

# Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais de filtros reutilizáveis e descartáveis de medula óssea

Isolation and characterization of mesenchymal stem cells obtained from reusable and disposable bone marrow collection filters

Glaziane Cordeiro de Deus<sup>1</sup>, Marília Normanton<sup>2</sup>, Nelson Hamerschlak<sup>3</sup>, Andrea Tiemi Kondo<sup>4</sup>, Andreza Alice Feitosa Ribeiro<sup>5</sup>, Anna Carla Goldberg<sup>2</sup>, Luciana Cavalheiro Marti<sup>2</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Comparar as células-tronco mesenquimais humanas obtidas de filtros de coleta reutilizáveis àquelas coletadas em filtros descartáveis e caracterizá-las utilizando os critérios da *International Society for Cellular Therapy*. **Métodos:** Foram isoladas células-tronco mesenquimais humanas de kits de coleta de medula óssea reutilizáveis e descartáveis, pela lavagem dos filtros com meio de cultura. As células isoladas foram caracterizadas de acordo com os critérios estabelecidos pela *International Society for Cellular Therapy*, por meio das técnicas de citometria de fluxo, diferenciação *in vitro* e citotóxica. **Resultados:** As amostras foram obtidas de filtro descartável (n=3) e reutilizável (n=3). Todas as amostras obtidas de filtros descartáveis produziram células-tronco mesenquimais, e todas as células-tronco mesenquimais humanas derivadas de medula óssea preencheram os critérios estabelecidos pela *International Society for Cellular Therapy*. **Conclusão:** Este estudo mostrou que as células-tronco mesenquimais também podem ser obtidas de kits de coleta reutilizáveis (que permanecem em uso em vários centros, no mundo inteiro), para serem empregadas em pesquisa como uma fonte alternativa e ética.

**Descritores:** Células-tronco mesenquimais; Medula óssea; Filtração; Equipamentos descartáveis; Reciclagem

## ABSTRACT

**Objective:** To compare human mesenchymal stem cells obtained from reusable and disposable filters and to characterize them according to the criteria of the *International Society of Cellular Therapy*. **Methods:** Human mesenchymal stem cells were isolated

from bone marrow collection reusable sets and compared with those obtained from disposable sets by washing the filters with cell culture media. The isolated cells were characterized according to the criteria of the *International Society of Cellular Therapy* using flow cytometry, differentiation *in vitro*, and cytochemistry techniques. **Results:** Samples were obtained from disposable (n=3) and from reusable collection sets (n=3). All samples obtained from bone marrow disposable sets successfully produced mesenchymal stem cells. All bone marrow derived mesenchymal stem cells were characterized and fulfilled the criteria established by *International Society of Cellular Therapy*. **Conclusion:** This study showed that mesenchymal stem cells can also be obtained from reusable collection sets (which are still used in several centers around the world) to be employed in research as an alternative and ethical source.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells; Bone marrow; Filtration; Disposable equipment; Recycling

## INTRODUÇÃO

A fonte que foi melhor caracterizada para obtenção de células-tronco adultas é a medula óssea, que contém uma população heterogênea de células, incluindo células-tronco e progenitoras hematopoiéticas.

Além desses tipos de células, a medula óssea também contém um subconjunto de células não hematopoiéticas com potencial multilineagem. Essas células-tronco são chamadas “células estromais de medula” ou “células-tronco mesenquimais humanas” (hMSC)<sup>(1)</sup>.

Estudo realizado no Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil; Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Serviço de Hematologia, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Serviço de Banco de Sangue, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>5</sup> Serviço de Oncologia, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Luciana Cavalheiro Marti – Centro de Pesquisa Experimental – Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein – Avenida Albert Einstein, 627/ 2oSS – Morumbi – CEP: 05652-901 – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: (11) 2151-1353 – E-mail: lmarti@einstein.br

Data de submissão: 6/3/2012 – Data de aceite: 6/5/2012

Conflito de interesse: não há.

Fontes de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), protocolo 2011/010274, Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein (SIBIHIAE) e doadores particulares.

As hMSC são células primitivas provenientes da camada mesodérmica germinativa, que dão origem ao tecido conjuntivo, células do músculo esquelético e células do sistema vascular<sup>(2,3)</sup>.

Em 2006, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais, da *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), propôs um critério mínimo para caracterização das hMSC<sup>(4)</sup>.

As hMSC devem ser plástico-aderentes quando mantidas em condições padrão de cultura. Além disso, devem expressar os antígenos CD29, CD73, CD90 e CD105, e não expressar os antígenos CD34, CD45, CD14 e o antígeno leucocitário humano HLA-DR na superfície. Também devem ter o potencial para se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*. Hoje em dia, a maioria dos estudos caracteriza as hMSC derivadas de medula óssea de acordo com esses critérios. No entanto, restam muitas perguntas não respondidas, como sobre a verdadeira natureza e a identidade das hMSC, incluindo sua localização, origem e capacidade multipotencial. Já se relatou o isolamento de hMSC a partir de vários tecidos, tais como medula óssea, tecido adiposo, fígado, músculo, fluido amniótico, placenta, sangue do cordão umbilical e polpa dentária<sup>(5-7)</sup>.

Como as hMSC derivadas da medula óssea são as células mais utilizadas em estudos clínicos, essas células provavelmente serão a fonte usual em estudos posteriores. Além disso, elas são um controle importante para a determinação de outras possíveis fontes de hMSC.

As hMSC tem sido recuperadas de forma eficiente, independente do gênero do doador, a partir de aspirados de medula óssea de indivíduos saudáveis e também de pacientes com doenças e lesões graves. No entanto, as hMSC representam um tipo de célula extremamente rara, que corresponde a menos de 0,1% das células nucleadas em aspirados de medula óssea<sup>(8-10)</sup>.

Para aplicações clínicas, a medula óssea é aspirada por uma agulha de punção na crista ilíaca posterior e coletada com *kits* descartáveis ou reutilizáveis que contêm meio de cultura suplementado com anticoagulante.

Por razões econômicas, os *kits* reutilizáveis de coleta de medula óssea são amplamente utilizados por vários centros, no mundo inteiro. Durante esse procedimento, o enxerto de medula óssea é filtrado e transferido para uma bolsa de transporte, principalmente para remover coágulos e partículas ósseas do material que vai ser infundido no paciente. O material que permanece no filtro normalmente é descartado.

Pelo protocolo padrão, as hMSC são isoladas a partir de amostras filtradas de medula óssea. Curiosamente, foi proposto que, no aspirado de medula óssea, também ocorre a formação de hematons, que são uma rede estromal, firmemente preenchida com células

progenitoras hematopoiéticas e células pós-mitóticas diferenciadas. Como esses aglomerados têm mais de 50mm de diâmetro, eles provavelmente são removidos pelos *kits* de filtros descartáveis, cujos poros têm de 500 a 200 $\mu$ m. Os filtros reutilizáveis têm poros menores, de 250 ou 150 $\mu$ m<sup>(11)</sup>. Dvorakova et al., Capelli et al., Sundin et al. e outros relataram o isolamento bem-sucedido de hMSC a partir de *kits* descartáveis de coleta de medula óssea, mas ninguém relatou ter conseguido isso a partir de filtros reutilizáveis<sup>(12-14)</sup>.

Neste estudo, foram isoladas e caracterizadas hMSC remanescentes nos filtros de coleta de medula óssea, tanto descartáveis quanto reutilizáveis. Como a coleta de medula óssea de voluntários saudáveis para pesquisa é uma questão complexa, devido à morbidade do procedimento (uma vez que vários centros ainda usam *kits* reutilizáveis para a coleta de medula óssea dos doadores), este estudo apresenta os *kits* reutilizáveis como uma fonte alternativa de células para fins clínicos e de pesquisa.

## OBJETIVO

Comparar as hMSC obtidas a partir de *kits* reutilizáveis e descartáveis, e caracterizá-las de acordo com os critérios da ISCT.

## MÉTODOS

### Coleta e isolamento de células

O procedimento para a obtenção de células a partir de filtro foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), número do processo 10/1.412. Após a coleta para fins de transplante e a filtragem das células da medula óssea de voluntários saudáveis, o filtro foi lavado com 20mL de meio de cultura celular DMEM-LG (Gibco®, Carlsbad, CA) para recuperação das células que permaneceram retidas no interior do filtro juntamente de coágulos sanguíneos e pequenos fragmentos ósseos (Figuras 1 e 2). O



Figura 1. Aspiração de medula óssea

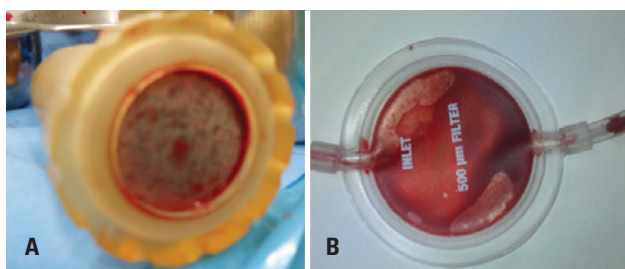


Figura 2. (A) Filtro reutilizável. (B) Filtro descartável

filtro descartável utilizado apresentava dois tamanhos de poros, com 200 e 500 $\mu$ m (Fenwal, Lake Zurich, IL), e o reutilizável apresentava dois tamanhos de poro, com 150 e 250 Fenwal, tendo sido utilizado neste estudo o de 150 Fenwal (*University of Washington, Seattle, WA*).

### Isolamento de hMSC

A amostra de medula óssea obtida após filtração foi diluída (1:3) com tampão fosfato salino (PBS), sendo, em seguida, transferida para um tubo cônico de 50mL contendo 20mL de Ficoll/Hypaque (GE Healthcare) e centrifugada durante 30 minutos a 500g e 22°C. Após a centrifugação, as células foram transferidas para outro tubo e, novamente, centrifugadas por 5 minutos a 500g e 22°C. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas com DMEM-LG (Gibco®, Carlsbad, CA) suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% (Gibco®, Carlsbad, CA), a fim de conseguir uma concentração de 1x10<sup>5</sup>cel/mL. Em seguida, as células foram cultivadas em frascos de 25cm<sup>2</sup>, mantidos em incubadoras umidificadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para favorecer a fixação das hMSC no fundo do frasco.

### Cultura e diferenciação das células

O meio foi trocado, pela primeira vez, após 48 horas de cultura e, dia sim dia não, depois disso. O frasco contendo as células foi verificado todos os dias por microscopia óptica, a fim de confirmar a aderência das colônias de hMSC. Após o estabelecimento de culturas de hMSC na quarta passagem, as células foram diferenciadas em adipócitos, osteoblastos e condrócitos.

A adipogênese foi induzida pela adição de meio adipogênico, constituído por Alpha-MEM (Gibco®, Carlsbad, CA) suplementado com FBS 10% (Gibco®, Carlsbad, CA), 1 $\mu$ m de dexametasona (Sigma, St Louis, MO), 100 $\mu$ g/mL de 3-isobutil-1-metilxantina IBMX (Sigma, St Louis, MO), 10 $\mu$ g/mL de insulina (Sigma, St Louis, MO) e 100uM de indometacina (Sigma, St Louis, MO). O meio adipogênico foi trocado dia sim dia não, durante 3 semanas.

A diferenciação osteoblástica foi induzida pela adição de meio osteogênico, constituído por Alpha-MEM (Gibco®, Carlsbad, CA) suplementado com FBS 10% (Gibco®, Carlsbad, CA), 1 $\mu$ m de dexametasona (Sigma, St Louis, MO), 2 $\mu$ g/mL de ácido ascórbico (Sigma, St Louis, MO) e 10 $\mu$ m beta-glicerofosfato (Sigma, St Louis, MO). O meio adipogênico foi trocado dia sim dia não, durante 3 semanas.

A diferenciação em condrócitos foi induzida pela adição de meio condrogênico, constituído por Alpha-MEM (Gibco®, Carlsbad, CA) suplementado com FBS 10% (Gibco®, Carlsbad, CA), 1 $\mu$ m de dexametasona (Sigma, St Louis, MO), 2 $\mu$ g/mL de ácido ascórbico (Sigma, St Louis, MO), 6,25 $\mu$ g/mL de insulina (Sigma, St Louis, MO), 10ng/mL de TGF-beta (Sigma, St Louis, MO). O meio condrogênico foi trocado a dia sim dia não, durante 3 semanas.

### Métodos de coloração imunoistoquímica

#### Oil Red O

A diferenciação adipogênica foi demonstrada por coloração de gotículas lipídicas após 3 semanas de cultura. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos, lavadas, desidratadas em isopropanol a 60% por 2 a 5 minutos, e coradas com solução de Oil Red O a 0,5% (S-0625, Sigma) em isopropanol a 100%, previamente diluído em água.

#### Vermelho de alizarina

A diferenciação osteogênica foi avaliada com o corante vermelho de alizarina após 3 semanas de cultura. Para a coloração com vermelho de alizarina, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos, lavadas com água destilada, coradas com vermelho de alizarina (2g em 100mL de água destilada) em pH 4,2 (A5533, Sigma), durante 5 a 10 minutos e cuidadosamente lavadas.

#### Azul de toluidina

A diferenciação condrogênica foi avaliada por coloração com azul de toluidina após 3 semanas de cultura. Para o azul de toluidina, as células foram fixadas com etanol a 70% durante 1 minuto, etanol a 90% durante 1 minuto e etanol absoluto durante 1 minuto; em seguida, adicionou-se o azul de toluidina (1g de azul de toluidina, 1g de borato de sódio/100mL de água) (198161, Sigma).

#### Citometria de fluxo

As células da quarta passagem foram usadas para a análise de marcadores de superfície celular. As células foram lavadas com PBS e, em seguida, separadas do plástico com TrypLE (Gibco®). As células obtidas fo-

ram coradas para CD14 (FITC), CD19 (APC), CD29 (PE), CD31 (PE), CD34 (PE), CD45 (PerCP-Cy5.5), CD73 (PE), CD90 (APC), CD105 (PE), CD106 (FITC), CD117 (PE), CD133 (APC), CD166 (PE), HLA-DR (PerCP-Cy5.5) e HLA-I (FITC) e os respectivos controles isotópicos (BD Biosciences, San Jose, CA; eBiosciences, San Diego, CA, EUA; Biolegend, San Diego, CA).

Após a coloração, os tubos foram incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguindo-se um passo de lavagem. As células sedimentadas foram no-

vamente colocadas em suspensão, e as medições foram realizadas utilizando-se o citômetro de fluxo FACSaria (BD Biosciences, San Jose, CA). As análises foram conduzidas com o *software* FlowJo (Tree Star, OR).

**RESULTADOS**

**Sucesso na obtenção de hMSC a partir do *kit* de coleta de medula óssea**

Dentre as seis amostras, cinco produziram hMSC. O número médio de células mononucleares obtidas a partir do *kit* de coleta reutilizável foi de  $1,5 \times 10^6$  ( $\pm 0,9 \times 10^6$ ) e o do *kit* de coleta descartável foi de  $50 \times 10^6$  ( $\pm 43 \times 10^6$ ).

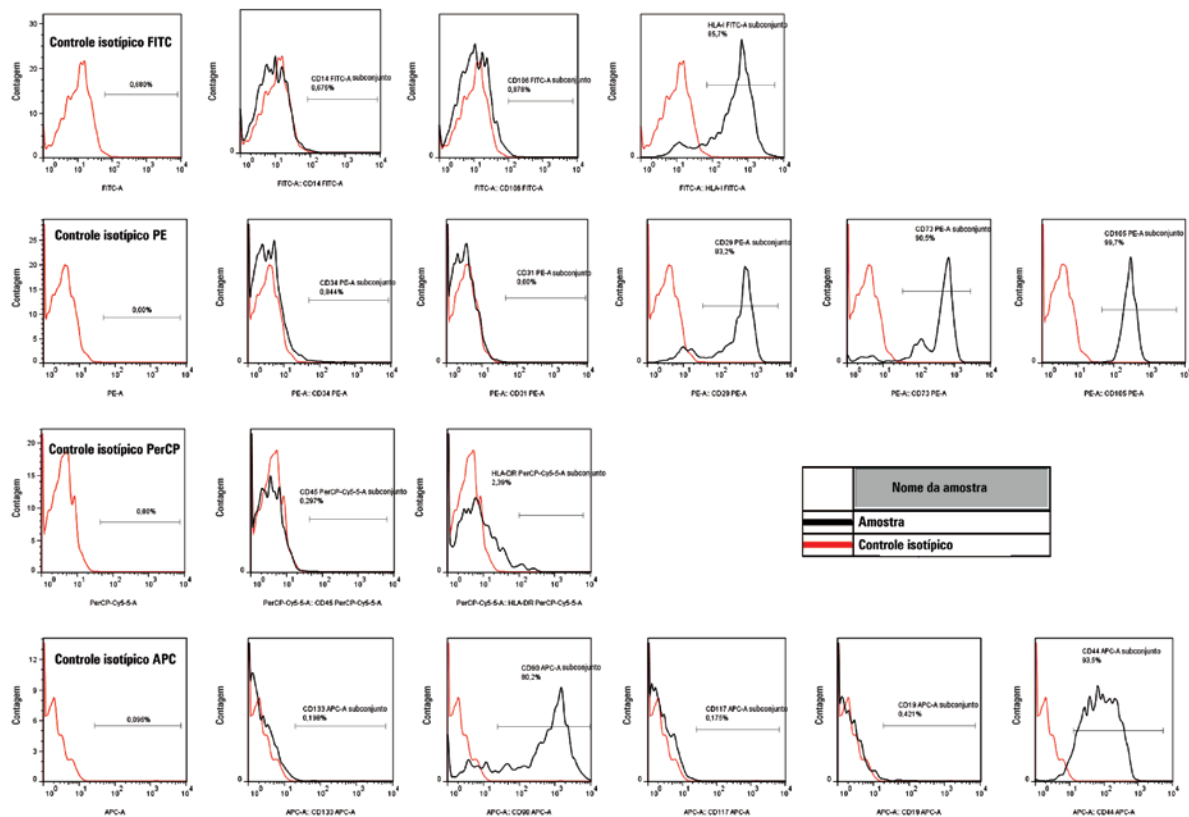
A amostra que não foi produziu hMSC foi a do filtro reutilizável, provavelmente devido ao baixo número de células obtidas. No entanto, todas as hMSC derivadas de medula óssea produzidas foram capazes de gerar grande número de células na passagem 4, acima de  $1 \times 10^7$  (Quadro 1).

A caracterização por análise de citometria de fluxo mostrou que não existiam diferenças significativas no perfil dos marcadores de superfície entre as hMSC obtidas a partir de filtros reutilizáveis ou descartáveis (Figura 3).

**Quadro 1.** Expansão das células-tronco mesenquimais humanas dos *kits* descartável e reutilizável

Amostra	Entrada de células mononucleares x10 <sup>6</sup>	Saída de hMSC x 10 <sup>6</sup> na passagem 4
1	100	30
2	20	26,5
3	32	20
4	2,7	21,0
5	1,0	16,7
6	0,5	-

hMSC: células-tronco mesenquimais humanas.



**Figura 3.** Representação das cinco experiências. A primeira fileira de gráficos representa os controles isotópicos utilizados para cada grupo de anticorpos. Os outros gráficos mostram a sobreposição do controle isotópico (vermelho) e marcador (azul). A barra representa a percentagem de células positivas para cada marcador pesquisado. As células-tronco mesenquimais foram negativas ou apresentaram positividade muito baixa para CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133, CD106, HLA-DR, e mais de 89% para CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e HLA-I

### Diferenciação das hMSC

As hMSC também foram caracterizadas por sua capacidade de se diferenciar em três linhagens celulares. Todas as cinco amostras obtidas a partir tanto de filtros reutilizáveis quanto descartáveis foram capazes de se diferenciar nas três linhagens.

### Diferenciação adipogênica

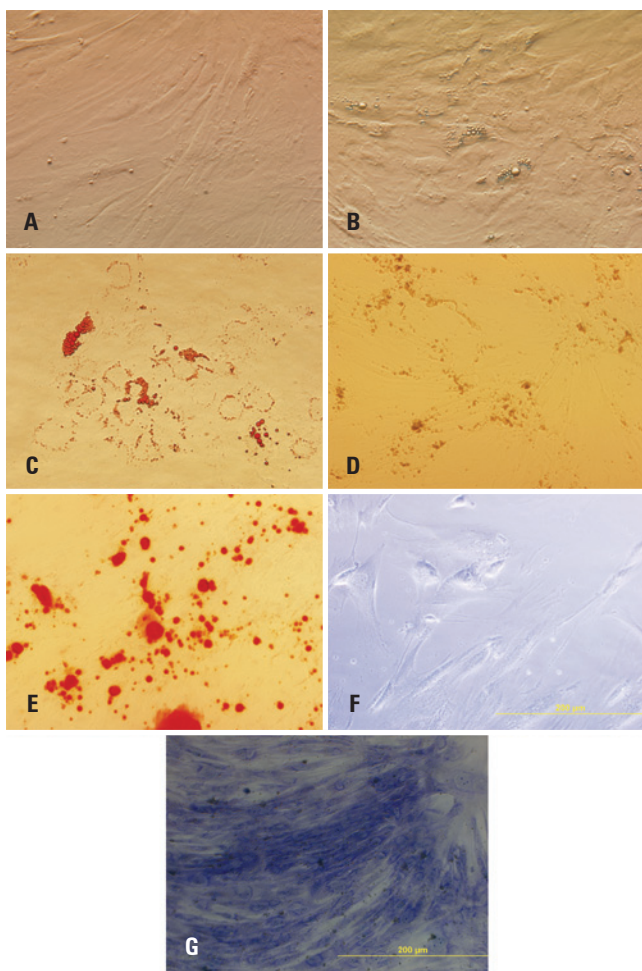
As hMSC indiferenciadas (Figura 4A) foram cultivadas em meio adipogênico durante 21 dias, o que levou à formação de gotículas citoplasmáticas de lípidos (Figura 4B). Para melhor visualização, as células foram coradas com Oil Red O, que cora as gotículas lipídicas no interior das células (Figura 4C).

### Diferenciação osteogênica

As hMSC indiferenciadas foram cultivadas em meio osteogênico durante 21 dias, o que resultou na formação de uma matriz de cálcio (Figura 4D). Para melhor visualização, as células foram coradas com vermelho de alizarina, que cora o cálcio (Figura 4E).

### Diferenciação condrogênica

As hMSC indiferenciadas foram cultivadas em meio condrogênico durante 21 dias, formando uma rica matriz de proteoglicanos (Figura 4F). Para melhor visualização, as células foram coradas com azul de toluidina, que cora proteoglicanos (Figura 4G).



**Figura 4.** (A) Células-tronco mesenquimais indiferenciadas - CTRL (40x). (B) Formação de gotículas lipídicas no interior das células cultivadas em cultura com meio adipogênico (40x). (C) Gotículas lipídicas coradas com Oil Red O no interior das células cultivadas em cultura com meio adipogênico (40x). (D) Deposição de cálcio nas células cultivadas em cultura com meio osteogênico (40x). (E) Deposição de cálcio corada com vermelho de alizarina nas células cultivadas em cultura com meio osteogênico (40x). (F) Alterações morfológicas nas células cultivadas em cultura com meio condrogênico (40x). (G) Matriz rica em proteoglicanos corada com azul de toluidina nas células cultivadas em cultura com meio condrogênico (40x)

### DISCUSSÃO

A medula óssea é a fonte melhor caracterizada dessas células, sendo as hMSC o tipo celular utilizado na maioria dos estudos clínicos, incluindo aqueles sobre prevenção da doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) por coinfusão de hMSC com células-tronco de medula óssea ou hematopoiéticas de sangue periférico. As hMSC estão também sendo testadas como tratamento da DECH, isoladas ou em combinação com a terapia com corticosteroides<sup>(15-17)</sup>.

Além da prevenção e tratamento da DECH, as hMSC estão relacionadas a várias sugestões terapêuticas, como distúrbios neurodegenerativos, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 1 e outros<sup>(18-21)</sup>.

Assim, os *kits* de coleta são uma fonte importante de células que irão proporcionar à comunidade científica a oportunidade de obtê-las e de esclarecer resultados conflitantes, como as implicações da variabilidade biológica e as diferenças de condições que podem afetar o resultado de terapias, sendo capazes de fornecer respostas a questões científicas e clínicas.

Este estudo forneceu evidências de que as hMSC podem ser obtidas a partir de *kits* reutilizáveis e descartáveis de medula óssea.

As hMSC foram isoladas por suas propriedades adesivas a plástico, cultivadas e expandidas após a semeadura. Na quarta passagem, as populações de células foram homogêneas na expressão de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e HLA-I. Além disso, as hMSC tiveram expressão muito baixa ou negativa para todos os marcadores de células hematopoiéticas e progenitoras, tais como CD14, CD19, CD34, CD45, CD117, CD133 e HLA-DR; foram também negativas para os marcadores endoteliais CD31 e CD106. Este estudo mostrou que as hMSC derivadas de amostras obtidas a partir de *kits* de coleta reutilizáveis ou descartáveis são capazes de dar origem, por diferenciação *in vitro*, a três linhagens

padrão de células mesenquimais: adipogênica, osteogênica e condrogênica. Essas culturas de células derivadas de filtro satisfazem totalmente o requisito mínimo para os marcadores de seleção positiva estabelecidos pela ISCT<sup>(4)</sup>.

Apesar dos *kits* de filtros reutilizáveis apresentarem menor tamanho dos poros, que deveria reter um número maior de hematóns, foi possível obter mais células com melhor eficiência a partir dos *kits* de filtros descartáveis. Isso provavelmente ocorreu devido ao fato de que esse tipo de filtro apresenta áreas maiores para lavagem. Outra possibilidade é o fato de que as MSC são plástico-aderentes e os *kits* de filtros descartáveis estão envoltos em plástico<sup>(22)</sup>.

## CONCLUSÃO

Este estudo mostrou evidências de que as hMSC podem ser obtidas a partir de *kits* reutilizáveis de coleta de medula óssea. As hMSC derivadas de *kits* reutilizáveis, mesmo com o número de células inicial inferior, foram capazes de gerar um número elevado de hMSC na quarta passagem, que, definitivamente, são utilizáveis em pesquisa como uma fonte muito ética.

## REFERÊNCIAS

- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974; 2(2):83-92.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28(8):875-84.
- Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest*. 2000; 105(12):1663-8.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011; 20(1):5-14.
- Beyer Nardi N, Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(174):249-82.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.
- Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Lymphoma*. 2005;46(11):1531-44.
- Peng L, Li H, Gu L, Peng XM, Huang YS, Gao ZL. Comparison of biological characteristics of marrow mesenchymal stem cells in hepatitis B patients and normal adults. *World J Gastroenterol*. 2007;13(11):1743-6.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
- Blazsek I, Delmas Marsalet B, Legras S, Marion S, Machover D, et al. Large scale recovery and characterization of stromal cell-associated primitive haemopoietic progenitor cells from filter-retained human bone marrow. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23(7):647-57.
- Dvorakova J, Hruby A, Velebný V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int*. 2008;32(9):1116-25.
- Capelli C, Salvade A, Pedrini O, Barbui V, Gotti E, Borleri G, et al. The washouts of discarded bone marrow collection bags and filters are a very abundant source of hMSCs. *Cytotherapy*. 2009;11(4):403-13.
- Sundin M, Remberger M, Lönnies H, Sundberg B, Ringdén O, Le Blanc K. No increased trapping of multipotent mesenchymal stromal cells in bone marrow filters compared with other bone marrow cells. *Cytotherapy*. 2008;10(3): 238-42.
- Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(5):389-98.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439-41.
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O; Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-86.
- Kebräie P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(7):804-11.
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Miglioretti M, Stecco A, Servo S, et al. Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study. *Cytotherapy*. 2012;14(1):56-60.
- Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011;109(8):923-40.
- Mabed M, Shahin M. Mesenchymal stem cell-based therapy for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7(3):179-90.
- Mageed AS, Pietryga DW, DeHeer DH, West RA. Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2007; 83(8):1019-26.