmente

acuñado por Schofield en 1978<sup>23</sup>, para explicar cómo las células adyacentes a las CT hematopoyéticas podrían estar manteniendo la troncalidad, y una vez que éstas células abandonan el nicho entran en diferenciación a menos que se les provea de un ambiente similar. El término nicho ha sido en la actualidad expandido para incluir diferentes aspectos que rodean a las CT tales como componentes de matriz extracelular, factores de crecimiento, células inflamatorias, factores físicos como rigidez y topografía, o concentraciones de oxígeno<sup>24</sup>. Tales componentes actúan como señales inductoras de mantenimiento del estado quiescente, de auto renovación, o de formación de células diferenciadas. Los nichos son altamente especializados para cada tejido, con una localización anatómica definida. La desregulación de las condiciones del nicho puede llevar a la desregulación de la homeostasis tisular y al desarrollo de estados patológicos como tumorigénesis o degeneración<sup>25,26</sup>. El nicho contiene no solamente a las CT, sino a una gran variedad de células con funciones específicas, y son numerosas las evidencias que demuestran que la interacción entre las células del nicho y las CT modulan tanto la diferenciación como la troncalidad. Las características celulares de cada nicho varían según el tejido, en algunos casos está conformado por la progenie de las CT en vías de diferenciación como en las células epiteliales, y las células troncales neurales<sup>24,27</sup>. En otros casos el nicho puede estar constituido por diversos tipos celulares como en la médula espinal, en donde se han identificado células de endotelio vascular, células perivasculares, osteoblastos, macrófagos y nervios simpáticos<sup>28</sup>. El nicho de las CT puede a su vez estar dividido en regiones que se especializan en formar tipos celulares con características particulares<sup>25</sup>, tal es el caso de la zona subventricular en el cerebro adulto, en donde ahora se sabe existe una regionalización que generan tipos neuronales específicos, que a su vez se incorporan a zonas particulares del bulbo olfatorio dependiendo de la zona subventricular de la que provengan; sin embargo aún está por descifrarse cuales características específicas determinan cada región dentro del nicho<sup>22</sup>.

La interacción con células del nicho puede ser por contacto directo célula-célula, o por estimulación paracrina mediante la secreción de factores que median la comunicación celular. Ejemplo de lo anterior es la interacción mediada por la molécula de adhesión E-selectin presente en células endoteliales en la médula espinal y que media la proliferación de las CT hematopoyéticas; se ha observado que el uso de agonistas de E-selectin inducen la quiescencia de las CT<sup>29</sup>. Por otra parte existen una gran cantidad de factores secretados implicados en el mantenimiento y diferenciación de CT, entre los más caracterizados se encuentran las proteínas altamente conservadas Wnt y Sonic Hedgehog (Shh), involucradas en la

regulación de CT en diversos tejidos. Shh tiene un importante papel regulatorio en los nichos presentes en los folículos pilosos o las criptas del epitelio intestinal, donde es clara su distribución espacial y temporal restringida, regulando la presencia de CT en estos tejidos<sup>30</sup>. Por otra parte se sabe que un gradiente de concentración de proteínas Wnt ejerce efectos diferenciales sobre CT hematopoyéticas, altas concentraciones inhiben su capacidad de autorenovación, y bajas concentraciones mantienen su fenotipo indiferenciado y de auto renovación<sup>31</sup>. En el caso del sistema nervioso central las proteínas Wnt desempeñan un importante papel en la regulación de la neurogénesis y la formación de nuevas neuronas a través de la activación transcripcional de genes como Neuro D1 en células progenitoras del hipocampo adulto<sup>32</sup>. Shh es un factor determinante en la formación del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario, y en la formación de neuronas tanto del cerebro anterior, neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, entre otras, mientras que en el adulto Shh también estimula la formación de nuevas neuronas en sitios neurogénicos como el hipocampo<sup>32</sup>. La matriz extracelular (ME) es también un factor determinante en el nicho de las CT, provee no solamente señalización bioquímica, sino también estructural y física. La interacción directa célula-ME mediada por receptores como las integrinas, participa en la señalización que regula auto renovación, proliferación, diferenciación y migración; por ejemplo en la piel en donde la expresión diferencial de las integrinas determina la presencia de las CT o de las CAT<sup>33</sup>. En el caso del sistema nervioso central, se ha reportado que existen dominios denominados fractones en los que la ME forma un continuo con la membrana basal de los vasos sanguíneos, en estos nichos se expresa de manera abundante las proteínas de ME lamininas, sin embargo solamente las CAT o precursoras neurales, y no las CT quiescentes expresan las integrinas α6β1 que funcionan como receptores para lamininas; en procesos de neuroregeneración sin embargo, la expresión de β1 es aumentada en las CT indicando una regulación fina de los receptores a componentes de ME dependiendo de las condiciones de quiescencia o proliferación<sup>34</sup>.

Las macromoléculas que componen la ME también proveen de organización tridimensional al nicho, en el que factores de crecimiento y células tienen una distribución característica permitiendo la formación de gradientes de concentración de proteínas y la interacción entre poblaciones celulares específicas.

Un creciente cuerpo de evidencias ha mostrado por otra parte que las propiedades físicas de la ME tiene también efectos determinantes en la biología de las CT. En años recientes, estudios *in vitro* han encontrado que las propiedades físicas como la rigidez, la elasticidad y la nanotopografía ejercen un profundo efecto sobre la regulación de la biología de las

CT<sup>35</sup>. Las propiedades físicas de la ME que conforma el nicho es "interpretada" por la maquinaria mecanosensora de las CT, repercutiendo en la regulación del citoesqueleto y los sitios de adhesión, y convergiendo en la regulación de la morfogénesis, proliferación, diferenciación, supervivencia<sup>36</sup>, e incluso en la expresión génica<sup>37</sup>.

### **Recapitulación del microambiente a través de biomateriales**

Las evidencias experimentales que demuestran la influencia del microambiente sobre las CT han sido determinantes para enfatizar la necesidad de incorporar los factores que componen un nicho en el estudio y desarrollo de estrategias de regeneración mediante CT. Por lo anterior, uno de los campos con mayor interés es el de los biomateriales, ya que a través de ellos es posible incorporar uno o más factores que mimeticen el nicho.

Los biomateriales son componentes de origen natural o sintético que pueden adquirir diversas características que los hacen compatibles con las células y los tejidos, de manera que pueden funcionar como proveedores de sustrato, células o proteínas. Adicionalmente, los biomateriales pueden proveer señales químicas mediante el acoplamiento de proteínas bioactivas, o péptidos que facilitan la interacción celular; pero también se pueden manipular sus propiedades físicas como la rigidez y la topografía para estimular el mantenimiento del estado indiferenciado, la supervivencia o la diferenciación de las CT. A continuación mencionaremos algunas de las estrategias y evidencias obtenidas referentes al uso de biomateriales para manipular y favorecer los procesos biológicos de las CT.

### **Biomateriales para la exposición a factores bioactivos**

En la ME existen diversos componentes como los glucosaminoglicanos que tiene la capacidad de unirse a factores de crecimiento vía interacciones electroestáticas, esta característica les permite exponer los factores de crecimiento a las células y modular su concentración y actividad sobre las mismas<sup>38</sup>.

Inspirados en la distribución de factores de crecimiento presentes en la ME, es posible diseñar materiales a los cuales se pueden acoplar moléculas bioactivas que se encuentren expuestas de manera específica dependiendo de las necesidades. Las proteínas bioactivas puede funcionar como un soporte trófico que mantiene la viabilidad celular, y que en el caso de células trasplantadas por ejemplo, favorece el número de células viables que a su vez se integran al tejido, o pueden también ser usadas para dirigir de manera específica la diferenciación *in situ* de CT<sup>39</sup>.

El uso de biomateriales para favorecer la interacción de CT con proteínas o péptidos bioactivos tiene varias aproximaciones; generalmente los biomateriales son inertes

desde el punto de vista de las interacciones químicas que pueden establecer con las células; ya que esto les confiere una mayor compatibilidad<sup>40</sup>, sin embargo los biomateriales pueden ser usados como vehículos de liberación de proteínas, o pueden ser utilizados como andamio para el crecimiento de las células, las cuales interactúan con las proteínas de interés conjugadas al biomaterial, ya sea en cultivos tridimensionales (3D), o en una conformación bidimensional (2D)<sup>41</sup>.

Un aspecto importante es considerar si las proteínas bioactivas son simplemente liberadas a partir del biomaterial que las contiene, o están covalentemente unidas a los materiales. Se ha encontrado que la interacción específica de CT neurales con el factor de crecimiento epidermal (EGF), unido de manera covalente a un sustrato, induce una mayor expansión selectiva de esta población, a diferencia de la interacción con el factor soluble en el medio de cultivo, además de contribuir a mantener el estado indiferenciado de la población<sup>42</sup>. La inmovilización del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en hidrogeles de agarosa por ejemplo, se ha probado que induce la diferenciación específica de células precursoras neurales a oligodendrocitos<sup>43</sup>.

Una estrategia interesante es la reportada por Egawa y col. (2011) quienes usando una proteína químérica realizada mediante la fusión por ingeniería genética del factor de crecimiento epidermal (EGF) y la proteína colágena, elaboraron hidrogeles de colágena contenido el factor de crecimiento activo, lo que favoreció una mayor la proliferación y supervivencia de CT neurales<sup>44</sup>. Por otra parte, el implante de geles de ácido hialurónico funcionalizados con las proteínas Efrina B2 y Shh, que se encuentran presentes en sitios neurogénicos, pero ausentes en zonas quiescentes del cerebro como la corteza y el estriado, fueron capaces de inducir la generación de nuevas neuronas en sitios no neurogénicos, e inducir la generación de mayor numero de neuronas en ratas envejecidas las cuales tiene disminuida su capacidad de neurogénesis hipocampal<sup>45</sup>.

El uso de factores de crecimiento, morfógenos, o proteínas con efectos tróficos y trópicos, tanto *in vitro*, como *in vivo*, ha mostrado efectos muy importantes en la expansión, proliferación o diferenciación de las CT; sin embargo la incorporación de estos factores en biomateriales puede aportar ventajas importantes tales como la liberación controlada y restringida espacialmente, que evite efectos pleiotrópicos, favorezca la exposición a poblaciones específicas, y que además potencie sus efectos. La exposición sobre demanda, a partir de biomateriales "inteligentes", que actúan liberando su contenido mediante la degradación controlada por procesos como degradación enzimática, cambios iónicos, luz, campos eléctricos etc. son una alternativa reciente que está siendo ampliamente explorada, y que permitirá modular de manera más fina la

exposición a moléculas bioactivas<sup>41</sup>.

### **Propiedades físicas de los biomateriales y su influencia en la biología de las células troncales**

La rigidez, que se define como la medida de la resistencia que ofrece un material a la deformación, es una de las propiedades mecánicas de la ME y que ahora se tiene evidencia que puede influir la biología de las CT. Considerando la rigidez de los tejidos sólidos, se sabe que el cerebro es uno de los tejidos más blandos (0.1-1 kPa), en el rango intermedio se encuentra el músculo estriado con alrededor de 100 kPa, mientras que el hueso es considerado como el tejido de mayor rigidez con 10<sup>6</sup> kPa<sup>46,47</sup>. Estudios *in vitro* han demostrado que el grado de rigidez del sustrato regula el comportamiento de las CT. Particularmente se ha reportado que la diferenciación de las CTM hacia un determinado linaje es altamente influenciado por el grado de rigidez del sustrato, independientemente de la presencia o ausencia de factores de crecimiento; así se ha observado que un sustrato blando estimula la diferenciación de CTM hacia un linaje neurogénico, en comparación a sustratos de rigidez intermedia que conducen a un linaje miogénico, mientras que sustratos rígidos estimulan la diferenciación hacia un linaje osteogénico<sup>47</sup>. Estos efectos se han observado también en CT con mayor potencialidad como las pluripotentes embrionarias de origen murino; donde se ha reportado que al ser cultivadas en presencia de sustratos rígidos, se favorece la diferenciación a cardiomiositos<sup>48</sup>, mientras que en sustratos blandos se mantiene la expresión de proteínas características del estado pluripotente, además de aumentar su capacidad proliferativa<sup>49</sup>. Sin embargo, este efecto no parece observarse en las CT pluripotentes derivadas del epiblasto de origen humano, que aún y en condiciones de rigidez similar al evaluado en CT embrionarias procedentes de roedor, inician un programa de diferenciación hacia el ectodermo neural<sup>50</sup>.

En precursores neurales procedentes de animales adultos, la capacidad de migración y diferenciación hacia un fenotipo glial se ve favorecida al ser cultivados *in vitro* sobre sustratos rígidos; mientras que la diferenciación neuronal se favorece en presencia de sustratos blandos<sup>51</sup>. Otros estudios que evalúan el mismo efecto empleando precursores neurales pero procedentes de la etapa embrionaria, han reportado que los sustratos blandos son capaces de promover la diferenciación tanto del fenotipo neuronal como glial, incluso en ausencia de factores de crecimiento<sup>52</sup>. Las diferencias encontradas en estos reportes sugieren que aun cuando la rigidez del sustrato es un factor relevante en la diferenciación de los precursores neurales, las características intrínsecas de las CT con las que se han realizado cada uno de los estudios también podrían determinar la respuesta al sustrato.

Más recientemente se ha demostrado que el cultivo prolongado de una población de CTM sobre un sustrato rígido induce la activación de un programa de diferenciación hacia el linaje osteogénico<sup>53</sup>. Este programa de diferenciación es incapaz de revertirse en presencia de sustratos blandos, los cuales estimula la diferenciación hacia un linaje neurogénico. Contrario a este efecto, CTM expuestas por periodos cortos de tiempo a sustratos rígidos, sí son capaces de revertir la expresión de factores pro-osteogénicos en presencia de sustratos blandos. Lo cual significa que el tiempo de exposición a un sustrato puede definir la reversibilidad de la expresión génica, de manera que determina si las células "recuerdan" el ambiente mecánico inicial al cual son expuestas<sup>37</sup>. Este resultado podría tener profundas implicaciones en cuanto a la manera que se realiza el cultivo y mantenimiento de la expansión de las CT, y en el diseño a futuro de biomateriales con propiedades mecánicas específicas que permitan manipular la expresión génica.

La topografía del sustrato a escala micro y nanométrica es otra de las propiedades físicas que regula características celulares como la morfología y conformación del citoesqueleto, la capacidad de migración, y eventualmente la diferenciación celular<sup>54</sup>. En ese sentido se han diseñado biomateriales con superficies nanoestructuradas que estimulan la proliferación y el mantenimiento de la multipotencialidad. Se ha observado que CTM cultivadas en soportes diseñados a base de nanofibras de diámetro de 230 nm, promueven la diferenciación hacia un fenotipo neural en ausencia de factores de crecimiento o factores de reprogramación celular<sup>55</sup>, mientras que sustratos diseñados a base de nanofibras alineadas promueve el compromiso de las CTM hacia un linaje miogénico<sup>56</sup>. Por otra parte, se sugiere que la forma que adquieren las CTM determina su compromiso hacia un linaje osteogénico o adipogénico, ya que se ha observado que existe relación entre la forma que adquiere la célula y la activación de proteínas que promueven el linaje miogénico<sup>57</sup>. Además del efecto que la nanotopografía de los materiales ejerce sobre la diferenciación de la CTM, también se ha observado regulación de la morfología, elongación y proliferación de las CT<sup>58</sup>.

### **Conclusiones**

El estudio de los factores que conforman el nicho de las CT está contribuyendo a comprender la importancia del microambiente que las rodea, y de cómo es posible manipular su biología mediante la modulación de los factores extrínsecos. Este conocimiento está siendo aprovechado para diseñar biomateriales que permitan mimetizar el nicho; sin embargo la complejidad del mismo hace de esta aproximación un gran reto que actualmente está siendo abordado mediante muy diversas estrategias. Los resultados obtenidos hasta el momento

muestran un panorama prometedor en el que los biomateriales sean una alternativa para complementar terapias de sustitución celular y medicina regenerativa; aunque no es una panorama inmediato, será necesaria la investigación multidisciplinaria para conocer más a profundidad temas como los referentes al balance entre los factores extrínsecos e intrínsecos en la biología de las CT, y los diversos aspectos que conllevan el diseño y aplicación de los biomateriales tales como la estructura, estabilidad, y compatibilidad que permitan su uso a nivel clínico.

## Bibliografía

1. P. Gadue, T.L. Huber, M.C. Nostro, S. Kattman, et al., Germ layer induction from embryonic stem cells, *Exp Hematol* 33 (2005) 955-964.
2. M.Z. Ratajczak, B. Machalinski, W. Wojakowski, J. Ratajczak, et al., A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues, *Leukemia* 21 (2007) 860-867.
3. I. Roeder, K. Braesel, R. Lorenz, M. Loeffler, Stem cell fate analysis revisited: interpretation of individual clone dynamics in the light of a new paradigm of stem cell organization, *J Biomed Biotechnol* 2007 (2007) 84656.
4. A.M. Wobus, K.R. Boheler, Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy, *Physiol Rev* 85 (2005) 635-678.
5. A. Trounson, The production and directed differentiation of human embryonic stem cells, *Endocr Rev* 27 (2006) 208-219.
6. A. Trounson, Human embryonic stem cell derivation and directed differentiation, *Ernst Schering Res Found Workshop* (2005) 27-44.
7. M. Votteler, P.J. Kluger, H. Walles, K. Schenke-Layland, Stem cell microenvironments—unveiling the secret of how stem cell fate is defined, *Macromol Biosci* 10 (2010) 1302-1315.
8. L.B. Hazeltine, C.S. Simmons, M.R. Salick, X. Lian, et al., Effects of substrate mechanics on contractility of cardiomyocytes generated from human pluripotent stem cells, *Int J Cell Biol* 2012 (2012) 508294.
9. Y.C. Hsu, E. Fuchs, A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 (2012) 103-114.
10. J.F. Engelhardt, Stem cell niches in the mouse airway, *Am J Respir Cell Mol Biol* 24 (2001) 649-652.
11. Y. Zhang, R.L. Xie, J. Gordon, K. LeBlanc, et al., Control of mesenchymal lineage progression by microRNAs targeting skeletal gene regulators *Trps1* and *Runx2*, *J Biol Chem* 287 (2012) 21926-21935.
12. K. Rehman, M.J. Iqbal, N. Zahra, M.S. Akash, Liver stem cells: from preface to advancements, *Curr Stem Cell Res Ther* 9 (2014) 10-21.
13. L. Fu, L. Zhu, Y. Huang, T.D. Lee, et al., Derivation of neural stem cells from mesenchymal stemcells: evidence for a bipotential stem cell population, *Stem Cells Dev* 17 (2008) 1109-1121.
14. J. Kim, T. Braun, Skeletal muscle stem cells for muscle regeneration, *Methods Mol Biol* 1213 (2014) 245-253.
15. N. Motohashi, A. Asakura, Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal, *Front Cell Dev Biol* 2 (2014).
16. J. Segales, E. Perdigero, P. Munoz-Canoves, Epigenetic control of adult skeletal muscle stem cell functions, *FEBS J* (2014).
17. C. Blanpain, V. Horsley, E. Fuchs, Epithelial stem cells: turning over new leaves, *Cell* 128 (2007) 445-458.
18. M. Ito, Y. Liu, Z. Yang, J. Nguyen, et al., Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis, *Nat Med* 11 (2005) 1351-1354.
19. T.A. Markel, P.R. Crisostomo, T. Lahm, N.M. Novotny, et al., Stem cells as a potential future treatment of pediatric intestinal disorders, *J Pediatr Surg* 43 (2008) 1953-1963.
20. V.W. Wong, B. Levi, J. Rajadas, M.T. Longaker, et al., Stem cell niches for skin regeneration, *Int J Biomater* 2012 (2012) 926059.
21. C. Ramachandran, S. Basu, V.S. Sangwan, D. Balasubramanian, Concise Review: The Coming of Age of Stem Cell Treatment for Corneal Surface Damage, *Stem Cells Transl Med* (2014).
22. A. Alvarez-Buylla, M. Kohwi, T.M. Nguyen, F.T. Merkle, The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73 (2008) 357-365.
23. R. Schofield, The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell, *Blood Cells* 4 (1978) 7-25.
24. S.W. Lane, D.A. Williams, F.M. Watt, Modulating the stem cell niche for tissue regeneration, *Nat Biotechnol* 32 (2014) 795-803.
25. V. Greco, S. Guo, Compartmentalized organization: a common and required feature of stem cell niches?, *Development* 137 (2010) 1586-1594.
26. A.J. Wagers, The stem cell niche in regenerative medicine, *Cell Stem Cell* 10 (2012) 362-369.
27. A. Alvarez-Buylla, J.M. Garcia-Verdugo, Neurogenesis in adult subventricular zone, *J Neurosci* 22 (2002) 629-634.
28. A. Mendelson, P.S. Frenette, Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration, *Nat Med* 20 (2014) 833-846.
29. I.G. Winkler, V. Barbier, B. Nowlan, R.N. Jacobsen, et al., Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance, *Nat Med* 18 (2012) 1651-1657.
30. D.T. Scadden, The stem-cell niche as an entity of action, *Nature* 441 (2006) 1075-1079.
31. T.C. Luis, B.A. Naber, P.P. Roozen, M.H. Brugman, et al., Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion, *Cell Stem Cell* 9 (2011) 345-356.
32. R. Faigle, H. Song, Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis, *Biochim Biophys Acta* 1830 (2013) 2435-2448.
33. P.H. Jones, S. Harper, F.M. Watt, Stem cell patterning and fate in human epidermis, *Cell* 80 (1995) 83-93.
34. I. Kazanis, J.D. Lathia, T.J. Vadakkann, E. Raborn, et al., Quiescence and activation of stem and precursor cell populations in the subependymal zone of the mammalian brain are associated with distinct cellular and extracellular matrix signals, *J Neurosci* 30 (2010) 9771-9781.
35. L.B. Hazeltine, J.A. Selekmán, S.P. Palecek, Engineering the human pluripotent stem cell microenvironment to direct cell fate, *Biotechnol Adv* 31 (2013) 1002-1019.
36. P.M. Gilbert, K.L. Havenstrite, K.E. Magnusson, A. Sacco, et al., Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture, *Science* 329 (2010) 1078-1081.
37. C. Yang, M.W. Tibbitt, L. Basta, K.S. Anseth, Mechanical memory and dosing influence stem cell fate, *Nat Mater* 13 (2014) 645-652.
38. L. Macri, D. Silverstein, R.A. Clark, Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering, *Adv Drug Deliv Rev* 59 (2007) 1366-1381.
39. S.P. Zustiak, Y. Wei, J.B. Leach, Protein-hydrogel interactions in tissue engineering: mechanisms and applications, *Tissue Eng Part B Rev* 19 (2013) 160-171.
40. J.D. Bryers, C.M. Giachelli, B.D. Ratner, Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts, *Biotechnol Bioeng* 109 (2012) 1898-1911.
41. K. Lee, E.A. Silva, D.J. Mooney, Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments, *J R Soc Interface* 8 (2011) 153-170.
42. S. Konagaya, K. Kato, T. Nakaji-Hirabayashi, H. Iwata, Selective and rapid expansion of human neural progenitor cells on substrates with terminally anchored growth factors, *Biomaterials* 34 (2013) 6008-6014.

43. Y. Aizawa, N. Leipzig, T. Zahir, M. Shoichet, The effect of immobilized platelet derived growth factor AA on neural stem/progenitor cell differentiation on cell-adhesive hydrogels, *Biomaterials* 29 (2008) 4676-4683.
44. E.Y. Egawa, K. Kato, M. Hiraoka, T. Nakaji-Hirabayashi, et al., Enhanced proliferation of neural stem cells in a collagen hydrogel incorporating engineered epidermal growth factor, *Biomaterials* 32 (2011) 4737-4743.
45. A. Conway, D.V. Schaffer, Biomaterial microenvironments to support the generation of new neurons in the adult brain, *Stem Cells* 32 (2014) 1220-1229.
46. D.E. Discher, P. Janmey, Y.L. Wang, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science* 310 (2005) 1139-1143.
47. A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell* 126 (2006) 677-689.
48. A. Arshi, Y. Nakashima, H. Nakano, S. Eaimkhong, et al., Rigid microenvironments promote cardiac differentiation of mouse and human embryonic stem cells, *Sci Technol Adv Mater* 14 (2013).
49. F. Chowdhury, Y. Li, Y.C. Poh, T. Yokohama-Tamaki, et al., Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix tractions, *PLoS One* 5 (2010) e15655.
50. A.J. Keung, P. Asuri, S. Kumar, D.V. Schaffer, Soft microenvironments promote the early neurogenic differentiation but not self-renewal of human pluripotent stem cells, *Integr Biol (Camb)* 4 (2012) 1049-1058.
51. N.D. Leipzig, M.S. Shoichet, The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior, *Biomaterials* 30 (2009) 6867-6878.
52. A.I. Teixeira, S. Ilkhanizadeh, J.A. Wigenius, J.K. Duckworth, et al., The promotion of neuronal maturation on soft substrates, *Biomaterials* 30 (2009) 4567-4572.
53. J.C. Chen, C.R. Jacobs, Mechanically induced osteogenic lineage commitment of stem cells, *Stem Cell Res Ther* 4 (2013) 107.
54. M. Nikkhah, F. Edalat, S. Manoucheri, A. Khademhosseini, Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface, *Biomaterials* 33 (2012) 5230-5246.
55. R.J. McMurray, N. Gadegaard, P.M. Tsimbouri, K.V. Burgess, et al., Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency, *Nat Mater* 10 (2011) 637-644.
56. J.M. Dang, K.W. Leong, Myogenic Induction of Aligned Mesenchymal Stem Cell Sheets by Culture on Thermally Responsive Electrospun Nanofibers, *Adv Mater* 19 (2007) 2775-2779.
57. R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, et al., Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment, *Dev Cell* 6 (2004) 483-495.
58. S. Gerecht, C.J. Bettinger, Z. Zhang, J.T. Borenstein, et al., The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells, *Biomaterials* 28 (2007) 4068-4077.