

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Ensaio Clínico de Segurança e Exequibilidade: Células-Tronco Mesenquimais
Para o Tratamento da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro Aguda
Resistente aos Corticosteroides**

Bruna Amorin

Orientadora: Dra Lucia Mariano da Rocha Silla

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Ensaio Clínico de Segurança e Exequibilidade: Células-Tronco Mesenquimais
Para o Tratamento da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro Aguda
Resistente aos Corticosteroides**

Bruna Amorin

Orientadora: Dra Lucia Mariano da Rocha Silla

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, como requisito para obtenção de título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Lucia Silla, pela oportunidade, pela receptividade em seu laboratório, pela confiança depositada em mim, pelo compartilhamento de ensinamentos e pelo exemplo de profissional e pesquisadora.

A toda equipe do Centro de Terapia Celular do Centro de Pesquisa Experimental pela amizade e convívio durante o meu doutorado.

Um agradecimento especial à Msc Vanessa Valim e Dra Fernanda dos Santos Oliveira pelos ensinamentos dos procedimentos práticos envolvidos nesta tese.

À colaboração da Dra Ana Paula Alegretti pelo incentivo constante.

Ao Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas por permitir acesso aos pacientes para realização deste projeto, pois sem uma equipe eficiente e dedicada neste projeto, ele não aconteceria.

Aos meus pais Nadir e Vera, pelo amor, apoio e incentivo que sempre me deram em todas as etapas, com certeza sem vocês, não teria chegado até esta etapa profissional.

Ao meu namorado Gustavo, pelo carinho, incentivo constante, apoio e por tornar tranquilos os meus momentos de apreensão.

*“A verdadeira viagem do descobrimento não consiste em procurar
novas paisagens, mas em ter novos olhos”.*

Marcel Proust

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são consideradas células multipotentes não hematopoéticas com propriedades de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e, talvez, não mesenquimais e, devido sua capacidade imunomodulatória, tem sido utilizada na terapia celular.

A Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro aguda (DECHa) resistente aos corticoesteroides é uma complicação do transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas e apresenta um mau prognóstico. Pacientes com DECHa resistente aos corticosteroides não dispõe de um tratamento estabelecido para esta grave complicação e, apesar das várias combinações de agentes imunossupressores, em torno de 16% dos pacientes sobrevivem em 2 anos.

Existem diferentes estudos clínicos (fases I, II e III) em diversos países relatando o uso das CTMs na terapia celular para o tratamento de diversas doenças, entre elas a DECH.

Este projeto teve como objetivo expandir células tronco mesenquimais em condições de boas práticas de manufatura para uso em terapia celular nestes pacientes acometidos com DECHa e avaliar a segurança e exequibilidade do uso destas células. Cabe salientar que no Rio Grande do Sul este é o primeiro estudo clínico com CTM para tratamento desta patologia.

Foram incluídos entre outubro de 2010 a maio de 2011, oito pacientes co DECHa resistente aos corticoesteroides neste estudo. Foram feitas no total 17 infusões de CTM (mediana de 2 infusões por paciente, range: 1-5) em não foram observados efeitos colaterais imediatos ou tardios relacionadas às infusões.

Cinco dos oito pacientes apresentaram resposta completa após 28 dias da primeira infusão. A sobrevida média dos pacientes foi de 303 dias e uma mediana de 123 dias (range: 49-740 dias).

ABSTRACT

The mesenchymal stem cells (MSCs) are considered non-hematopoietic multipotent cells with properties of self-renewal and ability to differentiate into mesenchymal tissues, and perhaps non-mesenchymal, and due to its immunomodulatory capacity, has been used in cell therapy.

Acute Graft Versus Host Disease (aGVHD) is a complication of allogeneic hematopoietic stem cells and has a poor prognosis. Patients with aGVHD resistant to corticosteroids does not have an established treatment for this serious complication and, despite various combinations of immunosuppressive agents, around 16% of patients survive for two years.

Different clinical trials (Phase I, II and III) in several countries are reporting the use of MSCs in cellular therapy to treat various diseases, including GVHD.

This project aimed to expand mesenchymal stem cells under conditions of good manufacturing practices for use in cell therapy in these patients affected with aGVHD and evaluate the safety and feasibility of using these cells. It should be noted that in Rio Grande do Sul, this is the first clinical study with MSC for treatment of this pathology.

Were included between October 2010 to May 2011, eight patients which aGVHD resistant to corticosteroids in this study. We made in total 17 infusions of MSC (median of two infusions per patient, range: 1-5) were not observed in either immediate or late side effects related to these infusions.

Five of the eight patients showed complete response 28 days after the first infusion. The median overall survival of these patients was 303 days and a median of 123 days (range: 49-740 days).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Célula-Tronco Mesenquimal ----- 15

FIGURA 2: Célula-Tronco Mesenquimal Diferenciada ----- 17

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Principais moléculas secretadas pelas ctm e suas funções----- 24

TABELA 2 – Efeitos imunomodulatórios das ctm em células imunes----- 26

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC** – Célula apresentadora de antígeno
- bFGF** – Fator de crescimento fibroblastóide básico
- CFU-F** – Unidade formadora de colônia fibroblastóide
- CMN** – Célula mononuclear
- COX2** – Cicloxigenase tipo 2
- CsA** – Ciclosporina
- CTA** – Célula-tronco adulta
- CTE** – Célula-tronco embrionária
- CTH** – Célula-tronco hematopoiética
- CTM** – Célula-tronco mesenquimal
- DECH** – Doença do Enxerto contra o Hospedeiro
- DECHa** – Doença do Enxerto contra o Hospedeiro aguda
- DECHc** - Doença do Enxerto contra o Hospedeiro crônica
- DMEM** – Dulbecco's Modified Eagles Medium
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- EVL** – Enxerto Versus Leucemia
- HCPA** – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- HGF** – Fator de crescimento hepatóide
- HLA** – Antígeno leucocitário humano
- HLA-G-5** – Antígeno de histocompatibilidade
- IDO** - Indoleamina 2,3 Dioxigenase
- IFN α** – Interferon alfa
- IFN γ** – Interferon gama
- IGF-1** – Fator de crescimento insulínico
- IL-10** – Interleucina 10
- IL-1 β** – Interleucina 1 beta
- IL-6** – Interleucina 6

ISCT – Sociedade Internacional de Terapia Celular

KYN – Quinurenina

LL-37 – Peptídeo antimicrobiano tipo LL-37

LP – Lisado plaquetário

MCP1 - Proteína-1 quimioatrativa de monócitos

M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos

MMF - Micofenolato mofetil

MMP3 – Matriz metaloproteinase tipo 3

MMP9 – Matriz metaloproteinase tipo 9

MO - Medula óssea

MP - Metilprednisolona

MTX – Metotrexato

NK – Natural Killer

P - Passagem

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE2 – Prostaglandina E2

PIGF – Fator de crescimento placentário

RIC – Condicionamento de intensidade reduzida

SFB – Soro Fetal Bovino

TCD - Depleção de células T

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCTH – Transplante de células-tronco hematopoiéticas

TGFβ – Fator de crescimento transformador beta

TLR – Receptor *Toll-like*

TNFα – Fator de necrose tumoral alfa

TSG6 – Fator de necrose tumoral induzido da proteína do gene 6

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1.REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1 CÉLULAS-TRONCO	11
1.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	12
1.2.1 Denominações utilizadas e caracterização básica das CTM	12
1.2.2 Ontogenia e fontes de CTM	13
1.2.3 Isolamento e cultivo de CTM da medula óssea	14
1.2.4 Morfologia e características imunohistoquímicas da CTM	15
1.2.5 Imunofenotipagem das CTMs	15
1.2.6 Fases do cultivo de CTM e a relação com a citogenética	16
1.2.7 Diferenciação	17
1.3 DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO AGUDA	17
1.4 TERAPÊUTICA PARA A DECH AGUDA	18
1.5 USO DE CTM COMO TERAPIA CELULAR PARA TRATAMENTO DA DECH AGUDA	19
1.6 MECANISMO DE AÇÃO DAS CTMS	22
1.7 CAPACIDADE DA CTM DE MIGRAR E ENXERTAR	23
1.8 SECREÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS PELA CTM	23
1.9 EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS DA CTM	24
REFERÊNCIAS	27
2.JUSTIFICATIVA	36
3.OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4.ARTIGO CIENTÍFICO 1	38
5.ARTIGO CIENTÍFICO 2	39
6.ARTIGO CIENTÍFICO 3	40
7.CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
ANEXO 1	42
ANEXO 2	44
ANEXO 3	46

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Células-tronco

As células-tronco são células indiferenciadas em que as principais características que as tornam extremamente interessantes para uso na terapia celular são: sua capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e sua potencial capacidade em se diferenciar em diversos tipos celulares (1, 2).

As células-tronco são divididas em dois grandes grupos que dizem respeito ao seu local de origem: podem ser células-tronco embrionárias (CTE), quando são derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário; e células-tronco adultas (CTA) que são aquelas obtidas do sangue de cordão umbilical, da medula óssea (MO), do sangue periférico e células-tronco tecido ou órgão específicas existentes em todo o organismo adulto (3), tais populações celulares indiferenciadas mantidas no organismo adulto são denominadas de CTA (4-6).

As CTAs ficam em estado quiescente ou de baixa proliferação, predominantemente nas fases G0 e G1 do ciclo celular, localizando-se em regiões específicas para o seu desenvolvimento e a manutenção dos seus atributos, particularmente a capacidade de autorrenovação (7). Essas regiões são denominadas de nichos celulares e dentre estes, os principais são: medula óssea (8), coração (9), rins, pele, fígado, pâncreas, ovários, cordão umbilical, placenta, líquido amniótico, entre outros (10).

As primeiras CTAs estudadas e, conseqüentemente, as mais bem caracterizadas são as células-tronco hematopoiéticas (CTH) provenientes da medula óssea, sangue periférico e de cordão umbilical. Estas células são capazes de

diferenciar-se nos constituintes mielóides e linfóides do sangue e há muito tempo vem sendo utilizadas com sucesso em transplantes para pacientes com falência medular ou com cânceres hematológicos (11).

Mais recentemente foi isolado outro tipo de CTA também constituinte da medula óssea, porém com propriedades diferentes das hematopoiéticas: as células-tronco mesenquimais (CTM), também chamadas, células-tronco estromais (12).

1.2 Células-tronco mesenquimais

As CTMs são consideradas células multipotentes não hematopoiéticas com propriedades de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e, talvez, não mesenquimais (12). O primeiro relato das CTMs foi realizado pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores, na década de setenta, que as descreveu como sendo células morfologicamente semelhantes a fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície plástica (13, 14). Vários estudos posteriores relataram a multipotência destas células, ou seja, a capacidade de diferenciarem-se em células derivadas do mesoderma embrionário: osteócitos, condroblastos e adipócitos (13, 15-17).

1.2.1 Denominações utilizadas e caracterização básica das CTM

As CTMs, sobretudo aquelas oriundas da medula óssea humana, diferem muito quanto à nomenclatura utilizada. Inicialmente foram chamados de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F, do inglês, *colony forming unit fibroblast*), devido à capacidade de aderir ao plástico das garrafas de cultivo e formar colônias de células similares aos fibroblastos (18). Foram também denominadas células-tronco ou progenitoras mesenquimais, pois, diferenciavam-se em uma grande variedade de células não-hematopoéticas (19) e de células estromais da medula óssea, porque pareciam originar-se de estruturas de suporte da medula óssea e podiam ser utilizadas como *feeder layer* para o crescimento das células-tronco hematopoiéticas em cultura (13).

Em 2005, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT – *International Society for Cellular Therapy*) propôs uma nova nomenclatura para designar a população de células fibroblastóides que crescem aderentes ao plástico, isoladas dos mais diversos tecidos e com capacidade de diferenciação multipotencial *in vitro*: células mesenquimais estromais multipotentes. A sigla CTM (MSC – do inglês, *Mesenchymal Stem Cell*) também pode ser utilizada para estas situações, mas deve ser corretamente identificada (20).

Ainda de acordo com o ISCT, uma determinada população de células será classificada como célula-tronco mesenquimal quando apresentar três características-chaves: a primeira é a capacidade de adesão seletiva à superfície do material onde são cultivadas (geralmente plástica); a segunda é a expressão de determinados antígenos de membrana e, por fim, que as células possam ser diferenciadas em tecido ósseo, adiposo e cartilaginoso após determinados estímulos específicos (20).

1.2.2 Ontogenia e fontes de CTM

A ontogenia da CTM ainda não é bem esclarecida. Acredita-se que a CTM multipotente descenda de uma célula pluripotente ou mesmo de outra multipotente presente durante a vida fetal em uma frequência muito maior. As CTMs situam-se na fração estromal da medula óssea, no nicho endosteal e perivascular, que provê um microambiente que fornece suporte para o crescimento e diferenciação de CTH e para hematopoiese (21).

No ser humano, a medula óssea é a principal fonte de CTM, mas também já foram isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como o tecido muscular esquelético (22), tecido adiposo (23), membrana sinovial (24), endotélio da veia umbilical (25), veia safena (26), rim (27), sangue de cordão umbilical e placentário (28, 29), cartilagem articular (30), ligamento periodontal (31) e pulmão (32).

Tem-se estimado que a CTM represente 0,01 – 0,0001% das células nucleadas na medula óssea de um adulto (33).

Se a CTM circula ou não no sangue periférico, ainda é uma questão em aberto. Fernandez *et al* (34) reportaram a presença de células “estromais” no sangue periférico mobilizado. Já os estudos de Zvaifler *et al.* (35) e Kuznetsov *et al.* (36) demonstraram que a CTM circula no sangue periférico, mas que são extremamente raras. Um estudo feito por Kassis *et al*, com o auxílio de micro-esferas de fibrina,

isolaram CTM de sangue periférico mobilizado, coletado por aférese, de doadores normais (37).

1.2.3 Isolamento e cultivo de CTM da medula óssea

Atualmente existem diversos métodos de isolamento *in vitro* de CTM da medula óssea. Tradicionalmente, estas células são isoladas utilizando-se o método originalmente descrito por Friedenstein (38), que se baseia na capacidade que estas células apresentam de adesão ao plástico.

Resumidamente, o aspirado de medula óssea é processado utilizando-se um gradiente de centrifugação como, por exemplo, o Ficoll. As células são coletadas e plaqueadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*), enriquecido com soro fetal bovino (SFB) e penicilina/estreptomicina. Após 24h (39) à 72h (15, 40), todo o meio de cultivo é trocado com o objetivo de remover as células não aderentes. As células restantes permanecem sendo cultivadas em câmara úmida, a 37°C com 5% de CO₂ e o meio de cultivo é trocado a cada 3 a 4 dias até atingir confluência em torno de 80%, o que ocorre por volta de 14 dias, quando as células então, são tripsinizadas (desaderidas da garrafa de cultura) e expandidas por passagens subsequentes (17). Estas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de várias passagens sucessivas para se obter grandes quantidades de CTMs, com ausência de outros tipos celulares. Porém, se mais passagens são necessárias, isto pode alterar a qualidade das CTMs (21).

A expansão de CTM *in vitro* por longas passagens pode levar à possibilidade de haver mudanças genéticas ou epigenéticas, o que pode levar a uma transformação celular (41).

O cultivo de CTM na presença de reagentes de origem xenogênica, como o soro fetal bovino, também limita a utilização destas células em ensaios clínicos. Diversos autores demonstraram a capacidade de substituir o uso de SFB pelo lisado plaquetário (LP) no cultivo de CTM (42-46). Este procedimento previne a contaminação das células cultivadas com patógenos bovinos e a xenoimunização, mantendo a capacidade de proliferação e diferenciação, e assim permite a utilização destas células cultivadas na terapia celular para combater diversas doenças. Outros

métodos de isolamento de CTM já foram descritos como a seleção positiva (47) ou negativa (29, 40) em colunas.

1.2.4 Morfologia e características imunohistoquímicas da CTM

As CTMs originam colônias após cultivo celular em baixa densidade ou após *sorting* de uma única célula (48).

Na microscopia, a CTM se apresenta como uma célula fibroblastóide alongada, fusiforme e pontiaguda, com núcleo eucromático, oval, grande e central e com citoplasma abundante. Também podem ser observadas, à microscopia eletrônica, cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, vacúolos lipídicos cheios ou vazios, corpos lisossomais e grande quantidade de polirribossomos e ribossomos livres citoplasmáticos, além de filamentos de actina bem organizados em suas extremidades (49). Quando senescentes, as CTMs são grandes, largas, achatadas, proliferam lentamente e expressam β -galactosidase associada à senescência (50). A figura 1 mostra a CTM visualizada por microscopia.

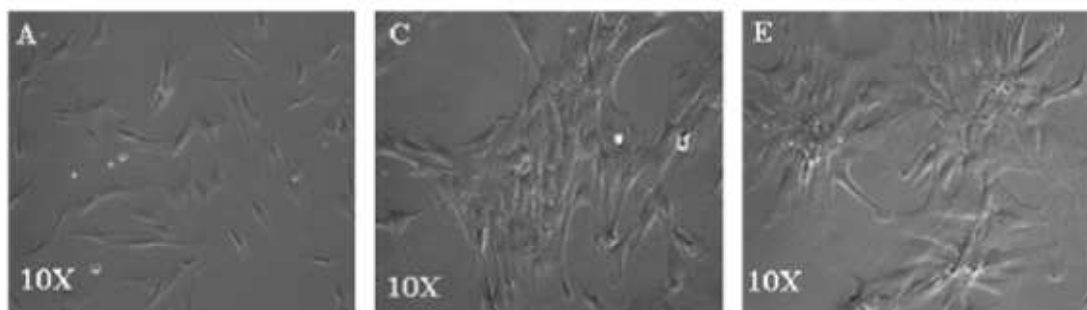


FIGURA 1 – Célula-tronco mesenquimal. (Adaptado de Grayson *et al*) (51).

1.2.5 Imunofenotipagem das CTMs

As CTMs expandidas em cultura expressam antígenos de membrana que podem ser detectados pela citometria de fluxo. O padrão de expressão de antígenos mais aceito é a expressão positiva de CD29, CD105, CD73, CD90 em 95% ou mais das células em cultura e ausência de expressão de CD45, CD34, CD3, CD14, CD19 e HLA-DR que devem existir em menos de 2% da população celular (52, 53).

1.2.6 Fases do cultivo de CTM e a relação com a citogenética

A vida de uma CTM pode ser dividida em três fases dependendo da sua idade *in vitro* - fase 1: quando completa menos de 50% da vida celular; fase 2: fase crescimento lento, na qual conclui 50 a 80% da sua existência; fase 3: fase de senescência, durante a qual há uma parada na proliferação celular. No campo da biogerontologia, baseado em características morfológicas, bioquímicas e nas características moleculares, as células na fase 1 são consideradas jovens e na fase 3 senescentes (54). Quando cultivadas ainda jovens, as CTMs mantêm seu cariótipo normal e não perdem a atividade da telomerase. Contudo, no cultivo extensivo, as funções celulares diminuem. Este fato é confirmado pelos sinais evidentes de senescência e/ou apoptose (16, 55).

A senescência replicativa é um fenômeno característico do cultivo de células. Há uma parada na proliferação celular, o que limita a geração de um grande número de células. Isto ocorre devido a vários fatores, incluindo o progressivo encurtamento do telômero, pela perda progressiva da atividade da telomerase (56). A estabilidade cromossômica de CTM é, portanto, relevante para sua preparação na aplicação na medicina regenerativa (57).

Alguns experimentos demonstram que as CTM humanas mantêm morfologia, fenótipo e características genômicas estáveis durante a expansão (58) enquanto outros estudos sugerem alterações genômicas que aparecem em culturas após várias passagens sob cultivo. Grigorian *et al.* observou que em uma de duzentas culturas de CTM examinadas, obtida de doadores sem patologias e cultivadas sob condições padrão, houve alterações morfológicas, proliferativas e cariotípicas no decorrer das passagens. As células dessa cultura anormal mantiveram características imunofenotípicas de células mesenquimais, porém algumas delas (em torno de 15-25%) apresentaram numerosas aberrações cromossômicas numéricas e estruturais (59). O surgimento de características tumorigênicas foi demonstrado em culturas de CTMs humanas após um grande número de passagens *in vitro* (>50) (59, 60). Por este motivo, o uso das CTM na terapia celular é realizado com células cultivadas nas primeiras passagens, evitando o risco de infusão de células com possíveis alterações citogenéticas.

1.2.7 Diferenciação

Como mencionado anteriormente, as CTM são capazes de formar osteócitos, condrócitos e adipócitos (figura 2) tanto *in vivo* como *in vitro*. Somada à identificação das CTM baseadas em suas características fenotípicas, a capacidade destas células formarem, ao menos, estes três tipos celulares distintos são um dos critérios funcionais disponíveis para identificá-las como sendo uma CTM (61).

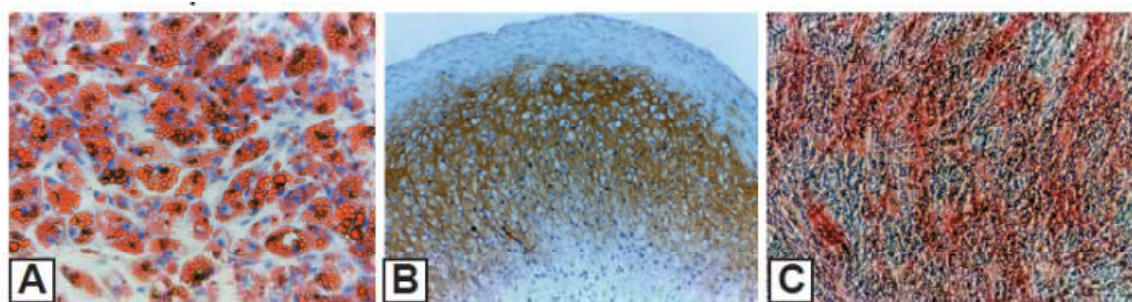


FIGURA 2 - Célula-tronco mesenquimal diferenciada. (A) adipócitos, (B) condrócitos e (C) osteócitos (Adaptado de Pittenger *et al*) (17).

1.3 Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro Aguda

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico é uma opção de tratamento potencialmente curativa, e o tratamento de escolha para doenças malignas e não malignas, principalmente para as hematopoiéticas. Contudo, o TCTH é acompanhado de elevada morbi-mortalidade, sendo a Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) aguda (DECHa) e crônica (DECHc) a principal complicação deste tipo de transplante (62, 63).

A DECHa continua a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade imediata no campo dos TCTH alogênicos, mesmo quando o grau de compatibilidade do antígeno leucocitário humano (HLA) é elevado (64). A DECHa usualmente compromete a pele, o trato gastrointestinal e/ou o fígado e ocorre geralmente dentro de 100 dias após o TCTH alogênico. A fisiopatologia da DECHa ocorre em três fases já conhecidas. A primeira é o resultado do regime de condicionamento que é conhecida como “tempestade de citocinas”, a segunda é uma fase de ativação das células T, que é caracterizada pela ativação de células T do doador por citocinas e células apresentadoras de antígenos (APC) do receptor. A terceira fase é a efetora,

em que células T iniciam o processo de agressão às células de alguns tecidos do receptor (64).

A DECHc é a principal causa de morbidade e mortalidade tardia nos sobreviventes ao TCTH, sendo as manifestações clínicas semelhantes a doenças autoimunes ou outras desordens imunológicas como esclerodermia, cirrose primária, bronquite obliterante, citopenias imunes e imunodeficiência crônica. Os sintomas costumam se apresentar em um prazo de 1 ano após o TCTH alogênico e muitas vezes é precedida de DECHa. As manifestações da DECHc podem estar limitadas a um único órgão ou tecido ou pode ser generalizadas. A DECHc pode levar a consequências debilitantes, como por exemplo, contraturas musculares com “congelamento” das articulações, perda da visão, doença pulmonar grave, frequentemente terminal, e imunossupressão crônica profunda (65).

1.4 Terapêutica para a DECH Aguda

Devido ao fato de a etiologia da DECHa ser resultante da reação citotóxica alogênica dos linfócitos do doador, o tratamento da DECHa visa à imunossupressão com a expectativa de instituir a imunotolerância doador-receptor sem anular o enxerto-versus-linfoma/leucemia (EVL) (66). O tratamento deve ser iniciado em pacientes que apresentam grau II ou superiores de DECHa. Os corticosteroides continuam sendo a terapia de primeira linha de tratamento (67) e um estudo recente demonstrou que os pacientes que tiveram uma resposta inicial a corticosteroides possuem mais chances de sobrevida (64). Indivíduos que responderam a doses altas da droga até o 5º dia após o início do tratamento, tiveram 27% de mortalidade, enquanto que, a mortalidade nos que necessitaram de tratamento prolongado com doses elevadas foi de 49% (3).

Contudo, apenas 60 a 70% dos pacientes com DECHa respondem ao tratamento padrão com o uso de corticosteroides. Pacientes com DECHa severa e resistente a este medicamento tem poucas alternativas de tratamento, não existindo protocolo terapêutico estabelecido e sobrevida, em dois anos, de 10% (68).

A profilaxia clássica da DECH consiste em uma combinação de um inibidor da calcineurina (ciclosporina A (CsA) ou tacrolimus) e "short course" de metotrexato

(MTX) (69). Para os grupos de maior risco ou grupos que receberam enxertos não convencionais (tais como os doadores com disparidades HLA e pacientes mais velhos, por exemplo), a melhor profilaxia está menos claramente estabelecida e outros fármacos imunossupressores tem sido utilizados, como o sirolimus em combinação com tacrolimus e dose baixa (5mg/m²) de MTX (70). A eficácia do micofenolato mofetil (MMF) associado com CsA tem sido estudada principalmente após regimes de condicionamento de intensidade reduzida (RIC). MMF pode substituir MTX na combinação CsA padrão devido à menor ocorrência de mucosite e boa tolerância geral (71).

Para os pacientes que receberam enxertos com disparidades HLA, a imunossupressão mais intensa é normalmente necessária. Métodos *ex vivo* de depleção de células T (TCD – *T cell depletion*), bem como métodos farmacológicos *in vivo* de TCD (como globulina antitimocítica ou alemtuzumab) tem sido utilizados. Em geral, estes métodos reduzem a DECHa, mas aumentam a incidência de infecção (devido ao atraso de reconstituição do sistema imunitário) e a incidência de recaída (devido a um efeito de diminuição do EVL) (72).

Uma vez estabelecida a DECHa, a primeira linha de tratamento é metilprednisolona (MP) na dose de 2 mg/Kg/d. Em caso de falha, existem várias alternativas de tratamento de segunda linha: tacrolimus, MMF, sirolimus, globulina antitimocítica (se não utilizados na profilaxia), anticorpos monoclonais (Anticorpo anti Receptor de IL-2, Anticorpos Anti-TNF α , Anticorpos Anti-CD52, Anticorpos Anti-CD147 ou Anti-CD3), e fotoaférese extracorpórea (PUVA) (68, 73, 74).

Estudos recentes sobre tratamento da DECHa com células-tronco mesenquimais tem recebido considerável atenção, pois há relatos de resultados promissores (75-78). Contudo, existe uma deficiência de estudos clínicos expressivos de fase III que tenham comparado CTM com a manutenção dos corticoesteroides ou outros imunomoduladores (67, 79).

1.5 Uso de CTM como terapia celular para tratamento da DECH Aguda

O tratamento com CTM para a DECHa envolve infusões de células não HLA idênticas ou *third party*, HLA idênticas de doadores não aparentados ou aparentados

de MO. As CTMs têm sido clinicamente aplicadas para tratar a DECHa devido ao fato de inibirem a proliferação e a atividade citotóxica das células do sistema imune (80).

O primeiro ensaio clínico utilizando precursores autólogos de CTM (mononucleares de MO) foi em 1995 (81). Após este estudo, uma vasta gama de ensaios clínicos tem sido conduzidos para testar exequibilidade e segurança (fase I), prova de eficácia (fase II) e poucos estudos comparando o tratamento com CTM com tratamento “padrão” (fase III). De uma forma geral, estes estudos mostraram a exequibilidade e segurança com ausência de efeitos adversos imediatos ou tardios e respostas parciais ou completas (82).

Vários ensaios clínicos FASE I/II sobre a utilização de CTM no tratamento da DECHa resistente aos corticoesteroides tem sido relatados (76, 83-86). Le Blanc *et al* (2004) realizaram o primeiro estudo em transplante haploidêntico, utilizando as CTMs do doador em um menino de 9 anos com DECHa grau IV de trato gastrointestinal e fígado. A resposta foi completa e o paciente permanecia em remissão após um ano da infusão (87). Em estudo subsequente, reportado por Ringdén *et al* (2006), foram tratados oito pacientes com DECHa resistente aos esteroides de grau III-IV e um paciente com DECHc. A DECHa desapareceu completamente em seis dos oito pacientes e o tempo de sobrevida foi significativamente maior do que os dezesseis pacientes controles históricos (pacientes com DECHa de trato gastrointestinal de graus II-IV, resistentes à terapêutica, que não foram tratados com CTM); sendo que cinco pacientes continuaram vivos entre 2 meses a 3 anos após a infusão de CTM (86).

Um estudo multicêntrico seguinte realizado por Le Blanc *et al.* descreveu 55 pacientes tratados com CTM em diferentes países da Europa em que todos os pacientes apresentavam DECHa grau II a IV, resistente a corticoesteroides. A resposta terapêutica com as CTMs ocorreu em 52% dos pacientes de forma independente da compatibilidade HLA – já que das 92 infusões realizadas 69 foram preparadas a partir de doadores sadios, não relacionados e não HLA idênticos (*third party*) (76).

Kurtzberg *et al* apresentaram em 2010, no encontro da *American Society of Blood and Marrow Transplantation*, um estudo fase II sobre o uso de CTM alogênica

third party como tratamento da DECH severa resistente aos corticoesteroides em 59 crianças. Após 28 dias da infusão a resposta global foi de 64% e esta resposta se correlacionou com a sobrevida em 100 dias. Este estudo confirmou que a terapia com CTM parece ter um excelente perfil risco/benefício (88). Martin *et al* apresentaram neste mesmo encontro, os resultados de um estudo randomizado, placebo-controlado, multicêntrico de fase III, sobre o uso de CTM (Prochymal[®]) no tratamento de DECHa resistente/refratária que envolveu 244 pacientes. Embora a resposta após 28 dias da infusão de CTM não tenha sido significativamente melhor na população tratada, observou-se uma diferença significativa na resposta de pacientes que apresentavam DECHa de fígado e gastrointestinal (89).

Von Bahr *et al* examinaram 108 amostras de tecidos obtidos na necropsia de 18 pacientes que tinham recebido CTM HLA incompatível dos quais em 15 pacientes, as amostras foram examinadas pela reação da polimerase em cadeia (PCR). Não foram verificados sinais de formação de tecido ectópico ou tumores malignos originados das CTM obtidas dos doadores no exame macroscópico ou histológico. O DNA de CTM do doador foi detectado em alguns tecidos, incluindo nódulos linfáticos, pulmões e intestino em oito pacientes. Esta detecção de DNA de doadores de CTM foi negativamente correlacionada com o tempo de infusão e coleta das amostras e não houve correlação entre o enxerto de CTM e a resposta ao tratamento (90).

Em geral, os estudos descritos mostram que a CTM parece ser uma opção segura para o tratamento da DECHa para indivíduos que apresentam resistência ao tratamento padrão e estas células não estão associadas com riscos a longo prazo, porém deve haver cautela quanto a possíveis tendências para publicações positivas sobre este assunto. Outros grandes trabalhos randomizados estão em andamento a fim de melhor caracterizar e avaliar o impacto destas infusões.

Quanto ao número ideal de CTMs a serem infundidas, um estudo de fase II (patrocinado por Osiris Therapeutics[®]) avaliou 31 pacientes com DECHa grau II-IV que receberam CTMs obtidas de doadores HLA não compatível *third party*. Os pacientes foram distribuídos aleatoriamente para receber uma dose baixa de CTM (2×10^6 células/kg) ou infusões de dose elevada (8×10^6 células/kg). As infusões (62

em 31 pacientes) foram bem toleradas com 77% de resposta completa em 28 dias após a infusão, e a dose de células não pareceu afetar a resposta (84).

Por outro lado, outros grupos publicaram resultados menos animadores sobre tratamentos com o uso da terapia com CTM. Recentemente, Forslöv *et al*, realizaram um estudo de coorte retrospectivo em que sugeriram que o tratamento com CTM pode ser um fator de risco para morte por pneumonia após o TCTH (91). Alguns autores acreditam que estes resultados negativos seriam devidos à heterogeneidade dos pacientes: regimes diferentes de TCTH, grau de gravidade da DECHa e órgão alvo e à diferenças na preparação e origem das CTMs – células provenientes de um único ou múltiplos doadores (HLA relacionados ou não), de medula óssea ou tecido adiposo, ou ainda à utilização de produtos de origem animal na cultura celular (como o SFB) (83, 92).

Neste contexto, foram identificados anticorpos contra proteínas do SFB em alguns pacientes que receberam CTM expandidas com este produto (83). Uma solução neste caso é a substituição deste soro de origem animal por soro humano rico em plaquetas – o lisado plaquetário, que parece ter os nutrientes necessários para a expansão das CTMs em cultura. Estudos *in vitro* demonstraram que o LP é tão efetivo quanto o SFB para a expansão de CTM (45, 83), e o uso *in vivo* também já foi estudado demonstrando êxito deste suplemento em humanos (83). Dessa forma, o LP parece ser mais seguro do ponto de vista biológico, e tão eficiente quanto o SFB para a expansão celular.

1.6 Mecanismo de ação das CTMs

As CTMs interagem com outras células do sistema imune; contudo, os mecanismos de sua atividade imunomodulatória ainda não são totalmente compreendidos. Sabe-se que as CTMs podem interagir, principalmente, com as células *Natural Killer* (NK), os monócitos e as células T regulatórias (93-95). Estas células também inibem a resposta imune de maneira complexa envolvendo mudanças na maturação das células apresentadoras de antígenos, bem como supressão da diferenciação e função de células dendríticas (DC) derivadas de monócitos. Além disso, a CTM altera o perfil de secreção de citocinas de células T

efetoras, células dendríticas e células NK e modifica o perfil TH1 pró-inflamatórias para o perfil anti-inflamatório TH2. Estas propriedades podem ser úteis para a prevenção e tratamento da DECH e a inibição da rejeição do enxerto (96). Estes achados, no entanto, foram na sua maioria definidos em estudos *in vitro*.

O uso da CTM em aplicações clínicas requer o entendimento das características biológicas que contribuem para seus efeitos terapêuticos. Atualmente, quatro propriedades são consideradas mais importantes: 1) habilidade de migrar aos sítios da inflamação quando infundidas de forma intravenosa; 2) habilidade de se diferenciar em outros tipos celulares; 3) habilidade de secretar múltiplas moléculas bioativas capazes de recuperar células lesadas e inibir a inflamação; 4) a ausência ou baixa imunogenicidade mantendo o papel imunomodulatório (97).

1.7 Capacidade da CTM de migrar e enxertar

Como visto acima, as CTM expandidas *in vitro* tem capacidade de migrar para sítios de inflamação após administração sistêmica, e esta migração celular parece depender da amplitude de sinais estimulatórios ou regulatórios, que podem ser fatores de crescimento ou quimiocinas secretadas por células lesadas ou células imunes envolvidas na fisiopatogenia da DECH (98). Estudos tem demonstrado que a migração de CTM é controlada por uma larga escala de receptores de fatores de crescimento tirosina quinase dependentes como o Fator de Crescimento Derivado Plaquetário (PDGF), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina -1 (IGF-1) e quimiocinas como CCR2, CCR3, CCR4 ou CCL5, como visto em ensaios de migração *in vitro* (99).

1.8 Secreção de moléculas bioativas pela CTM

As CTMs podem também secretar múltiplas moléculas bioativas, incluindo fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, das quais podem exercer efeitos moduladores em local específico. A tabela 1 mostra algumas das principais moléculas secretadas pelas CTM e suas respectivas funções.

Parekkadan *et al* utilizando o método *Cytokine Antibody Array* analisaram 174 proteínas secretadas por CTMs ativadas, detectando 69 proteínas relacionadas à atividade anti-apoptótica e à regeneração celular, na sua maioria fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (100).

TABELA 1 – Principais moléculas secretadas pelas CTM e suas funções

Molécula	Função
Prostaglandina-E2 (PGE2)	Mediador anti-proliferativo (101); anti-inflamatório (102)
Interleucina-10 (IL-10)	Anti-inflamatória (79)
Fator de crescimento transformador β 1 (TGF β 1), Fator de crescimento do hepatócito (HGF)	Suprime proliferação de linfócito T(103)
Antagonista de receptor interleucina-1	Anti-inflamatório (104)
Isoforma G de antígeno leucocitário humano (HLA-G5)	Anti proliferação para célula-T naive (105)
Peptídeo antimicrobiano LL-37	Peptídeo antimicrobiano e reduz inflamação (106)
Angiopoetina-1	Restaura permeabilidade de proteína epitelial (107)
Matriz Metaloproteinase 3 e 9 – (MMP3, MMP9)	Mediador de neurovascularização (108)
Fator de crescimento de queratinócitos	Transporte de fluído alveolar epitelial (109)
Fator de crescimento endotelial (VEGF), Fator de crescimento fibroblastóide básico (bFGF), Fator de crescimento placentário (PIGF), Proteína-1 quimioatrativa de monócitos (MCP-1)	Aumento de proliferação de células endoteliais e células do músculo liso (110), (111)

1.9 Efeitos imunomodulatórios da CTM

A habilidade da CTM de modular o sistema imune foi primeiramente reconhecida em 2000 em um estudo realizado por Liechty *et al* (112). A partir daí, vários estudos confirmaram as propriedades imunomodulatórias da CTM. Entretanto, os mecanismos precisos relacionados à imunomodulação continuam sem ser completamente compreendidos. O contato célula-célula e/ou a liberação de fatores imunossupressores solúveis são as principais linhas de estudo deste assunto. Como já referido, as CTMs podem interagir com uma vasta gama de células do sistema imunológico, incluindo os linfócitos T, linfócitos B, células NK, células dendríticas e

macrófagos. A tabela 2 mostra os principais efeitos imunomodulatórios das CTM nestas células.

A baixa imunogenicidade das CTM parece ser devida sua baixa expressão de moléculas do MHC classe I e ausência de MHC classe II. Além disso, as CTM não expressam moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 ou CD86, que estão envolvidas na ativação de células T e na rejeição de transplante (113, 114). Vários estudos tem demonstrado que as CTM indiferenciadas ou diferenciadas tem efeito supressor na proliferação de linfócitos cultivados na presença de mitógenos e alo-antígenos com a redução concomitante na produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (113, 115, 116).

Tem sido reportado que as CTM humanas expressam receptores do tipo Toll-Like Receptors (TLR) TLR1 ao TLR10 (117-121). Estes receptores são encontrados em células lesadas ou infectadas compondo a resposta imune primária. Níveis basais de expressão de TLR humano em CTMs obtidas de MO e de tecido adiposo são sensíveis ao estímulo do ambiente em que se encontram já que sua expressão pode ser super regulada por hipóxia (para TLR1, TLR2, TLR5 e TLR9) ou por condições inflamatórias pelo IFN γ , TNF, IFN α e IL-1 β (para TLR2, TLR3, TLR4) (122, 123).

Em um ambiente não inflamatório, as CTM expressam baixos níveis de ciclooxigenase 2 (COX-2), PGE2, TGF- β , indoleamina (IDO), entre outros fatores. No entanto citocinas pró-inflamatórias regulam drasticamente a secreção de fatores anti-inflamatórios pelas CTMs. Um exemplo é que o IFN- γ induz o aumento da secreção de IDO, HGF e TGF- β e o TNF- α induz o aumento da secreção de PGE2 pelas CTM (124-126).

TABELA 2 – Efeitos imunomodulatórios das CTM em células imunes.

Tipo celular	Efeitos da CTM (REF)	Fatores Solúveis Envolvidos (REF)
Linfócito T	Suprime a proliferação de células T induzida por estímulos celulares ou mitógenos não específicos (103); Altera o perfil de secreção de citocina de células T efectoras e naive (124); Promove a expansão e função de células T regulatórias (127) Indução da apoptose de Célula T ativada (128) Geração de T regulatória (129)	IL-1 β (130) TGF β 1 (130) HGF (103) PGE2 (124) IDO (128) LIF (131) IGF (132) HLA-G (131) CCL1 (129)
Linfócito B	Inibe a proliferação de linfócito B (133); Afeta propriedades quimiotáticas de célula B (134); Supressão de diferenciação de célula B (135)	IFN- γ (136) IL-6 (137)
Célula NK	Altera o fenótipo de célula NK e suprime a proliferação, secreção de citocinas e citotoxicidade contra alvos que expressam HLA classe I (138)	TGF β (138) IDO (139) HLA-G (105) PGE2 (139)
Células Dendríticas (DC)	Influencia na diferenciação, maturação, e função de DC diferenciadas em monócitos (140); Suprime migração, maturação e apresentação de antígeno de DC (141)	M-CSF (142)
Macrófagos	Recrutamento de macrófagos M2; Conversão de macrófagos M1 (pró-inflamatórios) em M2 (anti-inflamatórios); Atenua respostas inflamatórias dos macrófagos	CCL3 (143) CCL12 (143) CXCL2 (143) PGE2 (143) KYN (143) TSG6 (143)

REFERÊNCIAS

1. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):287-98.
2. Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1044:132-8.
3. Vogel G. Can old cells learn new tricks? *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1418-9.
4. Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, et al. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells*. 1996 Mar;14(2):239-48.
5. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19(3):193-204.
6. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1427-30.
7. Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *J Physiol Paris*. 2002 Jan-Mar;96(1-2):81-90.
8. Meirelles LS, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioscience*. 2009;14:4281-98.
9. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*. 2005 Oct;85(4):1373-416.
10. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1431-3.
11. Hirao A, Arai F, Suda T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle*. 2004 Dec;3(12):1481-3.
12. Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2005 Dec;5(12):1571-84.
13. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.
14. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393-403.
15. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000 Aug;28(8):875-84.
16. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001 Jun;226(6):507-20.
17. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
18. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.
19. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.
20. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
21. Bydlowski SP. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009;31:25-35.
22. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of

skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 2001 Sep 1;264(1):51-62.

23. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.

24. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001 Aug;44(8):1928-42.

25. Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Sep;36(9):1179-83.

26. Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siqueira R, et al. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Exp Cell Res*. 2005 Oct 1;309(2):340-4.

27. Almeida-Porada G, El Shabrawy D, Porada C, Zanjani ED. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Exp Hematol*. 2002 Dec;30(12):1454-62.

28. Lee MW, Choi J, Yang MS, Moon YJ, Park JS, Kim HC, et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 16;320(1):273-8.

29. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1669-75.

30. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2004 May;50(5):1522-32.

31. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

32. Sabatini F, Petecchia L, Tavian M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*. 2005 Aug;85(8):962-71.

33. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*. 2006 May;20(3):161-71.

34. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant*. 1997 Aug;20(4):265-71.

35. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000;2(6):477-88.

36. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001 May 28;153(5):1133-40.

37. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant*. 2006 May;37(10):967-76.

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

39. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*. 1999 Nov;107(2):275-81.

40. Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2004;6(4):372-9.
41. Lepperdinger G, Brunauer R, Jamnig A, Laschober G, Kassem M. Controversial issue: is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Exp Gerontol*. 2008 Nov;43(11):1018-23.
42. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005 Nov;205(2):228-36.
43. Horn P, Bokermann G, Cholewa D, Bork S, Walenda T, Koch C, et al. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2010 Nov;12(7):888-98.
44. Salvade A, Della Mina P, Gaddi D, Gatto F, Villa A, Bigoni M, et al. Characterization of platelet lysate cultured mesenchymal stromal cells and their potential use in tissue-engineered osteogenic devices for the treatment of bone defects. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Apr;16(2):201-14.
45. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2007 Aug;47(8):1436-46.
46. Xia W, Li H, Wang Z, Xu R, Fu Y, Zhang X, et al. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*. 2011 Jun 1;35(6):639-43.
47. Campioni D, Lanza F, Moretti S, Dominici M, Punturieri M, Pauli S, et al. Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD105(+) and fibroblast(+) stromal cells from AML: implications for their plasticity along endothelial lineage. *Cytotherapy*. 2003;5(1):66-79.
48. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004 May;32(5):414-25.
49. Tagami M, Ichinose S, Yamagata K, Fujino H, Shoji S, Hiraoka M, et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. *Cell Tissue Res*. 2003 Apr;312(1):31-40.
50. Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol*. 2005 Dec;40(12):926-30.
51. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jul 6;358(3):948-53.
52. Harichandan A, Buhring HJ. Prospective isolation of human MSC. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Mar;24(1):25-36.
53. 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.
54. 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 Dec;33(6):919-26.
55. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 May;11(5):321-34.

56. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004 Nov;95(5):209-14.
57. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol*. 2010;11:11.
58. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*. 2007 Apr;211(1):121-30.
59. Grigorian AS, Kruglyakov PV, Taminkina UA, Efimova OA, Pendina AA, Voskresenskaya AV, et al. Alterations of cytological and karyological profile of human mesenchymal stem cells during in vitro culturing. *Bull Exp Biol Med*. 2010 Dec;150(1):125-30.
60. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3035-9.
61. 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.
62. 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 Oct 15;104(8):2254-62.
63. Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch Intern Med*. 2002 Jul 22;162(14):1558-66.
64. Voltarelli JC. *Transplante de células-tronco hematopoéticas*: Atheneu.
65. 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 Dec;11(12):945-56.
66. 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 transplantation*. Sep 6.
67. 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 Jan 5;119(1):16-25.
68. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4119-26.
69. 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 Mar 20;314(12):729-35.
70. 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 Apr 1;109(7):3108-14.
71. Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, Petersdorf E, Hegenbart U, Sandmaier BM, et al. Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated

donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1620-9.

72. Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet*. 2005 Aug 27-Sep 2;366(9487):733-41.

73. Bacigalupo A. Management of acute graft-versus-host disease. *Brazilian Journal of Haematology*. 2007 Apr;137(2):87-98.

74. Kim SS. Treatment options in steroid-refractory acute graft-versus-host disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Pharmacother*. 2007 Sep;41(9):1436-44.

75. Ringden O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Mar;24(1):65-72.

76. 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 May 10;371(9624):1579-86.

77. Baron F, Lechanteur C, Willems E, Bruck F, Baudoux E, Seidel L, et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jun;16(6):838-47.

78. Wernicke CM, Grunewald TG, Juenger H, Kuci S, Kuci Z, Koehl U, et al. Mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory GvHD: a review of the literature and two pediatric cases. *Int Arch Med*. 2011;4(1):27.

79. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009 Jan;15(1):42-9.

80. Lee ST, Jang JH, Cheong JW, Kim JS, Maemg HY, Hahn JS, et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol*. 2002 Sep;118(4):1128-31.

81. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*. 1995 Oct;16(4):557-64.

82. Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:20.

83. von Bonin M, Stolzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Holig K, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Feb;43(3):245-51.

84. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Jul;15(7):804-11.

85. Lucchini G, Introna M, Dander E, Rovelli A, Balduzzi A, Bonanomi S, et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Sep;16(9):1293-301.
86. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2006 May 27;81(10):1390-7.
87. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004 May 1;363(9419):1439-41.
88. Kurtzberg J, Prasad V, Grimley MS, Horn B, P.A.; C, Jacobsohn D. Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (Prochymal) as a rescue agent for severe treatment resistant GVHD in pediatric patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2010;16:1.
89. Martin PJ, Uberti JP, Soiffer RJ, Klingemann H, Waller EK, Daly AS. Prochymal improves response rates in patients with steroid-refractory acute graft versus host disease (SR-GVHD) involving the liver and Gut: results of a randomized, placebo-controlled, Multicenter phase III trial in GVHD. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2010;16:2.
90. von Bahr L, Sundberg B, Lonnie L, Sander B, Karbach H, Hagglund H, et al. Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Apr;18(4):557-64.
91. Forslow U, Blennow O, LeBlanc K, Ringden O, Gustafsson B, Mattsson J, et al. Treatment with mesenchymal stromal cells is a risk factor for pneumonia-related death after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2012 Sep;89(3):220-7.
92. Arima N, Nakamura F, Fukunaga A, Hirata H, Machida H, Kouno S, et al. Single intra-arterial injection of mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Cytotherapy.* 2010 Apr;12(2):265-8.
93. Di Ianni M, Del Papa B, De Ianni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol.* 2008 Mar;36(3):309-18.
94. Grazia MS, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, L. M. 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.* 2011;107(4):7.
95. Parham P, editor. *O Sistema Imune: Artmed; 2001.*
96. Nasef A, Mathieu N, Chapel A, Frick J, Francois S, Mazurier C, et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation.* 2007 Jul 27;84(2):231-7.
97. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol.* 2012;5:19.
98. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 2008 May;15(10):730-8.
99. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* 2010;19(6):667-79.

100. Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One*. 2007;2(9):e941.
101. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One*. 2010;5(12):e14247.
102. Foraker JE, Oh JY, Ylostalo JH, Lee RH, Watanabe J, Prockop DJ. Cross-talk between human mesenchymal stem/progenitor cells (MSCs) and rat hippocampal slices in LPS-stimulated cocultures: the MSCs are activated to secrete prostaglandin E2. *J Neurochem*. 2011 Dec;119(5):1052-63.
103. 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 May 15;99(10):3838-43.
104. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 26;104(26):11002-7.
105. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):212-22.
106. 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 Dec;28(12):2229-38.
107. Fang X, Neyrinck AP, Matthay MA, Lee JW. Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured human alveolar type II cells by secretion of angiopoietin-1. *J Biol Chem*. 2010 Aug 20;285(34):26211-22.
108. Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, Jung J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(6):867-76.
109. Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 22;106(38):16357-62.
110. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004 Mar 30;109(12):1543-9.
111. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004 Mar 19;94(5):678-85.
112. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000 Nov;6(11):1282-6.
113. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003 Oct;31(10):890-6.

114. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2003 Mar-Apr;10(2):228-41.
115. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002 Jan;30(1):42-8.
116. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 2005;12(1):47-57.
117. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, et al. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells.* 2008 Jan;26(1):279-89.
118. Lombardo E, DelaRosa O, Mancheno-Corvo P, Menta R, Ramirez C, Buscher D. Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. *Tissue Eng Part A.* 2009 Jul;15(7):1579-89.
119. Opitz CA, Litzenger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Koppel A, et al. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells.* 2009 Apr;27(4):909-19.
120. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood.* 2007 Feb 15;109(4):1422-32.
121. 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 Jan;26(1):99-107.
122. Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells.* 2006 Dec;24(12):2744-52.
123. Raicevic G, Rouas R, Najar M, Stordeur P, Boufker HI, Bron D, et al. Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Hum Immunol.* 2010 Mar;71(3):235-44.
124. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005 Feb 15;105(4):1815-22.
125. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006 Feb;24(2):386-98.
126. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 2007 Aug;149(2):353-63.
127. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol.* 2009 Apr;156(1):149-60.
128. Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia.* 2005 Sep;19(9):1597-604.
129. Batten P, Sarathchandra P, Antoniow JW, Tay SS, Lowdell MW, Taylor PM, et al. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell

allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng.* 2006 Aug;12(8):2263-73.

130. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol.* 2005 Aug;33(8):928-34.

131. Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, Francois S, Chapel A, Thierry D, et al. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol.* 2008 May-Jun;253(1-2):16-22.

132. Gieseke F, Schutt B, Viebahn S, Koscielniak E, Friedrich W, Handgretinger R, et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFN γ R1 signaling and IDO expression. *Blood.* 2007 Sep 15;110(6):2197-200.

133. 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 May;35(5):1482-90.

134. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006 Jan 1;107(1):367-72.

135. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol.* 2009 May;37(5):604-15.

136. Kang HS, Habib M, Chan J, Abavana C, Potian JA, Ponzio NM, et al. A paradoxical role for IFN- γ in the immune properties of mesenchymal stem cells during viral challenge. *Exp Hematol.* 2005 Jul;33(7):796-803.

137. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringden O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol.* 2007 Apr;65(4):336-43.

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

139. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1327-33.

140. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev.* 2004 Jun;13(3):263-71.

141. Chen L, Zhang W, Yue H, Han Q, Chen B, Shi M, et al. Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells. *Stem Cells Dev.* 2007 Oct;16(5):719-31.

142. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2005 May 15;105(10):4120-6.

143. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012 May;12(5):383-96.

2. JUSTIFICATIVA

Como relatado anteriormente, a infusão de CTM, em diversos outros países, parece ser segura e vêm auxiliando na resposta de diversos pacientes com doenças inflamatórias, entre elas a DECHa resistente ao tratamento padrão.

Quarenta e cinco por cento dos pacientes submetidos ao TMO alogênico desenvolvem DECH no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Destes, trinta e três por cento desenvolvem DECHa resistente a corticosteroide (informação da equipe de TCTH do HCPA). Sendo assim, pretende-se, contribuir para o melhor entendimento do papel das CTM no tratamento da DECH aguda grave, resistentes ao tratamento padrão e implementar esta terapia celular no Centro de Terapia Celular localizado no Centro de Pesquisa Experimental desta Instituição. Cabe salientar que este será o primeiro grupo de pesquisa que utilizará este tratamento para DECHa no Rio Grande do Sul e que o grupo deste mesmo laboratório já implementou o uso de Lisado Plaquetário como suplemento para o cultivo de CTM, substituindo assim, o Soro Fetal Bovino que é inconveniente para a terapia celular por causar xenorreação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a segurança e exequibilidade da terapia celular com CTM, cultivadas na presença de Lisado Plaquetário, para tratamento da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro Aguda Resistente aos Corticosteroides.

3.2 Objetivos específicos

1. Expandir CTM em condições de “boas práticas de manufatura”;
2. Executar teste de viabilidade como controle de qualidade das CTM;
3. Executar imunofenotipagem como controle de qualidade das CTMs;
4. Executar teste de diferenciação da CTM em adipócitos, condrócitos e osteócitos como controle de qualidade das CTMs;
5. Executar testes de micoplasma para controle de qualidade das CTMs;
6. Executar testes de detecção de endotoxina e BactAlert® para controle de qualidade das CTMs;
7. Infundir CTMs em pacientes com DECHa;
8. Avaliar a resposta à infusão de CTM no tratamento da DECHa 28 dias após a primeira infusão;
9. Avaliar a sobrevida global dos pacientes após a infusão de CTM.

4. ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo de Revisão

(Publicado na Revista HCPA)

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS – CARACTERIZAÇÃO, CULTIVO,
PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS E APLICAÇÕES CLÍNICAS.**

**Bruna Amorin, Vanessa de Souza Valim, Natália Emerim Lemos, Lauro Moraes
Júnior, Annelise Martins Pezzi da Silva, Maria Aparecida Lima da Silva, Lucia Silla**

Células-tronco mesenquimais – caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas

Células-tronco mesenquimais - revisão

Mesenchymal stem cells – characterization, cultivation, immunological properties and clinical applications

Bruna Amorin¹, Vanessa de Souza Valim¹, Natália Emerim Lemos¹, Lauro Moraes Júnior¹, Annelise Martins Pezzi da Silva¹, Maria Aparecida Lima da Silva¹, Lucia Silla¹.

¹ Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoéticas, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Autor Responsável para correspondência:

Dra Lucia Silla
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Ramiro Barcellos, 2350 - Bairro: Santa Cecília
Porto Alegre - CEP: 90035-903
Fone: 3359-8317
lsilla@hcpa.ufrgs.br

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são consideradas células multipotentes não hematopoéticas com propriedades de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e, possivelmente em não mesenquimais. Vários estudos recentes tem reforçado o caráter multipotente destas células pela capacidade de diferenciarem-se em células derivadas da mesoderma embrionário: osteócitos, condroblastos e adipócitos.

Devido ao fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas, as CTM têm se tornado as candidatas ideais para os protocolos da medicina regenerativa.

Este artigo revisa as principais características desta célula, forma de obtenção e cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas.

PALAVRAS-CHAVES: Células-tronco mesenquimais, cultura, terapia celular.

ABSTRACT

The mesenchymal stem cells (MSC) are considered non-hematopoietic multipotent cells with self-renewal properties and ability to differentiate into mesenchymal tissues, and possibly non mesenchymal cells. Several lines of evidence in the past few years have underlined the ability of these cells to differentiate into cells derived from embryonic mesoderm, such as osteocytes, adipocytes and chondroblasts.

Based on the easiness to isolate and culture, its differentiation potential and production of growth factors and cytokines, MSC has become an ideal candidate for regenerative medicine protocols.

This article reviews the main characteristics of MSC, how to isolate and culture, its immunological properties and clinical applications.

KEYWORDS: Mesenchymal stem cells, culture, cell therapy.

As células-tronco, por definição, são células indiferenciadas, capazes de autorrenovação através de divisões mitóticas assimétricas (1). As principais características das células-tronco, tornando-as extremamente interessantes, são: sua capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e, mais interessante ainda, sua potencial capacidade em se diferenciar em diversos tipos celulares do mesmo tecido e, aparentemente de tecidos diferentes (2).

As células-tronco são divididas em dois grandes grupos que dizem respeito ao seu local de origem: podem ser células-tronco embrionárias (CTE), quando são derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário; e células-tronco adultas (CTA) que são aquelas obtidas do sangue de cordão umbilical, da medula óssea e do sangue periférico; adicionalmente, se acredita existirem células tronco tecido ou órgão específicos em todo o organismo adulto (3).

As CTEs são células pluripotentes dotadas de grande plasticidade, que apresentam características peculiares, como uma ilimitada capacidade de proliferação *in vitro* sob estímulos, além da possibilidade de formar células derivadas dos três folhetos embrionários em cultura (4, 5).

Como ressaltado acima, as células-tronco são encontradas em vários órgãos e tecidos no indivíduo adulto, onde participam da homeostase tecidual, gerando novas células em resposta ao repovoamento celular fisiológico ou a uma injúria. Tais populações celulares indiferenciadas mantidas no organismo adulto são também denominadas CTAs (5-7).

As CTAs estão em estado quiescente ou de baixa proliferação, predominantemente nas fases G0 e G1 do ciclo celular, localizando-se em regiões específicas para o seu desenvolvimento e manutenção dos seus atributos, particularmente a capacidade de autorrenovação (8). Essas regiões são denominadas de nichos celulares e dentre os principais sítios estão: medula óssea (9), coração (10), rins, pele, fígado, pâncreas, ovários, cordão umbilical, placenta, líquido amniótico, âmnio, entre outros (11).

As primeiras CTAs estudadas e, conseqüentemente, as mais bem caracterizadas são as células hematopoiéticas provenientes da medula óssea (12). Estas células são capazes de diferenciar-se nos constituintes mielóides e linfóides do sangue e há muito vem sendo utilizadas com sucesso em transplantes para pacientes com falência medula ou com câncer.

Mais tarde foi isolado outro tipo de célula-tronco adulta também constituinte da medula óssea, porém com propriedades diferentes das hematopoiéticas: as células-tronco mesenquimais (CTM) ou células-tronco estromais. Elas receberam essa denominação, pois derivam do folheto embrionário intermediário, o mesoderma, que é responsável pela formação dos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo.

Células-tronco mesenquimais

As CTMs são consideradas células multipotentes não hematopoéticas com propriedades de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e, talvez, não mesenquimais (13). O primeiro relato das CTMs foi realizado pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores, na década de setenta, que as descreveu como sendo células morfológicamente semelhantes a fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície plástica (14). Vários estudos posteriores relataram a multipotência destas células, ou seja, a capacidade de diferenciarem-se em células derivadas da mesoderma embrionária: osteócitos, condroblastos e adipócitos (14-17).

Denominações utilizadas e caracterização básica das CTM

As CTMs, sobretudo aquelas oriundas da medula óssea humana, diferem muito quanto à nomenclatura utilizada. Inicialmente foram chamados de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F, *colony forming unit fibroblast*), devido à capacidade de aderir ao plástico das garrafas de cultivo e formar colônias de células similares aos fibroblastos (18). Foram também denominadas células-tronco ou progenitoras mesenquimais, pois, diferenciavam-se em uma grande variedade de células não-hematopoéticas (19) e de células estromais da medula óssea, porque pareciam originar-se de estruturas de suporte da medula óssea e podiam ser utilizadas como *feeder layer* para o crescimento das CTHs em cultura (14).

Em 2005, a sociedade internacional para terapia celular (ISCT – *International Society for Cellular Therapy*) propôs uma nova nomenclatura para designar a população de células fibroblastóides que crescem aderentes ao plástico, isoladas dos mais diversos tecidos e com capacidade de diferenciação multipotencial *in vitro*: células mesenquimais estromais multipotentes. A ISCT propõe ainda, que o termo célula-tronco mesenquimal seja para àquelas que indubitavelmente, preenchem as características de células-tronco e ressalta que estas células compõem uma subpopulação das células aderentes ao plástico. A sigla CTM (MSC – do inglês, *Mesenchymal Stem Cell*) pode ser utilizada para estas situações, mas deve ser corretamente identificada (20).

Ainda de acordo com o ISCT, uma determinada população de células será classificada como célula-tronco mesenquimal quando apresentar três características chave. A primeira é que as mesmas sejam isoladas com base nas suas propriedades de adesão seletiva à superfície do material onde são cultivadas (geralmente plástica); a segunda é a expressões de determinados antígenos de membrana e, por fim, que as células possam ser diferenciadas em tecido ósseo, gorduroso e cartilaginoso após estímulo (20).

Ontogenia e fontes de CTM

A ontogenia da CTM ainda não é bem conhecida. Acredita-se que a CTM multipotente descenda de uma célula pluripotente ou mesmo de outra multipotente presente durante a vida fetal em uma frequência muito maior.

As CTMs situam-se na fração estromal da medula óssea, que provê um microambiente que suporta a hematopoese. De fato, essas células fornecem o suporte do estroma para o crescimento e diferenciação de células-tronco hematopoéticas e para hematopoese (21).

São pontos interessantes de serem relatados: 1) a presença de uma camada de células estromais que daria sustentação a hematopoese na região aorto-gônada-mesonéfrica em murinos; 2) a observação de que o sangue humano fetal contém, durante as primeiras semanas, grande quantidade de CTHs e de células estromais; 3) o encontro de células fetais na circulação e nos tecidos maternos, mesmo décadas após a gravidez, que parecem participar na reparação tissular. Em combinação, estas observações apóiam a hipótese da existência de uma CT multi- ou pluripotente que existe desde a idade gestacional precoce e que pode persistir por toda a vida do adulto (22).

Além disso, a correlação inversa entre a presença de CTMs no cordão umbilical e a idade gestacional, também observada para as CTHs, sugere que as células mesenquimais migrem precocemente durante o desenvolvimento, dos seus sítios primários para outros tecidos fetais (16). Contudo, a real identidade desta célula e a sua correlação com as CTMs expandidas *in vitro* ainda necessitam ser definidas.

No ser humano, a medula óssea é a fonte mais conhecida de CTM, mas também já foram isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como o tecido muscular esquelético e a derme (23), o tecido adiposo (24), a membrana sinovial (25), o endotélio da veia umbilical (26) e da veia safena (27), o rim (28), sangue de cordão umbilical e placentário (29, 30), medula óssea (31), cartilagem articular (32), ligamento periodontal (33) e o pulmão (34).

Tem se estimado que a CTM represente 0,01 – 0,0001% das células nucleadas na medula óssea de um adulto (35).

Se a CTM circula ou não no sangue periférico, ainda é uma questão em aberto. Fernandez *et al* (36) reportaram a presença de células “estromais” no sangue periférico mobilizado. Já os estudos de Zvaifler *et al.* (37) e Kuznetsov *et al.* (38) demonstraram que a CTM circula no sangue periférico, mas que são extremamente raras.

Um estudo feito por Kassis *et al*, com o auxílio de micro esferas de fibrina, isolaram CTM de sangue periférico mobilizado, coletado por aférese, de doadores normais (39).

Isolamento e cultivo de CTM da medula óssea

Atualmente existem diversos métodos de isolamento de CTM da medula óssea. Tradicionalmente, estas células são isoladas utilizando-se o método originalmente descrito por Friedenstein (40), que se baseia na capacidade que estas células têm de aderir ao plástico.

Resumidamente, o aspirado de medula óssea é processado utilizando-se um gradiente de centrifugação como, por exemplo, o ficoll. As células são coletadas e plaqueadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), enriquecido com soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina.

Após 24h (41) à 72h (15, 42), todo o meio de cultivo é trocado com o objetivo de remover as células não-aderentes. As células restantes são cultivadas em câmara úmida, a 37° C com 5% de CO₂ e o meio de

cultivo é trocado a cada 3 a 4 dias até atingir confluência em torno de 80%, o que ocorre por volta de 14 dias, quando as células são tripsinizadas e expandidas por passagens subseqüentes (17).

Estas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de várias passagens sucessivas para se obter grandes quantidades de MSCs altamente enriquecidas, com ausência de outros tipos celulares. Porém, se mais passagens são necessárias, isto pode alterar a qualidade das MSCs (21).

A expansão de CTM *in vitro* possui o risco de acumular mudanças genéticas e epigenéticas na célula, o que pode levar a uma transformação celular e ao câncer (43). O cultivo de CTM na presença de reagentes de origem xenogênica, como o soro fetal bovino, também limita a utilização destas células em ensaios clínicos.

Diversos autores demonstraram a capacidade de substituir o uso de soro fetal bovino pelo lisado de plaquetas no cultivo de CTM (44-48). Este procedimento previne a contaminação das células cultivadas com patógenos bovinos e a xenoimunização, mantendo a capacidade de proliferação e diferenciação, e assim permite a utilização destas células cultivadas na terapia celular para o tratamento diversas doenças.

Outros métodos de isolamento de CTM já foram descritos como a seleção positiva (49) ou negativa (30, 42) em colunas.

Morfologia e características imunohistoquímicas da CTM

As CTMs originam colônias após cultivo celular em baixa densidade ou *sorting* de uma única célula (22). Presume-se que estas colônias sejam derivadas de uma única célula precursora (15). As colônias com mais de 50 células, quando contadas após 10 a 14 dias de cultivo das células mononucleares (CMN) da medula óssea, são chamadas de CFU-F (42).

Na microscopia, a CTM apresenta-se como uma célula fibroblástóide alongada, fusiforme e pontiaguda, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante. Também podem ser observadas, à microscopia eletrônica, cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, vacúolos lipídicos cheios ou vazios, corpos lisossomais e grande quantidade de poli-ribossomos e ribossomos livres citoplasmáticos, além de filamentos de actina bem organizados em suas extremidades (50). Quando senescentes, as CTMs são grandes, largas, achatadas, proliferam lentamente e expressam uma β -galactosidase associada à senescência (51). Células com morfologia intermediária são observadas no decorrer do cultivo (41).

As CTMs indiferenciadas coram-se pela fosfatase alcalina, sudan-black, colágeno IV, fibronectina e não se coram pela esterase. A matriz que contorna as CTMs contém colágeno do tipo I e laminina da membrana basal. Além disso, um grupo de colônias pode também, sintetizar um antígeno associado ao fator VIII, o que indicaria uma provável origem endotelial (52).

Expansão e proliferação da CTM

A cinética da expansão em cultura das CTM pode ser dividida em 3 fases: 1) inicial, com duração de 3 a 4 dias, ocorre logo após o plaqueamento das CMN da MO e o crescimento celular é muito lento; 2) logarítmica, durante as primeiras passagens, apresenta um crescimento acelerado; 3) *plateau*: inicia-se quando a célula atinge a senescência e perde a capacidade de expansão (53, 54).

Um estudo feito por Colter *et al.* (54) demonstrou que as CTMs podem ser expandidas por mais de 50 vezes quando plaqueadas em diluições muito baixas como 1,5 células/cm². Contudo, se expandiam por apenas 15 vezes quando plaqueadas em concentrações de 5000 células/cm². Os autores concluíram ainda que seja possível expandir e obter mais de 10¹³ CTMs de apenas 20 mL de MO (54).

Stenderup *et al.* (55) avaliaram 2 grupos de doadores normais com idades que variavam entre 18 e 29 e 66 a 81 anos e encontraram uma capacidade de duplicação da população celular significativamente menor para as células do grupo mais velho comparado com o grupo mais jovem. Concluíram também que as CTMs obtidas dos doadores mais idosos, apesar de manterem a capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos, exibem uma diminuição do potencial de proliferação, assim como, uma aceleração no processo de senescência, se comparadas às dos doadores jovens.

Quanto às horas necessárias para a duplicação celular durante a fase de crescimento logarítmico, Conget & Minguell (56) encontraram um valor de 33 horas, enquanto que Stute *et al.* (57) de 24 horas.

Imunofenotipagem das CTMs

Todas as células do organismo apresentam um conjunto de marcadores de superfície que caracterizam a singularidade biológica e a marca das células que os contêm. Contudo, as CTM apresentam

poucos marcadores imunofenotípicos específicos (52, 58), sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de um perfil de marcadores específicos e não específicos.

As diferenças quanto à intensidade de expressão dos diversos antígenos podem ser explicadas devido às variações no método de cultivo e na fase evolutiva em que as células são avaliadas (35).

A população de CTM isoladas da medula óssea de humanos e camundongos expressa em sua superfície marcadores moleculares como: CD44 (receptor de hialuronato), CD105 (endoglina: marcador angiogênico), CD106 (VCAM-1: molécula de adesão vascular), CD166 (ALCAM: moléculas de adesão de leucócitos ativados), CD29 (integrinas VLA-β), CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1), Stro-1 (estroma de suporte da hematopoese) e Sca-1 (59-61).

Kolf *et al.* afirmaram que o marcador Stro-1 é o melhor marcador a se investigar quando se deseja pesquisar a presença de CTM. Entretanto, esse marcador é gradualmente perdido durante a expansão em culturas. Talvez, porém, combinações como Stro-1 e CD106 poderiam constituir bons marcadores para a identificação de CTM humanas (60).

Existe um consenso na literatura de que as CTM não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoéticas e endoteliais, como, por exemplo: CD11b (marcador de célula imune - integrina Mac-1), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS), CD31 (PECAM-1: molécula de adesão plaquetária), CD33 (receptor transmembrana de células mielóides), CD34 (receptor de células endoteliais), CD133 e CD45 (presentes em todas as células hematopoéticas). Sendo assim, a ausência dos antígenos CD14, CD34 e CD45 na superfície dessas células mesenquimais permite distingui-las das precursoras hematopoéticas.

Embora já tenham sido identificados oito marcadores de superfície para identificação de MSC, a ISCT concorda que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem expressos marcadores hematopoiéticos, é suficiente para a caracterização imunofenotípica dessas células. Contudo, essa caracterização deve sempre estar acompanhada da demonstração da aderência celular por longos períodos em cultura e da diferenciação destas em pelo menos duas linhagens celulares distintas (20).

Fases do cultivo de CTM e a relação com a citogenética

A vida de uma CTM pode ser dividida em três fases dependendo da sua idade *in vitro* - fase 1: quando completa menos de 50% da vida celular; fase 2: fase crescimento lento, na qual conclui 50 a 80% da sua existência; fase 3: fase de senescência, durante a qual há uma parada na proliferação celular. No campo da biogerontologia, baseado em características morfológicas, bioquímicas e nas características moleculares, as células na fase 1 são consideradas jovens e na fase 3 senescentes (55).

Após o seu cultivo moderado, as CTMs mantêm seu cariótipo normal e não perdem a atividade da telomerase. Contudo, no cultivo extenso, as funções celulares diminuem fato confirmado pelos sinais evidentes de senescência e/ou apoptose (16, 62).

A senescência replicativa é um fenômeno característico do cultivo de células comprometidas *ex vivo*. Há uma parada na proliferação celular o que limita a geração de um grande número de células. Ocorre secundariamente a vários fatores, incluindo o progressivo encurtamento do telômero, secundário à perda progressiva da atividade telomerase (63).

O ambiente de estresse por baixas e altas concentrações de oxigênio pode afetar a estabilidade cromossômica das CTM e assim contribuir para diferentes propriedades biológicas. Além disso, estabilidade cromossômica de CTM sobre essas condições é relevante para preparação da CTM e sua aplicação clínica em regeneração tecidual (64).

Alguns experimentos demonstram que as CTM humanas retêm morfologia estável, fenótipo e características genômicas durante a expansão (65) enquanto outros sugerem lesões genômicas que apareceriam em culturas após várias passagens. Grigorian *et al.* (66) observaram que em uma de duzentas culturas de CTM examinadas, obtida de doadores sem patologias e cultivadas sob condições padrões houve alterações morfológicas, proliferativas e cariotípicas no decorrer das passagens. As células dessa cultura anormal mantiveram características imunofenotípicas de células mesenquimais, porém algumas delas (em torno de 15-25%) tiveram numerosas aberrações cromossômicas numéricas e estruturais.

Existem estudos reportando acúmulo de mutações seguidas de transformações malignas das células mesenquimais de camundongos (67). Já o surgimento de características tumorigênicas foi demonstrado em culturas de CTMs humanas após um grande número de passagens *in vitro* (>50) (66, 68).

Por outro lado, alterações cromossômicas não foram observadas em outro estudo sobre o efeito da hipóxia ou normóxia nas CTM (64).

Ciclo celular

Estudos de ciclo celular revelaram que, enquanto uma pequena fração das CTMs está ativamente engajada na proliferação (aproximadamente 10% das células se encontram nas fases S + G₂ + M), a maioria das células se encontra na fase G₀-G₁ do ciclo celular (56), o que sugere uma alta competência destas células em se diferenciar (16). Entretanto, estudos que distinguem as células em crescimento das quiescentes evidenciam que apenas 20% destas encontram-se na fase G₀ (não-ciclantes) do ciclo celular (56).

Diferenciação

Como mencionado anteriormente, as células-tronco são capazes de formar osteócitos, condrócitos e adipócitos tanto *in vivo* como *in vitro*. Somada à identificação das CTMs baseadas em suas características fenotípicas, a capacidade destas células formarem, ao menos, estes três tipos celulares distintos são um dos critérios funcionais disponíveis para identificá-las até então (60).

Existem evidências ainda controversas que as CTMs podem, além de diferenciar-se em células de linhagem mesodérmica, também dar origem às células dos sítios endodérmicos e neuroectodérmico, através do processo de transdiferenciação. Dentre estas diferenciações *in vitro*, sob condições de cultivo apropriadas, estão às derivações em tenócitos, células musculares, cardiomiócitos, células endoteliais, hepatócitos e neurônios (60).

Um trabalho de Baksh *et al.* demonstrou um modelo teórico de diferenciação das CTMs no qual as células indiferenciadas passariam por duas fases antes de adquirir um fenótipo específico. Na primeira, a CTM originaria por divisão assimétrica uma população de células menos indiferenciadas e outra, de células precursoras com potencial de auto-renovação e diferenciação mais restritas (69).

A transição do compartimento de células-tronco para o das comprometidas ocorreria com a divisão simétrica das células progenitoras tri- ou bipotentes, o que originaria os progenitores unipotentes. Este processo é bem controlado e envolve uma alteração no perfil de secreção de citocinas e de fatores de crescimento, assim como, uma alteração na estrutura tridimensional da matriz extracelular, além da ativação e inativação de fatores transcricionais e a conseqüente expressão de genes relacionados a esta via de diferenciação (69).

Vários são os sinais químicos e/ou biológicos que atuam como indutores da diferenciação de MSCs. Fatores como TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) - o mais potente deles, IGF-1 (*Insulin-like Growth Ffactor 1*), bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), Wntn e ascorbato estimulam o potencial de diferenciação das MSCs em condrócitos. Várias vias de sinalização intracelulares, como MAPK e Smads, são ativadas, induzindo vários fatores de transcrição (SOX9,SOX5,SOX6), levando à produção de proteínas de matriz celular, incluindo colágeno tipo II, agrecan, requeridos para a formação de cartilagem (21).

BFGF (*Basic fibroblast growth factor*) ou o sinalizador Wnt podem estimular o potencial de diferenciação osteogênico ou neural. O meio suplementado com 1,25-diidroxivitamina D₃, 2-fosfato-ascorbato e β -glicerofosfato pode induzir a diferenciação osteogênica. VEGF, por sua vez, estimula o potencial de diferenciação endotelial (21).

Dexametasona, juntamente com isobutil-metilxantina, insulina e indometacina, estimulam o potencial adipogênico; vacúolos ricos em lípidos, detectáveis por coloração com *oil red O*, acumulam-se no interior das células, que passam a expressar PPAR- γ 2 (21).

A diferenciação em adipócitos é iniciada por fatores agonistas que incluem a insulina, a isometilbutilxantina, a indometacina e os glicocorticóides. A diferenciação é acompanhada não só por alterações na morfologia celular, mas também pela ativação transcripcional de muitos genes como o LPL e o PPAR γ 2 (*peroxisome proliferator activated receptor γ 2*). Este último é membro da superfamília de receptores de ligantes de fatores transcricionais ativados e é reconhecido como um receptor nuclear hormonal específico do adipócito. Ele tem um papel chave na regulação do aumento das células gordurosas e a sua expressão é estimulada pela dexametasona (50).

A diferenciação em condrócitos ocorre quando as CTMs são cultivadas em condições específicas, que incluem o cultivo em formato tri-dimensional, meio nutritivo sem SBF e a adição de um dos membros da família do TGF- β (*transforming growth factor - β*), sendo que o TGF- β ₂ e o TGF- β ₃ são os mais efetivos na promoção da condrogênese. Quando cultivadas nestas condições, as células rapidamente perdem a sua

morfologia fibroblastóide e começam a expressar os componentes da matriz extracelular, específicos da cartilagem como os glicosaminoglicanos (70).

O ácido ascórbico, a dexametasona, o β -glicerolfosfato e o SBF são necessários para a ativação da diferenciação em osteócitos. Esta via requer a expressão de genes como o Cbfa-1 (*core binding factor alpha1*), fosfatase alcalina, osteopontina (OST), osteocalcina e colágeno I (71). Quando cultivadas em monocamadas na presença de meio indutor específico, as células adquirem morfologia de osteoblastos, após 14 a 21 dias (72), com aumento da atividade da fosfatase alcalina e deposição de uma matriz extracelular rica em cálcio mineralizado (70).

Produção de fatores de crescimento, interleucinas e citocinas

As CTMs produzem um grande número de citocinas, dentre elas, podemos citar o LIF (*leukemia inhibitory factor*), o SCF (*stem cell factor*), SDF-1 (*stromal derived factor*), a oncostatina M (OSM), a BMP-4 (*bone morphogenetic protein-4*), o ligante Flt-3 da tirosina *kinase* (Flt-3 lig) e o TGF β .

Também produzem uma grande variedade de interleucinas (IL), como: IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 e IL-15. Quando cultivadas na presença da IL-1 α , as CTMs produzem citocinas que agem nos progenitores hematopoéticos mais maduros, como a TPO (*thrombopoietin*), o GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), o G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), o M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) (16, 35, 73).

As CTMs expressam também receptores (R) para diversas citocinas e fatores de crescimento, como: IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIF-R, SCF-R, G-CSF-R, INF γ -R (*interferon γ receptor*), TNF $_1$ -R e TNF $_2$ -R (*tumor necrosis factor receptor*), TGF β_2 -R, TGF β_3 -R, bFGF-R (*basic fibroblast growth factor receptor*), PDGF-R (*platelet-derived growth factor receptor*) e o EGF-R (*epidermal growth factor receptor*) (16, 73).

Estes dados em conjunto sugerem que as CTMs contribuem para a formação e o funcionamento do microambiente estromal, o qual produz sinais indutores regulatórios não só para as CTMs, mas também para o desenvolvimento dos progenitores hematopoéticos e outras células estromais presentes na medula óssea (16, 35, 73).

Propriedades Imunológicas da CTM

As CTM, devido ao seu fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas, têm se tornado as candidatas ideais para os protocolos da medicina regenerativa (63).

Outro motivo pelas CTM se tornarem foco de atenção terapêutica é devido o seu potencial imunomodulatório (74), embora os mecanismos de imunossupressão sobre a resposta inflamatória e sobre os mecanismos de rejeição ao transplante não estejam totalmente esclarecidos.

Mediante um contato direto das CTM com um tecido (allogênico ou autólogo) ou mediante a interação parácrina com o interferon-gama (INF- γ), produzido por células imunes do organismo, as CTM desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis que atuarão sobre as células do sistema imunológico (linfócitos e células dendríticas apresentadoras de antígeno - APC) (75, 76). Dentre esses fatores, estão as prostaglandinas (PGE2), interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), fator de crescimento transformador beta (TGF β), o fator de crescimento hepatóide (HGF) e a enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (76).

A liberação de TGF- β e HGF suprime a proliferação dos linfócitos T e B (77), enquanto que a liberação de PGE2 inibe, especificamente, a produção dos linfócitos T citotóxicos e as demais citocinas pró-inflamatórias. A enzima IDO induz a apoptose dos linfócitos T por transformar o triptofano, que é um aminoácido essencial para a ativação dessas células em produtos tóxicos no seu citoplasma (78). De forma análoga aos mecanismos anteriormente descritos, *in vitro*, a IDO, PGE2 e TGF- β induzem a perda do potencial citotóxico das células natural killer (NK), por suprirem a produção de IL-2, IL-15 e INF- γ (79). Em relação às APC, evidenciou-se que as CTM interferem na diferenciação, maturação e ativação dessas células por meio da produção de IL-6 e de fator de crescimento estimulador de macrófago (M-CSF). Além disso, a liberação de PGE2 pelas CTMs inibe a produção e secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de INF- γ e estimula a produção de citocina anti-inflamatória IL-10 (76, 78).

Além dos efeitos imunossupressores, as CTM expressam pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) e níveis negligenciáveis de MHC-II (80) e/ou não expressão MHC-II em sua superfície (81). Durante o processo de seleção clonal positiva e negativa realizada pelas células de defesa do organismo (reconhecimento do próprio e do não próprio), essas células utilizam o MHC para realizar tal seleção. Logo, na ausência de MHC, como verificado nas CTM, o processo de seleção de não próprio não ocorre, impedindo que o organismo que recebeu essas células indiferenciadas as reconheça como não próprias e realize a rejeição destas (74).

Também o contato célula-célula faz com que haja a produção de diferentes tipos de fatores de crescimento solúveis pelas CTM, incluindo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator

estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e diversas interleucinas (IL-1,6,7,8,11,12,14,15), que influenciam fibroblastos e células granulocíticas envolvidas no processo de inflamação (15).

Por outro lado, um estudo feito por Spaggiari *et al.* demonstrou que as células NK, previamente ativadas pela IL-2, lisam de maneira eficiente as CTMs autólogas ou alogênicas. Tal ativação pode ser inibida pela exposição das CTMs ao INF- γ , que resulta em uma maior expressão das moléculas de HLA classe I na superfície das CTMs. Por outro lado, as CTMs podem, por mecanismos ainda não elucidados, inibir a indução de proliferação das células NK latentes e não ativadas. Todavia, este efeito é apenas parcial nas células NK no estágio proliferativo (82).

Em um outro estudo, Corcione *et al.* avaliaram o efeito das CTMs sobre as células B e demonstraram que, pela secreção de fatores solúveis inibitórios após sinalização parácrina, as CTMs inibem, *in vitro*, a proliferação, a quimiotaxia e a diferenciação das células B em células secretoras de anticorpos (75).

Como acima exposto, as CTMs parecem ser efetivas na indução da tolerância. Entretanto, a maioria das análises foi realizada com CTMs cultivadas e não *in vivo* (22).

Aplicações clínicas da CTM

A habilidade de purificar, cultivar e manipular CT somáticas multipotentes fornece aos pesquisadores células de valor inestimável, que podem servir para o estudo e o desenvolvimento do reparo tissular com o objetivo de corrigir lesões provocadas por doenças congênitas ou degenerativas.

A terapia celular compreende um conjunto de técnicas ou métodos que visam substituir as células doentes ou disfuncionais por células saudáveis. A terapia com células-tronco é um ramo da terapia celular.

Campo emergente da medicina regenerativa, a terapia celular baseia-se na tentativa de tratamento de uma variedade de doenças degenerativas ou relacionadas com a idade, para as quais ainda não existe tratamento específico ou efetivo. As células-tronco somáticas, autólogas ou alogênicas, têm vasta aplicabilidade clínica e podem ser utilizadas para tratar tecidos lesados e múltiplas doenças por infusão local ou sistêmica.

As células-tronco mesenquimais, devido ao seu fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas, têm se tornado as candidatas ideais para os protocolos da medicina regenerativa (63).

Nos estudos utilizando CTMs em ensaios clínicos, bilhões de CTMs isoladas ou ligadas a biomateriais, são necessárias. A produção de CTMs para este propósito necessita da observação e aderência às boas práticas de manufatura, para assegurar a liberação deste "medicamento celular" de modo seguro, reprodutível e eficiente.

São várias as áreas da medicina em que as células-tronco têm sido empregadas, entre elas: cardiologia (83); ortopedia (84); neurologia (85); endocrinologia (86).

A CTM tem ganhado considerável atenção também como ferramenta de tratamento da DECHa (Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro aguda) após transplante heterólogo de células tronco hematopoiéticas (87). Esta ferramenta de tratamento é estudada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo grupo do Centro de Tecnologia Celular do RS localizado do Centro de Pesquisas Experimental.

REFERÊNCIAS

1. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):287-98.
2. Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1044:132-8.
3. Vogel G. Can old cells learn new tricks? *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1418-9.
4. Deb KD, Sarda K. Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. *J Transl Med*. 2008;6:7.
5. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19(3):193-204.

6. Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, et al. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells*. 1996 Mar;14(2):239-48.
7. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1427-30.
8. Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *J Physiol Paris*. 2002 Jan-Mar;96(1-2):81-90.
9. Meirelles LS, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioscience*. 2009;14:4281-98.
10. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*. 2005 Oct;85(4):1373-416.
11. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1431-3.
12. Hirao A, Arai F, Suda T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle*. 2004 Dec;3(12):1481-3.
13. Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2005 Dec;5(12):1571-84.
14. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.
15. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000 Aug;28(8):875-84.
16. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001 Jun;226(6):507-20.
17. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
18. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.
19. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.
20. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
21. Bydlowski SP. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009;31:25-35.
22. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004 May;32(5):414-25.
23. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 2001 Sep 1;264(1):51-62.
24. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.
25. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001 Aug;44(8):1928-42.
26. Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Sep;36(9):1179-83.
27. Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siqueira R, et al. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Exp Cell Res*. 2005 Oct 1;309(2):340-4.
28. Almeida-Porada G, El Shabrawy D, Porada C, Zanjani ED. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Exp Hematol*. 2002 Dec;30(12):1454-62.
29. Lee MW, Choi J, Yang MS, Moon YJ, Park JS, Kim HC, et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 16;320(1):273-8.
30. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1669-75.
31. Ahrens N, Tormin A, Paulus M, Roosterman D, Salama A, Krenn V, et al. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. *Transplantation*. 2004 Sep 27;78(6):925-9.
32. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2004 May;50(5):1522-32.
33. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

34. Sabatini F, Petecchia L, Tavian M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 2005 Aug;85(8):962-71.
35. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 2006 May;20(3):161-71.
36. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant.* 1997 Aug;20(4):265-71.
37. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2(6):477-88.
38. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001 May 28;153(5):1133-40.
39. Kassiss I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 2006 May;37(10):967-76.
40. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976 Sep;4(5):267-74.
41. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 1999 Nov;107(2):275-81.
42. Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2004;6(4):372-9.
43. Lepperdinger G, Brunauer R, Jamnig A, Laschober G, Kassem M. Controversial issue: is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Exp Gerontol.* 2008 Nov;43(11):1018-23.
44. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Lense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol.* 2005 Nov;205(2):228-36.
45. Horn P, Bokermann G, Cholewa D, Bork S, Walenda T, Koch C, et al. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2010 Nov;12(7):888-98.
46. Salvade A, Della Mina P, Gaddi D, Gatto F, Villa A, Bigoni M, et al. Characterization of platelet lysate cultured mesenchymal stromal cells and their potential use in tissue-engineered osteogenic devices for the treatment of bone defects. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010 Apr;16(2):201-14.
47. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion.* 2007 Aug;47(8):1436-46.
48. Xia W, Li H, Wang Z, Xu R, Fu Y, Zhang X, et al. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.* 2011 Jun 1;35(6):639-43.
49. Campioni D, Lanza F, Moretti S, Dominici M, Punturieri M, Pauli S, et al. Functional and immunophenotypic characteristics of isolated CD105(+) and fibroblast(+) stromal cells from AML: implications for their plasticity along endothelial lineage. *Cytotherapy.* 2003;5(1):66-79.
50. Tagami M, Ichinose S, Yamagata K, Fujino H, Shoji S, Hiraoka M, et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. *Cell Tissue Res.* 2003 Apr;312(1):31-40.
51. Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol.* 2005 Dec;40(12):926-30.
52. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev.* 2004 Aug;13(4):436-48.
53. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997 Feb;64(2):278-94.
54. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3213-8.
55. 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 Dec;33(6):919-26.
56. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999 Oct;181(1):67-73.
57. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol.* 2004 Dec;32(12):1212-25.

58. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. 2006;119:10.
59. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003 May 1;116(Pt 9):1827-35.
60. 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.
61. 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 Nov;25(11):2896-902.
62. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 May;11(5):321-34.
63. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004 Nov;95(5):209-14.
64. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol*. 2010;11:11.
65. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*. 2007 Apr;211(1):121-30.
66. Grigorian AS, Kruglyakov PV, Taminkina UA, Efimova OA, Pendina AA, Voskresenskaya AV, et al. Alterations of cytological and karyological profile of human mesenchymal stem cells during in vitro culturing. *Bull Exp Biol Med*. 2010 Dec;150(1):125-30.
67. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*. 2006 Apr;24(4):1095-103.
68. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3035-9.
69. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
70. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):568-84.
71. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Aug;33(8):881-7.
72. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther*. 2008 Jan;15(2):109-16.
73. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2000 Nov;7(6):358-63.
74. Wan CD, Cheng R, Wang HB, Liu T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008 Feb;7(1):29-33.
75. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367-72.
76. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3499-506.
77. 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 May 15;99(10):3838-43.
78. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815-22.
79. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006 Jan;24(1):74-85.
80. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2003;5(6):485-9.
81. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):318-24.
82. 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 Feb 15;107(4):1484-90.
83. Hutmacher A, Gutersohn A, Noppeney R, Neumann T, Erbel R, Duhrsen U. Rapid succession of peripheral blood progenitor cell mobilization cycles in patients with chronic heart failure: effects on the hematopoietic system. *Transfusion*. 2006 Aug;46(8):1424-31.

84. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells*. 2003;21(5):610-9.
85. Chernykh ER, Stupak VV, Muradov GM, Sizikov MY, Shevela EY, Leplina OY, et al. Application of autologous bone marrow stem cells in the therapy of spinal cord injury patients. *Bull Exp Biol Med*. 2007 Apr;143(4):543-7.
86. Voltarelli JC, Couri CE. Stem cell transplantation for type 1 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2009;1(1):4.
87. Le Blanc K, Fibbe W. A new cell therapy registry coordinated by the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant*. 2008 Feb;41(3):319.

5. ARTIGO CIENTÍFICO 2

Artigo de Revisão

(Submetido para a revista: “Clinical and Developmental Immunology”)

Mesenchymal stem cell therapy for acute graft-versus-host disease: a review

Bruna Amorin, Ana Paula Alegretti, Vanessa Valim, Annelise Pezzi, Álvaro Laureano,
Andréa Wieck, Lucia Silla

Mesenchymal stem cell therapy for acute graft-versus-host disease: a review

Bruna Amorin^{1,2}, Ana Paula Alegretti¹, Vanessa Valim¹, Annelise Pezzi^{1,2}, Álvaro Laureano^{1,2}, Andréa Wieck¹, Lucia Silla^{1,2,3}

¹ Cell Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

³ Department of Hematology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author:

Dra Lucia Silla
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Ramiro Barcellos, 2350 - Bairro: Santa Cecília
Porto Alegre - CEP: 90035-903
Phone: 3359-8317
lsilla@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are being widely studied as potential cell therapy agents due to their immunomodulatory properties, which have been established by *in vitro* studies and in several clinical trials. Within this context, mesenchymal stem cell therapy appears to hold substantial promise, particularly in the treatment of conditions involving autoimmune and inflammatory components. Nevertheless, many research findings are still contradictory, mostly due to difficulties in characterization of the effects of MSCs *in vivo*. The purpose of this review is to report the mechanisms underlying mesenchymal stem cell therapy for acute graft-versus-host disease (aGVHD), particularly with respect to immunomodulation, migration, and homing, as well as report clinical applications described in the literature.

Stem cells

By definition, stem cells are undifferentiated cells with the capacity to undergo self-renewal by means of asymmetric mitotic division [1]. The main characteristics of stem cells that make them extremely appealing for cell therapy are their aforementioned capacity for self-renewal, i.e. their ability to multiply while remaining undifferentiated, thus enabling constant, active replacement of cell populations in tissues, and their potential ability to differentiate into a variety of distinct cell types [2].

Stem cells can be broadly divided into two groups by site of origin: embryonic stem cells (ESCs), which are derived from the inner cell mass of a blastocyst, and adult stem cells (ASCs), which are obtained from umbilical cord blood, bone marrow, or peripheral blood, and present in specific tissues and organs throughout the adult body [3-6].

Totipotent stem cells are the only cell type capable of originating an entire organism, as they are able to generate all cell and tissue types, including both embryonic and extraembryonic tissues (such as the placenta) [7]. Pluripotent stem cells, in turn, are able to differentiate into cells from any of the three primary germ layers (ectoderm, mesoderm, and endoderm, primordial tissues formed in the early stages of embryonic development that will later originate all other tissues in the body). Unlike totipotent cells, pluripotent cells cannot grow an entire organism, as they are incapable of generating extraembryonic tissues [8].

ASCs remain in a quiescent or low-proliferation state, mostly in phases G0 and G1 of the cell cycle, and are located in specific regions that ensure their development and the maintenance of their attributes, particularly their capacity for self-renewal [9]. These regions are known as stem cell niches, and their main sites include the bone marrow [10], heart [11], kidneys, skin, liver, pancreas, ovaries, umbilical cord, placenta, and amniotic fluid [12].

Bone marrow hematopoietic stem cells (HSCs) were the first ASCs to be studied and, consequently, are the best characterized. These cells are capable of differentiation into the myeloid and lymphoid components of blood, and their transplantation has long been used to great effect in the treatment of bone marrow failure and cancer [13].

Another type of ASC present in the bone marrow, but with distinct properties from those of HSCs, was later isolated: mesenchymal stem cells (MSCs), also known as stromal stem cells [14]. As reported at the time of their discovery by Friedenstein in the 1970s, MSCs are highly plastic-adherent and are similar to fibroblasts. As multipotent stem cells, MSCs can differentiate into cells derived from the mesoderm germ layer, namely chondroblasts, adipocytes, and osteocytes [15]. *In vitro*, culture-expanded MSCs express membrane antigens that can be immunophenotyped by flow cytometry. The most widely accepted antigen expression pattern is CD29, CD105, CD73, and CD90 positivity in $\geq 95\%$ of cells and minimal expression of CD45, CD34, CD3, CD14, CD19, or HLA-DR, which should be positive in less than 2% of cells [16, 17].

As they inhibit the proliferation and cytotoxic action of immune cells, MSCs have been employed in the clinical treatment of several diseases, including graft-versus-host disease (GVHD) in its acute form [18]. The purpose of this review is to report the mechanisms underlying MSC therapy for acute GVHD (aGVHD) as they relate to immunomodulation, migration, and homing and to describe clinical applications for MSC therapy that have been previously reported in the literature.

Bone Marrow Transplantation and Acute Graft-versus-Host Disease

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a potentially curative treatment option and treatment of choice for several malignant and nonmalignant conditions, particularly those affecting the hematopoietic system. However, HSCT is associated with high morbidity and mortality rates, and GVHD is the foremost serious complication of this treatment modality [19, 20].

Chronic GVHD (cGVHD) is related to late mortality and is the leading cause of morbidity in long term survivors of allogeneic HSCT. Symptoms usually present within the first year and are often preceded by an episode of aGVHD. Its clinical manifestations are similar to those of several autoimmune or immune system disorders, such as scleroderma, primary biliary cirrhosis, immune cytopenias, and chronic immunodeficiency and may be limited to a single organ system or may be generalized. cGVHD can have debilitating consequences, including joint contractures, vision loss, end-stage lung disease, and profound chronic immunosuppression [21].

aGVHD remains a major cause of immediate morbidity and mortality in allogeneic HSCT recipients, even when donor and recipient have a high level of human leukocyte antigen (HLA) compatibility [22]. aGVHD commonly affects the skin, gastrointestinal tract (GI), and liver, and usually presents within 100 days of allogeneic HSCT. The pathophysiology of aGVHD is characterized by three well-established stages. The first, commonly known as “cytokine storm”, is a result of the HSCT conditioning regimen. The second involves cellular activation, and is characterized by activation of donor T cells by recipient cytokines and antigen-presenting cells (APCs). The third is the “effector” stage, in which T cells start to damage the cells of certain host tissues [22].

Current prophylaxis regimens for GVHD usually combine a calcineurin inhibitor (cyclosporin A [CsA] or tacrolimus) and a short course of methotrexate (MTX) [23]. There is no clear consensus on optimal prophylaxis for high-risk patients and recipients of unconventional grafts (inadequate donor, older patients, reduced-intensity

conditioning regimen), and several other immunosuppressants have been employed, including sirolimus plus tacrolimus and low-dose (5 mg/m²) MTX [24]. The efficacy of mycophenolate mofetil (MMF) plus CsA has been studied, especially in patients who underwent reduced-intensity conditioning (RIC) regimens. MMF may replace MTX as an adjunct to CsA, due to lower rates of mucositis and good overall tolerability [25]. Recipients of mismatched grafts usually require more intensive immunosuppression. Both *ex vivo* and *in vivo* methods for T-cell depletion (TCD), the latter including anti-thymocyte globulin and alemtuzumab, have been employed. These methods usually reduce the incidence of aGVHD, but at the expense of an increased incidence of infection (due to delayed reconstitution of the immune system) and relapse (due to blunting of the GVL effect) [26].

Treatment of Acute GVHD

As the etiology of aGVHD involves an allogeneic cytotoxic reaction of donor lymphocytes, the cornerstone of aGVHD treatment is immunosuppression, with the purpose of inducing donor/recipient tolerance without eliminating the graft-versus-leukemia/graft-versus-lymphoma (GVL) effect [27]. aGVHD can be classified in 4 degrees of severity from I to IV, and systemic treatment is warranted in Grade \geq II. Again, corticosteroids are the first-line therapy of choice [28], and a recent study confirmed that early response to corticosteroids is associated with increased odds of survival [22]. Patients who responded to high-dose steroids within 5 days of treatment initiation had a 27% mortality rate, versus 49% in patients who required protracted, high-dose steroid therapy (3). However, only 60 to 70% of patients with aGVHD respond to standard corticosteroid therapy. Patients with severe or steroid-refractory aGVHD have few therapeutic alternatives, no established treatment protocol, and a two-year survival as low as 10% [29].

The first-line treatment of choice for aGVHD is methylprednisolone (MP) at a dose of 2 mg/kg/day. In case of treatment failure, several agents may be used as second-line therapy, such as tacrolimus, MMF, sirolimus (if not used for prophylaxis), anti-thymocyte globulin, monoclonal antibodies (anti-IL-2 receptor, anti-TNF α , anti-CD52, anti-CD147, and anti-CD3), and extracorporeal photopheresis (PUVA) [29-31].

Recent studies of MSCs in the treatment of aGVHD have been the subject of substantial attention due to their promising findings [32-35]. However, there is a dearth of phase III comparisons of these agents in the treatment of steroid-refractory aGVHD [28, 36].

MSCs in the Treatment of Acute GVHD

A promising treatment option for aGVHD consists of infusion of third-party, HLA-unrelated, or related bone-marrow donor MSCs. MSCs have been used in the treatment of aGVHD due to their inhibitory effects on the proliferation and cytotoxic activity of immune system cells [37]. The first trial using mesenchymal progenitor cells was conducted in 1995, in which 15 patients have benefited from administration of autologous bone marrow derived MSC [38].

Le Blanc et al. reported the result of haploidentical MSC infusion in a 9-year-old boy with grade IV aGVHD of the GI tract and liver. The clinical response was striking, and the patient remained well at 1-year follow-up [39]. A subsequent study was reported by Ringdén et al. in 2006. The authors administered MSCs to eight patients with grade III/IV steroid-resistant aGVHD and one patient with cGVHD. There was complete resolution of aGVHD in 6 out of 8 patients, and survival was significantly longer than in the control group (16 patients with Grade II–IV, treatment-resistant GVHD of the GI tract who did not receive MSC infusions); 5 patients remained alive over a follow-up period of 2 months to 3 years post-infusion [40]. Since then, a wide range of clinical trials have been conducted to test safety and feasibility (phase I), obtain proof of efficacy in human subjects (phase II) and compare MSC therapy versus the standard of care (phase III). These studies have generally shown good tolerability, with no adverse effects of MSC therapy, and encouraging partial or complete response rates [32, 40–44]. Among those, a multicenter trial conducted by Le Blanc et al. described 55 patients treated with MSCs in several European countries. All subjects had grade II–IV, steroid-resistant aGVHD. Overall, 52% of patients responded to MSC infusions, regardless of HLA compatibility, since of the 92 infusions administered, 69 were prepared from the cells of healthy, unrelated, and HLA-mismatched donors [33].

In the 2010 meeting of the American Society of Blood and Marrow Transplantation, Kurtzberg et al. reported on the use of allogeneic MSCs for treatment of severe steroid-refractory GVHD. The investigators obtained a 64% response rate in 59 children at 28 days after infusion, and this response was found to correlate with 100-day survival, suggesting that MSC therapy has an excellent risk–benefit ratio [45].

Prasad et al. reported on the use of off the shelf allogeneic MSCs for the compassionate treatment of severe steroid-refractory GVHD including 12 children with treatment resistance grade III and IV gut aGVHD. Overall, 7 (58%) patients had complete response, 2 (17%) partial response, and 3 (25%) mixed response. Complete resolution of GI symptoms occurred in 9 (75%) patients. Five of 12 patients (42%) were

still alive after a median follow-up of 611 days (range: 427-1111). No infusional or other identifiable acute toxicity was seen in any patient [46].

Utilizing the same cellular product, Martin et al. presented the results of a randomized, placebo-controlled, multicenter phase III trial of MSC therapy for treatment of steroid-resistant/refractory aGVHD in 244 patients at the 2010 ASMBT meeting. Although the response rate 28 days after MSC infusion was not significantly higher in the treatment group, subgroups analysis showed a significant higher response rate among patients with liver and bowel involvement [47].

Table 1 provides a summary of the many clinical trials of MSC therapy for aGVHD that have been conducted thus far, as well as the response rates observed. Overall, these studies have shown that MSC infusion appears to be a safe treatment option for aGVHD and is not associated with any long-term risk.

Although the aforementioned studies suggest that MSC administration can provide several benefits in patients with grade II–IV, steroid-resistant aGVHD, caution is necessary as there may be a trend toward selective publication of positive trials in this field. Other large randomized controlled trials (RCTs) are ongoing and should better characterize and assess the impact of this treatment modality.

Infused MSC systemic distribution was studied by Von Bahr et al. which examined 108 tissue samples obtained postmortem from 18 patients who had received HLA-mismatched MSCs. There were no signs of ectopic tissue formation or MSC-derived malignancies on gross or histopathological examination. Donor MSC DNA was detected by PCR in some tissues—including lymph node, lung, and bowel—of 8 patients. Detection of donor DNA correlated negatively with time since infusion and time to sample collection, and there was no correlation between MSC engraftment and treatment response [48].

Regarding the optimal dose of MSCs for infusion, a phase II trial sponsored by Osiris Therapeutics assessed infusion of MSCs obtained from HLA-mismatched third-party donors for the treatment of grade II–IV aGVHD. Patients were randomly allocated to receive either low-dose (2×10^6 cells/kg) or high-dose (8×10^6 cells/kg) MSC infusions. The complete response rate at 28-day follow-up was 77% in 31 evaluable patients. The authors failed to show a dose–response relationship [41].

On the other hand, some investigators have reported less encouraging outcomes with MSC therapy. A recent retrospective cohort study by Forsl w et al. found that administration of MSCs may be a risk factor for pneumonia-related mortality

after HSCT [49]. Some authors believe these negative outcomes are primarily attributable to the heterogeneity of patient populations treated with different HSCT regimen, severity of aGVHD, differences in the source of MSCs cells obtained from a single donor or multiple donors (HLA-related or otherwise), and from bone marrow or adipose tissue and to the use of products of animal origin as cell culture media (such as fetal bovine serum, FBS) [44, 50]. Anti-FBS protein antibodies have been detected in some patients who received MSCs expanded in FBS medium [44]. One possible solution is replacement of FBS with platelet-rich human serum, also known as platelet lysate (PL), which contains the nutrients required for expansion of MSCs in culture. *In vitro* studies have shown that PL is as effective as FBS for MSC expansion [44, 51], and *in vivo* studied in humans have also demonstrated successful results [44]. Therefore, as a cell expansion medium, PL is safer from a biological standpoint and noninferior in efficacy to FBS.

MSCs for Prophylaxis of Acute GVHD

Some clinical trials have sought to determine the potential role of MSCs in aGVHD prophylaxis, on the basis of preclinical trials attempting to reduce the incidence of aGVHD in murine models of allogeneic HLA-mismatched transplantation [52]. The protocols of these trials have usually entailed co-transplantation of HSCs and third-party MSCs or transplantation of both cell types from the same donor. According to Baron et al. and Lazarus et al., this procedure is safe and appears to reduce mortality [34, 53], but these findings should be interpreted with caution due to small sample sizes and to a lack of controlled cohort studies.

Ning et al. raised the hypothesis of an excessive recurrence rate when HLA-identical sibling-matched HSCs were co-transplanted with MSCs in patients with hematological malignancies. Even so, among the 25 patients enrolled in this open-label, randomized clinical trial, the incidence of grade II–IV aGVHD was lower in the MSC group (11.1%) than in the control group (53.3%) [54]. In view of the small sample size, these findings cannot be considered statistically robust, but they do suggest that further research into the effect of these cells on the GVL effect in patients who do not develop aGVHD are warranted, as are studies designed to ascertain the optimal provenance of MSCs (same donor as HSCs or third party). Finally, co-transplantation of MSCs and HSCs may be a “double-edged sword”. As **Table 2** shows, some studies reported unsatisfactory outcomes [53, 55, 56], but further randomized clinical trials are required to assess the risk of blunting the GVL effect when MSCs are co-transplanted

with HSCs, particularly to determine the optimal timing of MSC infusion for aGVHD prophylaxis – days after HSC infusion or at the engraftment, without affecting GVL.

Mode of Action of MSCs as Cell Therapy Agents

MSCs are known to interact with other immune system cells; however, the mechanisms underlying their immunomodulatory action have yet to be fully elucidated. MSCs are capable of interacting primarily with natural killer (NK) cells, monocytes, and regulatory T cells [57-59]. These cells also inhibit the immune response by means of complex mechanisms, including changes in antigen-presenting cell maturation and suppression of monocyte-derived dendritic cell (DC) differentiation and activity. Furthermore, MSCs alter the cytokine secretion profiles of effector T cells, DCs, and NK cells, shifting it from a proinflammatory Th1 cytokine profile to an anti-inflammatory Th2 cytokine profile. These effects may prove useful in the prevention and treatment of GVHD and in the inhibition of graft rejection [60]. However, it bears stressing that these findings are mostly derived from *in vitro* studies, as there has been little *in vivo* research.

The clinical use of MSCs requires an understanding of the biological characteristics that underlie their therapeutic effects. Four properties of MSCs are currently considered most important to potential clinical uses: 1) the ability to home to sites of inflammation following tissue injury when injected intravenously; 2) the ability to differentiate into various cell types; 3) the ability to secrete multiple bioactive molecules capable of inhibiting inflammation and healing injured cells and 4) the ability to perform immunomodulatory functions while lacking immunogenicity [61].

Homing and Engraftment of MSCs

In vitro and animal model studies have showed that culture-expanded MSCs are capable of homing to and grafting into sites of inflammation and exerting functional effects on local tissues after systemic administration. Cell migration depends on a variety of stimulatory or regulatory signals, which range from growth factors to chemokines secreted by damaged cells and/or respondent immune cells [62]. Studies have shown that MSC homing is controlled by a wide range of growth factor receptor tyrosine kinases, such as platelet-derived growth factor (PDGF) or insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and chemokines such as CCR2, CCR3, CCR4, and CCL5, as shown by *in vitro* homing assays [18].

Secretion of Bioactive Molecules by MSCs

MSCs can also secrete a wide range of bioactive molecules, including growth factors, cytokines, and chemokines, which can exert dynamic effects on specific sites. **Table 3** lists several of these molecules and their respective roles. In a protein array study of MSCs, Parekkadan et al. detected 69 of 174 analyzed proteins. Most of the detected molecules were growth factors, cytokines, and chemokines, which are known to have regenerative and anti-apoptotic effects [63].

Immunomodulatory Effects of MSCs

The ability of MSCs to modulate immune function was first recognized in 2000, when Liechty et al. found that MSCs has immunomodulatory properties that enabled the persistence of human MSCs in a xenogeneic environment [64]. Several later studies gradually confirmed these immunomodulatory properties. Nevertheless, the precise mechanisms underlying MSC-mediated immunomodulation have yet to be fully understood. Cell–cell contact and release of soluble immunosuppressant factors are the main mechanisms being studied since, as aforementioned, MSCs are capable of interacting with a wide range of immune system cells, including T lymphocytes, B lymphocytes, natural killer cells, dendritic cells, and macrophages. **Table 4** lists the main immunomodulatory effects of MSCs on these immune cells.

MSCs appear to exhibit little immunogenicity, in view of their low class I MHC expression and absence of class II MHC molecules. Furthermore, MSCs do not express co-stimulatory molecules such as CD40, CD80, or CD86, which are involved in T-cell activation in the transplant rejection setting [65, 66]. Several studies have shown that differentiated and undifferentiated MSCs have alloantigen suppressing effects on *in vitro* myogen-induced lymphocyte proliferation using mixed lymphocyte reaction (MLR) cultures, with a concomitant decrease in secretion of proinflammatory cytokines such as interferon gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). [65, 67, 68]

Human MSCs have been reported to express toll-like receptors (TLR) types TLR1 to TLR1 [69-73]. These receptors are associated with tissue injury and infection. Furthermore, baseline levels of TLR expression in BM-derived and adipose tissue-derived human MSCs are sensitive to environmental stimuli. Expression may be hyper regulated by hypoxia (for TLR1, TLR2, TLR5, and TLR9) or inflammatory conditions, by IFN γ , TNF, IFN α , and IL-1 β (for TLR2, TLR3, and TLR4) [74, 75].

In a non-inflammatory environment, MSCs express low levels of cyclooxygenase 2 (COX-2), prostaglandin E2 (PGE2), transforming growth factor- β (TGF- β), indoleamines (IDO), and other factors. However, pro-inflammatory cytokines

drastically regulate secretion of anti-inflammatory factors by MSCs. One example is increased secretion of IDO, hepatocyte growth factor (HGF), and TGF- β induced by IFN- γ and increased secretion of PGE2 induced by TNF- α in MSCs [76-78].

Interactions between MSCs and T Lymphocytes

The interactions between MSCs and T lymphocytes have been most widely studied, particularly *in vitro*. Several articles have reported that MSCs have an impact on several T-cell properties—for instance, suppressing proliferation of activated CD4⁺ (helper) T cells and CD8⁺ (cytotoxic) T cells [79, 80]. MSCs keep activated T cells in phase G0/G1 of the cell cycle [81], but apoptosis is not induced [79, 80]. In addition to their ability to regulate activated T-cell proliferation, MSCs may prolong survival of unstimulated T cells and inhibit endogenous proteases involved in cell death [82]. Other studies have shown that MSCs reduce expression of IFN- γ by CD4⁺ Th1 cells and IL-12 release by CD4⁺ Th17 (T helper) cells, whereas IL-4 secretion by CD4⁺ Th2 cells is increased [76, 83]. The cytolytic potential of cytotoxic T cells may also be affected by MSCs [84].

Recent studies have investigated the impact of MSCs on regulatory T lymphocytes (T_{reg}), a population of CD4⁺/CD25^{high} cells that play an important role in induction of peripheral tolerance and inhibition of pro-inflammatory immune responses [85]. Many studies have shown that MSC can induce expansion of CD4⁺/CD25^{high}/Foxp3⁺ T cells (functional T_{regs}) [76, 83, 86, 87]. Countless mechanisms have been suggested, including cell contact-dependent and independent mechanisms, but there is no consensus; TGF- β , for instance, was reported to be involved in this effect by English et al. [86], but not in a later study conducted by Prevosto et al. [87]. This discrepancy is probably attributable to phenotypic variation and differences in MSC culture methods.

The current body of evidence provides an outline of which specific molecules are involved in the immunomodulatory effects of MSCs on effector T lymphocyte proliferation and function. In the human immune system, the effects of MSCs on T cells are mediated primarily by independent cell–cell contact, evincing the importance of secretion of such factors as [88] IL-1 β [89], TGF β -1 [86], HGF [79], PGE2[76], IDO[90], heme oxygenase-1 (HO-1)[91], leukemia inhibitory factor (LIF)[92], IGF[93], sHLA-G5[92], galectin[94], and Jagged-1[69].

Some authors have reported that, *in vitro*, pretreatment of MSCs with the pro-inflammatory cytokine IFN- γ boosts immunomodulation [95, 96]. This may explain the

ability of MSCs to act on inflammatory conditions such as aGVHD, in which production of cytokines such as IFN- γ by T lymphocytes and NK cells may promote MSC immunomodulation, and, subsequently, suppress CD4⁺, CD8⁺, and NK cell proliferation [96]. This paradox must still be elucidated if the immunomodulatory effects of MSCs are to be understood [95, 97].

Interactions between MSCs and B Lymphocytes

Some studies have shown that MSCs can regulate B-lymphocyte functions, including migration, proliferation, and immunoglobulin (Ig) synthesis [98]. *In vitro*, MSCs inhibit B lymphocyte proliferation by G0/G1 cell cycle arrest. MSCs also inhibit IgM, IgA, and IgG production [99, 100]. The effects of MSCs on B lymphocytes are mediated both by soluble factors, such as IFN γ and IL-6 [98, 101], and by cell–cell (MSC–B lymphocyte) contact [98, 102].

Interactions between MSCs and DCs

DCs are derived from monocytes and lymphoid precursors, and function as potent antigen-presenting cells (APCs), which internalize, transport, and present antigens to naïve T cells, thus triggering T lymphocyte activation [103]. In the presence of MSCs, differentiation of CD14⁺ monocytes into DCs is impaired, and monocytes retain high CD14⁺ expression—a marker of DC immaturity—without an increase in CD1a, HLA-DR, or co-stimulatory molecule expression, thus preventing DCs from inducing effector T cell response [104]. MSCs also suppress the T cell-activating effect of DC, including stimulation of T lymphocyte proliferation, reduction of Th1 differentiation from naive CD4⁺ T cells, and promotion of Th2 responses. MSCs may reduce secretion of TNF- α by DCs, which leads to a quantitative decrease in the production of IFN γ -expressing Th1 cells. APCs generated in the presence of MSCs express low levels of IL-12, TNF- α , and MHC II and high concentrations of IL-1 β and IL-10, independently of CD86 expression [105]. MSCs also induce DCs to secrete IL-10, which skews the immune response profile toward T_{regs} and IL-4-producing Th2 cells [76]. Furthermore, MSCs hinder cytokine release by activated DCs through PGE2 [76, 106].

Some studies have shown that MSCs may function as non-professional APCs, as IFN γ -stimulated MSCs have been reported to present exogenous antigens by means of MHC II overexpression, triggering CD4⁺ T cell activation [107, 108]. MSCs can also induce CD8⁺ T cell proliferation by presenting endogenous antigens [109, 110]. Studies have also shown that, like DCs, MSCs express high levels of TLR. TLRs

are primary receptors expressed by APCs that recognize pathogen-associated molecular patterns. Triggering of TLR3, which binds double-stranded RNA, and TLR4, which binds lipopolysaccharides (LPS) and innate autoantigens, leads to production of pro-inflammatory mediators such as IL-1b, IL-6, and IL-8 [69, 111]. However, another study has shown that TLR triggering by MSCs induces immunosuppression, thus leading to production of immunosuppressant kynurenine induced by the IDO enzyme [71]. These conflicting data, which suggest that MSCs both suppress DC maturation and are themselves APCs and thus induce a pro-inflammatory response, justify further research.

Interactions between MSCs and NK Cells

NK cells are lymphocytes of the innate immune system and play an important role in the elimination of virally infected and tumor cells. When activated, NK cells are highly cytotoxic and secrete large quantities of proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IFN- γ [112, 113]. Within the innate immune response, these cytotoxic lymphocytes recognize and respond to MHC molecules, distinguishing self from non-self by means of co-stimulatory and inhibitory receptors instead of specific antigens, as done by adaptive immune system T and B cells. A small number of studies have shown that MSCs are able to suppress NK cell proliferation and cytokine production [76, 84, 114]. This inhibition requires both cell–cell contact and secretion of soluble factors, such as PGE2 and TGF- β [96, 114]. MSCs are also capable of modulating NK cell cytotoxicity by decreasing the amount of cytokines (including IFN- γ , IL-10, and TNF- α) secreted by NK cells; this phenomenon also requires cell–cell contact [114, 115]. Nevertheless, stimulated NK cells can still lyse both autologous and allogeneic MSCs [114, 116]. The NK cell activating receptors Nkp30, NKG2D, and DNAM-1 act as mediators of NK cell-versus-MSK cytotoxicity. Conversely, IFN- γ stimulates MSCs, thus decreasing their susceptibility to lysis by NK cells by increasing surface expression of MHC I [116]. Finally, secretion of soluble HLA-G (sHLA-G) by MSCs plays an important role in inhibiting NK cell cytotoxicity and IFN- γ release [117].

Interactions between MSCs and Macrophages

Macrophages play a crucial role in the inflammatory response and in tissue regeneration. Macrophages differentiate from monocytes after migration into tissues under homeostatic conditions or after inflammatory activation [118]. In a CCL3- and CXCL2 (MIP2)-dependent manner, human MSCs recruit monocytes and macrophages from across the body and into inflamed tissues [119]. Macrophages exhibit plasticity, and can be polarized by the microenvironment (including by presence of MSCs) into

two forms of activated macrophages, M1 (antimicrobial) or M2 (inflammatory). Co-culture of human MSCs and monocytes promotes formation of M2 macrophages, which exhibit high levels of IL-10 expression and intense phagocytic activity and low TNF and IFN γ levels and MHCII expression [120-122]. This differentiation occurs as a result of cell–cell contact and by several soluble factor-mediated mechanisms, such as IDO and PGE2 secretion by MSCs.

Conclusion

In recent years, MSCs have become a subject of clinical research interest due to their easy isolation and culture, their striking potential for differentiation, their production of growth factors and cytokines, and their potential immunomodulatory effects. Upon direct contact with tissues or by means of paracrine interactions, MSCs trigger the release of a variety of soluble factors that act on immune system cells. These cells are able to identify “warning signs”, or a lack thereof, and modulate immune cells accordingly so as to ensure a balance between activation and inhibition of immune responses as necessary. Nevertheless, the mechanism whereby MSCs exert immunosuppressant effects on the inflammatory response and on transplant rejection processes have yet to be fully elucidated *in vivo*, despite extensive *in vitro* research.

In short, MSCs appear to be safe and well-tolerated for use in cell therapy, and, as a treatment modality, can provide hope to patients with steroid-resistant aGVHD. The results of clinical trials have thus far been encouraging, and research in this field continues to improve. At the time of writing, 307 clinical trials of mesenchymal stem cells for a variety of therapeutic applications were registered in the ClinicalTrials.gov database (<http://clinicaltrials.gov>), 31 of which designed to test MSCs in the treatment of GVHD. Further information on the biology of MSCs must be obtained so as to keep pace with progress being made in regenerative medicine and ascertain the safety and efficacy of these cells for treatment of aGVHD and other inflammatory and autoimmune conditions.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest were disclosed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support provided by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/ HCPA).

REFERENCES

1. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):287-98.
2. Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1044:132-8.
3. Vogel G. Can old cells learn new tricks? *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1418-9.
4. Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, et al. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells*. 1996 Mar;14(2):239-48.
5. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19(3):193-204.
6. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1427-30.
7. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
8. Yu J, Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev*. 2008 Aug 1;22(15):1987-97.
9. Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *J Physiol Paris*. 2002 Jan-Mar;96(1-2):81-90.
10. Meirelles LS, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioscience*. 2009;14:4281-98.
11. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*. 2005 Oct;85(4):1373-416.
12. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1431-3.
13. Hirao A, Arai F, Suda T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle*. 2004 Dec;3(12):1481-3.
14. Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2005 Dec;5(12):1571-84.
15. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.
16. Harichandan A, Buhring HJ. Prospective isolation of human MSC. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Mar;24(1):25-36.
17. 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.
18. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*. 2010;19(6):667-79.
19. 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 Oct 15;104(8):2254-62.
20. Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch Intern Med*. 2002 Jul 22;162(14):1558-66.
21. 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 Dec;11(12):945-56.
22. Voltarelli JC. Transplante de células-tronco hematopóéticas: Atheneu.

23. 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 Mar 20;314(12):729-35.
24. 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 Apr 1;109(7):3108-14.
25. Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, Petersdorf E, Hegenbart U, Sandmaier BM, et al. Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1620-9.
26. Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet*. 2005 Aug 27-Sep 2;366(9487):733-41.
27. 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 transplantation*. Sep 6.
28. 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 Jan 5;119(1):16-25.
29. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4119-26.
30. Bacigalupo A. Management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2007 Apr;137(2):87-98.
31. Kim SS. Treatment options in steroid-refractory acute graft-versus-host disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Pharmacother*. 2007 Sep;41(9):1436-44.
32. Ringden O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Mar;24(1):65-72.
33. Le Blanc K, Frassonni 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 May 10;371(9624):1579-86.
34. Baron F, Lechanteur C, Willems E, Bruck F, Baudoux E, Seidel L, et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jun;16(6):838-47.
35. Wernicke CM, Grunewald TG, Juenger H, Kuci S, Kuci Z, Koehl U, et al. Mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory GvHD: a review of the literature and two pediatric cases. *Int Arch Med*. 2011;4(1):27.
36. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009 Jan;15(1):42-9.
37. Lee ST, Jang JH, Cheong JW, Kim JS, Maeng HY, Hahn JS, et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol*. 2002 Sep;118(4):1128-31.
38. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells

(mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone marrow transplantation*. 1995 Oct;16(4):557-64.

39. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004 May 1;363(9419):1439-41.

40. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006 May 27;81(10):1390-7.

41. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Jul;15(7):804-11.

42. Lucchini G, Introna M, Dander E, Rovelli A, Balduzzi A, Bonanomi S, et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Sep;16(9):1293-301.

43. Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:20.

44. von Bonin M, Stolzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Holig K, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone marrow transplantation*. 2009 Feb;43(3):245-51.

45. Kurtzberg J, Prasad V, Grimley MS, Horn B, P.A.; C, Jacobsohn D. Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (Prochymal) as a rescue agent for severe treatment resistant GVHD in pediatric patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16:1.

46. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, Talano JA, Jacobsohn D, Broadwater G, et al. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Apr;17(4):534-41.

47. Martin PJ, Uberti JP, Soiffer RJ, Klingemann H, Waller EK, Daly AS. Prochymal improves response rates in patients with steroid-refractory acute graft versus host disease (SR-GVHD) involving the liver and Gut: results of a randomized, placebo-controlled, Multicenter phase III trial in GVHD. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16:2.

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

49. Forslow U, Blennow O, LeBlanc K, Ringden O, Gustafsson B, Mattsson J, et al. Treatment with mesenchymal stromal cells is a risk factor for pneumonia-related death after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2012 Sep;89(3):220-7.

50. Arima N, Nakamura F, Fukunaga A, Hirata H, Machida H, Kouno S, et al. Single intra-arterial injection of mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Cytotherapy*. 2010 Apr;12(2):265-8.

51. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2007 Aug;47(8):1436-46.

52. Chung NG, Jeong DC, Park SJ, Choi BO, Cho B, Kim HK, et al. Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2004 Nov;80(4):370-6.

53. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 May;11(5):389-98.

54. Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*. 2008 Mar;22(3):593-9.
55. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007 Aug;21(8):1733-8.
56. Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, Roelofs H, Zecca M, Avanzini MA, et al. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone marrow transplantation*. 2011 Feb;46(2):200-7.
57. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol*. 2008 Mar;36(3):309-18.
58. Grazia MS, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, L. M. 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*. 2011;107(4):7.
59. Parham P, editor. *O Sistema Imune: Artmed*; 2001.
60. Nasef A, Mathieu N, Chapel A, Frick J, Francois S, Mazurier C, et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*. 2007 Jul 27;84(2):231-7.
61. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012;5:19.
62. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther*. 2008 May;15(10):730-8.
63. Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One*. 2007;2(9):e941.
64. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000 Nov;6(11):1282-6.
65. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003 Oct;31(10):890-6.
66. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2003 Mar-Apr;10(2):228-41.
67. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002 Jan;30(1):42-8.
68. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci*. 2005;12(1):47-57.
69. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, et al. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):279-89.
70. Lombardo E, DelaRosa O, Mancheno-Corvo P, Menta R, Ramirez C, Buscher D. Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. *Tissue Eng Part A*. 2009 Jul;15(7):1579-89.
71. Opitz CA, Litzenger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Koppel A, et al. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-

derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells*. 2009 Apr;27(4):909-19.

72. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1422-32.

73. Tomchuck SL, Zwezdaryk 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 Jan;26(1):99-107.

74. Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells*. 2006 Dec;24(12):2744-52.

75. Raicevic G, Rouas R, Najar M, Stordeur P, Boufker HI, Bron D, et al. Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Hum Immunol*. 2010 Mar;71(3):235-44.

76. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815-22.

77. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):386-98.

78. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2007 Aug;149(2):353-63.

79. 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 May 15;99(10):3838-43.

80. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 Feb 15;75(3):389-97.

81. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2821-7.

82. Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, et al. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*. 2007 Jul;25(7):1753-60.

83. Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol*. 2010 Jul 1;185(1):302-12.

84. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005 Apr;90(4):516-25.

85. Riley JL, June CH, Blazar BR. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity*. 2009 May;30(5):656-65.

86. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2009 Apr;156(1):149-60.

87. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 2007 Jul;92(7):881-8.

88. Batten P, Sarathchandra P, Antoniow JW, Tay SS, Lowdell MW, Taylor PM, et al. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng*. 2006 Aug;12(8):2263-73.

89. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol*. 2005 Aug;33(8):928-34.
90. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4619-21.
91. Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Souillou JP, et al. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3691-4.
92. Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, Francois S, Chapel A, Thierry D, et al. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol*. 2008 May-Jun;253(1-2):16-22.
93. Gieseke F, Schutt B, Viebahn S, Koscielniak E, Friedrich W, Handgretinger R, et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFN γ signaling and IDO expression. *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):2197-200.
94. Gieseke F, Bohringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Muller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3770-9.
95. Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang HI, Bai CH, et al. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. *Stem Cells*. 2006 Nov;24(11):2466-77.
96. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3722-9.
97. Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jan;190(1):239-45.
98. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringden O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol*. 2007 Apr;65(4):336-43.
99. Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Apr;23(4):1196-202.
100. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367-72.
101. 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 Jul;33(7):796-803.
102. 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 May;35(5):1482-90.
103. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev*. 1997 Apr;156:25-37.
104. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005 May 15;105(10):4120-6.
105. 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 Mar 1;105(5):2214-9.
106. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6576-83.

107. Chan WK, Lau AS, Li JC, Law HK, Lau YL, Chan GC. MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. *Exp Hematol*. 2008 Nov;36(11):1545-55.
108. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2570-7.
109. Francois M, Romieu-Mourez R, Stock-Martineau S, Boivin MN, Bramson JL, Galipeau J. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood*. 2009 Sep 24;114(13):2632-8.
110. Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, Meloni F, Salis A, Millo E, et al. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells*. 2008 May;26(5):1275-87.
111. Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, Bouchentouf M, Spaner DE, Galipeau J. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol*. 2009 Jun 15;182(12):7963-73.
112. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):461-9.
113. Moretta A, Locatelli F, Moretta L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev*. 2008 Aug;224:58-69.
114. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006 Jan;24(1):74-85.
115. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1327-33.
116. 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 Feb 15;107(4):1484-90.
117. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):212-22.
118. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012 May;12(5):383-96.
119. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008;3(4):e1886.
120. Francois M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther*. 2012 Jan;20(1):187-95.
121. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol*. 2009 Dec;37(12):1445-53.
122. Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzon IM, Nepomnaschy I, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*. 2010;5(2):e9252.
123. Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc*. 2007 Dec;39(10):3358-62.
124. Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoffer F, et al. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*. 2008 Jan-Feb;40(1):25-32.

125. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2764-7.
126. Guo M, Sun Z, Sun QY, Han Q, Yu CL, Wang DH, et al. A modified haploidentical nonmyeloablative transplantation without T cell depletion for high-risk acute leukemia: successful engraftment and mild GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Aug;15(8):930-7.
127. Zhang X, Li JY, Cao K, Lu H, Hong M, Qian S, et al. Cotransplantation of HLA-identical mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in Chinese patients with hematologic diseases. *Int J Lab Hematol*. 2010 Apr;32(2):256-64.
128. Gonzalo-Daganzo R, Regidor C, Martin-Donaire T, Rico MA, Bautista G, Krsnik I, et al. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy*. 2009;11(3):278-88.
129. Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone marrow transplantation*. 2009 Mar;43(6):447-54.
130. Fang B, Li N, Song Y, Li J, Zhao RC, Ma Y. Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia. *Pediatr Transplant*. 2009 Jun;13(4):499-502.
131. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One*. 2010;5(12):e14247.
132. Foraker JE, Oh JY, Ylostalo JH, Lee RH, Watanabe J, Prockop DJ. Cross-talk between human mesenchymal stem/progenitor cells (MSCs) and rat hippocampal slices in LPS-stimulated cocultures: the MSCs are activated to secrete prostaglandin E2. *J Neurochem*. 2011 Dec;119(5):1052-63.
133. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 26;104(26):11002-7.
134. 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 Dec;28(12):2229-38.
135. Fang X, Neyrinck AP, Matthay MA, Lee JW. Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured human alveolar type II cells by secretion of angiopoietin-1. *J Biol Chem*. 2010 Aug 20;285(34):26211-22.
136. Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, Jung J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(6):867-76.
137. Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 22;106(38):16357-62.
138. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004 Mar 30;109(12):1543-9.
139. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004 Mar 19;94(5):678-85.
140. Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia*. 2005 Sep;19(9):1597-604.

141. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol.* 2009 May;37(5):604-15.
142. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev.* 2004 Jun;13(3):263-71.
143. Chen L, Zhang W, Yue H, Han Q, Chen B, Shi M, et al. Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells. *Stem Cells Dev.* 2007 Oct;16(5):719-31.

TABLE 1 – Clinical studies of MSCs for treatment of acute graft-versus-host disease.

Year/Ref	Study type	N	MSC source	P / Media	MSC dose/Kg	Response
2004/ [39]	Case report	1	BM; Related donor	3 wks / BFS	1.0x10(6)	Complete response. Patient still alive 1 year after infusion.
2006 / [40]	Phase I	8	BM; HLA-identical, haploidentical, and unrelated	1-4 / FBS	1.0x10(6)	5 patients survived 2 months to 3 years after infusion.
2007 / [123]	Efficacy	6	Adipose tissue; Haploidentical (2) and unrelated donors (4)	5 / FBS	1.0x10(6)	aGVHD resolved in 5 patients; of these, 4 remained alive after a median 40-month follow-up.
2008 / [124]	Safety and feasibility	7 (2 with aGVHD)	BM;HSC donor (5) and third-party related donors (2)	Max 6 wks / FBS	0.4x10(6) to 3.0x10(6)	2 patients with severe aGVHD did not progress to cGVHD; one experienced complete remission
2008 / [33]	Phase II	55	BM;HLA-identical; HLA-haploidentical; third party.	1-4 / FBS	1.4x10(6)	Complete response in 63% of children and 43% of adults; partial response in 16% of children and 17% of adults; 3 relapses; 2-year survival: 53%.
2009 / [44]	Cohort	13	BM; Third-party HLA-mismatched donor	1-2 / PL	Median: 0.9x10(6)	2 patients (15%) responded and required no further immunosuppressant therapy. 11 patients received immunosuppressants concomitantly with MSCs; after 28 days, 5 of these (45%) had responded. 4 patients (31%) remained alive at 257-day follow-up.
2009 / [41]	Phase II multicenter RCT	31	Osiris Therapeutics; Unrelated donors	-	2 or 8x10(6) in combination with corticosteroids	Complete response in 77%, partial response in 16% of patients
2010 / [42]	Multicenter	11	BM; unrelated HLA- mismatched donors	- / PL	Median: 1.2x10(6)	Overall response in 71.4% of patients, CR in 23.8% of cases. No patients presented GVHD progression after MSC administration, but 4 patients presented GVHD recurrence 2 to 5 months post-infusion. 2 patients developed limited cGVHD.
2010 / [50]	Pilot	3	BM; related; HLA-identical (1); unknown	3 wks culture / Expanded with donor serum	5.0x10(6)	Complete response in 1 patient, partial response in 2 patients

CR, complete response. FBS, fetal bovine serum. GI, gastrointestinal. PBSCT, peripheral-blood stem cell transplantation. PL, platelet lysate. PR, partial response.

TABLE 2 – Clinical studies of MSCs for graft-versus-host disease prophylaxis.

Year/Ref	Study type	N	MSC source	P / Media	MSC dose/Kg	Response
2005/ [53]	Safety and feasibility	46	BM; related donor	- / FBS	1.0-5.0x10 ⁹ (6) 4 hours before HSCT	28% (13) developed grade II-IV aGVHD. 61% (36) developed cGVHD.
2007 / [55]	Pilot	7	BM; HLA-identical and HLA-haploidentical	2-3 / FBS	1.0x10 ⁶ (6)	5 patients developed aGVHD and 1 developed cGVHD.
2007 / [125]	Pilot	47	BM; HLA-matched	3 / FBS	1.0-5.0x10 ⁶ (6) 4 hours before HSCT	4 deaths (2 relapses, 2 viral infections).
2008 / [54]	Phase II, randomized	10	PBSC or BM; Related donors	- / FBS	0.03x10 ⁶ (6) a 1.5x10 ⁶ (6)	The incidence of grade II-IV GVHD was 11.1% in the MSC group versus 53.3% in the control group. The incidence of aGVHD was 44.4% in the MSC group versus 73.3% in the control group.
2009 / [126]	Phase II (???)	33	PBSCT + MSCs	3-5 / FBS	0.5x10 ⁵ (5) a 1.7x10 ⁶ (6)	15 patients (45.5%) developed grade I-IV aGVHD and 2 (6.1%) developed grade III-IV aGVHD. 9 (31%) of 29 developed cGVHD.
2009 / [127]	Safety and feasibility	14	BM; HLA-identical (same donor as HSCT)	3-4 / human MSC stimulatory supplements	2.0x10 ⁶ (6) após 1 hora do TCTH	Two patients developed grade II-IV aGVHD and two developed cGVHD. Four patients contracted CMV infection and were treated successfully. Five patients died.
2009 / [128]	Pilot	9	BM; third party	1-3 / FBS	1.04-2.15x10 ⁶ (6) immediately after cord blood and mobilized HSC transplantation	Four patients developed grade II aGVHD (two had steroid-refractory GVHD).
2009 / [129]	Phase I-II	15	BM; related donors	1-4 /-	0.9 to 5x10 ⁶ (6) on day of HSCT; 3 patients received a booster dose 21 days later	Incidence of GVHD at 100 days post-HSCT was similar in patients who received MSCs (p=0.44)
2009 / [130]	Report of two cases	2	Adipose tissue	- / FBS	1.0x10 ⁶ (6) within 4 hours after PBSC infusion	Both patients survived 2 years post transplantation.
2010 / [34]	Pilot	20	PBSC of HLA-mismatched donors	P2 / FBS	1.0-2.0x10 ⁶ (6), 30 to 120 minutes before PBSC	Co-transplantation of HLA-mismatched PBSCs and third-party MSCs was feasible. No mortality (10% at 1-year follow-up)
2011 / [56]	Cohort	13	BM; related donor	2-3 / FBS	1 a 3.9x10 ⁶ (6) on the day of HSCT	No differences between the intervention and control groups.

TABLE 3 – Molecules secreted by MSCs and their roles

Molecule	Role
Prostaglandin E2 (PGE2)	Mediates antiproliferative [131], anti-inflammatory [132] effects
Interleukin 10 (IL-10)	Anti-inflammatory [36]
Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1), hepatocyte growth factor (HGF)	Suppress T cell proliferation [79]
Interleukin 1 receptor antagonist	Anti-inflammatory [133]
Human leukocyte antigen, G isoform (HLA-G5)	Suppresses naive T cell proliferation [117]
Antimicrobial peptide LL-37	Antimicrobial, anti-inflammatory [134]
Angiopoietin 1	Restores epithelial protein permeability [135]
Matrix metalloproteinases 3 and 9 (MMP3, MMP9)	Mediate neovascularization [136]
Keratinocyte growth factor	Alveolar epithelial fluid transport [137]
Vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), placental growth factor (PlGF), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)	Increase endothelial cell and smooth muscle cell proliferation [138], [139]

TABLE 4 – Immunomodulatory effects of MSC therapy on immune system cells.

Cell type	Effects of MSC therapy	Soluble factors involved
T lymphocytes	<p>Suppresses T cell proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli [79];</p> <p>Alters the cytokine secretion profile of effector T cells [76];</p> <p>Promotes expansion and activity of regulatory T cells [86]</p> <p>Induces apoptosis of activated T cells [140]</p> <p>Regulatory T cell generation [88]</p>	<p>IL-1β [89]</p> <p>TGFβ1 [89]</p> <p>HGF [79]</p> <p>PGE2 [76]</p> <p>IDO [140]</p> <p>LIF [92]</p> <p>IGF [93]</p> <p>HLA-G [92]</p> <p>CCL1 [88]</p>
B lymphocytes	<p>Inhibits B cell proliferation [102];</p> <p>Affects the chemotactic properties of B cells [100];</p> <p>Suppresses B cell differentiation [141]</p>	<p>IFN-γ [101]</p> <p>IL-6 [98]</p>
NK cells	<p>Alters the NK cell phenotype, suppresses NK cell proliferation, cytokine secretion, and cytotoxicity against HLA class I-expressing targets [114]</p>	<p>TGFβ [114]</p> <p>IDO [115]</p> <p>HLA-G [117]</p> <p>PGE2 [115]</p>
Dendritic cells (DC)	<p>Influences the differentiation, maturation, and role of DCs differentiated from monocytes [142];</p> <p>Suppresses DC migration, maturation, and antigen presentation [143]</p>	<p>M-CSF [104]</p>
Macrophages	<p>M2 macrophage recruitment;</p> <p>Conversion of proinflammatory M1 macrophages into anti-inflammatory M2 macrophages;</p> <p>Attenuates macrophage inflammatory response</p>	<p>CCL3 [118]</p> <p>CCL12 [118]</p> <p>CXCL2 [118]</p> <p>PGE2 [118]</p> <p>KYN [118]</p> <p>TSG6 [118]</p>

6. ARTIGO CIENTÍFICO 3

Artigo Original – Letter to Editor

(Aceito na Revista “Leukemia and Lymphoma”)

A SAFETY AND FEASIBILITY STUDY WITH PLATELET LYSATE EXPANDED BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS FOR THE TREATMENT OF ACUTE GVHD IN BRAZIL

Lucia Silla, Vanessa Valim, Bruna Amorin, Ana Paula Alegretti, Fernanda dos Santos de Oliveira, Maria Aparecida Lima da Silva, Alice Dahmer, Natália Emerim Lemos, Márcia Arthmar Mentz Albrecht, Álvaro Macedo Laureano, Carmem Bonfim, Lauro Moraes Júnior, Annelise Pezzi, Letícia Baggio, Cristina Arthmar Mentz Albrecht, Marcelo Capra, Laura Fogliatto, Lisandra Della Costa Rigoni, Gustavo Fischer, Alessandra Paz, Liane Esteves Daudt.

LETTER TO EDITOR:

A SAFETY AND FEASIBILITY STUDY WITH PLATELET LYSATE
EXPANDED BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS FOR THE
TREATMENT OF ACUTE GVHD IN BRAZIL

Lucia Silla^{1,2,4}, Vanessa Valim¹, Bruna Amorin^{1,2}, Ana Paula Alegretti¹, Fernanda dos Santos de Oliveira¹, Maria Aparecida Lima da Silva¹, Alice Dahmer¹, Natália Emerim Lemos¹, Márcia Arthmar Mentz Albrecht¹, Álvaro Macedo Laureano^{1,2}, Carmem Bonfim³, Lauro Moraes Júnior¹, Annelise Pezzi^{1,2}, Letícia Baggio¹, Cristina Arthmar Mentz Albrecht¹, Marcelo Capra^{1,2}, Laura Fogliatto⁴, Lisandra Della Costa Rigoni⁴, Gustavo Fischer⁴, Alessandra Paz⁴, Liane Esteves Daudt⁴.

¹ Cellular Therapy Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Center for Experimental Research, Porto Alegre - Rio Grande do Sul – Brazil

² Post-graduation in Medicine: Medical Sciences – Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Brazil

³ Bone Marrow Transplantation of Hospital de Clinicas da Universidade Federal do Paraná.

⁴ Hematology and Bone Marrow Transplantation of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre - Rio Grande do Sul - Brazil

CORRESPONDENCE TO: Professor Lucia Silla, MD, PhD (lsilla@hcpa.ufrgs.br)

Adress Ramiro Barcelos, 2350, Centro de pesquisa experimental, 2º andar. Zipcode: 90035-903. Porto Alegre-RS / Brazil - Phone/Fax Number: 55-51-3359-8850.

Allogeneic haemopoietic-stem-cell transplantation (AlloSCT) is the treatment of choice for many malignant and non-malignant hematological disorders [1]. However, this treatment is frequently complicated by acute graft-versus-host disease (aGVHD), which can be associated with high morbidity and mortality [2]. Steroids are still the first-line treatment for established aGVHD with a response rate of 30–50%; and there is no established and effective therapy for severe steroid-refractory aGVHD. The outcome for patients is poor, and overall survival low with as few as 16% of the patients been alive at 2 years [3]. In case of failure after corticosteroid treatment, different therapeutic options have been introduced as second- or third-line strategies [4]. In this scenario, infusion of ex-vivo expanded mesenchymal stromal cells (MSC) has emerged as an additional tool for the treatment of GVHD. Due to its proprieties the infusion of MSC had shown promising results in studies for the treatment of aGVHD [5-7]. Here we report the results of a safety and feasibility pilot study including eight patients with steroid-resistant aGVHD treated with Good Manufacturing Practice (GMP) clinical grade, PL expanded MSC.

Between October 2010 and May 2011, eight patients were treated. Inclusion criteria were as follows: patients of any age submitted to a myeloablative or reduced intensity conditioning AlloSCT with biopsy proven steroid-resistant aGVHD treated or not with basiliximab and/or infliximab. Acute GVHD was classified according to the National Institutes of Health (NIH) Consensus Conference [8], and steroid resistant aGVHD defined according to the European Bone Marrow Transplant Guideline [9].

Patients from three different Institutions were included - Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA (n=5), Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (n=1), and Hospital Universitário da Universidade Federal do Paraná (n=2). The study was approved by the

local ethics committee (number 10-0435) or institutional review boards of the participant institutions, and donor and recipients or their legal guardians gave written informed consent. The response criteria were *Complete Response* (CR) for patients whose all symptoms disappeared; *Partial Response* (PR) for patients whom decreased in at least one degree of aGVHD and *No Response* (NR). This assessment of response was analyzed 28 days after the first infusion of MSC.

50 mL of bone marrow (BM) was obtained from the posterior iliac crest of six healthy BM donors at our center. BM mononuclear cells (MNBMC) were separated by density gradient centrifugation as previously described [10] and resuspended in Dulbecco's modified Eagle' medium (DMEM low Glucose) (Gibco, Invitrogen corp., Carlsbad, CA, USA) with 1% Penicillin (10,000 U/mL) Streptomycin (100 μ g/mL) (Gibco, Invitrogen corp., Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% of platelet lysate. In short, each PL lot was prepared from 5 units of platelets from our Institution blood bank, after several rounds of freezing and thawing, followed by filtration and addition of Heparin as described elsewhere [11,12]. For the cells cultures, 9×10^7 MNBMC were plated in 300cm² flasks (TPP, Switzerland) with complete medium and maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After around 14 days, the cells reach 80% of confluence and were detached with Trypsin (Gibco, Invitrogen corp., Carlsbad, CA, USA) and replated at a density of 1.5×10^6 cells per flaks. On average, 1.5×10^9 cells were obtained from each culture, 28 days after the initial plating, and there was not a case of culture contamination (data not shown). MSC cultures showed the typical morphology of MSC, i.e. triangular at low density seeding and spindle-shaped at confluence and characteristic phenotype with expression of CD105, CD73, CD29, CD90, with lack of CD34, CD45,

CD14 and HLA-DR. Moreover, these cells differentiated in osteoblasts, chondrocytes and adipocytes.

Except for the first two infusions (Table I), after passage three (P3), the cells were either cryopreserved in 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Baxter Healthcare, Deerfield, IL, USA) at a concentration of 10^7 cells/mL, or resuspended in an infusion solution with 5% Citric Acid Dextrose anticoagulant (ACD), 25% Albumin and 70% Saline, to a total volume of 100mL, irrespectively of the total number of cells. The release criteria for clinical use was absence of contamination by mycoplasma (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza, Rockland USA) and endotoxin (Endosafe PTS 0.05-5.0EU/mL, Charles River, Wilmington, USA). Cell viability was determined by Trypan Blue Assay and the mean viability of all cultured cells infused was 90% (87-99%). Frozen cells were thawed immediately before, and infused in 100 mL infusion solution. All infusions were done through a filter (ForteCare, Colombo, PR, Brazil) to avoid clumps.

The findings were analyzed as of the last data collection in 20 August, 2012. We estimated the probability of survival with the Kaplan-Meier method. From October 2010 to May 2011 eight patients with steroid resistant aGVHD received a total of 17 MSC infusions – median 2/patient (range: 1 to 4). The median age was 28 years (range: 4 to 48 years); donors were HLA identical related (n=7) and 9/10 HLA mismatched unrelated (n=1), and except for the RIC (reduced-intensity conditioning) transplant recipients, all patients received cyclosporine and methotrexate for GVHD prophylaxis. The six first patients with steroid resistant aGVHD were included after lack of response to monoclonal antibody therapy. The last two patients received MSC infusions right after the diagnosis of steroid resistant GVHD. Seven out of the seventeen infusions (41%) were frozen MSC thawed just

before infusion. With the exception of patients 7 and 8, to whom the cells were infused 24 hours after 1 dose of Basiliximab each, in the remaining 6 patients, MSC infusions were initiated at a median of 33.5 days (19-91 days) after steroid resistant aGVHD was diagnosed. Patient 3 presented a late onset aGVHD (52 days) as defined by the NIH [8].

Of the 8 patients, at day 28 of treatment, there were 5 complete remissions and 3 non-responders that ultimately died of aGVHD. All three of the latter were very ill, at the intensive care unit (ICU) under mechanical respiratory ventilation and circulatory support at the moment of cells infusion. The small number of patients treated here precludes conclusions towards utilization of fresh or cryopreserved cells, or if there is greater efficacy in a subtype of GVHD or patient's age. Nevertheless, our results are comparable to the reported in the literature [6,7,10,13]. Three patients (2, 4 and 6) died shortly after the first MSC infusion, but were desperately ill under ventilatory and circulatory support and the infusions were done under compassionate utilization authorized by their Institution IRB.

Except for patient number 3 who relapsed 30 days after the last infusion (and because of iatrogenic Diabetes Mellitus was re-treated with 4 MSC infusions and got into a second remission – data not shown) all responders were in continuous aGVHD remission as of 20 August, 2012, with a mean duration of 303 days and median of 123 days (range, 49 to 740). No immediate or late side effects attributable to its infusions were observed. This observation is consistent with other studies that show that there is no adverse reaction after infusion of GMP, animal serum-free expanded MSC. [5,6,14]. We are presently accruing patients for a randomized clinical trial testing MSC up-front for the treatment of steroid resistant aGVHD against monoclonal antibody based therapy.

REFERENCES

1. Appelbaum FR. The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu Rev Med* 2003;54:491-512.
2. Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, Nahleh Z. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch Intern Med* 2002;162:1558-1566.
3. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 2007;109:4119-4126.
4. Couriel D, Saliba R, Hicks K, et al. . Tumor necrosis factor-alpha blockade for the treatment of acute GVHD. *Blood* 2004;104:649-654.
5. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, et al. . Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:804-811.
6. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. . Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579-1586.
7. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. . Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006;81:1390-1397.
8. Filipovich AH. 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. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005;11:11.
9. Devergie A. Graft versus host disease. In: *Guideline EBMT*, editor: European Bone Marrow Transplant Guideline 2008.
10. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226:507-520.
11. Blande IS, Bassaneze V, Lavini-Ramos C, et al. . Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion* 2009;49:2680-2685.
12. Schallmoser K, Strunk D. Preparation of pooled human platelet lysate (pHPL) as an efficient supplement for animal serum-free human stem cell cultures. *J Vis Exp* 2009.
13. von Bahr L, Sundberg B, Lonnies L, et al. . Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:557-564.
14. Lucchini G, Introna M, Dander E, et al. . Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:1293-1301.

TABLE I: Type of steroid resistant aGVHD, first, second and concomitant treatment, time to MSC infusion, number of cells and infusions, and outcome of 8 patients treated with GMP, clinical grade, platelet lysate expanded MSC at the GMP facility.

Pat	AlloSCT date	aGVHD onset	aGVHD organ/grade	aGVHD first line MP	Second line therapy	MSC first infusion date	D to MSC	MSC Cells/kg	P	Outcome, Day 28 after 1 st MSC infusion	Death	Cause of Death	OS (days)
1	08/12/10	09/16/10	GI/IV	2mg/kg	Basiliximab Infliximab	10/20/10	34	0.57x10 ⁶ 0.02x10 ⁶	P5 P6	CR	--	--	740
2	10/05/10	10/28/10	GI/IV Liver III Skin III	2mg/kg	Basiliximab	11/20/10	23	1.93x10 ⁶	P3	#	11/23/10	interstitial pneumonitis	49
3	09/06/10	11/17/10	Skin III GI II	2mg/kg	Basiliximab Infliximab Rituximab PUVA	02/16/11	91	0.16x10 ⁶ 2.00x10 ⁶ 1.87x10 ⁶ 2.04x10 ⁶ 0.51x10 ⁶	P3* P3 P2 P3 P3*	CR	11/24/11	aGVHD, ALL, pneumonia	444
4	01/13/11	01/28/11	GI/IV Skin II Liver I	2mg/kg	Basiliximab Infliximab	03/02/11	33	1.35x10 ⁶	P3*	#	03/10/11	unspecified septicemia, lymphoma	56
5	01/03/11	03/06/11	GI/III	2mg/kg	Basiliximab Infliximab	03/25/11	19	0.56x10 ⁶ 2.3x10 ⁶ 3.76x10 ⁶	P3* P3 P3	CR	--	--	596
6	03/14/11	03/29/11	GI/IV Skin/III	2mg/kg	Basiliximab	05/02/11	34	2.05x10 ⁶ 2.17x10 ⁶ 2.21x10 ⁶	P3* P3* P3*	#	05/22/11	respiratory failure, pulmonary hemorrhage	66
7	04/12/11	05/09/11	Liver/III Skin/II	2mg/kg	Basiliximab	05/13/11	4	3.00x10 ⁶	P3	CR	--	--	497
8	04/08/11	05/07/11	Liver/I Skin/II	2mg/kg	Basiliximab	05/13/11	6	3.00x10 ⁶	P3	CR	08/09/11	BK hemorrhagic cystitis	123

AlloSCT: Allogeneic Stem Cell Transplant; aGVHD: acute graft versus host disease; MP: methylprednisolone; MSC: mesenchymal stromal cell; OS: overall survival; P: culture passage number; GI: gastrointestinal; CR: complete remission; D: days from refractory aGVHD onset to MSC infusion; *: frozen cells; #: Death prior to 28th day after the first infusion and no response

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos neste estudo, será dado segmento deste trabalho pela equipe do Centro de Terapia Celular com o seguinte projeto: “*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*” que terá como objetivo principal testar a eficácia terapêutica da infusão de CTM, cultivadas in vitro, no tratamento da DECH aguda refratária e/ou resistente a corticosteroides, em estudo randomizado com o tratamento convencional segundo a rotina do Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA.

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A
DOAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS****HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
UNIDADE DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

Prezado Paciente ou responsável,

Você está sendo convidado para ser doador de células mesenquimais.

As células mesenquimais estão presentes na medula óssea e possuem a capacidade de regular o sistema imunológico do paciente no sentido de diminuir a gravidade da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).

As células 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 proliferação no laboratório.

A infusão de células mesenquimais é uma modalidade nova de tratamento na área de transplante de medula óssea em pacientes que apresentam DECH grave, que pode ser o caso de seu receptor de Medula Óssea.

As suas células mesenquimais serão obtidas no mesmo procedimento para a coleta da sua medula óssea quando será coletado de 50 a 100ml a mais, sem qualquer risco adicional a você.

O seu receptor, não necessariamente receberá as células mesenquimais obtidas da sua Medula Óssea, 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.

Você não terá benefício com essa doação, contudo poderá ajudar os pacientes que precisarem destas células. Você não terá nenhum custo com este procedimento.

Se você tiver dúvidas em relação ao conteúdo ético desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (51 33598304).

Seu nome não será divulgado, bem como os seus dados serão tratados de forma confidencial.

Uma via deste documento será entregue a você.

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

Eu, _____, RG n° _____
recebi as informações acima e, ciente dos meus direitos, concordo em doar amostra de medula para expansão de células mesenquimais, para o meu receptor de medula ou para ser congelada para uso futuro em outro receptor que necessite este tratamento

Os médicos da 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 a aceito doar amostra adicional para células mesenquimais.

Lucia Silla (Médica responsável pelo Transplante de Medula Óssea do HCPA, Serviço de Hematologia do HCPA – 51 33598317) em horário comercial.

____/____/____

Assinatura do Doador

Nome e Assinatura do Médico Responsável pela Obtenção do Consentimento

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA INFUSÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS****HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
UNIDADE DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

Prezado Paciente ou responsável,

Você esta sendo convidado para participar do estudo: “Células Tronco Mesenquimais Para o Tratamento da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro.”

Atualmente você esta apresentando uma reação grave e frequente do transplante de medula óssea. Esta reação é chamada de Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro, também conhecida como 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 corticoides, que diminuem a reação da medula que você recebeu, contra as suas células. Algumas vezes esta reação é tão forte, que os corticoesteroides não conseguem diminuir a DECH, como é a sua situação atual.

Como alternativa para estes casos em que os corticoesteroides não funcionam como deveriam no tratamento da DECH está sendo testado mundialmente, o uso de um tipo especial de célula: as células-tronco mesenquimais. Estas células, na maioria dos pacientes tratados, ajudam muito a diminuir a DECH aguda. Mas este tratamento é novo, e por isso é chamado de experimental. Por este motivo ainda existe a possibilidade de ele não melhorar a sua doença. Durante a infusão destas células podem ocorrer reações alérgicas, desde urticárias até choque anafilático, com ou sem febre associada.

A equipe assistencial acompanhará a evolução do seu quadro de saúde, através de exames, tomando as medidas de segurança adequadas.

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

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

Em principio, uma única dose pode ser suficiente para controlar a sua doença, porém outras doses poderão ser necessárias, de acordo com critérios técnicos

definidos pela equipe assistencial. Se você precisar de mais de uma dose, ela sempre será advinda do mesmo doador da primeira dose.

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

Qualquer dúvida pode ser resolvida ligando para a Dra Lucia Silla, Serviço de Hematologia (51 33598317) durante os dias da semana em horário comercial. Nos outros dias e horários, ligar para 51 99112587. Se você tiver dúvidas em relação ao conteúdo ético desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (51 33598304).

Seu nome não será divulgado, bem como os seus dados serão tratados de forma confidencial.

Você não terá nenhum custo com este tratamento.

Se após a leitura deste termo senhor concordar em participar deste estudo, preencha as informações abaixo e assine após. Uma via deste documento será entregue a você.

Eu, _____, RG n° _____ recebi as informações acima e, ciente dos meus direitos, concordo em ceder parte do material colhido para o acompanhamento da minha doença para a pesquisa acima bem como em receber células mesenquimais como parte do tratamento da minha doença.

ASSINATURA

Data

Nome e Assinatura do Pesquisador

Data

ANEXO 3

METODOLOGIA

Coleta de amostras

Todos os doadores de MO para o TCTH alogênico serão, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I), submetidos à coleta adicional de 50-100ml de MO. Destas amostras serão estabelecidas culturas de células mesenquimais que, se não utilizadas, serão criopreservadas após a Passagem 2 (P2).

As células serão coletadas em seringas com anticoagulante e imediatamente encaminhadas ao laboratório para o processamento. Todos os indivíduos doadores envolvidos neste estudo serão informados sobre os procedimentos e serão incluídos nos estudos apenas quando houver total concordância dos mesmos, manifestada pela assinatura de termo de consentimento pós-informação.

Pacientes

Serão incluídos pacientes que apresentarem DECHa no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, não responsiva ao tratamento padrão, que assinarem o TCLE (anexo II).

Serão aceitos pacientes de todas as idades que apresentem DECHa de grau II-IV, que não responderam ao tratamento com corticoesteroide (>2 mg/Kg/dia) por pelo menos 7 dias ou com progressão de pelo menos um grau de gravidade após o início do tratamento.

O paciente seguirá com o regime de medicamentos em que estaria sendo submetido, sem alterar qualquer protocolo imunossupressor. A infusão de CTM será adicionada ao protocolo de tratamento em andamento.

A expansão *in vitro* de CTM, leva de 6 a 8 semanas. Se o paciente desenvolver a DECHa resistente a corticosteroides antes que as células mesenquimais de seu doador estejam prontas para ser infundidas, este receberá as células de outros doadores já criopreservadas a -80°C (*third party*).

Tamanho Amostral

Tratando-se de um estudo de segurança e exequibilidade, serão incluídos 8 pacientes que apresentaram DECH aguda resistente aos corticosteroides que se enquadraram nos critérios de inclusão e que assinarem o TCLE.

Obtenção e produção de CTM em condições de “Boas Práticas de Manufatura”

As células tronco mesenquimais derivadas de MO serão isoladas e expandidas em laboratório sob condições de Boas Práticas de Manufatura em sala “GMP-like”. Todos os procedimentos de laboratório serão realizados seguindo as Normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - Decreto n.º 3.029 -portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006.

A obtenção das CTM será feita através da separação por gradiente com Ficoll Hystopaque® (Sigma Aldrich) a partir de 50-100 mL de MO.

Imediatamente após a separação da camada mononuclear, as culturas serão iniciadas utilizando meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, low glucose, Gibco® - Invitrogen) suplementado com 10% de lisado de plaquetas e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®-Invitrogen), na densidade celular de 300.00 células/cm². As culturas serão incubadas a 37°C, em atmosfera umedecida contendo 21% O₂. A primeira troca de meio deverá ocorrer 36-48 horas depois, onde as células não aderentes serão retiradas e o meio de cultura será trocado aproximadamente três vezes por semana. Quando as células atingirem aproximadamente 80% de confluência serão tratadas com Tripsina/EDTA (Gibco® - Invitrogen) e será realizada uma nova subcultura. Cada nova subcultura é denominada de passagem (P). A partir da primeira passagem (P1) alíquotas serão coletadas para as análises de qualidade da amostra – diferenciação e imunofenotipagem; e a esterilidade da amostra (endotoxina, micoplasma e bacteriológico) será avaliada antes da realização da infusão de CTM em um paciente.

O objetivo é a obtenção de pelo menos 2x10⁶ células/Kg do paciente a ser infundido. As células poderão ser infundidas no mínimo em P2 e no máximo em P5, conforme os estudos descritos na literatura.

Somente CTM proveniente de um único doador será manipulada e mantida em cultura por vez para evitar contaminação cruzada. Havendo necessidade de congelar CTM, será feita a criopreservação.

Expansão de Células Criopreservadas

Em caso utilização de células criopreservadas, estas serão descongeladas e colocadas novamente em cultura celular conforme o item 6.4. Todos os testes e controle de qualidade serão realizados antes do congelamento e após o descongelamento.

Testes de Controle de Qualidade

Imunofenotipagem

As CTM são distribuídas igualmente em tubos de ensaio e logo marcadas com os anticorpos monoclonais (BD Biosciences) CD105 PE, CD73 PE, CD90 PE, CD29PE, CD45 FITC, CD14FITC, Anti-HLA-DR FITC, CD34PE e incubadas por 20 minutos. Logo após serão lavadas e fixadas com paraformoldeído. As células serão adquiridas no citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e analisadas no programa de aquisição e análise CellQuest.

Diferenciação

Será realizado o ensaio de diferenciação da CTM em adipócitos, osteócitos e condrócitos.

Para diferenciação osteogênica acrescenta-se ao meio DMEM ácido ascórbico, β - glicerofosfato e dexametasona. Na diferenciação adipogênica emprega-se um meio rico em glicose contendo dexametasona e insulina. E para diferenciação condrogênica utiliza-se meio DMEM, insulina, TGF β 1 e ácido ascórbico.

Para verificação da diferenciação serão utilizados corantes específicos para cada tipo celular: Oil Red (para diferenciação adipogênica), Alizarin Red (diferenciação osteogênica) e Alcian Blue (diferenciação condrogênica) e visualizados em microscopia.

Teste de detecção de Micoplasma

A presença de micoplasma será testada com um kit comercial (Mycoalert, Lonza, EUA). O MycoAlert Assay® é um teste bioquímico seletivo que explora a atividade de determinadas enzimas micoplásmicas. Os micoplasmas viáveis são lisados e as enzimas reagem com o substrato MycoAlert® por catalisar a conversão de ADP em ATP. Ao medir o nível de ATP em uma amostra antes e após a adição do Substrato MycoAlert®, uma relação pode ser obtida, que é indicativo da presença ou ausência de micoplasma.

Testes bacteriológicos

Para certificado de amostra livre de endotoxinas, será usado o teste Endosafe® (Charles River, EUA.), que revela a presença de toxinas de bactérias na amostra.

Além deste teste será feito o teste de detecção bacteriológica através de garrafas bacteriológicas BactAlert®.

Viabilidade

A viabilidade celular será avaliada por microscopia pelo método de incorporação do corante Tripán Blue (Invitrogen) em células mortas.

Infusão das CTM

Após a expansão com confluência de 80% e no mínimo em P2, as células serão tripsinizadas, lavadas três vezes em DMEM e diluídas em 70 mL de solução fisiológica, 5 mL de solução anticoagulante de aférese (ACD) e 20 mL de albumina na concentração de 2 milhões de células por Kg do paciente. As células diluídas serão colocadas em uma bolsa de transferência e imediatamente infundidas por acesso intravenoso na velocidade de 2ml/minuto. Durante todo o procedimento e após 30, 60, 90 e 120 minutos do término da infusão a enfermeira de pesquisa da equipe acompanhará os sinais vitais do paciente.

Avaliação dos Resultados de Ensaio Clínico para o tratamento da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro

Embora este estudo seja de segurança exequibilidade, os pacientes que receberem CTM derivadas de MO serão avaliados em relação ao desaparecimento dos sintomas da DECH aguda da seguinte forma: resposta completa: desaparecimento de todos os sintomas, resposta parcial: com a diminuição de pelo menos um grau da DECHa e sem resposta: quando não há resposta ao tratamento. A avaliação desta resposta será feita no 28º dia após a primeira infusão de CTM (76). Será avaliada também a sobrevida global dos pacientes incluídos neste estudo. Pretende-se determinar nesta fase inicial, a segurança e exequibilidade da infusão em termos de possíveis reações a infusão de CTM.