

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ATIVIDADE ANTI-TUMORAL ESTIMULADA PELA INFUSÃO DE  
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS UTILIZADAS NO TRATAMENTO  
DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA (DECHa)  
RESISTENTE A ESTEROIDES**

VANESSA DE SOUZA VALIM

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ATIVIDADE ANTI-TUMORAL ESTIMULADA PELA INFUSÃO DE  
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS UTILIZADAS NO TRATAMENTO  
DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA (DEChA)  
RESISTENTE A ESTEROIDES**

VANESSA DE SOUZA VALIM

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia  
Mariano da Rocha Silla. Tese de  
doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas,  
UFRGS, para obtenção do título  
de doutor.**

Porto Alegre

2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Valim, Vanessa de Souza

ATIVIDADE ANTI-TUMORAL ESTIMULADA PELA INFUSÃO DE  
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS UTILIZADAS NO TRATAMENTO  
DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA (DECHa)  
RESISTENTE A ESTEROIDES / Vanessa de Souza Valim. --  
2017.

82 f.

Orientadora: Lucia Mariano da Rocha Silla.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Célula-tronco mesenquimal. 2. Doença do enxerto  
contra hospedeiro. 3. citocinas. 4. células Natural  
Killer. 5. imunomodulação. I. Silla, Lucia Mariano da  
Rocha, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

...À Dra. Lúcia pela orientação, pela confiança e principalmente pelo apoio e amizade  
nesses longos anos de trabalho e convivência;

À equipe do Serviço de Hematologia Clínica pela confiança;

... À Maria Aparecida pelas palavras de apoio e parceria;

...À Bruna Zambonato, por toda a dedicação que foi fundamental para o acontecimento  
desse estudo;

...À Bruna Amorin pelo apoio nos momentos difíceis dessa trajetória;

...À Annelise Pezzi, pelos cafés e pelas risadas;

...À Alice Dahmer, pela companhia e conversas;

Ao Filipe Sehn com toda sua paciência e boa vontade;

...À equipe técnica e iniciação científica do CTTC que sempre ajudaram nas tarefas do  
laboratório, facilitando muito a execução do trabalho

...Ao Rafael que me apoia e incentiva nos momentos difíceis, que não me deixa desistir  
dos meus sonhos sempre com muito amor e paciência;

...Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e foram responsáveis por eu chegar  
aqui;

...A minha irmã, que cuidou com muito amor do meu filho, me proporcionando mais  
tempo para dedicação ao projeto;

...Aos meus filhos, Guilherme e Eduardo, que são minhas verdadeiras motivações.

## RESUMO

O transplante de Células Tronco Hematopoéticas alogênico é o tratamento curativo para diversas doenças hematológicas malignas, benignas e imunodeficiências, porém é acompanhado de grande morbidade e mortalidade. Uma das principais complicações é a doença do enxerto contra hospedeiro aguda que, se não controlada rapidamente, pode ser fatal. A Doença do Enxerto contra Hospedeiro aguda tem como tratamento o uso de esteróides, no entanto, em cerca de 30 a 50% dos casos se revela resistente à esta terapia, sendo considerados com Doença do Enxerto contra Hospedeiro aguda refratária ou resistente. O tratamento para Doença do Enxerto contra Hospedeiro aguda refratária ou resistente à esteróides não está ainda estabelecido sendo alta a mortalidade desses pacientes. Nesse contexto, começou-se a pesquisar o papel das células-tronco mesenquimais em pacientes com Doença do Enxerto contra Hospedeiro aguda resistente a esteróides, devido a capacidade de imunomodulação que aquelas possuem. As células-tronco mesenquimais são células-tronco adultas, com capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação em diferentes linhagens celulares. As propriedades imunomoduladoras das células-tronco mesenquimais ainda não são totalmente conhecidas, mas sabe-se por estudos *in vitro* que elas interagem com diversos tipos celulares e citocinas, sendo sua aplicabilidade terapêutica muito pesquisada em diversas doenças inflamatórias; ainda assim, poucos se conhece sobre o efeito modulador das células-tronco mesenquimais *in vivo*. Inúmeros estudos piloto ou séries de casos sobre a aplicabilidade de célula-tronco mesenquimal para o tratamento da Doença do Enxerto contra Hospedeiro aguda foram publicados com resultados animadores, no entanto, não há até o momento na literatura estudo prospectivo randomizado em pacientes com Doença do Enxerto contra Hospedeiro aguda refratária

comparando célula-tronco mesenquimal com o tratamento padrão. Finalmente, dentre os problemas decorrentes da intensa imunossupressão necessária para controlar a Doença do Enxerto contra Hospedeiro aguda resistente a esteroides, se destacam o aumento da incidência de infecções graves e a possibilidade da diminuição do Efeito Enxerto Versus Leucemia, ao qual se atribui o poder curativo do transplante de células-tronco hematopoético alogênico. As células Natural Killer com sua capacidade anti-tumoral inata, parecem ser os principais linfócitos envolvidos no Enxerto Versus Leucemia. Esse estudo teve como objetivo determinar o papel das células-tronco mesenquimais no tratamento da Doença do Enxerto contra Hospedeiro aguda resistente a esteroides comparando, de forma randomizada, com a terapia com anticorpos monoclonais padrão; e estudar aspectos relacionados à imunomodulação decorrente da terapia com célula-tronco mesenquimal, *in vivo*, com particular atenção à citocinas e ao comportamento das células Natural Killer neste contexto. Nossos resultados confirmam que a infusão de célula-tronco mesenquimal levam a um aumento significativo da Interleucina 10 de efeito anti-inflamatório, e indicam pela primeira vez, que as células Natural Killer aumentam gradativamente durante e após as infusões de células-tronco mesenquimais tanto em proporção dentre os linfócitos, como no seu grau de ativação, resultando em uma atividade citotóxica significativamente elevada no 28<sup>o</sup> dia após o início das infusões. Postulamos, inclusive, que a ativação das células Natural Killer seria o mecanismo pelo qual não se observa aumento de recidiva ou das infecções com o emprego de infusões de células-tronco mesenquimais para o tratamento da Doença do Enxerto contra Hospedeiro aguda resistente a esteróides.

**Palavras chave:** Célula-tronco Mesenquimal, Doença do Enxerto contra Hospedeiro, imunomodulação, Célula Natural Killer e citocinas

## ABSTRACT

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is the curative therapy for several malignant and non-malignant hematological diseases as well as for immunodeficiencies. Although curative, morbidity and mortality are high, been acute Graft versus Host Disease and infections amongst the most frequent life threatening complications. Treatment for acute Graft versus Host Disease is high dose steroids, however, 30 to 50% of the cases are resistant or refractory to it. Steroid resistant or refractory Graft versus Host Disease is a very difficult condition to treat and effective treatment strategies are still to be defined. In this scenario, the intravenous infusion of Mesenchymal Stem Cells has emerged as a tool to rescue patients from that condition because of its immunomodulatory potential. Mesenchymal Stem Cells are adult stem cells with capacity for self-renewal, proliferation and differentiation in mesodermal tissues, particularly chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts. Its immunomodulatory proprieties and effectiveness in several inflammatory diseases are still a matter of intense debate and mostly studied in *in vitro* conditions. There are several published or ongoing studies on the role of Mesenchymal Stem Cells for steroid resistant acute Graft versus Host Disease, but none randomizing it with monoclonal antibody therapy frequently utilized as treatment with variable results, and complicated by an intense cellular immunodeficiency and severe infections. Since hematologic malignancies are the number one indication for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and the secondary Graft versus Leukemia effect mediated by immune effector cells recognized as responsible for its curative potential, an intense cellular immunodeficiency is not desirable in this scenario. In the last few years, Natural Killer cells have emerged as an effector involved in Graft versus Leukemia sparing the patient of Graft versus Host Disease, however, *in vivo* Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer crosstalk have not been studied although severe infections and relapse are not increased after Mesenchymal Stem Cells cellular therapy. Here we show that, in spite of the results of most of the *in vitro* studies suggesting that Mesenchymal Stem Cells inhibits Natural Killer cell activity, *in vivo* evidences points to an increment of Natural Killer cells number and activity during the several Mesenchymal Stem Cells infusions, particularly at the 28<sup>th</sup> day after the beginning of infusions, thereby explaining the apparent infection and relapse protection promoted by Mesenchymal Stem Cells.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1	Estratégia de busca de referências bibliográficas .....	16
Figura 2	Cavidade Medular.....	33



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Sistema de Classificação: Estadiamento para cada órgão.....	37
Tabela 2	Sistema de Classificação Geral (Glucksberg) .....	38
Tabela 3	Conferência de Consenso sobre DECHa .....	38

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
APC	Célula apresentadora de antígenos
CD	Célula dedrítica
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFU-F	Unidades formadoras de colônias fibroblastóides
COX2	Cicloxigenase tipo 2
CTH	Célula-tronco hematopoética
CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco adulta
CTE	Célula-tronco embrionária
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DECHa	Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
EVL	Enxerto versus leucemia
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HLA-I	Antígeno leucocitário humano classe I
HLA-II	Antígeno leucocitário humano classe II
HLA-G	Antígeno leucocitário humano G
IDO	Idoelamina 2,3 dioxigenase
IL	Interleucina

INF- $\gamma$	Interferon gama
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
KIR	<i>killer immunoglobulin-like receptor</i>
KYN	Kynurenine
LFA1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LP	Lisado de plaquetas
LPS	Lipopolissacarídeos
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófago 1
MO	Medula óssea
NK	Célula <i>natural killer</i>
NKT	Natural killer T (NKT) cells
NCRs	<i>Natural Cytotoxicity Receptors</i>
Nes+	Nestina positivo
P	Passagem
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PGE2	Prostaglandina 2
Rantes	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
SFB	Soro fetal bovino
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoéticas
TGF- $\beta$ 1	Fator de transformação do crescimento beta 1
Th0	<i>T helper 0</i>
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>

TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T regulatórias
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
VGPR	<i>Very good partial response</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13	
<b>2.</b>	135	
<b>2.1</b>	155	
<b>2.2</b>	166	
<b>2.3</b>	177	
<b>2.3.1</b>	199	
<b>2.3.2</b>	211	
<b>2.3.3</b>	233	
<b>2.3.4</b>	244	
<b>2.3.5</b>	255	
<b>2.3.6</b>	<i>Interação entre células-tronco mesenquimais e linfócitos T</i>	26
<b>2.3.7</b>	277	
<b>2.4</b>	3131	
<b>2.5</b>	322	
<b>2.6</b>	366	
<b>2.7</b>	399	
<b>2.8</b>	422	
<b>2.9</b>	455	
<b>3</b>	477	
<b>4</b>	488	
<b>4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO</b>	48	
<b>4.2</b>	488	
<b>5</b>	4949	
ARTIGO CIENTÍFICO	62	
ANEXO 1 (TERMO DE CONSENTIMENTO)	76	

## 1. INTRODUÇÃO

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) são células multipotentes que apresentam a capacidade de auto-renovação. Obrigatoriamente elas devem, *in vitro*, apresentar formato fibroblastóide, aderência ao plástico, capacidade de se diferenciar nas linhagens: osteogênica, condrogênica e adipogênica; expressar os marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 e não expressar os marcadores hematopoéticos CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR (1).

As CTMs foram descritas em praticamente todos os órgãos e tecidos sendo as fontes mais utilizadas para a obtenção e expansão *in vitro* de CTM a medula óssea (MO), o tecido adiposo e o cordão umbilical (2-4) Essas células estão sendo muito estudadas pelas propriedades imunomoduladoras que possuem e vem sendo aplicadas em ensaios clínicos de terapia celular como agente regulador do sistema imune (5, 6).

O transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) é um tratamento curativo para muitas doenças hematológicas malignas e não malignas (7-9). A complicação mais frequente do TCTH é a doença do enxerto contra hospedeiro aguda (DECHa) que, se não controlada, é uma condição bastante grave com uma morbidade elevada (10, 11). Para controlar a DECHa utiliza-se corticoesteróides, porém, em alguns casos há resistência a esse medicamento e as alternativas terapêuticas atuais não são de grande eficácia (12). Nesse contexto, e baseado em estudos pré-clínicos que sugeriam ter as CTMs propriedades imunomodulatórias, a eficácia do emprego de CTMs no tratamento da DECHa refratária a esteroides foi demonstrada pela primeira vez em 2004, por Le Blanc e colaboradores (13).

Estudos clínicos empregando CTMs para DECHa já foram realizados com resultados mostrando que as CTMs tem efeito terapêutico, sendo um agente promissor. (13, 14). Contudo, há falta de estudos que analise os efeitos imunológicos das CTM *in vitro*. Esse estudo teve o objetivo determinar, *in vivo*, o efeito das CTM sobre as células Natural Killer, envolvidas na erradicação de células malignas – o conhecido efeito enxerto versus leucemia (EVL).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura está focada no uso das Células-tronco mesenquimais, para o tratamento da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro aguda e refratária a esteroides. Também foi pesquisado os efeitos imunológicas, principalmente nas células Natural Killer, seus receptores e interleucinas. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: SciELO e PubMed Foram realizadas buscas através dos termos “Mesenchymal”, “Graft versus Host Disease”, “immunomodulation”, “Natural Killer”, “Interleukin” e suas combinações apresentadas na Figura 1. O período de busca foi de janeiro de 2017 a junho de 2017, das referências pesquisadas foram utilizados 134 artigos.

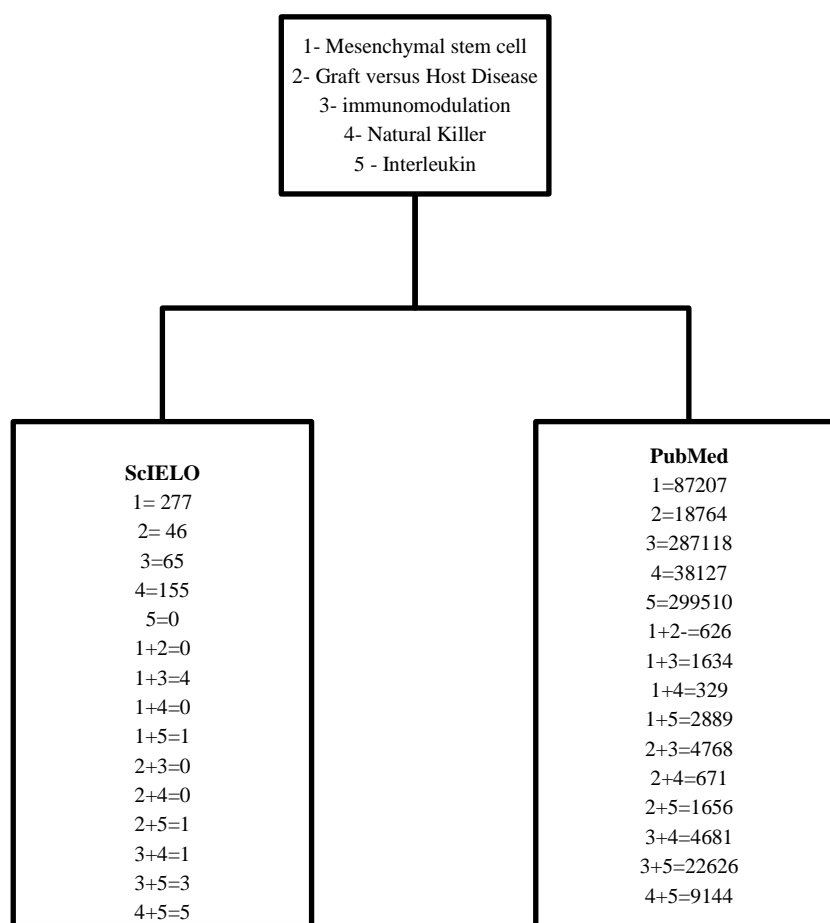


Figura 1: Estratégia de busca na literatura



## 2.2 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CTs) são células não diferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e diferenciação em diferentes tecidos. Essas células possuem dois tipos de classificação: baseada na origem, sendo classificadas como CT embrionárias (CTEs) e CT adultas (CTA), e no potencial de diferenciação, recebendo a classificação de totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes (15, 16).

As CTEs são derivadas do mesoderma, sendo consideradas pluripotentes, pois apresentam a capacidade de se diferenciar em todas as linhagens, exceto nos anexos embrionários. Essas células são obtidas do embrião, no estágio de blastocisto, cinco dias após a fecundação (17). O blastocisto é originado do zigoto totipotente, que possui a capacidade de diferenciação em todas as linhagens, incluindo os anexos embrionários (15).

As CTAs podem ser multipotentes ou unipotentes, elas também apresentam a capacidade de autorrenovação e diferenciação em linhagens específicas. As células multipotentes possuem a capacidade de diferenciação em linhagens dependentes do tecido de origem dessas CTAs. Foram descritas pela primeira vez, em órgãos caracterizados por alto *turnover* celular como sangue, pele, intestino e testículos. Relatos recentes mostraram que as células-tronco também podem ser encontradas na maioria, se não em todos os órgãos adultos que não exibem alto *turnover* celular, como o SNC e o miocárdio. A célula-tronco mesenquimal, célula-tronco hepática e célula-tronco hematopoética (CTH) são exemplos de CTA multipotente (16, 18, 19).

As células unipotentes apresentam a capacidade de diferenciação em apenas um tipo celular maduro. Exemplos de células progenitoras unipotentes, são as células de

miossatélite do músculo, células progenitoras endoteliais e células epiteliais da córnea (19).

### 2.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Friedenstein, em 1970, identificou células precursoras não hematopoéticas na medula óssea. Foram observadas células aderidas ao plástico que formavam colônias fibroblastóide e assim receberam a denominação de “Unidades Formadoras de colônias – fibroblastóides” (CFU-F, do inglês, *colony-forming unit-fibroblast*) (20). Atualmente essas células são conhecidas como células-tronco mesenquimais e, *in vitro*, obrigatoriamente devem apresentar formato fibroblastóide, aderência em superfícies poliméricas, por exemplo, plástico, capacidade de diferenciar nas linhagens de origem mesodérmicas como, osteogênica, condrogênica e adipogênica, expressarem os marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 e não expressarem os marcadores hematopoéticos CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR (1).

Foi relatado que as CTMs humanas de medula óssea cultivadas contêm três tipos de clones, que possuíam capacidade osteo-condro-adipogênica, osteo-condrogênica e apenas de diferenciação osteogênica. Em conclusão, a nível clonal, as CTMs apresentam um potencial de diferenciação multilinhagem. Mostrando uma hierarquia na diferenciação, com a linhagem adipogênica divergindo mais cedo e as linhagens osteocondrogênicas prosseguindo em conjunto, possivelmente se ramificando mais tarde (21).

Existem diversas fontes de CTM, como medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical (2, 3, 22). Há evidências de que as CTMs isoladas da medula óssea, tecido adiposo e qualquer outro órgão ou tecido são derivadas de paredes de vasos sanguíneos. Essas células são conhecidas como pericitos, também referidos como células periendothelias ou células de Rouget que são células murais que se encontram no lado

externo dos vasos sanguíneos, imediatamente oposto às células endoteliais. A cultura de CTMs derivadas de células periendothelias sugere que os pericitos desempenham um papel importante no processo de reparação de tecidos, na homeostase do sistema imune, além do seu papel na manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Nos órgãos, os pericitos tornam-se especializados como, por exemplo, as células Ito ou células hepáticas estreladas do fígado e as células mesangiais encontradas no glomérulo renal. Na medula óssea, células que exibem características periciticas são referidas como células reticulares adventícias. A localização perivascular das CTM serviria como ligação entre o sistema imune e o vascular, enfatizando seu papel como integrador fisiológico e sua importância no reparação/regeneração tecidual (23).

*In vitro*, as CTMs apresentam multipotencialidade de diferenciação em diversas outras linhagens como, por exemplo, tenócitos, células musculares, cardiomiócitos e neurônios (24-26) e por isto passaram a ser uma alternativa atraente para terapias que visam a regeneração tecidual (27).

Apesar da evidência de que as CTMs se diferenciam em vários tipos de células *in vitro*, a contribuição delas ao reparo tecidual, através de enxertos e diferenciação em células específicas do tecido com relevância biológica e funcional, ainda não está clara (26, (28). Aparentemente, o potencial regenerativo da CTM advém de atividade parácrina que não apenas estimula a regeneração do tecido lesado como também modula a resposta imune/inflamatória atuando em linfócitos, células dendríticas, células *natural killer* (NK) e macrófagos (5, 6).

### 2.3.1 *Cultura de células-tronco mesenquimais*

As CTMs são células de fácil cultivo, devido à característica de aderir ao plástico se isolando progressivamente, devido a esta propriedade, das outras células do tecido de origem pela troca sucessiva do meio de cultura, já que os outros tipos celulares ficam em suspensão e são removidos com a troca de meio. O meio de cultura para manter e expandir as CTMs é o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) *low glucose* acrescido de 1% de antibiótico e 10% de suplemento. O suplemento comumente usado é o soro fetal bovino (SFB), porém, devido ao uso clínico dessas células, começou-se a pesquisar suplemento de origem humana com o intuito de evitar a xenorreação. Com isso, o lisado de plaquetas (LP) surgiu como alternativa de fator de crescimento e parece ser muito mais eficaz na expansão celular mesenquimal do que o SFB (29).

Quando as células são colocadas pela primeira vez no frasco cultura, diz-se que ela está na passagem 0 (P0). Aos poucos, as CTMs vão formando populações celulares em pontos isolados do frasco. Quando essas populações mostram-se bem confluentes, deve-se desprendê-las do frasco de cultura pela utilização da tripsina, sendo, esta etapa, reconhecida como tripsinização. As células desprendidas são colocadas em outro frasco com uma área adequada para o número de células que se obteve. Esta ressemeadura é conhecida como P1 (ou primeira passagem). Após P1, devido à população de CTMs já ser mais homogênea, a cultura cresce de forma proporcional no fundo do frasco, não se observando populações distintas. Quando aproximadamente 80% do fundo do frasco estiver coberto por células, realiza-se nova tripsinização para ampliar a área de cultivo, caracterizando uma nova passagem da cultura (30, 31).

O tempo de vida da CTM pode ser dividido em três fases dependendo da sua idade *in vitro*: fase 1 - apresenta característica de crescimento celular rápido (<50% do tempo de vida concluído); fase 2 - possui taxa de crescimento reduzida (fase 2: 50-80 % do tempo de vida concluído) e, por fim, fase 3 - onde há a senescência celular e a parada do crescimento (> 80% do tempo de vida concluído) (32).

Para utilização clínica de CTMs expandidas *in vitro* é necessário o cuidado quanto à segurança dessas células. Ao avaliar CTM de medula óssea e de sangue de cordão umbilical em P4, P8 e P12, referente à morfologia e aos marcadores imunofenotípicos, não foram observadas diferenças entre as diferentes passagens. A capacidade proliferativa diminui ao longo do tempo, para medula óssea, começando a diminuir na 7ª passagem. Contudo, o comprimento de telômeros, a atividade mitocondrial e aneuploidias não se mostrou diferente entre as passagens. Quanto à capacidade imunológica, se observou que em passagens mais tardias, as CTMs diminuíram a capacidade de inibir células T, porém não houve aumento na suscetibilidade à lise de CTM por células *natural killer* (33). Em outro estudo quando comparadas CTM de MO e de tecido adiposo, se verificou que a capacidade proliferativa de CTM derivada de MO atinge até a 7ª passagem, enquanto a de tecido adiposo atinge até 14ª passagem (34).

Um estudo que avaliou pacientes os quais receberam CTMs como terapêutica para Doença do Enxerto contra Hospedeiro (DECH) relacionada ao TCTH alogênico, a sobrevida de 1 ano foi de 75% em pacientes que receberam CTMs em passagem precoce (passagens 1-2) e de 21% usando CTMs de passagens posteriores (passagens 3-4). Com isso, a cultura de CTMs em segunda passagem parece ser mais indicada para uso na terapia celular, visto que estará mais pura que em primeira passagem e por

apresentar maior efeito anti-inflamatório do que as células que são cultivadas por períodos prolongados (35).

### **2.3.2 Mecanismos imunológicos das células-tronco mesenquimais**

As CTMs apresentam atividade imunomoduladora complexa. Waterman *et al.* demonstraram que as CTMs podem ter perfil pro-inflamatório (CTM1) ou anti-inflamatório/imunossupressor (CTM2) (36). A atividade imunomoduladora parece variar de acordo com o tecido de origem das CTs (37). Por outro lado, as ações desempenhadas nos tecidos dependem da constituição molecular do microambiente onde está ocorrendo os distúrbios imunológicos (38).

O efeito imunossupressor das CTMs é induzido por estímulos celulares ou humorais (39). Um recente estudo sobre a imunomodulação de CTM em ratos sugere que a CTM inibe a diferenciação de células progenitoras mielóides em um ambiente inflamatório através do contato direto célula-célula e que esse contato intercelular é mediado pela interação CD200-CD200R1; a expressão de CD200 por CTMs parece ser indispensável para a inibição de diferenciação de progenitores mielóides na inflamação. (40)

Quando pesquisados, *in vitro*, os mecanismos subjacentes à supressão de células T (CD2 positiva) mediada por CTM de medula óssea, mostrou que a CTM inibe a proliferação de células T por um mecanismo dependente de contato célula-célula. As culturas de linfócitos T apenas com efetores liberados pela CTM apresentou uma diminuição de 70% na proliferação, sugerindo que fatores solúveis estavam envolvidos na supressão da proliferação de células T e atribuíram esse efeito aos fatores de crescimento de hepatócito (HGF, do inglês, *hepatocyte growth factor*) e fator de

transformação do crescimento beta 1 (TGF $\beta$ 1, do inglês, *transforming growth factor-beta 1*). Contudo, a taxa de inibição de linfócitos T foi aumentada quando foi permitido um contato célula-célula entre CTM da medula óssea e efetores celulares, sugerindo duas formas distintas de imunomodulação de linfócitos T (39).

O interferon gama (IFN- $\gamma$ , do inglês, *interferon gamma*) é uma importante citocina que atrai e promove o efeito imunossupressor da CTM. As CTMs derivadas de cordão umbilical quando estimuladas com IFN-  $\gamma$ , suprimiram a proliferação de células T de 2 a 7 vezes mais que CTMs não-estimuladas, regulando a expressão de genes imunossupressores como idoelamina 2,3 dioxigenase 1, ciclooxigenase tipo 2 (COX2), antígeno leucocitário humano G (HLA-G, do inglês, *human leukocyte antigen G*) e proteínas supressoras solúveis, tais como HLA-G, quinurenina (KYN, do inglês, *kynurenine*), interleucina 10 (IL-10) e prostaglandina E2 (PGE2) de CTM. Mostrando que o IFN- $\gamma$  pode aumentar eficazmente a capacidade imunossupressora das CTMs (41). Adicionalmente, em um experimento com CTMs de medula óssea estimuladas e não-estimuladas com IFN-  $\gamma$ , embora as duas inibam a proliferação de células T, apenas as CTMs estimuladas com IFN- $\gamma$  inibiram significativamente a produção de citocinas por células T Th1 como IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , do inglês, *tumor necrosis factor alpha*) e IL-2 (42).

### 2.3.3 Receptores de células-tronco mesenquimais

Na lesão, infecção ou destruição tecidual os receptores *toll-like-receptors* (TLRs) presentes em diferentes tipos de células do sistema imunológico reconhecem moléculas liberadas de células e patógenos e sua ativação é a primeira linha da resposta imune (43). As CTMs apresentam diferentes TLRs e dependendo do receptor ativado, as células polarizam-se em dois fenótipos de ações distintas: o TLR3 conduz a um perfil imunossupressor enquanto TLR4, a um perfil pró-inflamatório. A ativação de TLR3 gera o aumento da deposição de fibronectina, da expressão de mediadores que reduzem a resposta imune e da supressão da ativação de células T. Por outro lado, a ativação de TLR4 resulta na deposição de colágeno, expressão de mediadores pró-inflamatórios e uma inversão dos mecanismos supressores estabelecidos por CTM levando a ativação das células T (36).

O fenótipo pró-inflamatório das CTMs além de induzir respostas de linfócitos T, também recruta outras células inflamatórias para sítios de lesão liberando citocinas pró-inflamatórias, incluindo proteína inflamatória de macrófago 1 (MIP-1, do inglês, *macrophage inflammatory protein 1*), RANTES, CXCL9, e IL-10. Já no fenótipo anti-inflamatório de CTM ocorre também o desenvolvimento de células T regulatórias (Treg) propiciando a criação de um ciclo para prevenir lesão e induzir reparo tecidual (41).

Como salientado acima, os receptores TLRs de CTM tratados com diferentes ligantes mostraram um comportamento diferente dependendo do ligante. As CTMs quando foram incubadas com lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana bacteriana (44) tiveram o padrão de secreção favorecendo mediadores pró-inflamatórios tais como IL-1, IL-6 e TNF; já quando tratadas com *poly (I:C)* (RNA de cadeia dupla



sintético que é utilizado experimentalmente como modelo de infecções virais *in vivo*), (45) os padrões de secreção parecem favorecer mediadores anti-inflamatórios tais como IL-10 e IL-12 (36). As concentrações de mediadores inflamatórios tais como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  também são responsáveis pela polarização de CTM. Nos baixos níveis destes mediadores, as CTMs convertem-se em fenótipo pró-inflamatório. Já quando esses mediadores e também o TGF- $\beta$ 1 estão elevados, as CTMs mudam para o fenótipo anti-inflamatório. Assim, todos os eventos moleculares de CTM podem ocorrer em diferentes momentos da inflamação, apresentando funções apropriadas conforme o ambiente (43).

Em um experimento sobre migração de CTM, na comparação dessas células cultivadas com meio contendo fatores quimiostáticos ou ligantes de TLRs, estes últimos promoveram uma maior migração celular. Assim, a estimulação de TLR pode ser um mecanismo que impulsiona o recrutamento, migração e modulação imunológica das CTMs ao foco inflamatório (46).

#### **2.3.4 Interação entre células-tronco mesenquimais e macrófagos**

Os macrófagos são células derivadas de monócitos circulantes que são recrutados para sítios teciduais da infecção e/ou inflamação. Em resposta a sinais ambientais, eles podem exibir alta plasticidade e adaptar sua fisiologia (47). Macrófagos M1 produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, e TNF- $\alpha$ . Os macrófagos M2 secretam grande quantidade de citocinas anti-inflamatórias e pro-fibróticas como IL-10, TGF- $\beta$  e receptor antagonista de IL-1 (48).

Macrófagos após 3 a 4 dias de co-cultura com CTMs derivadas de medula óssea apresentaram um aumento nos níveis de expressão de CD206 (marcador anti-inflamatório), quando comparados com macrófagos cultivados isoladamente. Ao analisar as citocinas, os macrófagos cultivados com CTMs produziram mais IL-10 em comparação com os macrófagos controle e menos IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  (49). Outro estudo com CTMs derivadas de tecido adiposo, sugere que as CTMs foram responsáveis pela comutação dos macrófagos M1 para M2 (50).

### ***2.3.5 Interação entre células-tronco mesenquimais e células dendríticas***

As células dendríticas (CDs) consistem em um grupo de células imunomoduladoras com a capacidade de apresentar antígeno aos linfócitos, induzindo respostas imunitárias inatas e adaptativas ou específicas. As CDs são as células apresentadoras de antígenos mais eficientes (51) e, embora representem cerca de 1% dos leucócitos mononucleares no sangue periférico, estas células encontram-se em diversos tecidos periféricos, atuando como sentinelas do sistema imunológico (52).

A capacidade das células dendríticas de iniciar uma resposta imunitária, além de outros fatores, depende da regulação positiva da expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês, *major histocompatibility complex*) de classe II e de moléculas co-estimuladoras, tais como CD80 e CD86, durante os seus estágios de maturação e proliferação. Por outro lado, o processo e característica da maturação da célula dendrítica pode induzir a tolerância imunológica das células T além de interagir com células B e células NK (53).

Existem evidências que as CDs podem também ser o alvo de CTMs, sofrendo sob a influência destas, alteração de fenótipo, liberação de citocinas, diferenciação e maturação, também comprometendo ou modulando a capacidade de apresentação de antígenos (54). As CTMs parecem exercer um efeito inibitório indireto nas células T por indução das células apresentadoras de antígenos (55).

### ***2.3.6 Interação entre células-tronco mesenquimais e linfócitos T***

A cultura de linfócitos estimulados por fito-hemaglutinina quando co-cultivados com CTMs, apresentaram uma taxa menor de proliferação de linfócitos CD4 e CD8, quando comparados com cultura controle sem adição de CTMs. Além disso, verificou-se que os receptores de ativação CD25 (receptor de IL-2), CD38 e CD69 dos linfócitos reduziram nas coculturas com CTMs(56).

Em um experimento com animais que sofreram lesão hepática, onde os linfócitos NKT hepáticos produtores de IL-17 são grandes causadores da doença, os animais tratados com CTMs tiveram a hepatite aguda atenuada. Foram observados níveis diminuídos de IL-17 inflamatória e níveis aumentados de IL-10 imunossupressora no soro, número reduzido de células NKT produtoras de IL-17 e aumento da presença de células NKT regulatórias (57).

Como visto acima, o efeito das CTMs nos linfócitos T parece estar intimamente ligado às células dendríticas. Camundongos que receberam enxerto de pele singênico e foram tratados com CTMs demonstraram níveis séricos menores de IL-2 e INF- $\gamma$  e aumento de IL-10 quando comparados com o grupo que não recebeu CTM. As citocinas IL-2 e INF- $\gamma$  geralmente são secretadas por células T ativadas durante a destruição do

enxerto. Acredita-se CTM tenha a capacidade de diferenciar Th0 para células T-reg e essas células são uma fonte de secreção de IL-10 (58, 59).

Alguns estudos têm demonstrado que as CTMs podem regular as funções dos linfócitos B, incluindo migração, proliferação e síntese de imunoglobulinas (60) *in vitro*, as CTMs inibem a proliferação de linfócitos B pela interrupção do ciclo celular G0/G1. As CTMs também inibem a produção de IgM, IgA e IgG (61). Os efeitos de CTMs sobre linfócitos B são mediados tanto por fatores solúveis, como IFN $\gamma$  e IL-6 (62) como pelo contato célula-célula (63).

### **2.3.7 Interação entre células-tronco mesenquimais e células natural killer**

As células NK são linfócitos efetores inatos que reconhecem e eliminam, através de lise celular, células infectadas por vírus e células neoplásicas sem sensibilização prévia ou restrição ao MHC (64). As células NK são uma fonte importante de citocinas imunorreguladoras e interagem com outras células do sistema imunológico para desencadear uma resposta imune adaptativa, ou antígeno-específica (65). Cerca de 5% a 15% dos linfócitos no sangue humano são células NK (CD56<sup>+</sup>, CD3/14/19<sup>-</sup>), 90% dos quais são CD56<sup>dim</sup>, com a maioria deles sendo CD16<sup>+</sup>, responsáveis pela imunidade inata precoce e pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, do inglês, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) contra a infecção ou células cancerígenas (66). Em contrapartida, os outros 10% das células NK são CD56<sup>bright</sup>, e participam na resposta inflamatória tardia (> 16 horas) através da secreção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF, do inglês, *granulocyte-colony stimulating factor*), fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e IL-3 (65).

As células NK possuem a capacidade de reconhecer moléculas MHC de classe I sobre as células-alvo através dos receptores KIR (*do inglês, killer immunoglobulin-like receptor*), que podem inibir ou ativar a função da célula NK (67, 68). Receptores KIR para moléculas de auto MHC classe I são cruciais para distinguir células normais de células autólogas transformadas ou infectadas. Neste contexto diferentes investigadores demonstraram que as células NK podem matar seletivamente as células autólogas que perderam ou apresentam baixa expressão de moléculas de auto MHC classe I (68). No entanto, a expressão de MHC classe I não é sempre necessária para evitar a lise por células NK, e a inibição por MHC de classe I nem sempre é suficiente para impedir a citotoxicidade NK. (65)

Portanto aspectos relacionados a atividade efetora das células NK são profundamente influenciados pela atuação concomitante dos demais receptores funcionais presentes na membrana celular (64, 69). Sabe-se que cada célula NK expressa o seu próprio repertório de receptores ativadores e inibidores. Sua citotoxicidade é regulada pela combinação de receptores de ativação, em particular, os receptores de citotoxicidade naturais (NCRs, *do inglês, Natural Cytotoxicity Receptors*) Nkp46, Nkp30 e Nkp44, a proteína de membrana NKG2D, os quais determinam a atividade das células NK frente as células-alvo e também regulam a produção de citocinas durante a sua fase efetora de ativação.(69) No entanto, outros receptores tais como, receptores de superfície celular inibitórios KIR, receptor heterodimérico tipo lectina C (NKG2A) o DNAM-1, o NKG2C/CD94, 2B4, e uma classe de receptores KIR ativadores também desempenham um papel na ativação de células NK (66).

Os estudos sobre a interação entre as células CTMs e linfócitos NK mostram resultados controversos (70, 71, 72). As CTMs parecem tanto inibir NK como serem

lisadas por elas, sugerindo que células NK não ativadas interagem com CTMs através dos seus receptores natural NKp30 e LFA1 (*do Inglês, Lymphocyte function-associated antigen 1*) conduzindo a uma liberação precoce de IFN- $\gamma$  que ativa propriedades imunossupressoras em CTM. Essas CTMs regulam negativamente a expressão de receptores NK e assim inibem a produção de citocinas e citotoxicidade de células NK contra as suas células-alvo. Esta imunossupressão é mediada pela produção das CTMs de TGF- $\beta$ , PGE-2 e HLA-G5 bem como o catabolismo do triptofano mediado pela idoelamina 2,3 dioxigenase (IDO). Já quando as células NK estão previamente ativadas por IL-2 ou IL-15 parecem ser capazes de matar as CTMs alogênicas e autólogas por liberação da perforina. Esta interação é aparentemente mediada pelos receptores NKG2D, LFA-1, NKP30 e DNAM-1 em NK e os seus homólogos em CTM (71). As CTMs derivadas de medula óssea co-cultivadas com células NK suprimiram a proliferação e a citotoxicidade de células NK e também a secreção de citocinas. O efeito das CTMs sobre as células NK parecem ser tanto parácrinos – pela ação da liberação de mediadores imunes, quanto secundários à interação célula-célula (72).

As CTMs que expressam o TLR3 e, portanto estão com perfil imunossupressor, tornam-se mais resistentes a células NK ativadas com IL-2, porém quando ativados os receptores TLR4 e TLR7/8 não se observa proteção significativa contra a citotoxicidade das células NK ativadas. Além disso, a degranulação da proteína de membrana 1 associada a lisossoma (CD107a) por células NK ativadas foi significativamente diminuída após o contato com CTM estimulada por TLR3, em comparação com CTM não tratada. Com isso as CTMs parecem ter a capacidade de adaptar o seu comportamento imune num contexto inflamatório, diminuindo a sua suscetibilidade à morte pelas células NK (73)

Em um ambiente inflamatório, as CTMs derivadas do fígado e da medula óssea apresentaram um aumento na expressão de MHC classe I na presença de inflamação, já a expressão de HLA-G aumentou apenas nas CTMs de medula óssea (74). As CTMs expressam constitutivamente, embora em baixas concentrações, a molécula HLA-G que parece inibir a citotoxicidade de NK; a inserção de vetores virais com o objetivo de super-expressar HLA-G nas CTMs, aumenta a resistência dessa célula às células NK (75).

Spaggiari *et al.*, cultivaram CTMs com células NK alogênicas com ou sem estímulo de IL-2. Na ausência de IL-2, as CTMs diminuíram a proliferação de células NK e esta diminuição dependeu da razão de CTM:NK. Por outro lado, a presença de ligantes dos receptores de ativação de células NK: DNAM-1 e NKG2D expressos nas CTMs assim como níveis baixos/intermediários de moléculas de HLA de classe I sugerem que as CTMs são suscetíveis à lise mediada por células NK, hipótese confirmada apenas quando as NK foram ativadas com IL-2, independentemente da utilização de células NK autólogas ou alogênicas (76). No entanto, de uma maneira geral, às CTMs é atribuída a propriedade de inibir células NK o que seria deletério para o EVL dos TCTH alogênicos.

## 2.4 CÉLULA-TRONCO HEMATOPOÉTICA

As células-tronco hematopoéticas (CTHs) são multipotentes, com a capacidade de auto-renovação e de diferenciação em todas as células que compõem a linhagem hematopoética, devendo expressar em sua membrana o antígeno CD34 (77). As CTHs, em condições de repouso, são uma população de células em divisão assimétrica, onde metade das divisões das CTHs se auto renovam, como todas as células-tronco tecido específicas, assegurando que as reservas de CTHs não sejam esgotadas. Cada ponto da divisão celular de CTHs deve evoluir para um processo de autorrenovação e um de diferenciação para uma progenitora (78).

Existem dois mecanismos pelos quais esta assimetria pode ser alcançada: assimetria divisional e assimetria ambiental. Na assimetria divisional, as duas células-filhas são diferentes, uma é igual à de origem e a outra é diferenciada, os determinantes do destino celular são assimetricamente localizados em apenas uma das duas células-filhas que retém o destino das células-tronco, enquanto que a segunda célula-filha é diferenciada. Já na assimetria ambiental a célula-tronco sofre uma divisão de auto-renovação simétrica, produzindo duas células-filhas idênticas, uma célula-filha permanece no nicho, conservando-se células-tronco, a outra entra em contato, passivamente ou ativamente, com um microambiente diferente, e deixa de preservar o fenótipo de células-tronco, iniciando a diferenciação (79).

Dependendo do estímulo que as CTHs recebem, elas se diferenciam em progenitoras da linhagem linfóide ou mielóide. As progenitoras linfóides dão origem aos linfócitos, enquanto a linhagem mielóide origina os granulócitos, monócitos, megacariócitos e eritrócitos (77).



## 2.5 MEDULA ÓSSEA

A hematopoese ocorre em mamíferos através de um processo gradual que inicia no saco vitelino entre a terceira e quarta semana da gestação. Nesse momento, muito antes da geração de CTHs definitivas, os progenitores mielóides desenvolvem-se a partir do ectoderma primitivo do saco vitelino e dão origem a macrófagos embrionários. Em torno da quinta semana de gestação, o fígado é o principal sítio hematopoiético fetal. No fígado fetal, as CTHs se expandem, amadurecem e, pela primeira vez, dão origem a células eritróides, linfóides e mielóides maduras. O fígado permanece o sítio hematopoiético predominante durante as semanas 20 a 24 de gestação. A partir do fígado, as CTHs começam a colonizar também o timo e o baço fetal. Finalmente, durante o segundo trimestre, a MO passa a ser a responsável pela hematopoese mediada por auto-renovação das CTHs como o precursor final da hierarquia hematopoética do adulto (80).

Um estudo realizado em animais sobre a ontogenia das CTMs detectou essas células nos principais sítios hematopoiéticos durante o desenvolvimento gestacional, como por exemplo, no fígado e apenas na fase adulta foram encontradas na medula óssea. Com isso, acredita-se que exista um desenvolvimento paralelo e coordenado dos sistemas hematopoiéticos e mesenquimais (81).

Na medula óssea encontra-se o nicho das CTHs. O termo "nicho da célula-tronco" foi introduzido em 1980 e definido como uma estrutura que abriga essas células (82, 83). A medula óssea é dividida em pelo menos quatro diferentes nichos que compõem o seu microambiente: endosteal, sub-endosteal, central e peri-sinusoidal. Os ensaios histológicos e funcionais indicam que as CTHs e progenitores multipotentes preferencialmente colonizam as regiões endosteal e sub-endosteal, em estreita

associação com a superfície óssea, onde estão quiescentes. Inversamente, progenitores comprometidos e células diferenciadas são distribuídos nas regiões central e perisinusoidal, onde deixam de estar quiescentes, regenerando de forma contínua a hematopoese (figura 2) (77, 79, 84-86).

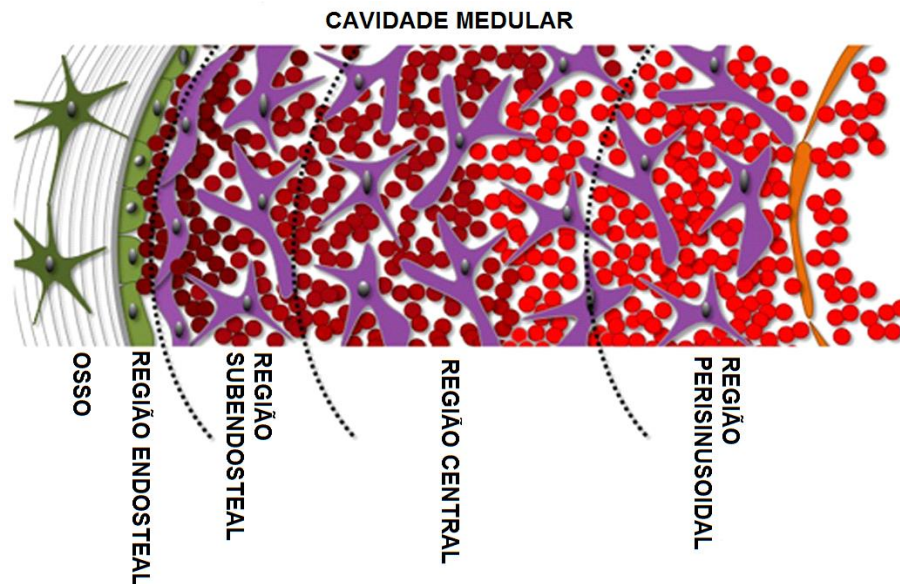


Figura 2. Divisão didática da cavidade medular; Adaptado de Matsumoto A e col.(77)

Um estudo em camundongos mostrou que osteoblastos e CTHs estão intimamente ligados por moléculas de junção aderentes, n-caderina e p-catenina que estão assimetricamente localizadas entre essas células, sendo os osteoblastos que revestem a superfície óssea um componente chave do nicho hematopoético (87). As CTMs compõem o estroma medular e participam do nicho para as CTHs, esse nicho fornece um microambiente que protege a manutenção e auto-renovação das CTHs protegendo de diferenciação e estímulos apoptóticos assim mantendo a reserva de células-tronco. Além disso, esse nicho também controla a proliferação e diferenciação de CTHs e a liberação de sua progênie madura para o sistema vascular. A regulação da quiescência das CTHs, através da manutenção na fase G0 do ciclo celular, o controle da

proliferação, diferenciação e recrutamento de CTHs no nicho vascular podem ser atribuídos as células estromais de medula óssea (5).

Células de medula óssea que expressam a proteína de filamento intermediária nestina ( $Nes^+$ ) são células não hematopoiéticas relativamente raras, distintas das células endoteliais vasculares porque não expressam CD31 (também designado por PECAM), CD34 ou VE-caderina. Elas têm uma distribuição perivascular em regiões adjacentes ao osso ou dentro do parênquima da medula óssea. As fibras nervosas catecolaminérgicas estão intimamente associadas às células  $Nes^+$  e expressam Cxcl12, tornando-as candidatas a ser uma célula estromal, em estado estacionário, que regula o tráfego de CTHs. Acredita-se que células  $Nes^+$  são CTMs, pois se comportam funcionalmente como elas, formando unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F, do inglês, *colony-forming unit fibroblasts*) e apresentam capacidade de diferenciação e auto-renovação, porém, *in vitro* as CTMs deixam de expressar a proteína nestina. As células  $Nes^+$  apresentam a expressão de genes que regulam a manutenção e atração de CTH na medula óssea (Cxcl12, ligante c-kit, angiopoietina-1, interleucina-7, molécula de adesão de células vascular-1 e osteopontina) muito mais elevada, quando comparada com outras células estromais da MO. Esses dados sugerem a existência de uma regulação equilibrada de linhagens hematopoética e mesenquimal, onde atuam os mecanismos homeostáticos neurais e hormonais na preservação do tecido hematopoético, indicando um nicho estruturalmente único na medula óssea feito de emparelhamentos CTM-CTH (88).

O nicho medular é tão importante para a hematopoese que não se consegue expandir CTHs *in vitro*. Porém, quando foram co-cultivadas CTHs de primatas com um nicho formado por células endoteliais, se conseguiu essa expansão e essas células,

quando infundidas, tiveram a capacidade de reconstituir a hematopoese (89). Estes dados sugerem que células endoteliais e células perivasculares são necessárias e suficientes para a preservação da CTHs.

Células da medula óssea  $CD271^+/CD45^-/CD146^{low}$  e  $CD271^+/CD45^-/CD146^+$  mostraram propriedades comparáveis às das CTMs (morfologia, expressão de marcador de superfície, capacidades de diferenciação *in vitro* e *in vivo*, capacidade de suporte de estroma e formação de colônias secundárias). Contudo, as diferenças na expressão de CD146 foram claramente correlacionadas com a localização *in situ* e, por conseguinte, permitiu identificar células  $CD271^+/CD146^{low}$  localizadas no espaço endosteal e células  $CD271^+/CD146^+$  de localização perivascular (90).

Então, além de CTHs e sua progênie, a MO é composta de uma matriz diversificada de células com funções especializadas que estão implicadas como contribuintes funcionais durante a homeostase. Estes incluem células endoteliais vasculares, células perivasculares, osteoblastos, nervos simpáticos, adipócitos, macrófagos e muitos subconjuntos de células estromais. As células de nicho medular fornecem sinais reguladores positivos e negativos para CTHs. Foi demonstrado que os adipócitos regulam negativamente a auto-renovação dessas células *in vivo*. A diferenciação adipogênica das células do estroma também leva ao aumento do número de adipócitos no MO, o que, por sua vez, dificulta a recuperação hematopoética após lesão (91).

## 2.6 TRANSPLANTE DE CÉLULA-TRONCO HEMATOPOÉTICA

Donald Thomas, em 1957, descreveu a primeira experiência com transplante alogênico de medula óssea em humanos quando foram tratados seis pacientes com radioterapia e quimioterapia e, em seguida, infusão intravenosa de medula de um doador normal. A infusão não foi acompanhada de efeitos adversos graves, mas nenhum paciente sobreviveu além de 100 dias (92). Na década de 60, houve a descoberta dos genes que fazem parte do complexo histocompatibilidade principal – MHC, e, no final dessa década e início da década de 70, compreendeu-se a relação desses genes com o transplante de MO, permitindo o sucesso da terapia (93, 94).

A classificação do TCTH é baseada no tipo de doador. Um transplante autólogo é quando o doador é o próprio receptor; quando o doador é um irmão gêmeo univitelino o transplante é denominado singênico, já quando o doador é outro indivíduo o transplante é alogênico. O transplante alogênico se divide em aparentado ou relacionado (quando é da mesma família) e não aparentado ou não relacionado (quando o doador não é familiar). (95). O TCTH alogênico é o único tratamento curativo para diversas doenças hematológicas malignas (7) e não malignas, como por exemplo, as hemoglobinopatias (8), e imunodeficiências (9). A fonte de CTHs pode ser a MO, o sangue periférico ou o sangue do cordão umbilical (96, 97).

São avaliados para a compatibilidade entre o doador e o receptor os HLAs de classe I (HLA-A, -B, -C) e classe II (HLA-DRB1). É considerado um bom doador “*matched*” não relacionado quando 10 dos 10 alelos HLA são idênticos. Um TCTH é chamado “*mismatched*” quando existe disparidade em algum alelo. Quando realizado entre indivíduos com disparidade no HLA, mas com identidade de haplótipos (pai ou

mãe doadora e, menos frequentemente de um irmão) chama-se transplante haploidêntico (95).

Pacientes submetidos ao TCTH são condicionados por quimioterapia e / ou radioterapia. O regime de condicionamento do transplante perturba alguns componentes-chave do nicho da medula óssea, por exemplo, embora os osteoblastos pareçam minimamente perturbados pelo condicionamento, a rede vascular sinusoidal é severamente interrompida, torna-se vazada, exibindo mudanças na morfologia e estrutura. A vasculatura danificada leva semanas para se recuperar e as células hematopoiéticas derivadas do doador, por via do eixo VEGF/ VEGFR2 (do inglês, *Vascular endothelial growth factor/Vascular endothelial growth factor receptor 2*), têm sido implicadas como participantes na sua recuperação (98).

As CTHs realizam o *homing* para a medula óssea, isso é, elas encontram seu caminho a partir da periferia, circulando por todo o organismo até finalmente encontrar um leito endotelial com moléculas afins e adentrar o microambiente hematopoético. Essas células colonizam a medula óssea esvaziada pelo condicionamento e reconstituem o sistema hematopoético (19).

Caselli *et al.*, estudaram em camundongos a reconstituição celular da MO após o condicionamento e infusão de CTHs. Notou-se que nas primeiras 24 horas já havia proliferação de osteoblastos, porém atingia o máximo de proliferação em 48 horas. Em uma nova série de experimentos, com a infusão 24 ou 48 horas após a ablação da medula, observou-se que a reconstituição hematológica era mais eficiente 48h após a ablação sugerindo assim, indiretamente, a importância dos osteoblastos para a reconstituição hematopoética (99).

O sucesso do transplante primeiramente está associado à chamada “pega”, onde as células do doador começam a aparecer no sangue do receptor. Em estudo com 120 pacientes com neoplasias malignas hematológicas submetidos a transplante de MO, analisou-se a cinética do enxerto do doador entre várias subpopulações de células sanguíneas periféricas e sua relação com os desfechos, após condicionamento não mieloablativo consistindo em irradiação total de 2Gy com ou sem adição de fludarabina. Os resultados sugeriram que o estabelecimento mais rápido dos quimerismos de granulócitos, células NK e monócitos do doador foram associados com uma melhor sobrevivência. Esse quimerismo observou-se a partir de 14 dias após o TCTH (10).

O TCTH é acompanhado de elevada morbi-mortalidade, sendo a DECH aguda a complicação mais frequente e, ocasionalmente, a mais grave desse tipo de transplante. (10, 11) Mesmo o doador e receptor tendo o sistema HLA 100% compatível, pode ocorrer a DECH, pois há indícios de que esta possa ocorrer por disparidade de antígenos menores de histocompatibilidade. (100)

## 2.7 DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO

A DECH aguda é uma complicação grave do TCTH que se desenvolve tipicamente entre 10 a 40 dias após o transplante (geralmente <100 dias), embora a DECH aguda persistente, recorrente ou de início tardio possa ser observada após o dia 100.(101) Pacientes pediátricos que foram submetidos ao TCTH apresentaram DECHa diagnosticada com mediana de 55 dias após o transplante.(102) A incidência e gravidade dependem de vários fatores, tais como método de profilaxia, compatibilidade entre o doador e o receptor, a intensidade do regime de condicionamento e da origem e composição do enxerto.(103)

A DECH aguda afeta com maior frequência a pele e depois progride para o sistema gastrointestinal e o fígado.(101) As manifestações para o diagnóstico da DECH são relativamente inespecíficas, sendo necessário um conjunto de história clínica, incluindo o momento e o tipo de TCTH, testes laboratoriais, biópsia e achados dermatológicos, além de exames de imagem.(104) A DECHa pode se manifestar de forma benigna, como um *rash* cutâneo leve e alterações discretas da função hepática ou formas graves e fatais com o aparecimento de lesões bolhosas na pele, diarreia grave, náuseas, vômitos, dor abdominal intensa e acometimento hepático com colestase grave. (101)

Nos casos de diagnóstico duvidoso, se procede a biópsia de pele e trato gastrointestinal. A biópsia de fígado oferece um risco acentuado ao paciente por plaquetopenia, portanto, a DECHa hepática será um diagnóstico provável na maioria das vezes. Para aferição do estadiamento e classificação de DECHa normalmente são utilizados os critérios do consenso Glucksberg modificado (Tabelas 1, 2 e 3) (105) e do



*National Institute of Health* dos Estados Unidos (NIH) nos casos de DECH aguda tardia (106).

**Tabela 1** – Sistema de Classificação: Estadiamento para cada órgão

Estádio	Pele / Exantema Maculopapular	Fígado / Bilirrubina	Gastrointestinal / Diarréia
+	<25% da superfície do corpo	34-50 umol/L	> 500 mL
++	25-50% da superfície do corpo	51-102 umol/L	> 1000 mL
+++	Eritroderma generalizado	103-255 umol/L	> 1500 mL
++++	Eritroderma generalizado com formação de bolhas e descamação	>255 umol/L	Dor abdominal severa com ou sem íleo

Adaptado de Glucksberg e col (105).

**Tabela 2** – Sistema de Classificação Geral (Glucksberg)

Grau da DECH	Grau do órgão envolvido
I	Pele: + a ++
II	Pele: + a +++ Intestino e/ou fígado: + Ligeira queda no desempenho clínico
III	Pele: ++ a +++ Intestino e/ou fígado: ++ a +++ Marcada queda no desempenho clínico
IV	Pele: ++ a ++++ Intestino e/ou fígado: ++ a ++++ Intensa queda no desempenho clínico

Adaptado de Glucksberg e col (105).

**Tabela 3** – Conferência de Consenso sobre DECHa

<b>Grau</b>	<b>Pele</b>	<b>Fígado</b>	<b>Intestino</b>
I	Estádio 1-2	0	0
II	Estádio 3 ou	Estádio 1 ou	Estádio 1
III	-	Estádio 2-3 ou	Estádio 2-4
IV	Estádio 4 ou	Estádio 4	-

Adaptado de Przepiorka e col (106).

Em um estudo com 100 pacientes pediátricos analisando a cinética da secreção de IL-12p70 antes e depois do TCTH, houve um padrão dramaticamente diferente entre os pacientes com DECHa de graus II a IV e os pacientes com graus 0 a I. O nível elevado de IL-12p70 medido ao no primeiro mês após o TCTH foi significativamente associados com o desenvolvimento de DECHa graus II a IV, sendo que diminuíram após a terapia para DECHa.(107) Já quando se avaliaram 13 pacientes pediátricos submetidos a TCTH de doadores não relacionados, oito pacientes desenvolveram DECHa grave (grau III-IV). Os níveis plasmáticos de IL-6, IL-10, fator estimulante de colônias de macrófagos, TNF-I e II foram significativamente elevados no grupo DECHa grave em comparação com o grupo DECHa leve (grau 0-II). Porém quando comparadas as citocinas no grupo com DECHa nos graus mais elevados, a IL-10 aumentada foi relacionada a melhora da DECHa nesses pacientes, sugerindo-se uma razão IL-10/TNF maior que 20 como um bom prognóstico. Também relacionaram o nível plasmático aumentado de IL-15 e M-CSF relacionado com a piora da DECHa (108).

A fisiopatologia da DECHa ocorre em três fases. A primeira é o resultado do regime de condicionamento que é conhecida como “tempestade de citocinas”, onde as células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês, *antigen-presenting cell*) são ativadas pelas citocinas pró-inflamatórias. A segunda é uma fase de ativação das células

T, que é caracterizada pela ativação de células T do doador por citocinas e APCs do receptor; quanto maior for a disparidade HLA entre o doador e o receptor, maior é a resposta das células T. A terceira fase é a efetora, em que citocinas pró-inflamatórias e mediadores celulares agem em sinergia amplificando a lesão nos tecidos alvo (12, 103, 109-111).

Estudou-se a possibilidade de prevenção da DECHa realizando a depleção de linfócitos da medula óssea antes de ser realizado o TCTH. Essa medida reduziu a DECHa, porém aumentou a recidiva da doença. O aumento na recidiva foi então atribuído às células do sistema imune do doador que reconheceriam e lisavam clones malignos residuais na medula do receptor, e assim foi cunhado o nome do efeito conhecido como Enxerto Versus Leucemia (EVL) (112). Um recente estudo que avaliou 640 crianças que receberam TCTH de sangue de cordão umbilical em um período de 12 anos correlacionou a não recidiva da leucemia com o aparecimento da DECH e também do regime de condicionamento por irradiação corporal total. Os resultados também demonstraram o delicado equilíbrio entre o efeito EVL e DECH. Enquanto a presença de DECHa grau II diminuiu a recaída, os pacientes que experimentaram grau III-IV estavam em maior risco de morte, sem o benefício de menos recaída, sugerindo que a presença e não a intensidade da DECH são importantes para o EVL (113).

## **2.8 TERAPÊUTICA DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO**

O tratamento de primeira linha para DECH ocorre com o uso de corticosteroides, sendo iniciados em pacientes que apresentam grau II ou mais de DECHa (12). Esse cuidado para iniciar o tratamento é para não interromper o efeito EVL (114). Verificou-se que, quanto mais prolongado o tratamento e maior a dose do corticosteroide, maior a mortalidade desses pacientes (115). Aproximadamente 30% dos pacientes com DECHa

II-IV respondem ao tratamento padrão com o uso de corticosteroides e a taxa de mortalidade dos não responsivos varia entre 50 a 60%. O paciente com DECHa resistente a este medicamento tem poucas alternativas de tratamento, não existindo protocolo terapêutico estabelecido e a sobrevida, em dois anos, é de 10%. Os corticosteroides são, portanto, o pilar do tratamento e a resposta aos esteroides é um preditor chave do resultado (116-120).

A profilaxia clássica da DECH consiste em uma combinação de um inibidor da calcineurina - ciclosporina A ou tacrolimus, e de metotrexato (121). Outros fármacos imunossupressores também têm sido utilizados, como o sirolimus em combinação com tacrolimus e dose baixa de metotrexato, nesse caso quando há disparidade HLA no TCTH (122).

Uma vez estabelecida a DECHa, inicia-se o tratamento com metilprednisolona na dose de 2 mg/Kg/d. Em caso de falha, embora sem estudos comparativos se utiliza, empiricamente, drogas imunossupressoras mais potentes como tacrolimus, micofenolato de mofetila, sirolimus, para os que já não os estão recebendo ou onde há disponibilidade destas drogas; ou agentes biológicos como a globulina antitimocítica (se não utilizados na profilaxia/condicionamento), anticorpos monoclonais (anticorpo anti-receptor de IL-2, anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , anticorpos anti-CD52, anticorpos anti-CD147 ou anti-CD3), e foto-aférese extracorpórea (99, 103, 116, 123). A mudança no tratamento quando diagnosticada a DECHa refratária deve acontecer o mais breve possível, pois quanto menor esse o tempo melhor é o prognóstico na terapêutica da DECHa refratária.(124)

Dois anticorpos monoclonais comumente utilizados para DECH refratária são o Infliximab ® e o Basiliximab ®. O Infliximab é um anticorpo monoclonal anti TNF e o Basiliximab se liga e bloqueia especificamente a cadeia alfa dos receptores de

interleucina-2 (IL-2R alfa), também conhecido como antígeno CD25, na superfície de linfócitos T ativados. (125, 126)

Um recente estudo que relatou o uso do Infliximab em 35 pacientes consecutivos com DECHa refratária, associou o anticorpo a respostas clínicas precoces que não eram duráveis e a uma maior incidência de infecções.(125) Outro grupo que avaliou a terapia com Infliximab em 52 pacientes com DECHa refratária, relatou uma resposta completa (CR) de 15% dos indivíduos.(127) Em pacientes pediátricos com DECHa refratária gastrointestinal, o Infliximab pareceu ser bem tolerado e efetivo, porém a incidência de infecção e a mortalidade foram elevadas.(128)

A utilização do Basiliximab para DECHa refratária pode levar a uma resposta completa em 50% dos pacientes, porém 54% dos pacientes que responderam apresentaram recorrência dos sintomas de DECHa. Foi observado uma depleção significativa de células T reguladoras após o tratamento com Basiliximab e atribui-se a esse fator a alta incidência da recorrência da DECHa.(129) Em uma análise da combinação de Basiliximab e Infliximab em 21 pacientes com DECHa refratária de grau III-IV do sistema gastrointestinal foi observado resposta completa em 43% 21 dias após o início do tratamento, porém um ano após apenas 24% dos pacientes estavam vivos.(130)

## **2.9 ESTUDOS CLÍNICOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO**

A variedade de propriedades imunomoduladoras que afetam a imunidade inata, bem como as respostas imunes celulares e humorais, particularmente mudando o painel de secreção de citocinas sugeriu serem as CTM candidatas à terapia da DECHa refratária a esteroides (131).

O primeiro emprego de CTMs para o tratamento DECH foi reportado na literatura científica pelo grupo da pesquisadora Le Blanc *et al*, em 2004, relatando o caso de um menino de 9 anos submetido a um TCTH, com DECH grau IV do sistema gastrointestinal e fígado, resistente a esteroides que recebeu a infusão endovenosa de CTMs haploidênticas. A resposta ao tratamento foi completa e o paciente permanecia em remissão após um ano da infusão (13). Posteriormente, o grupo europeu liderados pela mesma pesquisadora publicou um estudo multicêntrico descrevendo 55 pacientes com DECHa grau II a IV, resistente a esteroides tratados com CTMs em diferentes países da Europa. A resposta terapêutica com o uso das CTMs ocorreu em 52% dos pacientes. Essa resposta não foi relacionada à compatibilidade HLA, visto que 69 das 92 infusões foram de CTM que não tinham HLA idêntico (*third party*) (131).

O primeiro estudo publicado no Brasil sobre uso de CTMs para DECHa, foi um estudo de fase I, onde foi testado a segurança e exequibilidade de CTMs cultivadas com suplemento de origem humana (lisado de plaquetas). As infusões de células não demonstraram nenhum efeito indesejável. Quando avaliado 28 dias após a infusão de CTMs, dos 8 pacientes que receberam, 5 permaneciam vivos (132). Outro grupo brasileiro publicou recentemente a utilização de CTMs em pacientes com DECH grau

III e IV resistentes a esteroides como terapia de segunda linha, metade desses pacientes apresentaram melhora clínica e destes, 13% tiveram resposta completa (133).

Chen *et col.* realizaram uma revisão sistemática e uma meta-análise de ensaios clínicos publicados sobre o uso de CTMs para DECHa refratária a esteroides afim de determinar possíveis fatores prognósticos que afetam a eficácia das CTMs. Foram incluídos 13 estudos com um total de 301 pacientes; destes, 136 pacientes apresentaram resposta completa e 69 pacientes apresentaram resposta parcial ou mista. Os pacientes com DECHa de pele refratária a esteroides apresentaram uma melhor resposta clínica do que os pacientes com DECHa gastrointestinal. Pacientes com grau II de DECHa refratária a esteroides exibiram uma melhor resposta clínica que em pacientes grau III-IV. Houve também uma tendência a uma melhor resposta clínica em crianças em comparação com adultos (14).

Embora a terapêutica com CTMs pareça ser promissora, existem preocupações quanto a possíveis efeitos secundários relacionados com a supressão indesejada da imunidade, levando a um risco aumentado de infecção. Por outro lado, dados recentes mostram que as CTMs exercem fortes efeitos antimicrobianos através de mecanismos diretos e indiretos, parcialmente mediados pela secreção de peptídeos e proteínas antimicrobianas (134).

Atualmente quando cruzar os termo “mesenchymal” e “GVHD” no site do *clinicaltrials.gov*, encontramos 46 estudos cadastrados, sendo que apenas um na América do Sul, Brasil. Quando adicionamos o termo “randomization”, encontramos 13 estudos, porém apenas o presente estudo é realizado na DECHa refratária, tendo o número de cadastrado NCT02770430 (135).

### 3 JUSTIFICATIVA

Muitos estudos clínicos mostraram os efeitos benéficos das CTM em pacientes com DECHa refratária a corticoesteróides, porém, os efeitos imunomodulatórios da infusão de células-tronco mesenquimais foram, na sua grande maioria determinados *in vitro*, havendo poucos estudos realizados *in vivo*, pós infusão. Os mecanismos pelos quais a infusão de CTMs parecem não interferir no EVL ou não aumentar a ocorrência de complicações infecciosas permanecem elusivos.



## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO**

Verificar se a infusão de CTM para o tratamento da DECHa interfere na atividade das células NK no efeito GVL

### **4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

1. Avaliar a concentração das citocinas (IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) *in vivo* antes e depois da infusão de CTM.
2. Medir a citotoxicidade das células NK antes e após infusão de CTM.
3. Caracterizar por imunofenotipagem a células NK antes e após infusão de CTM.

## 5 REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Lo Furno D, Mannino G, Cardile V, Parenti R, Giuffrida R. Potential Therapeutic Applications of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2016.
3. Tata PR, Rajagopal J. Plasticity in the lung: making and breaking cell identity. *Development*. 2017;144(5):755-66.
4. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006;91(8):1017-26.
5. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726-36.
6. Fayyad-Kazan H, Faour WH, Badran B, Lagneaux L, Najjar M. The immunomodulatory properties of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are defined according to multiple immunobiological criteria. *Inflamm Res*. 2016;65(6):501-10.
7. Sisler IY, Koehler E, Koyama T, Domm JA, Ryan R, Levine JE, et al. Impact of conditioning regimen in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with acute myelogenous leukemia beyond first complete remission: a pediatric blood and marrow transplant consortium (PBMTTC) study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(12):1620-7.
8. Yesilipek MA, Karasu G, Kazik M, Uygun V, Ozturk Z. Posttransplant oral iron-chelating therapy in patients with beta-thalassemia major. *Pediatr Hematol Oncol*. 2010;27(5):374-9.
9. Talmadge JE. Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(8):1121-43.
10. Baron F, Baker JE, Storb R, Gooley TA, Sandmaier BM, Maris MB, et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic

hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*. 2004;104(8):2254-62.

11. Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch Intern Med*. 2002;162(14):1558-66.

12. Wolf D, von Lilienfeld-Toal M, Wolf AM, Schleuning M, von Bergwelt-Baildon M, Held SA, et al. Novel treatment concepts for graft-versus-host disease. *Blood*. 2012;119(1):16-25.

13. 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.

14. Chen X, Wang C, Yin J, Xu J, Wei J, Zhang Y. Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136991.

15. Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*. 2005;23(6):719-26.

16. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadiani S, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran*. 2017;55(1):6-23.

17. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157-68.

18. Chen J, Chen L, Zern MA, Theise ND, Diehl AM, Liu P, et al. The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche. *Liver Int*. 2017.

19. Serafini M, Verfaillie CM. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med*. 2006;24(5):379-88.

20. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-74.

21. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 2000;113 ( Pt 7):1161-6.

22. de Soure AM, Fernandes-Platzgummer A, Moreira F, Lilaia C, Liu SH, Ku CP, et al. Integrated culture platform based on a human platelet lysate supplement for the

isolation and scalable manufacturing of umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem/stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016.

23. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-99.

24. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):204.

25. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006;12(4):459-65.

26. Mareschi K, Novara M, Rustichelli D, Ferrero I, Guido D, Carbone E, et al. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K<sup>+</sup> channel types. *Exp Hematol*. 2006;34(11):1563-72.

27. Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int*. 2017;2017:5173732.

28. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902.

29. Valim V, Amorin B, Pezzi A, Silva M, Alegretti AP, Lucia S. Optimization of the Cultivation of Donor Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Use in Cellular Therapy. *CellBio*; 2014. p. 25-33.

30. Haack-Sørensen M, Follin B, Juhl M, Brorsen SK, Søndergaard RH, Kastrup J, et al. Culture expansion of adipose derived stromal cells. A closed automated Quantum Cell Expansion System compared with manual flask-based culture. *J Transl Med*. 2016;14(1):319.

31. Saei Arezoumand K, Alizadeh E, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Esmaeillou M, Zarghami N. An overview on different strategies for the stemness maintenance of MSCs. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016:1-17.

32. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003;33(6):919-26.

33. de Witte SFH, Lambert EE, Merino A, Strini T, Douben HJCW, O'Flynn L, et al. Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion. *Cytotherapy*. 2017.
34. Han ZC, Du WJ, Han ZB, Liang L. New insights into the heterogeneity and functional diversity of human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng*. 2017;28(s1):S29-S45.
35. von Bahr L, Sundberg B, Lönnies L, Sander B, Karbach H, Hägglund H, et al. Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(4):557-64.
36. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4):e10088.
37. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One*. 2010;5(2):e9016.
38. Khatun M, Sorjamaa A, Kangasniemi M, Sutinen M, Salo T, Liakka A, et al. Niche matters: The comparison between bone marrow stem cells and endometrial stem cells and stromal fibroblasts reveal distinct migration and cytokine profiles in response to inflammatory stimulus. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175986.
39. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43.
40. Amouzegar A, Mittal SK, Sahu A, Sahu SK, Chauhan SK. Mesenchymal Stem Cells Modulate Differentiation of Myeloid Progenitor Cells during Inflammation. *Stem Cells*. 2017; 35(6):1532-1541.
41. Liu XD, Liu D, Zang CB, Zhang HY, Ming Y, Chi LL, et al. [IFN- $\gamma$  stimulation enhances immunosuppressive capability of human umbilical cord mesenchymal stem cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014;22(3):605-11.
42. Chinnadurai R, Copland IB, Patel SR, Galipeau J. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- $\gamma$ -licensed human mesenchymal stromal cells. *J Immunol*. 2014;192(4):1491-501.

43. Shirjang S, Mansoori B, Solali S, Hagh MF, Shamsasenjan K. Toll-like receptors as a key regulator of mesenchymal stem cell function: An up-to-date review. *Cell Immunol.* 2017;315:1-10.
44. Day CJ, Tran EN, Semchenko EA, Tram G, Hartley-Tassell LE, Ng PS, et al. Glycan:glycan interactions: High affinity biomolecular interactions that can mediate binding of pathogenic bacteria to host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(52):E7266-75.
45. Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(4):R759-66.
46. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells.* 2008;26(1):99-107.
47. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41(1):14-20.
48. Rostam HM, Singh S, Salazar F, Magennis P, Hook A, Singh T, et al. The impact of surface chemistry modification on macrophage polarisation. *Immunobiology.* 2016;221(11):1237-46.
49. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.* 2009;37(12):1445-53.
50. Manferdini C, Paoletta F, Gabusi E, Gambari L, Piacentini A, Filardo G, et al. Adipose stromal cells mediated switching of the pro-inflammatory profile of M1-like macrophages is facilitated by PGE2: in vitro evaluation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017.
51. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001;106(3):255-8.
52. Joffre O, Nolte MA, Spörri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2009;227(1):234-47.
53. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.

54. Spaggiari GM, Moretta L. Interactions between mesenchymal stem cells and dendritic cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013;130:199-208.
55. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005;105(5):2214-9.
56. Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2004;60(3):307-15.
57. Milosavljevic N, Gazdic M, Markovic BS, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, et al. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between IL-17 producing and regulatory NKT cells. *Liver Transpl.* 2017.
58. Moravej A, Geramizadeh B, Azarpira N, Zarnani AH, Yaghobi R, Kalani M, et al. Mesenchymal stem cells increase skin graft survival time and up-regulate PD-L1 expression in splenocytes of mice. *Immunol Lett.* 2017;182:39-49.
59. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):425-8.
60. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringdén O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol.* 2007;65(4):336-43.
61. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107(1):367-72.
62. Kang HS, Habib M, Chan J, Abavana C, Potian JA, Ponzio NM, et al. A paradoxical role for IFN-gamma in the immune properties of mesenchymal stem cells during viral challenge. *Exp Hematol.* 2005;33(7):796-803.
63. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol.* 2005;35(5):1482-90.
64. Bodduluru LN, Kasala ER, Madhana RM, Sriram CS. Natural killer cells: the journey from puzzles in biology to treatment of cancer. *Cancer Lett.* 2015;357(2):454-67.
65. Leung W. Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2014;20(13):3390-400.

66. Ames E, Murphy WJ. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(1):21-8.
67. Malhotra A, Shanker A. NK cells: immune cross-talk and therapeutic implications. *Immunotherapy*. 2011;3(10):1143-66.
68. Mentlik James A, Cohen AD, Campbell KS. Combination immune therapies to enhance anti-tumor responses by NK cells. *Front Immunol*. 2013;4:481.
69. Davies JO, Stringaris K, Barrett AJ, Rezvani K. Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease. *Cytotherapy*. 2014;16(11):1453-66.
70. Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol*. 2008;36(6):733-41.
71. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*. 2012;12(5):574-91.
72. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24(1):74-85.
73. Giuliani M, Bennaceur-Griscelli A, Nanbakhsh A, Oudrhiri N, Chouaib S, Azzarone B, et al. TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing. *Stem Cells*. 2014;32(1):290-300.
74. Raicevic G, Najar M, Najimi M, El Taghdouini A, van Grunsven LA, Sokal E, et al. Influence of inflammation on the immunological profile of adult-derived human liver mesenchymal stromal cells and stellate cells. *Cytotherapy*. 2015;17(2):174-85.
75. Boura JS, Vance M, Yin W, Madeira C, Lobato da Silva C, Porada CD, et al. Evaluation of gene delivery strategies to efficiently overexpress functional HLA-G on human bone marrow stromal cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2014;2014(1).
76. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107(4):1484-90.
77. Matsumoto A, Nakayama KI. Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(2):2335-44.



78. Chao MP, Seita J, Weissman IL. Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2008;73:439-49.
79. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):93-106.
80. De Kler I, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol.* 2014;5:423.
81. Mendes SC, Robin C, Dzierzak E. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development.* 2005;132(5):1127-36.
82. Heissig B, Ohki Y, Sato Y, Rafii S, Werb Z, Hattori K. A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology.* 2005;10(3):247-53.
83. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):383-96.
84. Cordeiro-Spinetti E, Taichman RS, Balduino A. The bone marrow endosteal niche: how far from the surface? *J Cell Biochem.* 2015;116(1):6-11.
85. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood.* 1975;46(1):65-72.
86. Gong JK. Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science.* 1978;199(4336):1443-5.
87. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425(6960):836-41.
88. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010;466(7308):829-34.
89. Gori JL, Butler JM, Kunar B, Poulos MG, Ginsberg M, Nolan DJ, et al. Endothelial Cells Promote Expansion of Long-Term Engrafting Marrow Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Primates. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(3):864-76.
90. Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Schütz B, Ehinger M, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood.* 2011;117(19):5067-77.
91. Sasine JP, Yeo KT, Chute JP. Concise Review: Paracrine Functions of Vascular Niche Cells in Regulating Hematopoietic Stem Cell Fate. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(2):482-9.

92. THOMAS ED, LOCHTE HL, LU WC, FERREBEE JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957;257(11):491-6.
93. Elfenbein GJ, Shevach EM, Green I. Demonstration of thymus-derived cell surface antigens on various guinea-pig lymphoid cell populations by a micro-immune adherence technique. *Immunology.* 1972;23(4):523-35.
94. Shevach EM, Paul WE, Green I. Histocompatibility-linked immune response gene function in guinea pigs. Specific inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by alloantisera. *J Exp Med.* 1972;136(5):1207-21.
95. Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(2):219-34.
96. Sohn SK, Kim JG, Seo KW, Chae YS, Jung JT, Suh JS, et al. GM-CSF-based mobilization effect in normal healthy donors for allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30(2):81-6.
97. Yeşilipek MA. Hematopoietic stem cell transplantation in children. *Turk Pediatri Ars.* 2014;49(2):91-8.
98. Ganuza M, McKinney-Freeman S. Hematopoietic stem cells under pressure. *Curr Opin Hematol.* 2017.
99. Caselli A, Olson TS, Otsuru S, Chen X, Hofmann TJ, Nah HD, et al. IGF-1-mediated osteoblastic niche expansion enhances long-term hematopoietic stem cell engraftment after murine bone marrow transplantation. *Stem Cells.* 2013;31(10):2193-204.
100. van der Zouwen B, Kruisselbrink AB, Jordanova ES, Rutten CE, von dem Borne PA, Falkenburg JH, et al. Alloreactive effector T cells require the local formation of a proinflammatory environment to allow crosstalk and high avidity interaction with nonhematopoietic tissues to induce GVHD reactivity. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(9):1353-67.
101. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009;373(9674):1550-61.

102. Khandelwal P, Mellor-Heineke S, Rehman N, Lane A, Smiley K, Villanueva J, et al. Cytokine Profile of Engraftment Syndrome in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(4):690-7.
103. Bacigalupo A. Management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2007;137(2):87-98.
104. Lubner MG, Menias CO, Agrons M, Alhalabi K, Katabathina VS, Elsayes KM, et al. Imaging of Abdominal and Pelvic Manifestations of Graft-Versus-Host Disease After Hematopoietic Stem Cell Transplant. *AJR Am J Roentgenol*. 2017:1-13.
105. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15(6):825-8.
106. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(12):945-56.
107. Mohty M, Blaise D, Faucher C, Vey N, Bouabdallah R, Stoppa AM, et al. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2005;106(13):4407-11.
108. Sakata N, Yasui M, Okamura T, Inoue M, Yumura-Yagi K, Kawa K. Kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: the ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27(11):1153-61.
109. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med*. 2003;54:29-52.
110. Reddy P, Arora M, Guimond M, Mackall CL. GVHD: a continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(1 Suppl):162-8.
111. Ghimire S, Weber D, Mavin E, Wang XN, Dickinson AM, Holler E. Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. *Front Immunol*. 2017;8:79.
112. Fowler DH. Shared biology of GVHD and GVT effects: potential methods of separation. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;57(3):225-44.

113. Page KM, Labopin M, Ruggeri A, Michel G, Diaz de Heredia C, O'Brien T, et al. Factors Associated with Long-Term Risk of Relapse after Unrelated Cord Blood Transplantation in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in Remission. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017.
114. Weng JY, Du X, Geng SX, Peng YW, Wang Z, Lu ZS, et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(12):1732-40.
115. Vogel G. Can old cells learn new tricks? *Science.* 2000;287(5457):1418-9.
116. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood.* 2007;109(10):4119-26.
117. Socié G, Vigouroux S, Yakoub-Agha I, Bay JO, Fürst S, Bilger K, et al. A phase 3 randomized trial comparing inolimomab vs usual care in steroid-resistant acute GVHD. *Blood.* 2017;129(5):643-9.
118. Castilla-Llorente C, Martin PJ, McDonald GB, Storer BE, Appelbaum FR, Deeg HJ, et al. Prognostic factors and outcomes of severe gastrointestinal GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(7):966-71.
119. Van Lint MT, Milone G, Leotta S, Uderzo C, Scimè R, Dallorso S, et al. Treatment of acute graft-versus-host disease with prednisolone: significant survival advantage for day +5 responders and no advantage for nonresponders receiving anti-thymocyte globulin. *Blood.* 2006;107(10):4177-81.
120. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, et al. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(8):1150-63.
121. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med.* 1986;314(12):729-35.
122. Cutler C, Li S, Ho VT, Koreth J, Alyea E, Soiffer RJ, et al. Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood.* 2007;109(7):3108-14.

123. Kim SS. Treatment options in steroid-refractory acute graft-versus-host disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Pharmacother.* 2007;41(9):1436-44.
124. Westin JR, Saliba RM, De Lima M, Alousi A, Hosing C, Qazilbash MH, et al. Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Adv Hematol.* 2011;2011:601953.
125. Yalniz FF, Hefazi M, McCullough K, Litzow MR, Hogan WJ, Wolf R, et al. Safety and Efficacy of Infliximab Therapy in the Setting of Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017.
126. Kapic E, Becic F, Kusturica J. Basiliximab, mechanism of action and pharmacological properties. *Med Arh.* 2004;58(6):373-6.
127. Pidala J, Kim J, Field T, McBride A, Kharfan-Dabaja M, Perkins J, et al. Infliximab for managing steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(9):1116-21.
128. Yang J, Cheuk DK, Ha SY, Chiang AK, Lee TL, Ho MH, et al. Infliximab for steroid refractory or dependent gastrointestinal acute graft-versus-host disease in children after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant.* 2012;16(7):771-8.
129. Chakupurakal G, García-Márquez MA, Shimabukuro-Vornhagen A, Theurich S, Holtick U, Hallek M, et al. Immunological effects in patients with steroid-refractory graft-versus-host disease following treatment with basiliximab, a CD25 monoclonal antibody. *Eur J Haematol.* 2016;97(2):121-7.
130. Nadeau M, Perreault S, Seropian S, Foss F, Isufi I, Cooper DL. The use of basiliximab-infliximab combination for the treatment of severe gastrointestinal acute GvHD. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(2):273-6.
131. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371(9624):1579-86.
132. Silla L, Valim V, Amorin B, Alegretti AP, Dos Santos de Oliveira F, Lima da Silva MA, et al. A safety and feasibility study with platelet lysate expanded bone marrow mesenchymal stromal cells for the treatment of acute graft-versus-host disease in Brazil. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(5):1203-5.

133. Dotoli GM, De Santis GC, Orellana MD, de Lima Prata K, Caruso SR, Fernandes TR, et al. Mesenchymal stromal cell infusion to treat steroid-refractory acute GvHD III/IV after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2017.
134. Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Khoury M. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Front Immunol.* 2017;8:339.
135. <https://clinicaltrials.gov>; acessado em 15/05/2017 às 17:45

## ARTIGO CIENTÍFICO

# MEDICAL HYPOTHESES

Guide for Authors

### **Guidelines for Authors on the construction of articles**

The purpose of *Medical Hypotheses* is to publish interesting theoretical papers. The journal will consider radical, speculative and non-mainstream scientific ideas provided they are coherently expressed.

*Medical Hypotheses* is not, however, a journal for publishing workaday reviews of the literature, nor is it a journal for primary data (except when preliminary data is used to lend support to the main hypothesis presented). Many of the articles submitted do not clearly identify the hypothesis and simply read like reviews.

These notes are designed to help authors formulate an article for *Medical Hypotheses* in such a way that the article is clearly distinguishable from a review. These are guidelines only and the Editor is happy to accept other formats provided that the principal requirements are met.

**MESENCHYMAL STEM CELL THERAPY FOR STEROID REFRACTORY  
ACUTE GRAFT VERSUS HOST DISEASE ACTIVATE *IN VIVO* GRAFT  
VERSUS LEUKEMIA EFFECT: WE REST THE CASE.**

Valim V., Senh F., Pezzi A., Zambonato, B., Silva M.A., Dahmer A., Amorin B  
Wilke I., Silla L.

**ABSTRACT**

The main indication for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is acute leukemias and its curative potential is attributed to the graft versus leukemia effect (GVL) caused by immune effectors in which natural killer cells (NK cells) are undoubtedly involved. Acute graft versus host disease is a very frequent life-threatening complication of allogeneic HSCT, and about 30 to 50% are steroid refractory with a mortality rate of over 80% in the first two years. An alternative therapy for steroid-refractory aGVHD is infusion of mesenchymal stromal cells. Here we discuss how MSCs interact *in vivo* with natural killer cells and provide a basis to understanding why *in vivo* immune modulation caused by MSCs infusions does not increase leukemia relapse or infection. Studying the cytokine profile and NK cell phenotype as well as NK cell activity after MSCs infusions, we were able to show that MSCs infusion decreases inflammatory cytokines and upregulates NK cells number, its anti-tumor receptors, and cytotoxic activity. Against *in vitro* studies results, we hypothesize that MSC infusion activate NK cell mediated graft versus leukemia effect *in vivo*.



## INTRODUCTION

Allogeneic bone marrow transplantations (BMT) is the treatment of choice for many malignant and non-malignant hematological disorders. Acute graft versus host disease (aGVHD) is its most frequent complication, known to affect in various degrees, most often the skin, gastrointestinal tract, and liver. Steroids are the first line of treatment, however, about 30 to 50% of the patients are resistant or refractory to it. There is no consensus on the optimal strategy for managing steroid refractory aGVHD, and its long-term mortality rate remains around 80%. (1-5)

Mesenchymal stem cells (MSCs), are adult, self-renewable, fibroblast-like, multipotent cells characterized by the ability to differentiate into tissues of mesodermal origin, and by cell surface expression of CD105, CD73, CD90 in the absence of CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$  or CD19, and HLA-DR.(6) Infusion of ex-vivo expanded MSCs has emerged as an additional tool in the treatment of steroids refractory acute GVHD.(7)

NK cells are known to be one of the first lymphocyte subpopulation to recover post-HSCT.(8) Although rarely, in some circumstances of extreme T cell depletion, NK cells may play a central role in promoting GVHD (9), NK cells are widely known by its ability of *in vivo* discriminate between healthy and malignant cells, separating graft-versus-leukemia (GVL) from GVHD, especially in the setting of haploidentical SCT HLA, where NK cells appear to have its most pronounced effect. More strikingly, NK cells were shown to mediate GVL effect while simultaneously decreasing GVHD. (10-

12) Additionally, NK cells effector function is associated with HSCT better outcomes both in non-relapse mortality and infections episodes.(13)

*In vitro* studies on the interaction between MSC and natural killer (NK) cells have shown conflicting results.(14) While Rongtao and al. have shown that MSC stimulates NK cells INF- $\gamma$  production (15) Sotiropoulou and al have shown that INF- $\gamma$  activate MSC that by its turn inhibits NK cells activation (16) Little is known about *in vivo* interactions between MSC and NK cells. What appears to be clear is that although MSC infusions can effectively suppress acute GVHD by enhancing regulatory T cells and IL-10 secretion, it does not increase leukemia relapse or infections. (17-19)

## **HYPOTHESIS**

MSC infusions for the treatment of steroid resistant aGVHD potentiates NK cell mediated Graft versus Leukemia (GVL) effect.

## **METHODS**

Studying NK cell behavior and cytokine profile before and after third party bone marrow derived MSC (BMMSC) infusion for the treatment of a 5 years-old girl with skin refractory grade III acute GVHD, we were able to show an immediate IL-6 and TNF- $\alpha$  decrement with a concomitant increase in IL-10 concentration, and progressive augmentation of peripheral blood NK cell proportion in the lymphocyte population and its cytotoxicity. This patient was enrolled in a randomized clinical trial on the utilization of MSC or monoclonal antibody for the treatment of steroid refractory aGVHD (ClinicalTrial.com number NCT02770430)

After a 76-hour of diagnosis of steroid resistant acute GVHD the patient was randomized to receive five, every second day, platelet lysate expanded third party BMMSC at a median cell concentration of  $2.3 \times 10^6/\text{kg}$ . Interleukine-10, IL-6, and TNF- $\alpha$  concentration were measured by a commercially available Human Cytokine/Chemokine kits for Luminex (Merck Millipore, Darmstadt, Germany); NK cell lymphocyte proportion and subpopulations analyzed on a BD FACS Canto II flow-cytometer (Becton, Dickinson and Company), and its cytotoxicity measured by  $^{51}\text{Cr}$ -release assay. All measurements were performed immediately before and two hours after the first, second, fifth, and at the 28<sup>th</sup> day of MSC infusion.

## RESULTS

Twenty four hours after the first BMMSC infusion the grade III skin aGVHD evolve to grade II and progressively remitted to be a complete response (CR) on the 7<sup>th</sup> day after the first infusion. As can be seen in Figure 1, IL-10 sharply increased two hours after the first infusion and progressively decreased before and after the subsequent infusions to a comparative very low level at the 28<sup>th</sup> day; the high concentration of IL-6 and TNF- $\alpha$  observed before the first infusion progressively decreased to be undetectable and very low at the 28<sup>th</sup> day. As for NK cell proportion of lymphocytes and cytotoxicity (Figure 2), there was a slow increment in its proportion up to the 28<sup>th</sup> day; NK cytotoxicity remained low and stable up to after the 5<sup>th</sup> MSC infusion, and significantly augmented on the 28<sup>th</sup> day. NK cells NKP expression (NKP30, NKP44 E NKP46), NKG2D, KIR3DL1/DL2 and KIR2DL3 varied with time and successive infusions as can be seen in Figure 3. NK cells activating receptors NKp, NKG2D expressed early in NK development, and the inhibitory receptors expressed by mature activated NK cells, were also measured at the mentioned time points (Figure 3)

## DISCUSSION

It has been shown, *in vitro*, that BM-MSCs suppress NK-cell proliferation and cytotoxicity (20), and impair T cell activation and proliferation.(21-23) Soluble factors involved in this effect include indoleamine 2, 3-dioxygenase, prostaglandin E2, TGF- $\beta$ 1, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and nitric oxide.(24-28) TNF- $\alpha$  and IL-6 are inflammatory cytokines known to be increased in aGVHD.(29) The rapid and progressive decrement of these cytokines observed in Figure 2 is in accordance with the clinical aGVHD remission obtained. It could be attributed to macrophage transmutation from M1 (inflammatory) to M2 (anti-inflammatory) phenotype promoted by MSC (30). Matsumoto *et al.* studying MSC and macrophage co-cultures observed an increase in IL-10 and a decrease in IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ . (31) In accordance to these *in vitro* studies, IL-10 increased almost four times two hours after the first infusion with a concomitant clinical improvement observed in the first 24h.

It was recently shown in humans that aGVHD induce a marked decrease in NK cell number and activation. (32) In accordance to that observation, a low NK cell lymphocyte proportion as well as a low NK cell lytic activity was observed before MSC infusion in our patient, and the latter remained low during treatment to increase significantly on the 28th day along with a progressive increment of peripheral blood NK cell proportion.

NKG2D and the natural cytotoxicity receptors (NCRs; NKp30, NKp44, NKp46) are key receptors involved in NK cell activation (33) expressed early in NK cell maturation. The down regulation of NKp and NKG2D observed over time and along with a higher expression of KIR receptors (Figure 2) are associated with maturation of NK cells toward a cytotoxic phenotype (34). The observed high expression of NKp during MSC

infusions might be explained by the cross-talk between MSC and NK since a positive feedback loop driven by NK cell-derived IFN- $\gamma$  and MSC-derived *XXL2* increases cytokine stimulated NK cells.

The killer immunoglobulin-like receptors (KIR) KIR3DL1/DL2 e KIR2DL3 are inhibitory receptors activated by its HLA class I ligand expressed at the target cell. NK cells lytic activity against leukemia cells is mediated in part by mismatching of the KIR ligand between the NK cell and its target (the missing self theory). (35) On the other hand, it was shown that NK cells can gain higher level of effector function when stimulated by cytokines or by CD16 engagement and can exert significant GVL in an inflammatory milieu, such as the post transplantation environment. (36-39)

## CONCLUSION

We were able to show that five every two days infusions of third party bone marrow derived platelet lysate ex-vivo expanded MSC, not only down regulates inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and increase anti-inflammatory IL-10, but also gradually and slowly increases NK cell proportion, maturation and cytotoxic activity on the 28<sup>th</sup> day after infusion. Taken together, these results led us to hypothesize that MSC infusion in the setting of acute GVHD, *in vivo* potentiates NK cell mediated GVL and have a role in infection control.

## REFERENCES

1. Sisler IY, Koehler E, Koyama T, Domm JA, Ryan R, Levine JE, et al. Impact of conditioning regimen in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with acute myelogenous leukemia beyond first complete remission: a pediatric blood and marrow transplant consortium (PBMTTC) study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(12):1620-7.
2. Socié G, Vigouroux S, Yakoub-Agha I, Bay JO, Fürst S, Bilger K, et al. A phase 3 randomized trial comparing inolimomab vs usual care in steroid-resistant acute GVHD. *Blood.* 2017;129(5):643-9.
3. Sood A, Midha V. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Indian J Gastroenterol.* 2007;26(6):285-9.
4. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2015;50(8):942-51.
5. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology.* 2014;146(6):1489-99.
6. 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.
7. Chen X, Wang C, Yin J, Xu J, Wei J, Zhang Y. Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136991.
8. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(4):205-17.
9. Shah NN, Baird K, Delbrook CP, Fleisher TA, Kohler ME, Rampertaap S, et al. Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood.* 2015;125(5):784-92.
10. Venstrom JM, Gooley TA, Spellman S, Pring J, Malkki M, Dupont B, et al. Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2010;115(15):3162-5.
11. Giebel S, Nowak I, Dziaczkowska J, Czerw T, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, et al. Activating killer immunoglobulin-like receptor incompatibilities enhance graft-

versus-host disease and affect survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2009;83(4):343-56.

12. Savani BN, Mielke S, Adams S, Uribe M, Rezvani K, Yong AS, et al. Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2007;21(10):2145-52.

13. Kim DH, Sohn SK, Lee NY, Baek JH, Kim JG, Won DI, et al. Transplantation with higher dose of natural killer cells associated with better outcomes in terms of non-relapse mortality and infectious events after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. *Eur J Haematol.* 2005;75(4):299-308.

14. Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol.* 2008;36(6):733-41.

15. Malik T, Mannon P. Inflammatory bowel diseases: emerging therapies and promising molecular targets. *Front Biosci (Schol Ed).* 2012;4:1172-89.

16. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells.* 2006;24(1):74-85.

17. von Bahr L, Sundberg B, Lönnies L, Sander B, Karbach H, Hägglund H, et al. Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(4):557-64.

18. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells.* 2010;28(12):2229-38.

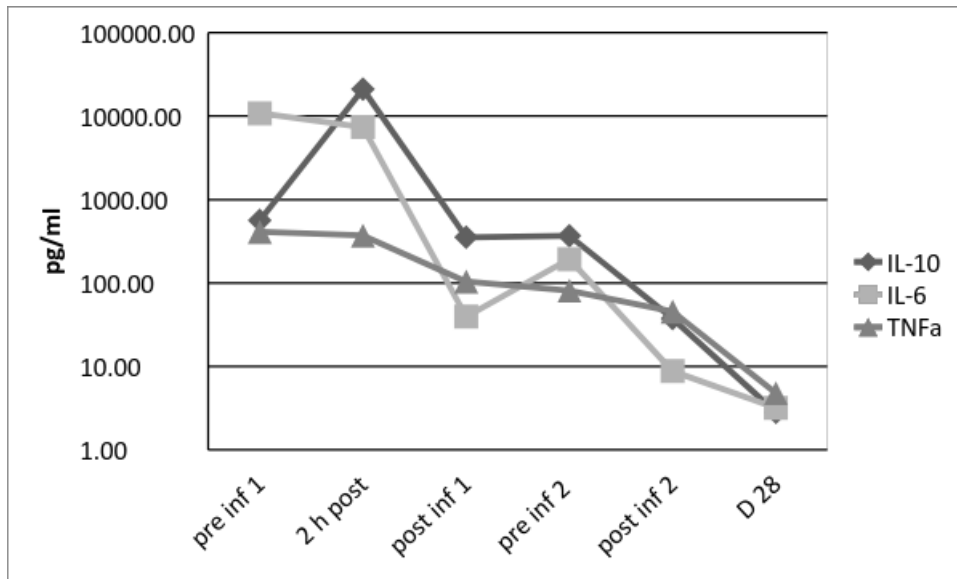
19. Krasnodembskaya A, Samarani G, Song Y, Zhuo H, Su X, Lee JW, et al. Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(10):L1003-13.

20. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006;107(4):1484-90.

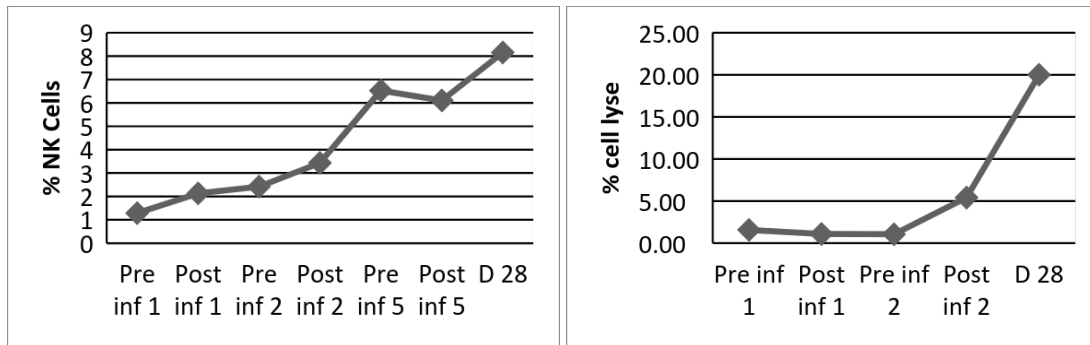
21. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43.
22. Ellinghaus D, Bethune J, Petersen BS, Franke A. The genetics of Crohn's disease and ulcerative colitis--status quo and beyond. *Scand J Gastroenterol*. 2015;50(1):13-23.
23. Jayanthi V, Probert CS, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF. Epidemiology of Crohn's disease in Indian migrants and the indigenous population in Leicestershire. *Q J Med*. 1992;82(298):125-38.
24. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*. 2012;12(5):574-91.
25. Chinnadurai R, Copland IB, Patel SR, Galipeau J. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- $\gamma$ -licensed human mesenchymal stromal cells. *J Immunol*. 2014;192(4):1491-501.
26. Probert CS, Jayanthi V, Wicks AC, Carr-Locke DL, Garner P, Mayberry JF. Epidemiological study of abdominal tuberculosis among Indian migrants and the indigenous population of Leicester, 1972-1989. *Gut*. 1992;33(8):1085-8.
27. Ko Y, Butcher R, Leong RW. Epidemiological studies of migration and environmental risk factors in the inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1238-47.
28. Li X, Sundquist J, Hemminki K, Sundquist K. Risk of inflammatory bowel disease in first- and second-generation immigrants in Sweden: a nationwide follow-up study. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(8):1784-91.
29. Ng SC. Epidemiology of inflammatory bowel disease: focus on Asia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(3):363-72.
30. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369(9573):1627-40.
31. Matsumoto A, Nakayama KI. Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(2):2335-44.



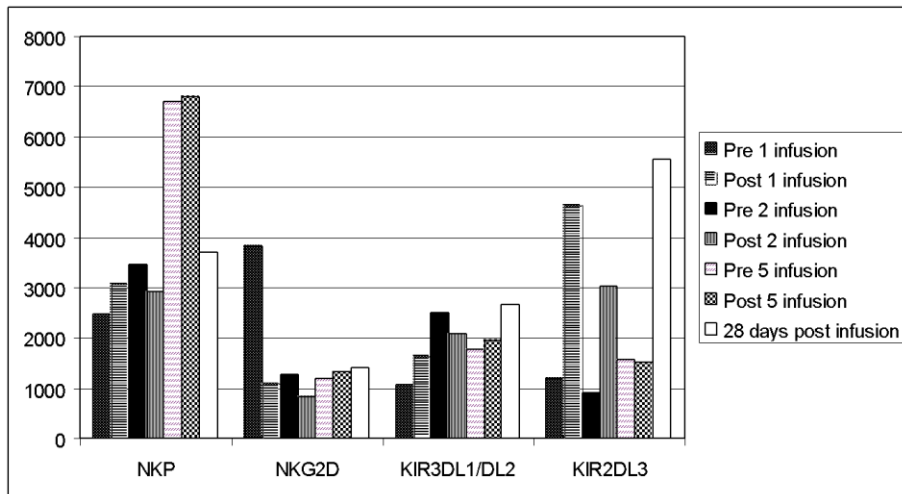
32. Ullrich E, Salzman-Manrique E, Bakhtiar S, Bremm M, Gerstner S, Herrmann E, et al. Relation between Acute GVHD and NK Cell Subset Reconstitution Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2016;7:595.
33. Dutta AK, Chacko A. Influence of environmental factors on the onset and course of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(3):1088-100.
34. Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood.* 2010;116(19):3853-64.
35. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012;491(7422):119-24.
36. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011;474(7351):307-17.
37. Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(5):968-84.
38. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(23):3668-72.
39. Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut.* 1993;34(4):517-24.



**Figure 1:** Cytokine concentration observed before and two hours after the first, second and at the 28<sup>th</sup> day of MSC infusion. After a sharp increase two hours after the first infusion IL-10 slowly returns to normal concentration over the next 28 days as well the inflammatory cytokines IL-6 and TNF. Results are shown as exponential.



**Figure 2:** NK cell lymphocyte proportion and cytotoxicity observed before and two hours after the first, second and at the 28<sup>th</sup> day of MSC infusion.



**Figure 3:** NK cell receptor expression before and two hours after the first, second, fifth, and at the 28<sup>th</sup> day of MSC infusion

## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (GRUPO DOADOR DE CÉLULAS MESENQUIMAIS)

Prezado Paciente ou responsável,

Você está sendo convidado para participar do estudo **“ESTUDO FASE II, RANDOMIZADO, SOBRE O EMPREGO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO TRATAMENTO DE PRIMEIRA LINHA PARA A DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO AGUDA RESISTENTE AOS ESTEROIDES”** realizado pelo Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Você está sendo convidado a participar deste estudo porque você já é um doador voluntário de medula óssea que irá realizar o procedimento nesta Instituição.

Uma das complicações mais comuns do Transplante de Medula Óssea é a reação dos glóbulos brancos do doador contra o receptor, a chamada Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH). Nos casos mais graves existem poucas possibilidades terapêuticas e a grande maioria dos pacientes falecem nos 2 primeiros anos após o transplante.

Nos últimos anos, tem-se realizado pesquisas sobre a utilização de células tronco mesenquimais no tratamento destes pacientes. As células tronco mesenquimais estão presentes na medula óssea e, quando cultivadas em laboratório, possuem a capacidade de regular o sistema imunológico no sentido de diminuir a gravidade da DECH. Os resultados destes estudos tem sido muito animadores o que nos incentivou a realizar aqui no Brasil este tipo de tratamento de forma estruturada no que se conhece como Ensaio Clínico, com a intenção não só de beneficiar nossos pacientes e, possivelmente o receptor de sua medula óssea, mas também no sentido de acrescentar dados à experiência internacional.

As células mesenquimais serão obtidas no mesmo procedimento para a coleta da sua medula óssea, quando será coletado de 50 a 100ml a mais de medula óssea, sem qualquer risco adicional a você. Ou seja, não será necessário nenhum procedimento extra, apenas será coletado uma quantidade maior de sua medula. Quando isto não for possível, gostaríamos de obter a sua permissão para utilizarmos as células de sua medula que restarem na bolsa utilizada para o transplante já que, ocasionalmente, conseguimos obter destas células residuais uma quantidade suficiente para o tratamento de outro paciente.

As células tronco mesenquimais precisam ser isoladas da amostra de medula óssea do doador, e passam por um período de cultivo em laboratório de aproximadamente 20 a 30 dias, onde necessitam crescer e se proliferar para que após sejam infundidas no paciente. Muitas vezes, infelizmente, essas células coletadas do doador não conseguem crescer nos meios de cultivo e, portanto não podem ser utilizadas. O sucesso do cultivo dessas células só pode ser garantido se ocorrer a sua multiplicação no laboratório. Se as suas células não puderem ser utilizadas, por algum motivo, solicitamos autorização para descartá-las, conforme as normas de segurança existentes.

Além disso, estamos solicitando sua autorização para acessar seus registros de prontuário, para avaliarmos seus dados clínicos e resultados de exames. Pedimos sua autorização, também, para o uso de suas células para a validação dos nossos processos de cultivo celular e para armazenar amostras de células para testes que se fizerem necessários no futuro, relacionados a este estudo.

O paciente que receber sua doação de medula óssea, não necessariamente receberá as células tronco mesenquimais obtidas da mesma medula, pois elas demoram a crescer e podem não estar prontas quando e se o seu receptor precisar. Da mesma forma, outra pessoa poderá receber as suas células. Como estamos

continuamente cultivando células mesenquimais, o seu receptor poderá se beneficiar de células obtidas de outro doador.

A participação neste estudo é totalmente voluntária e você não terá benefício com essa doação, contudo, poderá ajudar os pacientes que precisarem destas células. Você não receberá nenhum tipo de pagamento, bem como, não terá nenhum custo com este procedimento. Seu nome não será divulgado nas publicações relacionadas a este estudo ou para qualquer possível receptor das células e todos os seus dados serão tratados de forma confidencial.

A equipe do transplante de medula óssea permanecem ao inteiro dispor para esclarecer eventuais dúvidas a respeito da doação e dos procedimentos. É importante ressaltar que você receberá o mesmo tratamento dispensado a todos os doadores de medula óssea, tendo ou não concordado em doar amostra adicional para produção de células tronco mesenquimais nesta pesquisa.

Se você tiver alguma dúvida poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável pelo projeto Dr<sup>a</sup> Lucia Mariano da Rocha Silla (Serviço de Hematologia Clínica do HCPA – 51 33598317) em horário comercial. Se você tiver alguma dúvida quanto ao conteúdo ético desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, localizado no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone 51 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

Este documento possui duas vias, uma via será entregue a você e a outra ficará em posse do pesquisador.

Se após a leitura deste termo você concordar em participar deste estudo, preencha as informações abaixo e assine após.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Número do prontuário do participante: \_\_\_\_\_

RG do participante: \_\_\_\_\_ CPF do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante:

\_\_\_\_\_

Nome do responsável (se aplicável):

\_\_\_\_\_

Grau de parentesco (se aplicável):

\_\_\_\_\_

Assinatura do responsável (se aplicável): \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (GRUPO RECEPTOR DE CÉLULAS MESENQUIMAIS)**

Prezado Paciente ou responsável,

Você está sendo convidado para participar do estudo **“ESTUDO FASE II, RANDOMIZADO, SOBRE O EMPREGO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO TRATAMENTO DE PRIMEIRA LINHA PARA A DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO AGUDA RESISTENTE AOS ESTEROIDES”** realizado pelo Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Você está sendo convidado a participar deste estudo porque você está apresentando a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).

Atualmente você está apresentando uma reação grave do transplante de medula óssea, chamada de DECH. Esta é uma complicação frequente do transplante de medula óssea alogênico, no qual células imunológicas funcionais da medula óssea transplantada atacam células e tecidos do organismo receptor, neste caso o seu. Esta reação chamada de DECH, também pode ser benéfica, pois se sabe que ela é necessária para que as células doentes sejam eliminadas do seu organismo. Contudo, muitas vezes ela é exagerada, e para esses casos são usados medicamentos chamados de corticóides, que diminuem a reação da medula que você recebeu, contra as suas células. Algumas vezes esta reação é tão forte, que os corticoides não conseguem diminuir a DECH, como é a sua situação atual.

Como alternativa para estes casos em que os corticoides não funcionam como deveriam no tratamento da DECH está sendo testado o uso de um tipo especial de célula: as células tronco mesenquimais. Embora os resultados iniciais pareçam promissores, ainda não se sabe se esta terapia é superior ao tratamento convencional (corticoides), por isto estamos fazendo este estudo, para comparar os dois tratamentos. Ainda mais, não é conhecido plenamente o motivo destas células atuarem benéficamente contra a DECH e os seus efeitos futuros no seu organismo.

Para que possamos descobrir se um tratamento é melhor que o outro, precisamos ter dois grupos de pacientes, um que recebe o tratamento convencional (corticoides) e outro que recebe as células tronco mesenquimais. Para isso, nós sorteamos cada paciente de forma aleatória e você foi sorteado para realizar o tratamento com células tronco mesenquimais.

As células tronco mesenquimais são obtidas através da medula óssea e são cultivadas em laboratório. Os estudos demonstram que não há necessidade de compatibilidade entre o doador e o receptor neste tipo de procedimento. As células tronco mesenquimais que serão infundidas em você são obtidas de um doador de medula óssea sadio. Na seleção deste doador, foram realizados testes laboratoriais estabelecidos com normas de segurança. As células foram multiplicadas em laboratório, atendendo a todas as exigências legais de segurança e controle de qualidade.

Para a multiplicação dessas células é utilizado no meio de cultura o lisado plaquetário. O lisado plaquetário é um suplemento obtido de plaquetas humanas e oferece fatores de crescimento necessários para a proliferação celular. Para a produção do lisado plaquetário, utilizamos plaquetas de doadores cujos exames sorológicos (que são os exames padrão para vírus

realizados em doadores) tenham sido negativos. Porém, devido à janela imunológica (que é quando o vírus ainda não está detectável no sangue, mas já existe no corpo), poderá ocorrer na transfusão de células tronco mesenquimais a transmissão de algum vírus que não tenha sido detectado no exame. Entretanto, salientamos que o risco é o mesmo a que você está sujeito quando recebe transfusão de plaquetas.

Durante a infusão destas células podem ocorrer reações adversas como palpitação ou reação alérgica, com ou sem febre associada. No entanto, é importante que você saiba que já realizamos este tratamento em um grupo inicial de pacientes e nenhum deles teve reação adversa em curto ou longo prazo. Além disso, a equipe médica e enfermeiros responsáveis irão realizar o monitoramento durante todo o tratamento, permanecendo ao seu lado durante a infusão, assim como, na hora subsequente, controlando seus sinais vitais e, caso houver reações, elas serão tratadas imediatamente. A equipe assistencial acompanhará a evolução do seu quadro de saúde, através de exames, tomando todas as medidas de segurança adequadas.

A transferência destas células será realizada através de uma infusão na veia, semelhante a que ocorreu no seu transplante de medula óssea.

Em princípio, serão 5 doses de células tronco mesenquimais, onde serão 2 doses por semana, por duas semanas e mais 1 na semana seguinte.

Além disso, serão coletadas amostras de sangue (tubos de 5 mL) antes e após as infusões de células tronco mesenquimais para podermos analisar e pesquisar sobre sua evolução. Solicitamos sua autorização para a realização destes exames, bem como, para o armazenamento de amostras para análises futuras, relacionadas a este estudo. Também precisamos fazer um acompanhamento da sua evolução clínica, coletando dados através do seu prontuário.

Se até o 28º dia após a primeira dose de células tronco mesenquimais você não estiver bem, você poderá voltar a receber o tratamento convencional (corticoide) em um procedimento que é conhecido como cruzamento (crossing over) dos grupos da pesquisa. Isto significa que os pacientes que foram sorteados para receber o tratamento convencional também poderão receber as células tronco mesenquimais.

A participação neste estudo é totalmente voluntária e você não receberá nenhum tipo de pagamento, bem como, não terá nenhum custo com este procedimento. Seu nome não será divulgado, bem como os seus dados serão tratados de forma confidencial.

Você está livre para tomar essa decisão. Caso não concorde em participar deste estudo, não haverá repercussão na continuidade dos demais procedimentos assistenciais prestados a você, que será tratado com o mesmo cuidado e atenção dedicada a todos os nossos pacientes.

Se você tiver alguma dúvida poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável pelo projeto Dr<sup>a</sup> Lucia Mariano da Rocha Silla (Serviço de Hematologia Clínica do HCPA – 51 33598317) em horário comercial. Se você tiver alguma dúvida quanto ao conteúdo ético desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa localizado no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone 51 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.



Este documento possui duas vias, uma via será entregue a você e a outra ficará em posse do pesquisador.

Se após a leitura deste termo você concordar em participar deste estudo, preencha as informações abaixo e assine após.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Número do prontuário do participante: \_\_\_\_\_

RG do participante: \_\_\_\_\_ CPF do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Nome do responsável (se aplicável): \_\_\_\_\_

Grau de parentesco (se aplicável): \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável (se aplicável): \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (GRUPO CONTROLE)

Prezado Paciente ou responsável,

Você está sendo convidado para participar do estudo **“ESTUDO FASE II, RANDOMIZADO, SOBRE O EMPREGO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO TRATAMENTO DE PRIMEIRA LINHA PARA A DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO AGUDA RESISTENTE AOS ESTEROIDES”**, realizado pelo Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Você está sendo convidado a participar deste estudo porque você está apresentando a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).

Atualmente você está apresentando uma reação grave do transplante de medula óssea, chamada de DECH. Esta é uma complicação frequente do transplante de medula óssea alogênico, no qual células imunológicas funcionais da medula óssea transplantada atacam células e tecidos do organismo receptor, neste caso o seu. Esta reação chamada de DECH, também pode ser benéfica, pois se sabe que ela é necessária para que as células doentes sejam eliminadas do seu organismo. Contudo, muitas vezes ela é exagerada, e para esses casos são usados medicamentos chamados de corticóides, que diminuem a reação da medula que você recebeu, contra as suas células. Algumas vezes esta reação é tão forte, que os corticoides não conseguem diminuir a DECH, como é a sua situação atual.

Como alternativa para estes casos em que os corticoides não funcionam como deveriam no tratamento da DECH está sendo testado o uso de um tipo especial de célula: as células tronco mesenquimais. Embora os resultados iniciais pareçam promissores, ainda não se sabe se esta terapia é superior ao tratamento convencional (corticoides), por isto estamos fazendo este estudo, para comparar os dois tratamentos. Para que possamos descobrir se um tratamento é melhor que o outro, precisamos ter dois grupos de pacientes, um que recebe o tratamento convencional (corticoides) e outro que recebe as células mesenquimais. Para isso, nós sorteamos cada paciente de forma aleatória e você foi sorteado para seguir com o tratamento convencional. Assim, usaremos seus dados para comparar com os dados dos pacientes que receberão o tratamento experimental.

Você será observado e tratado com os medicamentos usuais durante 28 dias. Se até lá não estiver bem, você poderá optar por receber as células tronco mesenquimais em um procedimento que é conhecido como cruzamento (crossing over) dos grupos da pesquisa. Isto significa que os pacientes que foram sorteados para receber as células tronco mesenquimais também poderão receber o tratamento convencional, caso elas não tenham tido um efeito favorável.

Para fazermos este estudo, precisamos fazer um acompanhamento de sua evolução clínica e laboratorial através de coletas de sangue (tubos de 5 mL) ao longo de seu tratamento e através de análise de dados do seu prontuário para avaliarmos sua evolução e pesquisarmos sobre esta doença. A coleta de sangue é um procedimento seguro e não causará danos a você, pois será realizada através do acesso venoso que você já possui.

A participação neste estudo é totalmente voluntária e você não receberá nenhum tipo de pagamento, bem como, não terá nenhum custo com este procedimento. Se você responder ao tratamento convencional, também não terá nenhum benefício, porém estará beneficiando a evolução da pesquisa nesta área. Seu nome não será divulgado, bem como os seus dados serão tratados de forma confidencial.

Você está livre para tomar a decisão de participar deste estudo. Caso não aceite, não haverá repercussão na continuidade dos demais procedimentos assistenciais prestados a você.

Se você tiver alguma dúvida poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável pelo projeto Dr<sup>a</sup> Lucia Mariano da Rocha Silla (Serviço de Hematologia do HCPA – 51 33598317) em horário comercial. Se você tiver alguma dúvida quanto ao conteúdo ético desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa localizado no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone 51 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

Este documento possui duas vias, uma via será entregue a você e a outra ficará em posse do pesquisador.

Se após a leitura deste termo você concordar em participar deste estudo, preencha as informações abaixo e assine após.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Número do prontuário do participante: \_\_\_\_\_

RG do participante: \_\_\_\_\_ CPF do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante:

\_\_\_\_\_

Nome do responsável (se aplicável):

\_\_\_\_\_

Grau de parentesco (se aplicável):

\_\_\_\_\_

Assinatura do responsável (se aplicável): \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.