

Cellule mesenchimali stromali: caratterizzazione immunofenotipica e funzionale

Campioni Diana¹, Lanza Francesco²

¹Sezione di Ematologia- Azienda Ospedaliera Universitaria S.Anna- Ferrara

²Sezione di Ematologia-Ospedale di Cremona- Cremona

e-mail: cmpdni@unife.it

ORIGINE DELLE CELLULE

MESENCHIMALI

Nel midollo oltre alle cellule emopoietiche esistono altri progenitori multipotenti di origine non-emopoietica come le cellule mesenchimali (MSC). Fin dal primissimo lavoro di Friedenstein e coll. nel 1970 (1) sembrò che le MSC di origine midollare potessero derivare da un progenitore aderente, non fagocitico di natura non-emopoietica in grado di aderire in coltura e di assumere forma fibroblastoide. Queste cellule fibroblastoidi furono poi isolate e successivamente studiate alla fine degli anni '70 da Dexter (2) attraverso saggi in coltura che misero in evidenza come nello strato aderente fossero presenti 3 principali tipi cellulari: i macrofagi derivati dalle cellule staminali emopoietiche, le cellule endoteliali midollari e i loro precursori (EPC) e le cellule stromali mesenchimali (MSC). Grazie agli studi successivi di Castro-Malaspina negli anni '80 (3) di Eaves (4) (1988) e di Mayani (1990) (5) venne dimostrato che queste cellule stromali mesenchimali rappresentavano nel midollo una rara popolazione (0.01-0.1%) di elementi cellulari allungati in grado di produrre numerose citochine stimolanti l'emopoiesi. Egli denominò tali unità CFU-F (unità formanti colonie fibroblastoidi), definizione ancora rimasta per designare il clone e la progenie di un unico progenitore mesenchimale.

COLTURE CELLULARI E CELLULE MESENCHIMALI

Le CFU-F possiedono un elevato potenziale proliferativo senza dimostrare particolari esigenze nutrizionali eccetto per la presenza di siero bovino fetale. Queste colonie possiedono variabilità morfologica che riguarda ad esempio le dimensioni che assumono in coltura: piccole cellule allungate con grande potenziale proliferativo e grandi cellule più vecchie, a forma più trapezoidale in fase di senescenza.

In questi ultimi decenni diversi studi hanno aumentato le nostre conoscenze sul potenziale clonogenico in vitro delle MSC (6-7) delle MSC e sulla crescita. Infatti un modello interessante per la differenziazione e semiconservativa dalle MSC, molto simile al modello emopoietico, è stato proposto da Colter e coll. (8) che ha dimostra-

to, attraverso un approccio citometrico-morfologico, l'esistenza di 3 diverse sottopopolazioni di MSC con diverse capacità replicative, tra cui la popolazione RS1 (rapid self renewal) che corrisponderebbe ad una piccola popolazione a più basso scatter di MSC molto giovani a rapida proliferazione.

Studi citometrici più recenti hanno confermato questi dati. Infatti attraverso l'utilizzo della "carboxyfluorescein succinimidyl ester" (CFDA-SE), che si lega irreversibilmente a proteine cellulari, è stato messo in evidenza il numero di divisioni cellulari a cui la cellula va incontro ed è stato anche evidenziato che nell'apparente omogeneità morfologica delle MSC coltivate in vitro si possono delineare delle sottopopolazioni di MSC a diverso ritmo proliferativo (9).

Queste sottopopolazioni di MSC diversamente positive alla CFSE in citometria sono successivamente state studiate da Taormin et al (10) che ha messo in evidenza un diverso pattern di espressione genica tra i subset di MSC rafforzando il concetto dell'esistenza di sottopopolazioni funzionali di MSC espanse in coltura.

Nonostante ciò le CFU-F in vitro possono perdere clonogenicità e multi potenzialità, mentre la loro espansione sembra essere influenzata da numerosi parametri.

CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DELLE CELLULE MESENCHIMALI

Le MSC sono in grado di esprimere geni di origine embrionale, molecole di adesione, proteine della matrice extracellulare, collagene, fibronectina, etc. Le MSC secernono numerose interleuchine e tra cui IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, nonché fattori di crescita stimolanti l'emopoiesi come SCF, G-CSF etc. e citochine di diverse tipo. Importante è la produzione del fattore di derivazione stromale (SDF-1) da parte delle MSC che regola la migrazione delle cellule staminali emopoietiche nel midollo osseo esprimendo il recettore CXCR-4 (CD184). Le MSC sono in grado di supportare in vitro le colture ematopoietiche a lungo termine in modo molto efficiente e possono influire sull'homing in vivo delle HSC.

Le MSC, dapprima individuate nel midollo, possono essere isolate da diversi tipi di tessuto incluso quello adiposo, la placenta, la pelle, il timo, il periostio, il musco-

lo, il liquido sinoviale e quello amniotico, il fegato fetale e il sangue cordonale.

Studi del profilo genico di MSC derivate da tessuti diversi dimostrano ancora una volta un diverso pattern di espressione genica suggerendo l'esistenza di sottopopolazioni funzionalmente diverse di MSC (11) in relazione alla sorgente tessutale.

Molti studi hanno confermato anche la multipotenza di queste cellule mesenchimali che in presenza di adeguati stimoli sembrerebbero avere la capacità di differenziarsi sia in vivo che in vitro in adipociti (con formazioni di vacuoli citoplasmatici contenenti lipidi), osteoblasti (con depositi di cristalli di idrossipatite), condrociti (con sintesi di matrice cartilaginea) e cellule muscolari (ricche di miotubuli).

Già Caplan nei primi anni '90 (12) propose e anticipò che le MSC avrebbero avuto la capacità di differenziarsi in una grande varietà di tessuti mesodermali. In accordo con questo concetto, le MSC sono state proposte come fonte di cellule "staminali" nella medicina rigenerativa.

In questo ultimo decennio si sono susseguiti numerosissimi studi che dimostrano l'utilità delle MSC in diverse applicazioni cliniche come la neurogenesi, l'osteogenesi, il riparo cardiaco, la cura della GVHD (graft versus host disease) etc. sebbene le basse percentuali di attecchimento di queste cellule non sembrerebbero giustificare il loro effetto benefico.

Pertanto, come suggerito da Horwitz & Dominici (2008) in un commentary su Cytotherapy (13), le MSC sembrerebbero agire più secondo un effetto paracrino e potrebbero avere diverse applicazioni nella terapia cellulare essendo in grado di:

- 1) differenziarsi in cellule mature e popolare il tessuto dove risiedono;
- 2) secernere citochine o altri mediatori solubili in grado di modificare il microambiente in cui si trovano;
- 3) svolgere la funzione di veicolare le proteine.

Quindi, l'evidenza più attuale sarebbe che la notevole attività biologica intesa come secrezione di marker solubili dopo la sistemica infusione delle MSC, supplirebbe alla scarsità di attecchimento locale e ciò implicherebbe almeno due cose:

Primo, la sorgente del tessuto delle MSC può essere importante nel determinare l'attività biologica ovvero diversi tessuti di origine possono generare MSC con differenti profili di espressione di citochine pertanto possono fornire MSC più idonee per specifiche applicazioni cliniche.

Secondo, l'isolamento e le condizioni di espansione in cultura possono influire considerevolmente sull'espressione genica, riprogrammando la bioattività, delle cellule. Tali condizioni includono la densità di semina, il mezzo di cultura, il siero e le citochine aggiunte. Diventa perciò importante standardizzare le condizioni di coltura ed espansione nonché la caratterizzazione immunofenotipica delle MSC prima dell'utilizzo clinico (14).

Le future ricerche cliniche potrebbero focalizzarsi sullo sviluppo di protocolli standardizzati per l'isolamento e la processazione delle MSC più idonee ad una specifica richiesta e indicazione clinica.

IMMUNOMODULAZIONE E CELLULE MESENCHIMALI MESENCHIMALI

Le MSC oltre ad essere cellule plastiche dal punto di vista differenziativo, possiedono proprietà immunoregatorie forti. Le MSC infatti possono sopprimere le reazioni immuni *in vitro* e *in vivo*. Le proprietà inibitorie delle MSC incidono praticamente su tutti i tipi di cellule del sistema immunitario, incluse le cellule T CD4+ e CD8+, le cellule B, e le cellule NK.

Molti meccanismi sarebbero alla base della proprietà immunoregolare delle MSC, compreso il rilascio di fattori solubili, e il contatto cellula-cellula. Negli uomini gli effetti inibitori delle MSC persistono anche in assenza del contatto cellula-cellula. Tra i vari fattori solubili, ricordiamo soprattutto l'HLA-G ma anche il TGF- β , IL-10 e IL-2, il fattore di crescita degli epatociti, prostaglandina (PGE₂), indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO), che hanno mostrato giocare un ruolo nell'immunoregolazione mediato dalle MSC (15). Anche l'INF γ induce gli effetti immunoregolatori delle MSC verso le cellule T CD4+ e CD8+, le cellule NK e le cellule B (16). Le MSC non esprimono HLA-DR e CD80.

Il meccanismo degli effetti immunosoppressivi delle MSC è ancora attualmente molto dibattuto. I nostri dati recentemente pubblicati dimostrano come le MSC riescano ad immunomodulare grazie all'HLA-G che viene espresso sulla superficie delle cellule, poi prodotto e rilasciato inibendo la proliferazione e la risposta linfocitaria (15). Questo meccanismo immunomodulante non sembrerebbe sempre attivo. Infatti abbiamo messo in evidenza che MSC coltivate in terreno contenente citochine angiogeniche, non producono HLA-G e non sono più in grado di immunomodulare la risposta linfocitaria, ma questo fenomeno può essere monitorato attraverso il controllo dell'espressione del CD90, Thy-1 antigene che correla in modo negativo con le capacità immunomodulanti delle MSC (17). Attualmente abbiamo inoltre messo a punto un semplice e rapido test *in vitro* per l'identificazione delle MSC più immunomodulanti che potrebbe essere utile in clinica dove è richiesto un approccio di immunoregolazione (18).

IMMUNOFENOTIPO E CELLULE MESENCHIMALI

Lo studio biologico delle cellule staminali midollari, tra cui le MSC, costituisce una premessa per un'eventuale applicazione clinica in medicina e l'immunofenotipo rimane soprattutto un campo di approfondimento. Bisogna infatti dapprima distinguere l'immunofenotipo delle MSC, in campioni a fresco prima dell'espansione e dopo l'espansione in coltura.

L'isolamento delle MSC da tessuti primari non fraziona-

ti e specialmente dal midollo osseo è ostacolato dalla limitata selettività dei markers disponibili mentre lo studio dell'immunofenotipo delle MSC in coltura non è stato ancora completato. Rimane ad esempio da capire in cosa differiscono le MSC rispetto ad altre cellule molto simili e aderenti come i generici fibroblasti (19) e quale approccio citometrico possa essere il migliore nel rivelare l'eterogeneità che sta recentemente emergendo in relazione alle MSC, soprattutto rispetto alle condizioni micromicrobientali che sembrerebbero in grado di modificare le loro proprietà funzionali nonché il loro immunofenotipo.

IMMUNOFENOTIPO DELLE CELLULE MESENCHIMALI NON ESPANSE

Le MSC possono essere ottenute da differenti sorgenti tessutali come anticipato precedentemente (midollo osseo, membrana amniotica, pelle, tessuto adiposo, cordone ombelicale, fegato fetale, sinovie, etc.) sebbene siano presenti con bassa frequenza (0,01-0,1%) e nonostante la carenza di marcatori specifici per selezionarle. Infatti, il pattern immunofenotipico delle MSC a fresco è difficile da stabilire e ciò ne limita l'entità dell'isolamento. Nonostante ciò, sono stati individuati alcuni anticorpi reagenti con antigeni superficiali che permettono di selezionare, arricchire e meglio isolare le MSC da campioni a fresco sebbene l'approccio citometrico utilizzato risulta molto individuale (20) e con un successo variabile poiché molti di essi riconoscono anche fibroblasti normali, cellule emopoietiche, nonché blasti di leucemie acute.

Antigeni singoli e combinazioni usate

Antigeni singoli e combinazioni usate	Applicazioni	Anno
CD49a*	Isolamento	2000
CD105 (SH2)	Isolamento e caratterizzazione	2000
CD45/Glycophorin A (Gly A)	Isolamento	2001
LNGFR, CD45/Gly A	Isolamento	2002
D7-FIB/CD45/LNGFR/Gly A	Isolamento e caratterizzazione	2002
STRO-1/CD106 (VCAM-1)	Isolamento e caratterizzazione	2003
STRO-1, CD63 (HOP-26), CD49a, CD166	Isolamento	2003
CD49a, CD45	Isolamento e caratterizzazione	2003
CD105, D7-FIB	Isolamento e caratterizzazione	2004
CD45/Gly A, cocktail (CD3 CD14, CD19, CD38, CD66b) selezione negativa	Isolamento	2004
CD73 (SH3), CD105, CD90, CD49a, CD45	Isolamento	2005

Tabella 1. Tabella che riassume i principali anticorpi utilizzati per la selezione delle MSC in campioni a fresco nei diversi studi presenti in letteratura (20).

Non esiste un protocollo standardizzato per il rilevamento ed il riconoscimento delle MSC a fresco, ed è ad

esempio discussa anche la negatività di espressione del CD45 sulle MSC (21). Per questo motivo, in alcuni lavori, l'analisi dei progenitori mesenchimali viene ampliata alle cellule CD45^{med-low} a bassa intensità.

Comunque, attualmente, per identificare le hMSC "naïve", vengono usati sistemi di separazione immunomagnetica (selezione positiva) o sorting con anticorpi contro molecole di superficie come il CD49, CD249, CD56, CDCP1, CD73, CD271 e in particolare il CD105, D7Fib come abbiamo descritto per le hMSC derivate da midollo osseo isolate da pazienti ematologici (22-23). Come mostrato in Tabella 1, anche il CD45 e la Gly-A (CD235, glicoforina) possono essere utilizzati mediante selezione negativa in cui vengono allontanate le cellule emopoietiche al fine di selezionare solo quelle non emopoietiche ovvero le CD45 negative. Ulteriori passi nell'identificazione a fresco delle MSC, sono stati fatti più recentemente utilizzando anticorpi monoclonali non "clusterati", come ad esempio il W8B2, W4A5, oppure utilizzando il frizzled-9 (FZD-9, recettore di Wnt) etc (23-24). Anche questi anticorpi sono stati utilizzati in tecniche di immunoselezione magnetica o sorting per arricchire con successo i progenitori mesenchimali nei campioni a fresco. Comunque in tutti questi approcci, finora il CD271 (Low affinity Nervous growth factor LNGF), combinato o meno ad altri markers come il CD56 e l'MSCA-1 (25-26), sembra costituire uno tra i migliori approcci per la selezione dei progenitori delle MSC. Molto incoraggianti sono gli studi più recenti che dimostrano l'utilità di usare nuovi markers come l'antigene ganglioside neurale GD2 e l'SSEA-1-4 (stage-specific embryonic antigen-4), (27-28), nonché la nestina (29). Basandosi su queste evidenze è chiaro che la citofluorimetria multiparametrica potrebbe essere un utile, rapido, affidabile e riproducibile approccio che potrebbe fornire le basi per lo sviluppo di protocolli standard per il rilevamento e la valutazione delle hMSC in vivo.

IMMUNOFENOTIPO DELLE CELLULE MESENCHIMALI ESPANSE EX VIVO

Storicamente i primi studi sull'immunofenotipo delle cellule stromali in coltura furono fatti da Simmons e Torok-Storb nel 1991 (30) che dimostrarono che le CFU-F, ovvero i precursori mesenchimali, esprimevano un antigene di superficie, assente in tutte le altre cellule progenitrici emopoietiche, riconosciuto dall'anticorpo monoclonale STRO-1, sebbene in modelli murini.

Studi più recenti dimostrano come, soprattutto dopo espansione, le MSC risultino negative sia per l'espressione dell'antigene precoce di staminalità, quale è il CD34, che per il CD45, marcatore pan leucocitario; mentre, per quanto riguarda la positività, poiché non è disponibile alcun protocollo standardizzato ci si riferisce normalmente alle linee guida molto generali pubblicate già nel 2005, dal Comitato della Società Internazionale

per le Terapie Cellulari (ISCT) che ha stabilito dei criteri di identificazione delle MSC che sono qui di seguito riassunti (31):

Fenotipo Positivo ($\geq 95\%$ +)	Fenotipo Negativo ($\leq 2\%$ +)
CD105	CD45
CD73	CD34
CD90	CD14 o CD11b
	CD79 α o CD19
	HLA-DR

L'adesione alla plastica in condizioni di coltura standard.
Fenotipo:

Fenotipo Positivo ($\geq 95\%$ +)

Fenotipo Negativo ($\leq 2\%$ +)

Differenziazione in vitro: osteoblasti, adipociti, condroblasti. Dimostrato dalla colorazione di coltura cellulare in vitro (31).

Da allora la maggior parte dei laboratori per caratterizzare le MSC ha utilizzato questo ristretto pannello di anticorpi con approccio citofluorimetrico in singola o doppia marcatura e specialmente per l'analisi di MSC isolate da fonti di tessuto normale. Ma altri lavori hanno ampliato l'analisi utilizzando MoAbs diretti contro molecole di adesione (CD29, CD106, CD105, CD166, CD36), e proteine della matrice extracellulare (CD90, CD44), markers emopoietici (CD10, CD31, CD34, CD11c, CD14, CD45-antigene comune dei leucociti), proteine regolatorie del complemento (CD59), antigeni di istocompatibilità (HLA-ABC-classe I, HLA-DR classe II), e recettori di chemochine (CD210, molecole CD184-CXCR4), antigeni neurali e/o endoteliali (CD146). Comunque, non tutti questi antigeni vengono sempre indagati contemporaneamente e quasi sempre il fenotipo, nei lavori in letteratura si riferisce a hMSC provenienti da diversi tessuti, a passaggi diversi e in terreni di coltura diversi generando una certa confusione come riportato da alcuni autori (32).

In relazione all'espansione delle MSC ex-vivo, nonostante un aspetto apparentemente omogeneo dal punto di vista morfologico, possiamo dire che le MSC risultano essere una popolazione eterogenea, come il nostro gruppo ha dimostrato almeno in MSC isolate da pazienti ematologici (33-34-35). Un paradigma emergente è che le MSCs potrebbero avere ruoli funzionali chiave nei tessuti nei quali risiedono o in cui vengono a trovarsi. Il fatto che le proprietà funzionali di queste cellule possano essere significativamente modificate in appropriate condizioni microambientali è un argomento odierno di grande interesse.

Ancor più interessante e da approfondire, rimane da stabilire come cambia l'immunofenotipo delle MSC in relazione alla sorgente tessutale di origine delle MSC o rispetto alle varie condizioni di espansione ex vivo, incluso l'uso di terreni senza siero, di lisato piastrinico o citochine addizionate, densità di crescita, passaggi, effetti della criopreservazione.

La caratterizzazione fenotipica delle MSC rimane dunque ancora un campo di approfondimento. Infatti, tutte queste variabili potrebbero avere implicazioni sulla selezione di tipi cellulari diversi generando possibili sottotipi di MSC funzionalmente e fenotipicamente distinti e alterando il potenziale plastico e clonogenico delle MSC. Inoltre l'attuale definizione delle MSC enfatizza le proprietà generiche funzionali di queste cellule e non si riesce a distinguere ancora completamente per esempio queste cellule da generici fibroblasti (19) ovvero a individuare con certezza sottopopolazioni immunofenotipicamente diverse con funzioni di nicchia specializzate. Ci sembra dunque che rimanga ancora da stabilire e standardizzare l'approccio citometrico migliore da usare per lo studio di queste cellule.

A questo proposito il nostro gruppo propone alcuni spunti per stabilire un approccio citometrico volto allo studio delle MSC che tenga conto di diversi aspetti:

- l'utilizzo della 7-AAD (amino-actinomicina-D) per escludere dal gate di analisi le MSC morte dopo la triplicazione.

- l'esclusione dal gate di cellule CD45+ emopoietiche normali o patologiche, come i blasti di alcune leucemie acute, spesso persistenti e strettamente adesi alle MSC ed esprimenti gli stessi antigeni.

- implementare lo studio dei markers che risultano sempre espressi dalle MSC in diverse condizioni, ad alta intensità come noto già per il CD73, HLA-ABC, CD29, CD59.

- implementare lo studio dei markers che risultano variabili in relazione invece alla fonte tessutale, alle condizioni di coltura, al numero dei passaggi, allo stadio differenziativo, come già noto per alcuni.

Sia dalla letteratura che da studi più recenti è noto che l'espressione dell'antigene HLA-DR (36), del CD44 (37), del CD10, e del CD106 variano a seconda delle condizioni di coltura (38) e della provenienza da fonti normali o patologiche delle MSC suggerendo possibili cambiamenti nella capacità adesiva o plastica delle MSC nonché immunomodulante come riportato per il CD90 e per l'HLA-G (17-18).

Un altro punto sul quale stiamo lavorando riguarda l'acquisizione di una strategia per l'analisi distinta ma combinata delle cellule non-emopoietiche quali cellule mesenchimali e progenitori endoteliali co-presenti nella nicchia midollare in modo da poter distinguere queste diverse popolazioni sia nei campioni a fresco, sebbene siano presenti a bassissime frequenze ma soprattutto dopo coltura.

Sulla base di queste osservazioni, ci auguriamo di poter migliorare e standardizzare lo studio immunofenotipico delle MSC poiché l'eterogeneità delle MSCs potrebbe rivelarci specializzazioni di funzioni che rimangono ancora da esplorare.

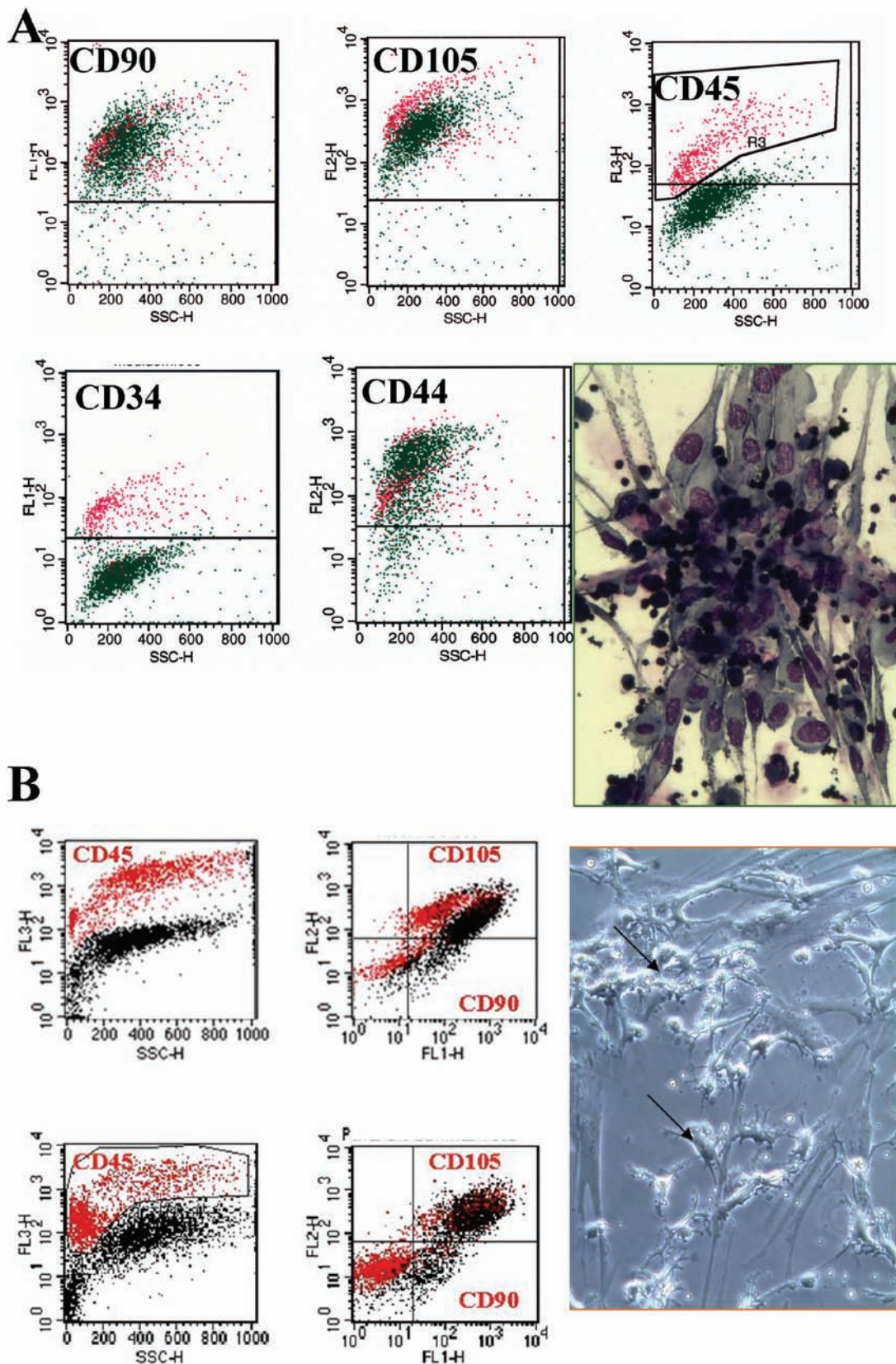


Fig. 1. Nel pannello A della figura è evidenziata l'analisi di cellule MSC derivate dal midollo di una leucemia acuta. Si può notare come i blasti (in rosa) CD45+ e CD34+ siano positivi anche per antigeni considerati mesenchimali come il CD90, il CD105, il CD44. Nella foto è rappresentato un monostrato di MSC contrastato in May Grunwald-Giemsa in cui i blasti rimangono strettamente adesi alle MSC anche dopo 30 giorni e dopo numerosi cambi di terreno. Nel pannello B vengono mostrati altri due casi di cellule MSC derivate da midolli in corso di patologia ematologica in cui le cellule emopoietiche normali, nonché i blasti, CD45+ (in rosso) devono essere esclusi dall'analisi poiché positivi per il CD90 e CD105. Nel riquadro sono visibili MSC in coltura con blasti monocitoidi strettamente adesi (freccia).

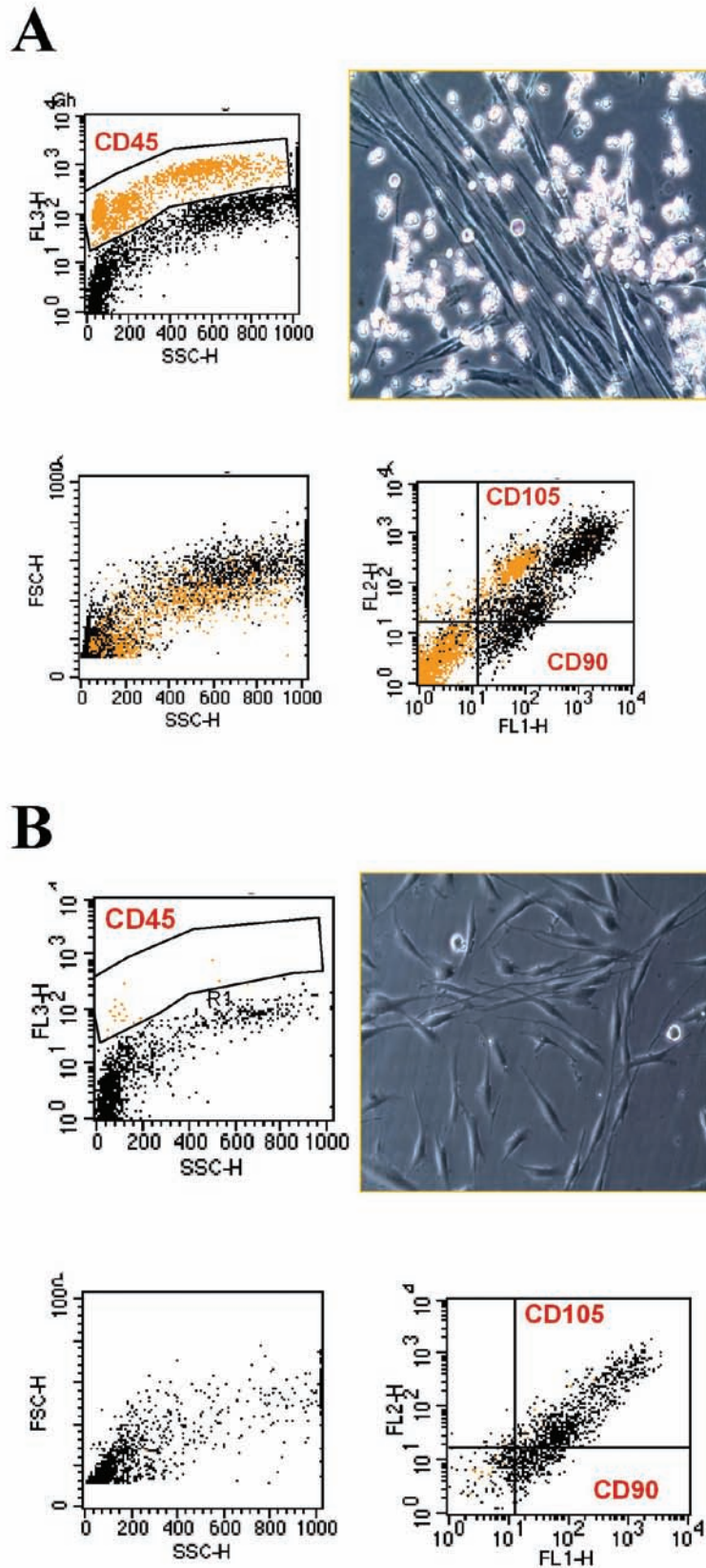


Fig. 2. Nella figura è rappresentata l'analisi delle stesse cellule MSC derivate da midollo coltivate in un terreno classico che mantiene (A) o non mantiene (B) la sopravvivenza delle cellule emopoietiche (CD45+ gialle). Si noti come nel terreno usato nel pannello B non siano presenti quasi per nulla le cellule emopoietiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen colonies. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
2. Dexter TM. Cell interactions in vitro. *Cin Haematol* 1979; 8: 453-468.
3. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnik G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56: 289-301.
4. Eaves AC, Eaves CJ. Maintenance and proliferation control of primitive hemopoietic progenitors in long-term cultures of human marrow cells. *Blood Cells* 1988; 14: 355-368.
5. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992; 49: 225-233.
6. Di Girolamo CM, Stokes D, Colter D et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107: 275-81
7. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143
8. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *PNAS* 2001; 98:7841-7845
9. Urbani S, Caporale R, Lombardini L et al. Use of CFDA-SE for evaluating the in vitro proliferation pattern of human MSC. *Cytotherapy* 2006; 8: 243-253
10. Taormina A, Brune JC, Olsson E, et al. Characterization of bone marrow derived MSC based on gene expression profiling of functionally defined MSC subsets. *Cytotherapy* 2009; 11:114-128
11. Wagner W, Wein F, Seckinger A. et al. Comparative characteristics of mesenchymal cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33:1402-1416
12. Caplan AL. Mesenchymal Stem Cell. *J Orthop Res* 1991; 9:641
13. Horwitz EM, Dominici M. How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? *Cytotherapy* 2008; 10:771-774
14. Horwitz EM. Culture conditions shape mesenchymal stromal cells phenotype and function. *Cytotherapy* 2009; 10:5-6
15. Rizzo R, Campioni D, Stignani M, et al. A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2008; 10:364-375
16. Krampera M, Franchini M, Pizzolo G et al. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfusion* 2007; 5:120-129
17. Campioni D, Rizzo R, Stignani M, et al. A decreased positivity for CD90 on human mesenchymal stromal cells (MSCs) is associated with a loss of immunosuppressive activity by MSCs. *Cytometry* 2009 in press
18. Rizzo R, Lanzoni G, Stignani M. et al. A simple method to identify mesenchymal stromal cells with high immunosuppressive potential. *Cytotherapy* 2011; 5:523-527
19. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD et al. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 2009; 94:258-263
20. Jones E, English A, Kinsey S et al. Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry Part B* 2006; 70B:391-399.
21. Deschaseux F, Charbord P. Human marrow stromal precursors are all integrin subunit-positive. *J Cell Physiol* 2000; 184:319-325.
22. Campioni D, Lanza F, Moretti S, et al. Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD105+ and fibroblasts+ mesenchymal cells from acute myeloid leukaemia: implication for their plasticity along endothelial lineage. *Cytotherapy* 2003; 5:66-79
23. Bühring HJ, Battula VL, Treml S et al. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1106:262-271
24. Bühring HJ, Kuci S, Conze T et al. CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and non-hematopoietic origin. *Stem Cells* 2004; 22:334-43.
25. Battula VL, Treml S, Bareiss PM et al. Isolation of functionally distinct MSC cell subsets using antibodies against CD56, CD271 and mesenchymal stem cell antigen -1 (MSCA-1). *Haematologica* 2009; 94:173-184.
26. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002;30:783-91.
27. Martinez C, Hofman TJ, Marino R et al. Human bone marrow mesenchymal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSC. *Blood* 2007; 109:4245-4248
28. Gang EJ, Bosnakovsky D, Figueiredo CA et al. SSEA-4 identifies MSC from bone marrow. *Blood* 2007; 109:1743-51
29. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F et al. Mesenchymal and hemopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010 466 nature09262
30. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78:55-62
31. Dominici M, Le Blank K, Mueller I et al. Position paper: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-17.
32. Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations: comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 2007 3:249-248
33. Campioni D, Moretti S, Ferrari L, et al. Immunophenotypic heterogeneity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with hematologic disorders: correlation with bone marrow microenvironment. *Haematologica* 2006; 91: 364-68.
34. Campioni D, Lanza F, Moretti S et al. Loss of Thy-1 (CD90) antigen expression on mesenchymal stromal cells from hematological patients may be induced by in vitro angiogenic stimuli and is associated with peculiar functional and phenotypic characteristics. *Cytotherapy* 2008; 10:69-82
35. Tremain N, Korkko J, Ibberson D et al. MicroSAGE analysis of 2353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNA of multiple cell lineages. *Stem Cells* 2001 19:408-18
36. Lanza F, Campioni D, Moretti S et al. Aberrant expression of HLA-DR antigen by bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients affected by acute lymphoproliferative disorders. *Leukemia* 2007; 21:378-81
37. Kemp K, Morse R, Wexler S, et al. Chemotherapy induce mesenchymal stem cell damage in patients with hematological malignancy. *Ann Hematol* 2010; 89:701-713
38. Esposito MT, Di Noto R, Mirabelli P. et al. Culture conditions allow selection of different MSC progenitors from adult mouse bone marrow. *Tissue Eng. Part A* 2009; 15:124.