

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA**

**Células mesenquimais de cordão umbilical em doença enxerto-contra  
hospedeiro aguda corticorrefratária.**

**CAMILA DERMINIO DONADEL**

**RIBEIRÃO PRETO  
2023**

**CAMILA DERMINIO DONADEL**

**Células mesenquimais de cordão umbilical em doença enxerto-contra  
hospedeiro aguda corticorrefratária.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina  
Transfusional.

Orientador: Prof. Dr. Renato Luiz Guerino Cunha

**RIBEIRÃO PRETO**

**2023**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Donadel, Camila Derminio

Células mesenquimais de cordão umbilical em doença enxerto-contra hospedeiro aguda corticorrefratária. Ribeirão Preto, 2023.

66 p. : il.; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto /USP. Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional

Orientador: Prof. Dr. Renato Luiz Guerino Cunha

1. Células mesenquimais estromais. 2. Transplante de células progenitoras hematopoéticas. 3. Doença enxerto-contra-hospedeiro.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Donadel, Camila Derminio

Título: Células mesenquimais de cordão umbilical em doença enxerto-contra hospedeiro aguda corticorrefratária.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e ao Departamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia Clínica pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao centro de terapia celular pela produção das células e fornecimento de dados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Luiz Guerino Cunha, por ter aceito este desafio, pela contribuição e por compartilhar comigo seu conhecimento.

Ao Dr. Gil Cunha De Santis, a quem tenho a honra de poder chamar de meu mentor, por todo apoio nesse e em outros trabalhos, pelos ensinamentos diários e, principalmente, por me ensinar a colocar o paciente sempre em primeiro lugar.

À Nathalia Cristine André que assumiu a responsabilidade deste projeto junto a mim e me auxiliou na condução do estudo do início ao fim.

Aos centros coparticipantes pelo auxílio na coleta de dados.

Aos pacientes pelos ensinamentos e dados fornecidos.

Ao meu marido, Trajano Aguiar Pires Gonçalves, pela compreensão, paciência e apoio incondicionais.

À minha família, pelos valores a mim ensinados, pelo apoio durante toda a minha formação e por acreditarem que eu seria capaz.

A Deus, por me guiar e me permitir viver este momento.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Nº 2013/08135-2).

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

## RESUMO

DONADEL, C. D. **Células mesenquimais de cordão umbilical em doença enxerto-contra hospedeiro aguda corticorretratária.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, 2023.

**Introdução:** A doença enxerto-contra-hospedeiro aguda corticorretratária (DECHa-CR) é uma complicação relativamente frequente do transplante alogênico de células progenitoras hematopoéticas. Seu prognóstico é sombrio. Além disso, não há consenso quanto à terapia de segunda linha. O tratamento com ruxolitinibe não é amplamente acessível em muitos países, entre os quais o Brasil, especialmente para os pacientes atendidos no Sistema Único de Saúde (SUS). Ademais, o ruxolitinibe ainda não foi aprovado para as crianças com DECHa-CR. Uma possível terapia é a administração de células estromais mesenquimais (CMEs), tanto obtidas da medula óssea quanto do cordão umbilical.

**Métodos:** Trata-se de estudo retrospectivo, observacional, multicêntrico (nove instituições), em que foram incluídos 52 pacientes com DECHa-CR grave tratados com CMEs de cordão umbilical.

**Resultados:** A mediana (intervalo) de idade foi de 12,5 (0,3–65) anos e a média  $\pm$  desvio padrão (DP) da dose ( $\times 10^6/\text{kg}$ ) de CMEs foi de  $4,73 \pm 1,3$  por infusão, com a mediana de 4 infusões (1-11). As taxas de resposta global (RG) e completa (RC) no dia 28 foram de 63,5% e 36,6%, respectivamente. Crianças (idade < 18 anos) (n= 35) tiveram melhor RG (71,5% vs. 47,1%, p= 0,12), RC (48,6% vs. 11,8%, p= 0,03), sobrevida global (p= 0,0006) e sobrevida livre de recaída (p= 0,0014) do que adultos (idade  $\geq$  18 anos) (n= 17). Eventos adversos agudos foram detectados em 32,7% dos pacientes (a maioria de leve intensidade), sem diferença entre os grupos de crianças e adultos (p= 1,0).

**Conclusões:** A administração de CMEs de cordão umbilical é uma terapia alternativa viável para DECHa-CR, especialmente em crianças. O perfil de segurança é favorável. A terapia com CMEs talvez deva ser incorporada ao arsenal terapêutico para essa complicação, em especial em países que não dispõem de muitas opções, como é o caso do Brasil.



**Palavras-chave:** células mesenquimais estromais; transplante de células progenitoras hematopoéticas; doença enxerto-contra-hospedeiro.

## ABSTRACT

DONADEL, C. D. **Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease.** Dissertation (Master) – University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School (FMRP/USP), Ribeirão Preto, 2023.

**Background:** Steroid-refractory acute graft-vs.-host disease (SR-aGVHD) is a relatively frequent complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a dismal prognosis. There is no consensus-based second-line therapy. Treatment with ruxolitinib is not easily accessible in many countries, including Brazil, especially for patients treated in the Unified Health System (SUS). Furthermore, ruxolitinib is not yet approved for children with GVHD. A possible therapy is the administration of mesenchymal stromal cells (MSCs), either obtained from the bone marrow or from the umbilical cord.

**Methods:** This is a retrospective, observational, multicenter study ((nine institutions), in which 52 patients with severe SR-GVHD treated with umbilical cord MSC were included.

**Results:** The median (range) age was 12.5 (0.3–65) years and the mean  $\pm$  standard deviation (SD) dose ( $\times 10^6/\text{kg}$ ) of MSCs was  $4.73 \pm 1.3$  per infusion, with a median of 4 infusions (1-11). Overall (OR) and complete response rates on day 28 were 63.5% and 36.6%, respectively. Children (age < 18 years) (n= 35) had better OR (71.5% vs. 47.1%, p= 0.12), complete response (48.6% vs. 11.8%, p= 0.03), overall survival (p= 0.0006), and relapse-free survival (p = 0.0014) than adults (age  $\geq$  18 years) (n= 17). Acute adverse events were detected in 32.7% of patients (mostly mild), with no significant difference in children and adult groups (p= 1.0).

**Conclusions:** Administration of umbilical cord MSCs is a feasible alternative therapy for SR=aGVHD, especially in children. The safety profile is favorable. Therapy with CMEs should perhaps be incorporated into the therapeutic arsenal for this complication, especially in countries that do not have many options, as is the case in Brazil.

**Keywords:** mesenchymal stromal cell; hematopoietic stem cell transplantation; acute graft-versus-host disease.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS.....	16
1.2 DOENÇA ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO.....	17
1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO AGUDA.....	20
1.4 CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS.....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 PRIMÁRIO.....	28
3.2 SECUNDÁRIOS.....	28
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	29
4.2 PACIENTES.....	29
4.2.1 Critérios de inclusão.....	29
4.2.2 Critérios de exclusão.....	30
4.3 CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS.....	30
4.4 VARIÁVEIS DE INTERESSE.....	30
4.5 AVALIAÇÃO ÉTICA.....	33
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
5.1 PACIENTES, DOSE CELULAR INFUNDIDA E ESQUEMA DE INFUSÃO.....	34
5.2 EFICÁCIA.....	36
5.2.1 Resposta global.....	36
5.2.2 Sobrevida global e sobrevida livre de recaída.....	37
5.3 DECH CRÔNICA.....	39
5.4 SEGURANÇA.....	39
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
<b>ADENDO A - ARTIGO PUBLICADO.....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Classificação da doença enxerto-contra-hospedeiro.....	18
<b>Figura 2</b> Fisiopatologia da DECHa.....	19
<b>Figura 3</b> Função imunomoduladora das células mesenquimais estromais.....	24
<b>Figura 4</b> Fluxograma mostrando os motivos da exclusão de 6 pacientes.....	34
<b>Figura 5</b> Sobrevida global de acordo com os subgrupos.....	37
<b>Figura 6</b> Sobrevida livre de recaída de acordo com os subgrupos.....	38
<b>Figura 7</b> Sobrevida global de acordo com a avaliação de resposta no dia 28.....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Estadiamento da DECHa conforme as manifestações clínicas.....	31
<b>Tabela 2</b>	Classificação da gravidade global da DECH aguda.....	32
<b>Tabela 3</b>	Classificação de resposta terapêutica ao uso de CMEs.....	32
<b>Tabela 4</b>	Características dos pacientes, dose infundida e esquema de infusão.....	35
<b>Tabela 5</b>	Avaliação de resposta do total de pacientes e dos subgrupos.....	36
<b>Tabela 6</b>	Eventos adversos associados à infusão de células mesenquimais.....	39
<b>Tabela 7</b>	Estudos recentes que avaliaram o uso de CMEs em DECHa-CR.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACD</b>	Citrato ácido dextrose
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CIBMTR</b>	Center for International Blood and Marrow Transplant Research
<b>CEP</b>	Comitê de ética em pesquisa
<b>CME</b>	Célula mesenquimal estromal
<b>CTCAE</b>	Common Terminology Criteria for Adverse Events
<b>CPH</b>	Células progenitoras hematopoéticas
<b>CR</b>	Corticorrefratário
<b>CO</b>	Cordão umbilical
<b>DECH</b>	Doença enxerto-contrá-hospedeiro
<b>DECHa</b>	Doença enxerto-contrá-hospedeiro aguda
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>EA</b>	Evento adverso
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitário humano
<b>IDO</b>	Idolamina 2,3-dioxigenase
<b>MAGIC</b>	Mount Sinai Acute GVHD International Consortium
<b>MO</b>	Medula óssea
<b>MSC</b>	Mesenchymal stromal cells
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NIH</b>	National Institute of Health
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OR</b>	Overall response
<b>OS</b>	Overall survival
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2

<b>RC</b>	Resposta completa
<b>RG</b>	Resposta global
<b>RP</b>	Resposta parcial
<b>SCUP</b>	Sangue de cordão umbilical e placentário
<b>SD</b>	Standard deviation
<b>SLR</b>	Sobrevida livre de recaída
<b>SMD</b>	Síndrome mielodisplásica
<b>SOS</b>	Síndrome obstrutiva sinusoidal
<b>SP</b>	Sangue periférico
<b>SR-aGVHD</b>	Steroid-refractory acute graft-vs.-host disease
<b>SUS</b>	Sistema único de saúde
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TCPH</b>	Transplante de células progenitoras hematopoéticas
<b>TGFβ</b>	Fator de crescimento transformador beta
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS

O transplante de células progenitoras hematopoéticas (TCPH) é um procedimento em que as células de um doador são infundidas em um receptor com o intuito de reconstituir o sistema hematopoético, em parte ou totalmente. O TCPH é uma modalidade terapêutica indicada para uma série de doenças malignas e não malignas (SNOWDEN et al., 2022). Sua indicação deve considerar as características clínicas (comorbidades, idade, sexo, status performance) do paciente e do doador, bem como as características da doença de base do paciente (estadiamento, quimioterapias realizadas, intercorrências do tratamento).

O TCPH pode ser classificado de diferentes maneiras. A primeira delas diz respeito à origem das células progenitoras hematopoéticas (CPH) e divide o procedimento em autólogo ou alogênico. No primeiro caso, as CPHs são coletadas do próprio paciente para posterior infusão. Já no segundo, elas são coletadas de um doador, que pode ser da mesma família (consanguíneo) ou provenientes de um banco de doadores (não consanguíneo). De acordo com as características do sistema de antígeno leucocitário humano (HLA), o doador pode ser classificado como idêntico ou com disparidade HLA, dentre os quais se inclui o haploidêntico (semelhança em 50% dos haplótipos do HLA). Outra classificação do TCPH é baseada na fonte das CPHs, que podem ser coletadas diretamente da medula óssea, do sangue periférico mobilizado ou do sangue de cordão umbilical. Cada fonte apresenta vantagens e desvantagens que devem ser observadas na escolha da melhor modalidade para o caso, tais como diferentes tempos para enxertia (menor para o sangue periférico e maior para o sangue de cordão umbilical), diferentes incidências de doença enxerto-contra-hospedeiro crônica (menores para a medula óssea e para o cordão umbilical) ou da necessidade de coleta sob anestesia em centro cirúrgico (como para a coleta proveniente da medula óssea) (HOLTICK et al., 2014).

Uma questão importante em relação ao TCPH são os eventos adversos a ele associados. Dentre os efeitos adversos, as infecções são extremamente comuns pelo contexto de citopenias graves e de imunossupressão, podendo ser causadas

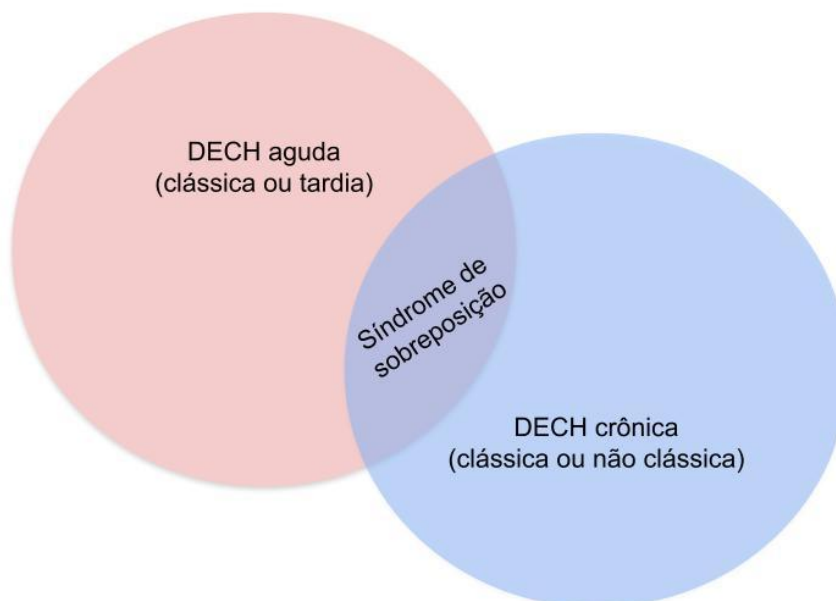
por bactérias, vírus e fungos (ZAIA et al., 2009; GIRMENIA et al. 2014; GIRMENIA et al., 2017). Também ocorrem complicações relacionadas ao dano endotelial, dentre elas, e de maior gravidade, a síndrome obstrutiva sinusoidal (SOS) (CARRERAS et al., 2011). Outra complicação temida no contexto do TCPH alogênico é a doença enxerto-contra-hospedeiro (DECH), observada em percentagem elevada dos pacientes e que será melhor abordada no item abaixo.

## 1.2 DOENÇA ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO

Inicialmente chamada de “doença secundária” (BARNES et al., 1962), a DECH é a principal complicação relacionada ao TCPH alogênico. Trata-se de uma síndrome clínica causada pela agressão imune de células do doador aos antígenos de histocompatibilidade expressos em tecidos do receptor, podendo acometer diversos órgãos e sistemas. Para a sua ocorrência, são necessárias ao menos três condições: enxerto com número suficiente de células imunologicamente competentes, disparidade antigênica entre receptor e doador e hospedeiro imunossuprimido, incapaz de rejeitar as células do doador (BILLINGHAM, 1966).

Classicamente, a DECH é dividida em aguda e crônica. Entretanto, a classificação original, em que DECH era definida como aguda se ocorresse nos primeiros 100 dias da infusão de CPH, ou de linfócitos do doador, e como crônica se ocorresse após esse período, foi substituída pela classificação atual, de acordo com as manifestações clínicas, visto que ambas (aguda e crônica) têm apresentações e fisiopatologia distintas, e os sinais e sintomas de DECH aguda podem estar presentes após o D+100. Diante disso, atualmente a DECH aguda (DECHa) é subclassificada nas suas formas clássica (ocorrência antes do D+100) ou tardia (ocorrência após o D+100). A forma tardia, por sua vez, pode ser subclassificada em “*de novo*” (primeiro episódio após o D+100), recorrente (quando tem início e resolução completa antes do D+100 e então ocorre recidiva após o D+100) ou refratária (quando tem início antes do D+100 persiste após o D+100). Quando há concomitância de alterações clínicas e laboratoriais de DECH aguda e crônica, o quadro é denominado de síndrome de sobreposição (SCHOEMANS et al., 2018) (Figura 1).

**Figura 1.** Classificação da doença enxerto-contra-hospedeiro.

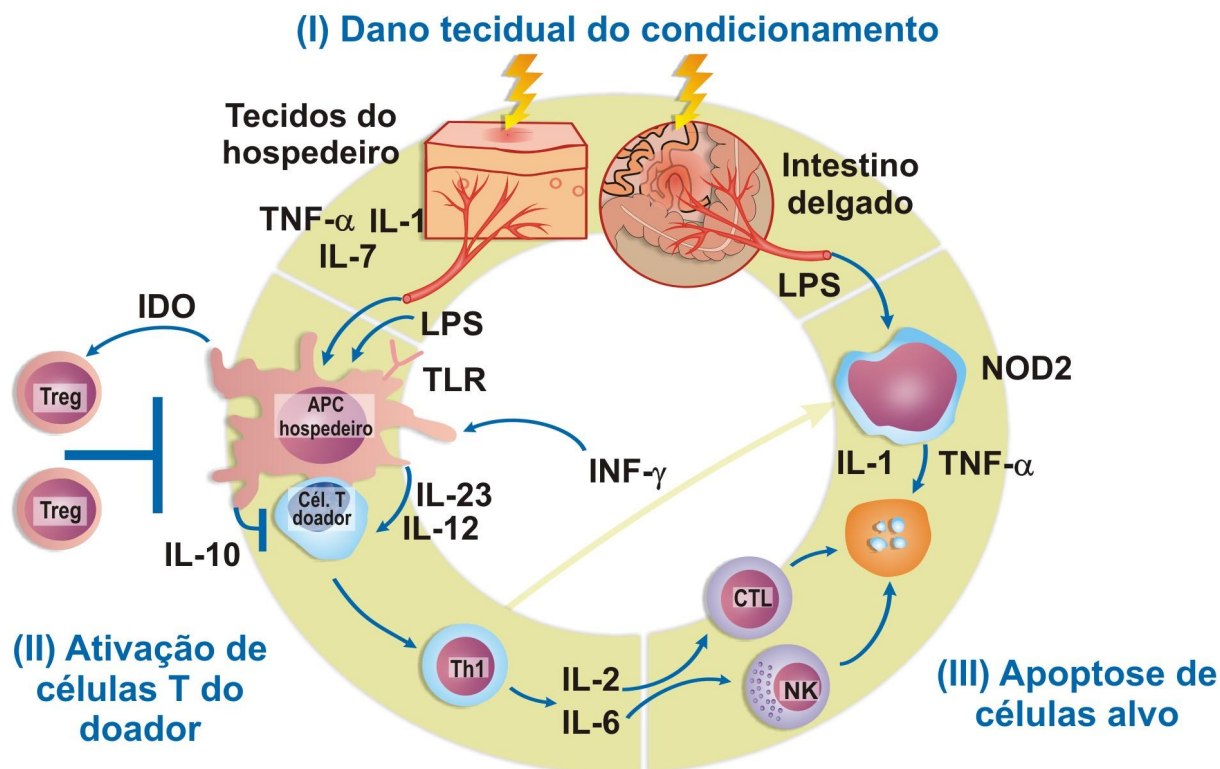


Adaptado de Shoemans et al. (2018)

A DECHa é a principal causa de óbito a curto prazo em pacientes submetidos ao TCPH alogênico (ZEISER; BLAZAR, 2017a). A incidência de casos moderados e graves de DECHa corresponde a aproximadamente 40% dos TCPH, variando conforme o tipo de doador e o método de profilaxia (ANASETTI et al., 1990; FLOWERS et al., 1990; EISNER; AUGUST, 1995; LEE et al., 2007). A fisiopatologia da DECHa pode ser didaticamente dividida em três fases: a primeira, resultado do condicionamento pré-TCPH, com consequente liberação de citocinas, a segunda, decorrente da ativação das células T do doador pelas citocinas liberadas e pelas células apresentadoras de antígenos e, por fim, a terceira fase, denominada efetora, em que as células T iniciam o processo de agressão aos tecidos do receptor (FERRARA et al., 2009) (Figura 2).

Os principais fatores de risco para a DECHa são: grau de disparidade HLA entre doador e receptor; doador do sexo feminino para receptor masculino; idade avançada do doador ou do receptor; condicionamento mieloablativo; sangue periférico como fonte de CPH e receptor com soropositividade para citomegalovírus (ANASETTI et al., 1990; LEE et al., 2007; FLOWERS et al., 1990; EISNER; AUGUST, 1995; HAHN et al., 2008).

**Figura 2.** Fisiopatologia da DECHa.



Durante a fase I ocorre dano tecidual causado pelo condicionamento com quimioterapia ou radioterapia, levando a liberação de citocinas inflamatórias; durante a fase II as células T do doador são ativadas; e durante a fase III as células T migram para os tecidos alvo, causando apoptose. APC: célula apresentadora de antígeno; CTL: linfócito T citotóxico; IDO: idolamina 2,3-dioxigenase; INF: interferon. IL: interleucina; LPS: lipopolissacarídeo; NK: célula natural killer; NOD2: domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos 2; TNF: fator de necrose tumoral; Treg: célula T regulatória. Adaptado de Malard et al. (2020).

A DECHa é caracterizada principalmente por acometimento, em diferentes graus de intensidade, da pele (exantema máculo-papular), do trato gastrointestinal (náusea, vômitos, anorexia, diarreia aquosa ou sanguinolenta e cólicas abdominais) e do fígado (colestase, manifesta por hiperbilirrubinemia). O seu diagnóstico é feito com base no quadro clínico, que pode exibir alteração nos três sistemas mencionados acima ou em um ou dois deles. Avaliações complementares (laboratorial, radiológica e histopatológica) podem auxiliar na confirmação diagnóstica, mas não são estritamente necessárias se nenhuma etiologia alternativa estiver presente (SCHOEMANS et al., 2018).

A classificação de gravidade atualmente mais utilizada para a DECHa é a do Mount Sinai Acute GVHD International Consortium (MAGIC) (HARRIS et al., 2016). Cada órgão acometido (pele, fígado, trato gastrointestinal alto e trato gastrointestinal baixo) é classificado individualmente quanto à gravidade, de grau 1 (leve) a grau 4 (muito grave) e a doença é classificada globalmente de grau I a IV. Os graus III-IV são os que conferem, como seria de esperar, maior índice de mortalidade (ZEISER; BLAZAR, 2017a).

A DECH crônica é uma complicação grave e comum que ocorre em 30 a 70% dos TCPH alogênicos (LEE; FLOWERS, 2008), com profundo impacto na qualidade de vida dos pacientes (JAGASIA et al., 2015). A fisiopatologia da DECH crônica é complexa e dinâmica e, assim como na DECHa, pode ser didaticamente dividida em três fases: a primeira, resultado da inflamação devido a lesão tecidual, a segunda, decorrente da lesão tímica e desregulação das células T e B e, por fim, a terceira fase, com reparação tecidual e fibrose. O principal fator de risco para o desenvolvimento de DECH crônica é o diagnóstico prévio de DECHa (HAMILTON, 2021). Os principais órgãos ou sistemas acometidos na DECH crônica são: pele, boca, trato gastrointestinal, fígado, trato urogenital, articulações, fáscias, pulmões e olhos. O consenso do National Institute of Health (NIH) de 2014 estabeleceu critérios para o diagnóstico e a classificação da DECH crônica, que servem de guia para o início do tratamento com imunossupressores (JAGASIA et al., 2015).

### **1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO AGUDA**

A administração de corticosteroides (prednisona ou metilprednisolona na dose de 2 mg/kg/dia) constitui o tratamento de primeira linha da DECHa. A exceção é feita em casos de acometimento do trato gastrointestinal alto (anorexia, náuseas, vômitos), que apresentam boa resposta com doses mais baixas de corticosteroide sistêmico (0,5 a 1mg/kg/dia) e em casos de acometimento cutâneo leve a moderado, que apresentam boa resposta aos corticosteroides tópicos. O tratamento deve ser mantido por pelo menos uma semana e até que ocorra melhora das manifestações da doença. Entretanto, 40-50% dos pacientes cursam com refratariedade ao uso desse medicamento (MARTIN et al., 2012; MACMILLAN et al., 2015). A DECHa corticorretratária (CR) é definida segundo os seguintes critérios:

progressão da doença após três dias de tratamento; falha de resposta após sete dias de tratamento; acometimento de novo sítio; recorrência da DECHa durante a fase de redução da dose de corticosteroide (ABEDIN; HAMADANI, 2020). A DECHa-CR confere um prognóstico sombrio aos pacientes por ela acometidos. A taxa de sobrevida dos pacientes com DECHa-CR, considerando todos os graus, é de 40% em seis meses (MARTIN et al., 2012) e, a longo prazo, de aproximadamente 17% (WESTIN et al., 2011). Vale ressaltar que essas taxas de sobrevida foram observadas em países desenvolvidos. Temos motivos para acreditar que as taxas de sobrevida sejam substancialmente inferiores em nosso meio, tanto em razão da infraestrutura inferior quanto em razão do menor acesso a medicamentos usados no tratamento de segunda linha.

O tratamento de segunda linha da DECHa-CR não é bem estabelecido e a escolha terapêutica deve levar em consideração diversos fatores, como o custo, as toxicidades esperadas e a experiência do serviço de transplante. O medicamento ruxolitinibe (inibidor da Janus quinase-JAK, frequentemente usado para o tratamento da mielofibrose primária) é a única droga aprovada pela agência Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento de segunda linha da DECHa-CR em adultos e crianças com 12 anos ou mais. Um estudo controlado mostrou desfechos substancialmente superiores com a administração desse medicamento comparados àqueles obtidos com qualquer outra terapia de segunda linha (ZEISER et al., 2020). Os autores deste estudo observaram que a taxa de resposta global no dia 28 da instituição do tratamento foi maior no grupo tratado com o ruxolitinibe que no grupo controle (62% vs 39%). Além do ruxolitinibe, diversos outros agentes foram usados (p. ex. fotoaférese extracorpórea, imunoglobulina antitimócitos, basiliximabe, infliximabe, etanercepte e alemtuzumabe), entretanto, nenhum deles proporcionou resposta clínica plenamente satisfatória (ABEDIM; HAMADANI, 2020). Alternativa interessante como tratamento de segunda linha da DECHa-CR parece ser o uso de células mesenquimais estromais (CME).

#### 1.4 CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS

As CMEs foram descritas pela primeira vez por Friedenstein et. al. (1968). São células precursoras não hematopoéticas, de origem mesodérmica, que estão presentes na maioria dos tecidos vascularizados do corpo, incluindo medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical e placenta, de onde podem ser extraídas e expandidas *ex vivo* (MIZUKAMI; SWIECH, 2018; MUSHAHARY et al., 2018). Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica estabeleceu critérios mínimos para definir as CMEs: capacidade de aderência ao plástico quando mantidas em condições de cultura padrão; expressão de marcadores CD73, CD90 e CD105 e ausência de expressão de marcadores hematopoéticos e endoteliais CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a e HLA-DR; capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagens de adipócitos, condrócitos e osteoblastos (DOMINICI et al., 2006).

As CMEs podem ser classificadas quanto à sua origem em autólogas ou alogênicas. As CMEs alogênicas são interessantes em razão da sua baixa imunogenicidade e rápida disponibilidade, uma vez que podem ser obtidas previamente de doadores saudáveis, seguidas de expansão *in vitro*, criopreservação e administração quando necessário (SANABRIA-DE LA TORRE et al., 2021). É importante ressaltar que o uso de CMEs de origem alogênica não precisa respeitar a compatibilidade HLA entre doador e receptor. Isso ocorre principalmente pela ausência de expressão de HLA de classe II pelas CMEs e por expressão de baixa densidade de HLA de classe I, reduzindo a ativação das vias de reconhecimento no receptor (KOT et al., 2020).

A medula óssea foi a primeira fonte utilizada para a obtenção de CMEs. No entanto, dentre as outras fontes possíveis de CMEs, aquelas derivadas de tecidos perinatais, como a placenta e o cordão umbilical, são de especial interesse pela facilidade de obtenção e maior potencial proliferativo (KERN et al., 2006). Estudos prévios também demonstraram que as CMEs obtidas de cordão umbilical apresentam menor capacidade de proliferação e diferenciação para linhagens de adipócitos e osteócitos, entretanto, além de serem menos imunogênicas e

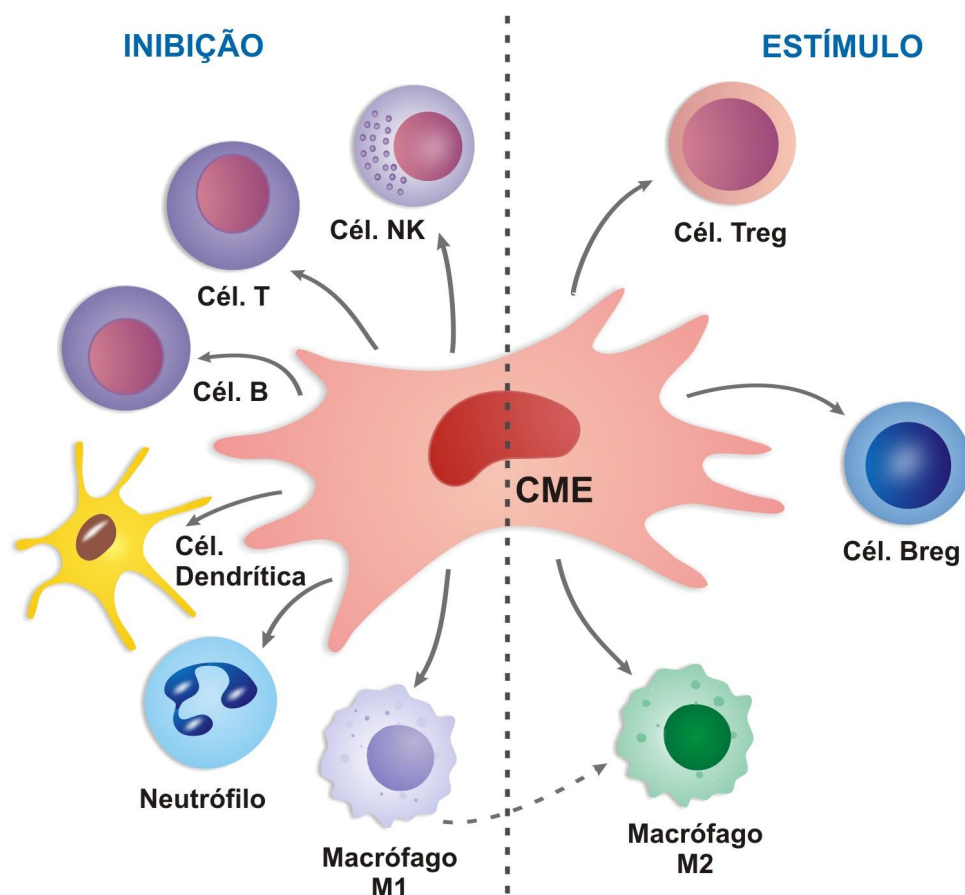
apresentarem maior atividade imunossupressora em comparação com as CMEs da medula óssea (LV et al., 2012; BÁRCIA et al., 2015;).

As CMEs podem ser usadas basicamente para duas finalidades: regenerar tecidos e órgãos (VEGA et al., 2015; FARINA JUNIOR et al., 2019; DE SANTIS et al., 2020) e promover a imunomodulação em doenças imunomediadas, como doenças autoimunes e a DECHa (MARKOV et al., 2021; BURNHAM; DALEY-BAUET; HORWITZ, 2020). Postula-se que as propriedades regenerativas se devem essencialmente aos fatores imunomoduladores e tróficos que elas secretam (RODRÍGUEZ-FUENTES et al., 2021).

As propriedades imunomoduladoras e imunológicas das CMEs são diversas, com efeitos sobre as imunidades inata e adaptativa. Na imunidade inata, as CMEs promovem a polarização dos macrófagos de um fenótipo pró-inflamatório (M1) para um fenótipo anti-inflamatório (M2) por meio da produção de moléculas e metabólitos imunossupressores, como a prostaglandina E2 (PGE 2). Além disso, as CMEs são capazes de inibir a diapedese, ou seja, inibem a infiltração de macrófagos, monócitos e neutrófilos nos locais de inflamação. As CMEs também mantêm os macrófagos, os monócitos e as células dendríticas em um estado imaturo e anti-inflamatório, impedindo assim a ativação das células T efetoras e promovendo a formação de células T reguladoras. As CMEs alteram o fenótipo das células natural killer (NK), inibindo a sua proliferação, o seu efeito citotóxico e a secreção de várias citocinas inflamatórias. As CMEs podem exercer efeitos diretos na imunidade adaptativa, especificamente nas células T, por meio de produção de moléculas imunossupressoras, como o óxido nítrico (NO), idolamina 2,3-dioxigenase (IDO), PGE 2, fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ), dentre outros. Por fim, as CMEs inibem as células B e promovem a expansão das células B reguladoras. (SHI et al., 2018; ZHOU et al., 2020; CHEUNG et al., 2020) (Figura 3).



**Figura 3.** Função imunomoduladora das células mesenquimais estromais.



As CMEs inibem a ativação e a proliferação das células T e B convencionais e promovem um aumento da proporção de células T (Treg) e B regulatórias (Breg). As CMEs também alteram o fenótipo das células natural killer (NK), inibindo sua proliferação, seu efeito citotóxico e a secreção de várias citocinas inflamatórias. Por fim, as CMEs estão associadas à supressão dos neutrófilos, podem inibir a diferenciação e função das células dendríticas e induzir a diferenciação dos macrófagos M1 em macrófagos M2. Criado com BioRender.com. Adaptado de Zhou et al. (2020).

Le Blanc et al. (2004) relataram pela primeira vez um caso bem-sucedido de uso de CMEs para DECHA-CR. Tratava-se de uma criança de nove anos de idade que havia recebido um transplante de CPH e apresentado um quadro de DECHA grave do trato intestinal e do fígado, refratária ao uso de corticosteroides, que apresentou resposta excelente e duradoura à infusão de CMEs de doador haploidêntico. Mais tarde, o mesmo grupo descreveu uma série de casos em que a administração de CMEs para DECHA-CR proporcionou excelente controle da doença (LE BLANC et al., 2008). Neste estudo foram incluídos 55 pacientes com DECHA-CR que receberam CMEs-MO como terapia de segunda linha. A dose mediana de células foi de  $1,4 \times 10^6/\text{kg}$  ( $0,4-9 \times 10^6/\text{kg}$ ). Um total de 30 (54.5%) pacientes apresentaram resposta completa. Nenhum dos pacientes apresentou

efeitos adversos decorrentes da administração de CMEs. Desde então, o uso das CMEs passou a ser considerado uma alternativa interessante para tratar a DECHa-CR. Posteriormente, Kurtzberg et al. (2020a; 2020b), em dois importantes estudos, mostraram benefícios da administração de CME para crianças com DECHa. O primeiro estudo foi um ensaio clínico de fase 3 de braço único, que mostrou benefícios clínicos encorajadores (resposta global de 70,4% no dia 28) para pacientes tratados com CMEs (KURTZBERG et al., 2020a). O segundo estudo, um programa de acesso expandido, incluiu 241 pacientes, com taxa de resposta global de 63,1% no dia 28, e sobrevida global de 66,9% no dia 100 da infusão das células, um resultado muito melhor do que os relatados anteriormente relatados na literatura com outros tipos de terapia (KURTZBERG et al., 2020b). Outros estudos também mostraram bons resultados, o que contribuiu para a aprovação do uso do produto de CMEs em crianças com DECHa-CR no Canadá, na Nova Zelândia e no Japão (KELLY; RASKO, 2021). Devido aos resultados obtidos até agora, a European Society for Blood and Marrow Transplantation recomendou a administração de CMEs como terapia de segunda linha (categoria 2A) para DECH aguda (PENACK et al., 2020). Um estudo retrospectivo do uso de CME de medula óssea em DECHa-CR desenvolvido por nosso grupo mostrou uma taxa de sobrevida de 2 anos de 17%, na qual todos os sobreviventes tiveram resposta completa (DOTOLI et al., 2017). Esses estudos empregaram a medula óssea como fonte de CMEs. No entanto, a utilização do cordão umbilical como fonte parece estar associada a resultados semelhantes (DING et al., 2023).

Os estudos que avaliaram uso de CMEs em DECH crônica são escassos e em grande parte restritos a população adulta (RINGDÉN et al., 2022). Um estudo multicêntrico randomizado, duplo-cedo, controlado, de fase II avaliou o uso de CMEs derivadas de cordão umbilical como profilaxia para DECH crônica. A incidência cumulativa de DECH crônica em 2 anos foi significativamente menor no grupo tratado com CMEs em comparação com o grupo controle (27,4% vs. 49%;  $p=0,02$ ). Achado interessante foi o achado de aumento da concentração em sangue periférico de linfócitos B de memória e de células T regulatórias após a infusão, o que talvez se constitua na principal explicação para o benefício clínico observado (GAO et al., 2016).

A administração de CMEs foi associada a alguns eventos adversos (EAs), geralmente de apresentação leve (KURTZBERG et al., 2020a; KURTZBERG et al., 2020b; DOTOLI et al., 2017). Os EAs mais frequentemente descritos em associação a essa modalidade terapêutica são aqueles relacionados à infusão: febre, arritmia, disfunção de órgãos, hepática e renal, principalmente, entre outros. No entanto, de acordo com uma metanálise, com a exceção da febre, os outros EAs não foram mais frequentes que no grupo controle (LALU et al., 2012). A médio e longo prazos, aventou-se a possibilidade, teórica, de ocorrência aumentada de neoplasia e de formação de tecido ectópico, que, entretanto, não foi confirmada (LALU et al., 2012). Outro tipo de risco possível é a ocorrência de trombose venosa, uma vez que as CMEs expressam em densidade aumentada e liberam o fator tecidual (GUILLAMAT-PRATS, 2022). A sua incidência não está bem estabelecida, pois os relatos são escassos e tiveram como base grupos de pacientes acometidos de condição clínica inflamatória, o que favorecia a ocorrência de complicações trombóticas, como a COVID-19 (BARANOVSKII et al., 2022).

Por fim, além do perfil de segurança favorável, os produtos de CMEs podem ser fabricados com relativa facilidade em centros que possuem laboratório dedicado à terapia celular. Além disso, esses produtos podem ser fabricados em países nos quais outros produtos para terapia de segunda linha para esta doença não estão prontamente disponíveis ou estão totalmente indisponíveis.

Neste estudo, analisamos retrospectivamente os resultados da administração de CMEs derivadas do cordão umbilical como terapia de resgate para pacientes com DECHa-CR.

## 2. JUSTIFICATIVA

Este estudo se justifica em razão da gravidade da DECH aguda corticorretratária, para a qual as terapias alternativas não estão plenamente disponíveis, ou estão completamente indisponíveis, em nosso meio. Essa condição clínica está associada a elevada taxa de morbidade e de mortalidade. Além disso, o produto celular CME é de manufatura local, portanto, disponível aos pacientes do SUS, pelo menos na escala em que têm sido usadas no momento. Os resultados relatados na literatura, inclusive por nosso grupo, sugerem que essa modalidade terapêutica pode ser de grande utilidade para esse grupo de pacientes, que, de outra forma, estariam condenados a um desfecho desfavorável em nosso meio.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 PRIMÁRIO**

- Avaliar a taxa de resposta global em pacientes com DECHa-CR tratados com células mesenquimais.

#### **3.2 SECUNDÁRIOS**

- Avaliar a taxa de resposta global em pacientes com DECHa-CR tratados com CMEs nos dias 28, 100, 180, 1 ano e 2 anos após da infusão (de células mesenquimais);
- Determinar a sobrevida global e sobrevida livre de recaída;
- Determinar a incidência e gravidade de reações adversas agudas ( $\leq 24h$ ) relacionadas à infusão de células mesenquimais.
- Avaliar a incidência de DECH crônica.
- Comparar as taxas de resposta e de sobrevida na população pediátrica com a adulta.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo multicêntrico retrospectivo, observacional e descritivo de pacientes com doença enxerto-contrá-hospedeiro aguda corticorrefratária tratados com células mesenquimais estromais de cordão umbilical. Os centros participantes foram:

- Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP,
- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo—USP,
- Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer—GRAACC,
- Hospital Samaritano,
- Hospital Sírio-Libanês,
- Hospital Israelita Albert Einstein,
- Fundação Pio XII-Hospital do Câncer de Barretos,
- Hospital A.C.Camargo,
- Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

### 4.2 PACIENTES

Foram incluídos neste estudo 52 pacientes com doença enxerto-contrá-hospedeiro aguda corticorrefratária e tratados com células mesenquimais estromais nos centros participantes entre os anos 2015 e 2022.

#### 4.2.1 Critérios de inclusão

- Idade de 0 a 65 anos;
- Pacientes submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoéticas;
- Ter apresentado DECH aguda grau  $\geq$  II (MAGIC) refratária ao tratamento com corticosteroide.

#### 4.2.2 Critérios de exclusão

- Óbito nas primeiras 24 horas após a infusão das células mesenquimais;
- Falta de informação clínica nos registros do paciente.

#### 4.3 CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS

As células mesenquimais estromais foram isoladas do cordão umbilical de neonatos saudáveis, expandidas *ex vivo* e criopreservadas com dimetilsulfóxido (DMSO) entre a terceira e a sétima passagem. O produto final foi armazenado na fase de vapor de um tanque de nitrogênio líquido (temperatura  $\leq 150^{\circ}\text{C}$  negativos). Antes da administração, o produto foi descongelado e reconstituído em albumina, salina e citrato ácido dextrose (ACD). O produto somente foi liberado para uso clínico após preencher os seguintes critérios de qualidade: viabilidade  $\geq 70\%$ ; imunofenótipo típico com presença de marcadores CD73, CD90, CD105 e CD166 e ausência de expressão de marcadores de linhagem hematopoética e endotelial CD45, CD34, CD14, CD31 e HLA-DR; ausência de contaminação por vírus, fungos, bactérias ou micoplasma.

#### 4.4 VARIÁVEIS DE INTERESSE

- idade
- sexo
- doença de base
- tipo de condicionamento
- fonte das células progenitoras hematopoéticas
- grau de compatibilidade HLA
- data da enxertia neutrofílica
- data do início da DECHa
- classificação da DECHa
- data da primeira infusão de CMEs
- dose total de CMEs infundida

- número de infusões de CMEs
- presença e gravidade de efeitos adversos agudos (<24h) relacionados à infusão de CMEs
- resposta terapêutica nos dias 28, 100, 180, 1 ano e 2 anos da infusão (de células mesenquimais)
- desenvolvimento de DECH crônica
- recaída da doença de base
- ocorrência ou não de óbito até a data da censura

Os regimes de condicionamento foram classificados em mieloablativos (MAC) ou intensidade reduzida (RIC), de acordo com a definição do Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) (BACIGALUPO et al., 2009). A gravidade da DECH foi classificada de acordo com escore MAGIC (Tabela 1 e Tabela 2) (HARRIS et al., 2016).

**Tabela 1.** Estadiamento da DECHa conforme as manifestações clínicas.

Estágio	Pele <sup>a</sup>	Fígado <sup>b</sup>	TGI alto <sup>c</sup>	TGI baixo <sup>d</sup>
0	Ausente	< 2	Ausente ou intermitente	Adulto: < 500 ml ou <3 episódios Criança: <10 ml/kg ou <4 episódios
1	< 25% da SC	2-3	Persistente	Adulto: 500-999 ml ou 3-4 episódios Criança: 10-19,9ml/kg ou 4-6 episódios
2	25-50% da SC	3,1-6	-	Adulto: 1000-1500 ml ou 5-7 episódios Criança: 20-30 ml/kg ou 7-10 episódios
3	>50% da SC	6,1-15	-	Adulto: >1500 ml ou >7 episódios Criança: >30 ml/kg ou >10 episódios
4	>50% da SC + formação bolhosa e com descamação > 5% SC	> 15	-	Dor abdominal intensa com ou sem íleo paralítico ou sangue (independente do volume de diarreia)

<sup>a</sup>Apenas eritema ativo; <sup>b</sup>Bilirrubinas totais em mg/dL; <sup>c</sup>Náuseas, vômitos ou anorexia; <sup>d</sup>Evacuações ao dia; SC: superfície corporal; TGI: trato gastrointestinal. Adaptado de Harris et al., 2016.



**Tabela 2.** Classificação da gravidade global da DECHa

<b>Grau</b>	<b>Pele</b>	<b>Fígado</b>	<b>TGI alto</b>	<b>TGI baixo</b>
<b>I</b>	Estadio 1-2	-	-	-
<b>II</b>	Estadio 3	Estadio 0-1	Estadio 0-1	Estadio 0-1
<b>III</b>	Estadio 0-3	Estadio 2-3	Estadio 0-1	Estadio 2-3
<b>IV</b>	Estadio 4	Estadio 4	Estadio 0-1	Estadio 4

Adaptado de Harris et al. 2016.

A definição de cortirrefratariedade foi definida conforme os seguintes critérios (ABEDIN; HAMADANI, 2020):

- progressão da doença após três dias de tratamento ou
- falha de resposta após sete dias de tratamento ou
- acometimento de novo sítio ou
- recorrência da DECHa durante a fase de redução da dose de corticosteroide .

A classificação de resposta terapêutica ao uso de células mesenquimais foram definidas de acordo com o descrito na Tabela 3:

**Tabela 3.** Classificação de resposta terapêutica ao uso de CMEs

<b>Resposta</b>	<b>Definição</b>
Resposta completa	Resolução da DECHa em todos os órgãos envolvidos.
Resposta parcial	Melhora de um estágio em um órgão sem piora de outros órgãos.
Resposta global	Inclui respostas parcial e completa.
Respondedores	Pacientes que atingiram resposta global.
Não respondedores	Pacientes que não atingiram resposta global.

Adaptado de Kurtzberg et a. 2020a.

#### **4.5 AVALIAÇÃO ÉTICA**

O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (CAAE: 60732522.4.0000.5440) e das outras instituições participantes. Foi solicitado ao CEP e aceita a dispensa de aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), devido ao fato de se tratar de um estudo retrospectivo, especialmente considerando que uma porcentagem substancial dos pacientes já havia falecido.

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

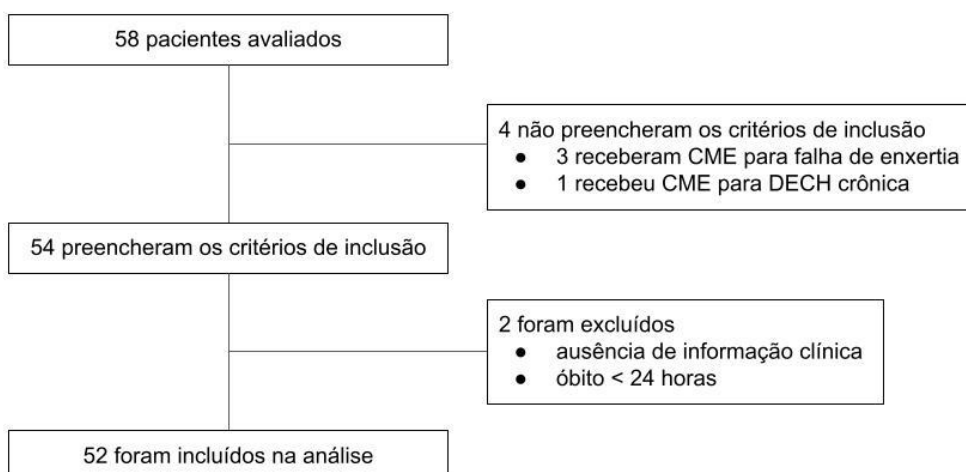
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana (intervalo) de acordo com as características de distribuição e proporções. Quando dois grupos foram comparados, foi usado um teste t de Student não pareado (para dados paramétricos) ou o teste de Mann-Whitney (para dados não paramétricos). As variáveis categóricas foram apresentadas como frequência (%) e comparadas por meio do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. As estimativas de sobrevida global (SG) foram calculadas usando o método de Kaplan-Meier, e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de log-rank. O tempo até os eventos foi calculado em dias e meses a partir do diagnóstico de DECHa até o dia da primeira administração de CME e deste até o óbito ou a última data de acompanhamento, respectivamente. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p estava abaixo de 0,05. As análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico GraphPAD Prism, versão 9.5.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PACIENTES, DOSE CELULAR INFUNDIDA E ESQUEMA DE INFUSÃO

Dos 58 pacientes inicialmente avaliados, o total de 52 com DECHa-CR foi incluído na análise, tratados com infusão de CMEs entre 2015 e 2022. Quatro pacientes não preencheram os critérios de inclusão (outros diagnósticos: 1 com DECH crônica e 3 com falha de enxertia), e dois pacientes foram excluídos da análise, um por falta de informação clínica e outro por ter falecido de sepse dentro das primeiras 24 horas após a infusão de CME (Figura 4).

**Figura 4.** Fluxograma mostrando os motivos da exclusão de 6 pacientes.



A mediana (intervalo) de idade no momento do transplante foi 12,5 anos (0,3-65 anos) e a maioria dos pacientes era do sexo masculino (65,4%). A maioria dos pacientes foi submetida a regimes de condicionamento mieloablativos (78,8%). A medula óssea foi a principal fonte de CPH (57,7%). A distribuição dos casos de DECHa quanto à gravidade foi a seguinte: 3,8% com DECHa de grau II, 25% com grau III e 71,2% com grau IV. O acometimento de pele, trato gastrointestinal e fígado foi observado em 75%, 96,2% e 38,5% dos pacientes, respectivamente. A mediana (intervalo) de seguimento foi de 4,6 (0-92) meses. A mediana (intervalo) de tempo desde o diagnóstico até a infusão de CMEs foi de 36,5 (4-250) dias. A mediana (intervalo) do número de infusões foi de 4 (1-11) e a dose média  $\pm$  desvio padrão (DP) por infusão foi de  $4,73 \times 10^6/\text{kg} \pm 1,3 \times 10^6/\text{kg}$ . Analisando separadamente os

grupos de adultos e crianças, observou-se diferença estatística em relação ao diagnóstico ( $p= 0,02$ ), condicionamento ( $p= 0,002$ ) e fonte de CPH ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos com relação à gravidade da DECHa, aos órgãos acometidos, ao tempo decorrido até a infusão, ao número de infusões e à dose infundida. A Tabela 4 resume as características dos pacientes, dose celular infundida e esquema de infusão do total de pacientes e de acordo com a idade,  $< 18$  anos (crianças) e  $\geq 18$  anos (adultos).

**Tabela 4.** Características dos pacientes, dose infundida e esquema de infusão.

	<b>Total (n= 52)</b>	<b>Crianças (n= 35)</b>	<b>Adultos (n= 17)</b>	<b>P-valor</b>
<b>Idade (anos)*</b>	12,5 (0,3-65)	8 (0,3-16)	32 (20-65)	
<b>Sexo masculino (%)</b>	34 (64,4)	23 (65,7)	11 (64,7)	1,0
<b>Diagnóstico (%)</b>				0,02
Leucemia aguda/SMD	39 (75,0)	30 (85,7)	9 (52,9)	
Linfoma	3 (5,8)	0	3 (17,6)	
Anemia aplástica	4 (7,7)	2 (5,7)	2 (11,8)	
Outros	7 (11,5)	3 (8,6)	3 (17,6)	
<b>Condicionamento (%)</b>				0,002
MAC	41 (78,8)	32 (91,4)	9 (52,9)	
RIC	11 (21,2)	3 (8,6)	8 (47,1)	
<b>Fonte CPH (%)</b>				$< 0,0001$
MO	30 (57,7)	27 (77,1)	3 (17,6)	
SP	20 (38,5)	6 (17,2)	14 (82,4)	
SCUP	2 (3,8)	2 (5,7)	0	
<b>Grau DECHa (%)</b>				0,37
II	2 (3,8)	2 (5,7)	0	
III	13 (25,0)	10 (28,6)	3 (17,6)	
IV	37 (71,2)	23 (65,7)	14 (82,4)	
<b>Órgãos acometidos (%)</b>				0,79
Pele	39 (75,0)	23 (65,7)	16 (94,1)	
TGI	50 (96,2)	33 (94,3)	17 (100)	
Fígado	21 (38,5)	13 (37,1)	8 (47,1)	
<b>Tempo até infusão (dias)*</b>	36,5 (4 - 294)	39 (4 - 250)	27 (12 - 294)	0,6
<b>Nº de infusões*</b>	4 (1 - 11)	4 (1 - 11)	3 (1 - 8)	0,06
<b>Dose média# (x 10<sup>6</sup>/kg)</b>	4,73 ± 1.30	4,93 ± 1.4	4,31 ± 0.98	0,11

\*Mediana (intervalo); #Média ± desvio padrão; SMD: síndrome mielodisplásica; MAC: condicionamento mieloablativo; RIC: condicionamento intensidade reduzida; CPH: célula progenitora hematopoética; MO: medula óssea; SP: sangue periférico; SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário; DECHa: doença enxerto-contra-hospedeiro aguda; TGI: trato gastrointestinal

## 5.2 EFICÁCIA

### 5.2.1 Resposta global

A taxa de resposta global (RG) no dia 28 após a infusão das CMEs foi de 63,5% do total de pacientes, 71,5% no subgrupo de crianças e 47,1% no subgrupo dos adultos ( $p=0,12$ ). No dia 100, a RG foi de 36,6% (45,7% em crianças e 17,7% em adultos,  $p=0,06$ ). No dia 180, a RG foi de 34,6% (45,7% em crianças e 11,8% em adultos,  $p=0,02$ ). A RG em 1 ano após a infusão foi de 28,8% (37,2% em crianças e 11,8% em adultos,  $p=0,1$ ). A RG em 2 anos após a infusão foi de 26,9% (34,3% em crianças e 11,8% em adultos,  $p=0,1$ ). Analisando separadamente adultos e crianças, observamos que houve diferença estatística entre as taxas de resposta completa nos dias 28 ( $p=0,03$ ) e 100 ( $p=0,008$ ). As taxas de RG, resposta completa (RC) e resposta parcial (RP), do total de pacientes e dos subgrupos estão resumidas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Avaliação de resposta do total de pacientes e dos subgrupos.

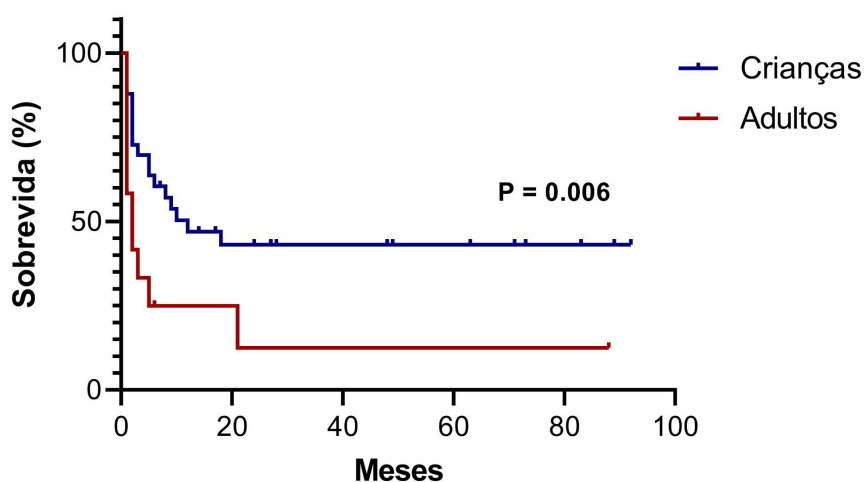
	Total (n= 52)	Crianças (n= 35)	Adultos (n= 17)	P-valor
<b>Dia 28</b>				
RG (%)	33 (63,5)	25 (71,5)	8 (47,1)	0,12
RC (%)	19 (36,6)	17 (48,6)	2 (11,8)	0,03
RP (%)	14 (26,9)	8 (22,9)	6 (35,3)	
<b>Dia 100</b>				
RG (%)	19 (36,6)	16 (45,7)	3 (17,7)	0,06
RG (%)	16 (30,8)	15 (42,8)	1 (5,9)	0,008
RP (%)	3 (5,8)	1 (2,9)	2 (11,8)	
<b>Dia 180</b>				
RG (%)	18 (34,6)	16 (45,7)	2 (11,8)	0,02
RC (%)	17 (32,7)	15 (42,8)	2 (11,8)	0,05
RP (%)	1 (1,9)	1 (2,9)	0	
<b>1 ano</b>				
RG (%)	15 (28,8)	13 (37,2)	2 (11,8)	0,1
RC (%)	14 (26,9)	12 (34,3)	2 (11,8)	0,15
RP (%)	1 (1,9)	1 (2,9)	0	
<b>2 anos</b>				
RG (%)	14 (26,9)	12 (34,3)	2 (11,8)	0,1
RC (%)	14 (26,9)	12 (34,3)	2 (11,8)	
RP (%)	0	0	0	

RG: resposta global; RC: resposta completa; RP: resposta parcial

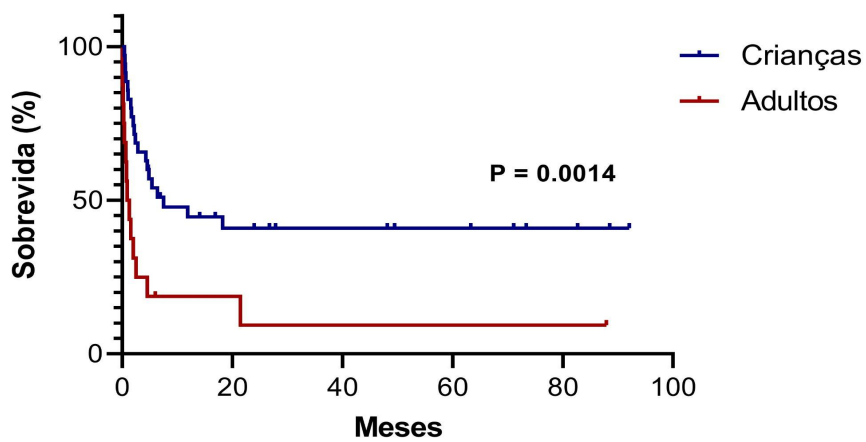
### 5.2.2 Sobrevida global e sobrevida livre de recaída

As sobrevidas global (SG) (Figura 5) e livre de recaída (SLR) (Figura 6) observadas no subgrupo das crianças foram significativamente superiores às dos adultos ( $p= 0,0006$  e  $p= 0,0014$ , respectivamente). Além disso, os pacientes que tiveram resposta favorável no dia 28 da infusão de CMEs também tiveram SG superior ( $p < 0,0001$ ) (Figura 7). A SG do total de pacientes nos dias 100 e 180 foi de 51,9% (27/52) e 38,5% (20/52), respectivamente. No dia 100, a SG em crianças e adultos foi de 62,9% (22/35) e 29,5% (5/17), respectivamente ( $p= 0,038$ ). No dia 180, a SG em crianças e adultos foi de 48,6% (17/35) e 17,6% (3/17), respectivamente ( $p= 0,038$ ). Finalmente, considerando apenas os pacientes que faleceram (35/52; 67,3%), observamos que crianças e adultos levaram 68,5 (12–547) dias e 25,0 (2–644) dias da primeira infusão de CME até o óbito, respectivamente ( $p= 0,02$ ).

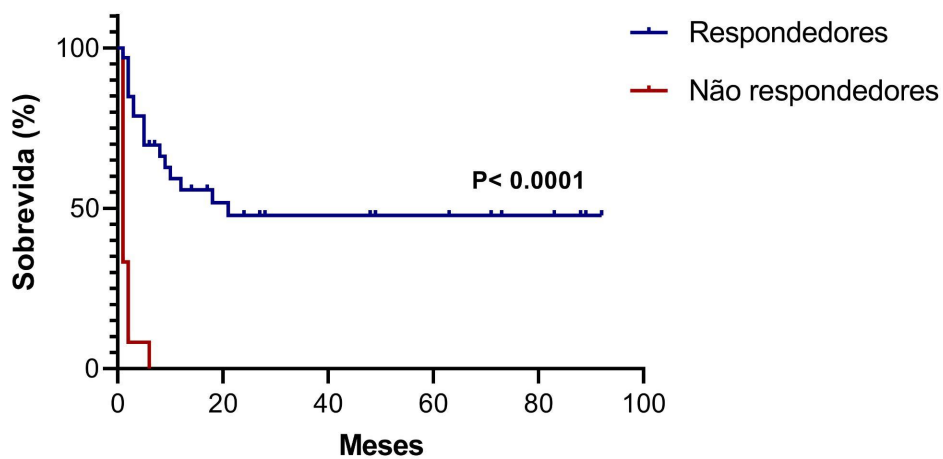
**Figura 5.** Sobrevida global de acordo com os subgrupos.



**Figura 6.** Sobrevida livre de recaída de acordo com os subgrupos.



**Figura 7.** Sobrevida global de acordo com a avaliação de resposta no dia 28.



### 5.3 DECH CRÔNICA

Somente os pacientes que sobreviveram além do dia 100 do TCPH (44 pacientes, 84,6%) foram avaliados para a ocorrência da DECH crônica, que foi observada em 10 (22,7%) dos pacientes, dos quais 7/34 (20,6%) crianças e 3/10 (30%) adultos ( $p= 0,67$ ).

### 5.4 SEGURANÇA

Um total de 17 (32,7%) pacientes (12 crianças e 5 adultos) apresentaram eventos adversos (EAs) agudos associados à infusão de CMEs dos quais apenas 2 foram considerados grau 3 (nenhum grau 4), de acordo com o Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) (MENDOZA et al., 2017). Os eventos adversos gastrointestinais (náuseas, vômitos e cólicas intestinais) foram os mais prevalentes e ocorreram em 13,5% dos pacientes. Não houve diferença entre os dois grupos (criança e adulto) quanto à ocorrência de EAs agudos em geral. Entretanto, a ocorrência de EAs cardiovasculares (taquicardia/bradicardia e hipertensão/hipotensão) foi observada em 11,4% das crianças e em 54,5% dos adultos ( $p= 0,06$ ). Os AEs agudos associados à infusão das CMEs no total de pacientes e dos subgrupos estão resumidos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Eventos adversos associados à infusão de células mesenquimais.

	Total (n= 52)	Crianças (n= 35)	Adultos (n= 17)	P-valor
<b>Eventos adversos (%)</b>	17 (32,7)	12 (34,3)	5 (29,4)	1,0
Taquicardia/bradicardia	6 (11,5)	2	4	
Hipertensão/hipotensão	4 (7,7)	2	2	
Dispneia	2 (3,8)	1	1	
Náuseas/vômitos/cólica	7 (13,5)	7	0	
Dor de cabeça/tontura	5 (9,6)	4	1	
Convulsão	1 (1,9)	1	0	
Febre/calafrio	5 (9,6)	4	1	
Exantema/prurido	2 (3,8)	1	1	
Angioedema	1 (1,9)	1	0	



## 6. DISCUSSÃO

Este estudo observacional e retrospectivo mostrou que a administração de células mesenquimais estromais obtidas do cordão umbilical resultou em benefícios clínicos substanciais em pacientes com a doença enxerto-contra-hospedeiro aguda corticorretratária, especialmente em crianças. Aproximadamente, dois terços dos pacientes aqui incluídos apresentaram resposta global no dia 28 da infusão das células mesenquimais, o que está de acordo com o que foi relatado em estudos anteriores, que mostraram resposta que variou de 56% a 70,4% (KURTZBERG et al., 2020a; KURTZBERG et al., 2020b; KEBRIAIEI et al., 2020; MURATA et al., 2021; DING et al., 2023) (resumo na Tabela 7). A taxa de resposta global do presente estudo foi muito maior em crianças do que em adultos, semelhante ao observado por Kebriaei et al. (2020) em um estudo multicêntrico randomizado que avaliou a eficácia do uso de CMEs (remestemcel-L) em DECHa-CR. No estudo em questão, a população pediátrica que recebeu o remestemcel-L apresentou uma RG significativamente maior em comparação com o placebo (64% vs 23%), o que não foi observado na população com 18 anos ou mais (57,7% vs 60,3%). Nossos resultados também foram semelhantes aos dos dois estudos de Kurtzberg et al. (2020a; 2020b), nos quais os autores avaliaram apenas a população pediátrica. O primeiro estudo, um ensaio clínico de fase 3 de braço único, incluiu 54 pacientes e evidenciou uma taxa de resposta global de 70,4% no dia 28 após a infusão de CMEs (KURTZBERG et al., 2020a). O segundo estudo mostrou os resultados de um programa de acesso expandido o qual incluiu 241 pacientes, com taxa de resposta global de 63,1% no dia 28 (KURTZBERG et al., 2020b). Considerando apenas a população pediátrica, nosso estudo mostrou RG de 71,5% no dia 28. O mais interessante é que, em nosso estudo, quase a metade das crianças apresentou resposta completa 28 dias após a infusão, índice superior ao observado nos dois ensaios clínicos de Kurtzberg et al. (2020a; 2020b) (48,6% vs 29,6% e 14,1%). Uma possível explicação para esse achado seria a maior dose de CMEs (o dobro) em nosso estudo do que nos estudos referidos, apesar da infusão celular relativamente tardia (36,5 dias após o diagnóstico de DECHa vs. 12 e 23 dias). Além disso, os pacientes de nosso estudo apresentavam um perfil de gravidade maior comparado com os dois estudos de Kurtzberg et al. (2020a; 2020b) acima mencionados (96,2% vs. 88,8% e 80,1%). É possível que uma dose maior de CMEs tenha compensado a

terapia relativamente tardia, o menor número de infusões (4 vs. 9,9 e 11) e a DECHa mais grave em nossos pacientes do que nos demais, conforme ilustrado na Tabela 7.

Em nosso estudo, a sobrevida global da coorte total (crianças e adultos) no dia 100 foi menor do que a observada nos dois estudos de Kurtzberg et al. (2020a; 2020b), que, cumpre lembrar, incluíram apenas crianças. No entanto, considerando apenas as crianças do nosso estudo, a diferença parece não ser significativa (62,9% vs. 74,1% e 66,9%). A sobrevida global da coorte total no dia 180 da infusão foi semelhante à observada por Kebriaei et al. (2020) e Murata et al. (2021) (38,5% vs. 34% e 40%, respectivamente). Além disso, em nosso estudo, a sobrevida global em crianças foi muito melhor do que a observada em adultos, o que está de acordo com Kebriaei et al. (2020). Ademais, a sobrevida global da população pediátrica no presente estudo (48,6%) no dia 180 foi inferior à observada por Kurtzberg et al. (2020a) (68,5%). Conforme mencionado acima, todos os pacientes do estudo de fase 3 de Kurtzberg et al. (2020a) receberam CMEs como terapia de segunda linha e mais precocemente do que nossa coorte, o que poderia explicar os resultados inferiores encontrados em nosso estudo. Esses fatores sugerem que a infusão de CMEs deve ser instituída o mais brevemente possível, conforme demonstrado por Murata et al. (2021), que observaram melhor resposta quando as CMEs foram infundidas nas primeiras duas semanas do diagnóstico da DECHa ( $p= 0,029$ ). Talvez mais importante seja a questão de que, em nosso estudo, como mencionado acima, a gravidade da doença era maior que no estudo citado, como consta da Tabela 7. Por fim, como esperado, a sobrevida global no grupo respondedor, definido como aqueles que atingiram resposta global no dia 28, foi superior à observada no grupo não respondedor, o que está de acordo com o observado por outros (KURTZBERG et al., 2020; MURATA et al., 2021).

É possível que a administração de CMEs para DECHa-CR em nossos pacientes tenha resultado em redução da ocorrência de DECH crônica (neste estudo 22,7% vs. 50%, aproximadamente, na literatura) (ARAI et al., 2015; ZEISER; BLAZAR, 2017b), fenômeno já sugerido por outros (FISHER et al., 2019). É importante salientar que a DECH crônica é uma complicação temida do TCPH alogênico, especialmente quando refratária ao uso de corticosteroides, pois existem poucas alternativas terapêuticas de segunda linha com benefício inequivocamente comprovado (ZEISER; LEE, 2022), de modo que a redução da incidência dessa

complicação pode caracterizar um benefício adicional do uso de CMEs para tratar a DECHa. Por fim, neste estudo, não foi observada diferença entre a incidência de DECH crônica em crianças e adultos.

Aproximadamente, um terço dos nossos pacientes apresentou EA agudo, em sua maioria de leve intensidade (graus 1 e 2, de acordo com o CTCAE); no entanto, esta foi uma taxa maior do que a observada por outros (KURTZBERG et al., 2020a; DING et al., 2023; LALU et al., 2012; THOMPSON et al., 2020). Uma possível explicação para esse achado seria o fato de nossos pacientes apresentarem doença mais avançada e de ter sido feita mais tardiamente durante a evolução da doença, em que a inflamação seria, supostamente, mais intensa. Apesar disso, consideramos importante ressaltar que a ocorrência de EA de grau 3 foi muito baixa (observada em apenas dois pacientes em nossa coorte) e que nenhum paciente apresentou EA de grau 4. Um achado interessante foi que o grupo adulto parece ser mais vulnerável a EA cardiovascular (Tabela 6). Além disso, a taxa de EA em nossos pacientes foi menor do que a observada com o uso de ruxolitinibe (JAGASIA et al., 2020; ZEISER et al., 2020), apesar de não termos acompanhado os pacientes quanto à ocorrência de EA de início tardio. O uso de CMEs não foi associado a alterações hematológicas, enquanto a citopenia, especialmente a trombocitopenia, é uma complicação comum do uso de ruxolitinibe. Locatelli et al. (2022) observaram que aproximadamente metade dos pacientes (crianças) tiveram alterações de dose ou interrupção de uso da droga devido a eventos adversos, que parecem ser mais frequentes e mais graves que os encontrados no presente estudo.

A indicação de uso de CMEs para DECHa-CR deve levar em consideração outros agentes com eficácia e perfil de segurança conhecidos. Neste contexto, o agente mais importante é o medicamento ruxolitinibe, recentemente aprovado pelo FDA para pacientes maiores de 12 anos com DECHa-CR (MARTINI, D.J.; CHEN Y.B.; DEFILIPP, Z.; 2022) no entanto, as taxas de resposta completa ainda não são plenamente satisfatórias (JAGASIA et al., 2020; ZEISER et al., 2020). Em estudo randomizado publicado recentemente, um total de 309 pacientes foram incluídos, dos quais 154 receberam ruxolitinibe e 155 o melhor tratamento disponível (grupo controle). As taxas de resposta global (62% vs. 39%) e de resposta completa (34,4% vs. 19,4%) no dia 28 foram maiores no grupo experimental do que no grupo controle. A sobrevida global mediana foi de 11,1 meses no grupo tratado com ruxolitinibe e de 6,5 meses no grupo controle (Risco relativo de morte: 0,83; IC 95%:

0,60 to 1,15). Nossos resultados sugerem que as CMEs propiciam uma taxa de resposta semelhante à apresentada com essa droga e, aparentemente, uma taxa de resposta completa ainda maior considerando todos os pacientes aqui descritos. Outra questão importante é a taxa de incidência de eventos adversos, que parece ser maior e mais grave com ruxolitinibe do que com as CMEs. Finalmente, comparando a terapia com CMEs com o tratamento com ruxolitinibe, em relação às taxas de resposta em crianças, observamos resultados levemente inferiores de RG e semelhantes de RC no dia 28 (71,5/48,2% vs. 84,4/48,9%, respectivamente) (LOCATELLI et al., 2022). Além disso, nos estudos REACH1 e REACH2, que avaliaram o uso de ruxolitinibe em adultos, a resposta global no dia 28 foi de 54,9% e 62%, respectivamente, superior aos nossos resultados (47,1%), entretanto, com as ressalvas sobre a gravidade de nossa coorte previamente mencionadas (JAGASIA et al., 2020; ZEISER et al., 2020).

Outro aspecto importante é o acesso relativamente limitado a outras drogas para DECHa-CR na rede pública de saúde em nosso país, como, por exemplo, o já citado ruxolitinibe. Além disso, os produtos de CMEs são administrados por um curto período de tempo, enquanto o ruxolitinibe é geralmente usado por períodos mais longos. É importante ressaltar que o ruxolitinibe ainda não está aprovado para menores de 12 anos, exatamente a faixa etária para a qual a administração de CMEs se mostrou mais eficaz.

As CMEs obtidas do cordão umbilical são uma fonte relativamente nova de CMEs, e são associadas a uma série de vantagens, como maior potencial proliferativo, menor risco de transmissibilidade de agentes infecciosos, maior facilidade de produção de unidades prontas para uso e um menor risco para o doador (RINGDÉN et al., 2022). Outras fontes interessantes para obtenção de CMEs parecem ser a medula óssea e decídua, que também são usadas para tratar DECHa-CR em crianças (KUÇI et al., 2016; RINGDÉN; GUSTAFSSON; SADEGHI, 2020). A principal desvantagem é que a separação das CMEs do cordão umbilical é mais trabalhosa em comparação com a medula óssea como fonte.

Este estudo apresenta as seguintes limitações principais, sendo a primeira inerente às análises retrospectivas. Outra limitação é o tamanho relativamente pequeno da amostra, especialmente para o grupo adulto (um terço da coorte total) e após o dia 180 da infusão de CMEs. Além disso, no presente estudo, pode-se notar relativa heterogeneidade dos pacientes, como quanto ao diagnóstico e aos cuidados

com o paciente, a fonte de enxerto, os regimes de condicionamento, a profilaxia e o tratamento de segunda linha para DECHa. Por fim, uma limitação é o curto período de acompanhamento, que não permitiu avaliar a ocorrência de complicações tardias. Apesar dessas limitações, tivemos um tamanho amostral grande o suficiente para mostrar a diferença de resposta entre crianças e adultos em relação aos desfechos de eficácia das CMEs para DECHa, além da importância da taxa de resposta no dia 28, que propiciou dividir a coorte entre os respondedores e os não respondedores, de modo a estabelecer a avaliação no dia 28 como um marco a ser seguido.

**Tabela 7.** Estudos recentes que avaliaram o uso de CMEs em DECHa-CR.

	<b>Kebriaei (2020)</b>	<b>Kurtzberg (2020)</b>	<b>Kurtzberg (2020)</b>	<b>Murata (2021)</b>	<b>Ding (2023)</b>	<b>Donadel<sup>c</sup> (2023)</b>
<b>Tipo de estudo</b>	fase 3	fase 3	acesso expandido	retrospectivo	retrospectivo	retrospectivo
<b>Participantes</b>	163	54	241	309	54	52
<b>Idade<sup>a</sup></b>	43,8	7,0	9,6	49	12,5	12,5
<b>DECHa grave<sup>b</sup> (%)</b>	77,3	88,8	80,1	80,5	88,8	96,2
<b>Fonte de CME</b>	MO	MO	MO	MO	CO	CO
<b>Tratamentos prévios</b>	≥ 3	2	≥ 2	≥ 1	≥ 3	≥ 3
<b>Nº de infusões<sup>a</sup></b>	8,8	9,9	11	8	2	4
<b>Dose por infusão<sup>a</sup></b>	2	2	2	2	2,54	4,73
<b>Tempo até a infusão<sup>a</sup></b>	-	12	23	29	19	36,5
<b>RG dia 28 (%)</b>	58,3	70,4	65,1	56	59,3	63,5 (71,5) <sup>d</sup>
<b>RC dia 28 (%)</b>	-	29,6	14,1	24	44	36,6 (48,6) <sup>d</sup>
<b>SG dia 100 (%)</b>	-	74,1	66,9	-	-	51,9 (62,9) <sup>d</sup>
<b>SG dia 180 (%)</b>	34	68,5	-	40	-	38,5 (48,6) <sup>d</sup>

DECHa: doença enxerto-contra-hospedeiro aguda; CR: corticorrefratária; CME: célula mesenquimal estromal; RG: resposta global; RC: resposta completa; SG: sobrevida global; MO: medula óssea; CO: cordão umbilical; <sup>a</sup>média ou mediana; <sup>b</sup>grau III/IV ou C/D; <sup>c</sup>estudo presente; <sup>d</sup>(crianças)

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acreditamos que as células mesenquimais estromais do cordão umbilical constituem uma modalidade terapêutica valiosa para a doença aguda do enxerto contra o hospedeiro corticorrefratária, especialmente em países em que outras terapias de segunda linha estão menos disponíveis, ou mesmo indisponíveis, considerando principalmente aqueles do SUS. As crianças apresentaram uma taxa de resposta muito superior à observada nos adultos. Além disso, a resposta clínica no dia 28 parece ser fundamental para definir o prognóstico. Ademais, a administração de CME de cordão umbilical parece ser segura. Nosso grupo acredita que a administração de CMEs deve ser considerada como terapia de segunda ou terceira linha para a DECHA-CR em crianças e, talvez, em adultos. Por fim, seria interessante, no futuro, investigar a associação entre o uso de CMEs e o ruxolitinibe, principalmente em adultos, mesmo como terapia ponte até o ruxolitinibe proporcionar os efeitos benéficos que se espera de seu uso.

**REFERÊNCIAS**

ABEDIN, S.; HAMADANI, M. **Experimental Pharmaceuticals for Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease.** J Exp Pharmacol 2020, 12, 549–557.

ANASETTI, C. **Effect of HLA Incompatibility on Graft-versus-Host Disease, Relapse, and Survival after Marrow Transplantation for Patients with Leukemia or Lymphoma.** Human Immunology 1990, 29, 79–91.

ARAI, S. et al. **Increasing Incidence of Chronic Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Transplantation – A Report from CIBMTR.** Biol Blood Marrow Transplant 2015, 21, 266–274.

BACIGALUPO, A. et al. **Defining the intensity of conditioning regimens: Working Definitions.** Biol Blood Marrow Transplant 2009, 15, 1628–1633.

BARANOVSKII, DS. et al. **Adverse events, side effects and complications in mesenchymal stromal cell-based therapies.** Stem Cell Investig. 2022 Nov 8;9:7.

BÁRCIA, R.N. et al. **What Makes Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Superior Immunomodulators When Compared to Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells?** Stem Cells Int. 2015;2015:583984.

BARNES, D.W.; LOUTIT, J.F.; MICKLEM H.S. **"Secondary disease" of radiation chimeras: a syndrome due to lymphoid aplasia.** Ann N Y Acad Sci. 1962 Oct 24;99:374-85.

BILLINGHAM R.E. **The biology of graft-versus-host reactions.** Harvey Lect. 1966-1967;62:21-78.

BURNHAM, A.J.; DALEY-BAUET, L.P.; HORWITZ, E.M. **Mesenchymal Stromal Cells in Hematopoietic Cell Transplantation.** Blood Adv 2020, 4, 5877–5887.

CARRERAS, E.; DIAZ-RICART, M. **The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT.** Bone Marrow Transplant. 2011 Dec;46(12):1495-502.

CHEUNG, T.S. et al. **Mesenchymal Stromal Cells for Graft Versus Host Disease: Mechanism-Based Biomarkers.** Front Immunol 2020, 11, 1338.

DE SANTIS, G.C. et al. **Mesenchymal Stromal Cells Administration for Osteonecrosis of the Jaw Caused by Bisphosphonate: Report of Two Cases.** Acta Oncologica 2020, 59, 789–792.

DING, Y. et al. **The Efficiency of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells as a Salvage Treatment for Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease.** Clin Exp Med 2023.

DOMINICI, M. et al. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

DONADEL, C.D. et al. **Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease.** Pharmaceuticals (Basel). 2023 Mar 30;16(4):512.

DOTOLI, G.M. et al. **Mesenchymal Stromal Cell Infusion to Treat Steroid-Refractory Acute GvHD III/IV after Hematopoietic Stem Cell Transplantation.** Bone Marrow Transplant 2017, 52, 859–862.

EISNER, M.D.; AUGUST, C.S. **Impact of Donor and Recipient Characteristics on the Development of Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease Following Pediatric Bone Marrow Transplantation.** Bone Marrow Transplant 1995, 15, 663–668.



FARINA JUNIOR, J.A. et al. **Autologous Adipose-Derived Stem Cell for Painful Leg Ulcers in Patients with Sickle Cell Disease. A Preliminary Study.** British Journal of Haematology 2019, 186, e47–e50..

FERRARA, J.L. et al. **Graft-versus-Host Disease.** The Lancet 2009, 373, 1550–1561.

FISHER, S.A. et al. **Mesenchymal Stromal Cells as Treatment or Prophylaxis for Acute or Chronic Graft-versus-host Disease in Haematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) Recipients with a Haematological Condition.** Cochrane Database Syst Rev 2019, 2019, CD009768.

FRIEDENSTEIN, A.J. et al. **Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.** Transplantation. 1968 Mar;6(2):230-47.

FLOWERS, M.E.D. et al. **Previous Donor Pregnancy as a Risk Factor for Acute Graft-versus-Host Disease in Patients with Aplastic Anaemia Treated by Allogeneic Marrow Transplantation.** British Journal of Haematology 1990, 74, 492–496.

GAO, L. et al. **Phase II Multicenter, Randomized, Double-Blind Controlled Study of Efficacy and Safety of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells in the Prophylaxis of Chronic Graft-Versus-Host Disease After HLA-Haploidentical Stem-Cell Transplantation.** J Clin Oncol. 2016 Aug 20;34(24):2843-50.

GIRMENIA, C. et al. **Incidence and Outcome of Invasive Fungal Diseases after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Prospective Study of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO).** Biology of Blood and Marrow Transplantation 2014, 20, 872–880.

GIRMENIA, C. et al. **Incidence, Risk Factors and Outcome of Pre-Engraftment Gram-Negative Bacteremia After Allogeneic and Autologous Hematopoietic**

**Stem Cell Transplantation: An Italian Prospective Multicenter Survey.** *Clinical Infectious Diseases* 2017, 65, 1884–1896.

GUILLAMAT-PRATS, R. **Role of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Coagulation.** *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 8;23(18):10393.

HAHN, T. et al. **Risk Factors for Acute Graft-Versus-Host Disease After Human Leukocyte Antigen–Identical Sibling Transplants for Adults With Leukemia.** *J Clin Oncol* 2008, 26, 5728–5734.

HAMILTON, B.K. **Updates in chronic graft-versus-host disease.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2021 Dec 10;2021(1):648-654.

HARRIS, A.C. et al. **International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium.** *Biol Blood Marrow Transplant* 2016, 22, 4–10.

HOLTICK, U. et al. **Bone Marrow versus Peripheral Blood Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation for Haematological Malignancies in Adults.** *Cochrane Database Syst Rev* 2014, CD010189.

JAGASIA, M.H. et al. **National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Mar;21(3):389-401.e1.

JAGASIA, M.H. et al. **Ruxolitinib for the Treatment of Steroid-Refractory Acute GVHD (REACH1): A Multicenter, Open-Label Phase 2 Trial.** *Blood* 2020, 135, 1739–1749.

KEBRIAELI, P. et al. **A Phase 3 Randomized Study of Remestemcel-L versus Placebo Added to Second-Line Therapy in Patients with Steroid-Refractory**

**Acute Graft-versus-Host Disease.** Biol Blood Marrow Transplant 2020, 26, 835–844.

KELLY, K.; RASKO, J.E.J. **Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Graft Versus Host Disease.** Frontiers in Immunology 2021, 12.

KERN, S. et al. **Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.** Stem Cells. 2006 May;24(5):1294-301.

KOT, M. et al. **The Importance of HLA Assessment in “Off-the-Shelf” Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Based-Therapies.** Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 5680.

KUÇI, Z. et al. **Mesenchymal Stromal Cells from Pooled Mononuclear Cells of Multiple Bone Marrow Donors as Rescue Therapy in Pediatric Severe Steroid-Refractory Graft-versus-Host Disease: A Multicenter Survey.** Haematologica 2016, 101, 985–994.

KURTZBERG, J. et al. **A Phase 3, Single-Arm, Prospective Study of Remestemcel-L, Ex Vivo Culture-Expanded Adult Human Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Pediatric Patients Who Failed to Respond to Steroid Treatment for Acute Graft-versus-Host Disease.** Biol Blood Marrow Transplant 2020, 26, 845–854.

KURTZBERG, J. et al. **Study 275: Updated Expanded Access Program for Remestemcel-L in Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease in Children.** Biol Blood Marrow Transplant 2020, 26, 855–864.

LALU, M.M. et al. **Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials.** PLoS one 2012, 7, e47559.

LE BLANC, K. et al. **Treatment of Severe Acute Graft-versus-Host Disease with Third Party Haploidentical Mesenchymal Stem Cells.** The Lancet 2004, 363, 1439–1441.

LE BLANC, K. 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.

LEE, S.J. et al. **High-Resolution Donor-Recipient HLA Matching Contributes to the Success of Unrelated Donor Marrow Transplantation.** Blood 2007, 110, 4576–4583.

LEE, S.J.; FLOWERS, M.E. **Recognizing and managing chronic graft-versus-host disease.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008:134-41.

LOCATELLI, F. et al. **Ruxolitinib in Pediatric Patients with Treatment-Naïve or Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease: Primary Findings from the Phase I/II REACH4 Study.** Blood 2022, 140, 1376–1378.

LV, F. et al. **Intrinsic properties of mesenchymal stem cells from human bone marrow, umbilical cord and umbilical cord blood comparing the different sources of MSC.** Curr Stem Cell Res Ther. 2012 Nov;7(6):389-99.

MACMILLAN, M.L. et al. **A Refined Risk Score for Acute Graft-versus-Host Disease That Predicts Response to Initial Therapy, Survival, and Transplant-Related Mortality.** Biology of Blood and Marrow Transplantation 2015, 21, 761–767.

MALARD, F.; HUANG, X.J.; SIM, J.P.Y. **Treatment and unmet needs in steroid-refractory acute graft-versus-host disease.** Leukemia. 2020 May;34(5):1229-1240.

MARKOV, A. et al. **Mesenchymal Stem/Stromal Cells as a Valuable Source for the Treatment of Immune-Mediated Disorders.** Stem Cell Research & Therapy 2021, 12, 192.

MARTIN, P.J. et al. **First- and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation.** Biology of Blood and Marrow Transplantation 2012, 18, 1150–1163.

MARTINI, D.J.; CHEN Y.B.; DEFILIPP, Z. **Recent FDA Approvals in the Treatment of Graft-Versus-Host Disease.** Oncologist. 2022 Aug 5;27(8):685-693.

MENDOZA, T.R. et al. **Evaluation of Different Recall Periods for the US National Cancer Institute's Patient-Reported Outcomes Version of the Common Terminology Criteria for Adverse Events (PRO-CTCAE).** Clin Trials 2017, 14, 255–263.

MIZUKAMI, A.; SWIECH, K. **Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization.** Stem Cells Int 2018, 2018, 4083921.

MURATA, M. et al. **Off-the-Shelf Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Treatment for Acute Graft-versus-Host Disease: Real-World Evidence.** Bone Marrow Transplant 2021, 56, 2355–2366.

MUSHAHARY, D. et al. **Isolation, Cultivation, and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells.** Cytometry A 2018, 93, 19–31.

PENACK, O. et al. **Prophylaxis and Management of Graft versus Host Disease after Stem-Cell Transplantation for Haematological Malignancies: Updated Consensus Recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation.** Lancet Haematol 2020, 7, e157–e167.

RINGDÉN, O.; GUSTAFSSON, B.; SADEGHI, B. **Mesenchymal Stromal Cells in Pediatric Hematopoietic Cell Transplantation a Review and a Pilot Study in**

**Children Treated With Decidua Stromal Cells for Acute Graft-versus-Host Disease.** *Frontiers in Immunology* 2020, 11.

RINGDÉN, O. et al. **Mesenchymal Stromal Cells for Enhancing Hematopoietic Engraftment and Treatment of Graft-Versus-Host Disease, Hemorrhages and Acute Respiratory Distress Syndrome.** *Frontiers in Immunology* 2022, 13.

RODRÍGUEZ-FUENTES, D.E. et al. **Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review.** *Arch Med Res.* 2021 Jan;52(1):93-101.

SANABRIA-DE LA TORRE, R. et al. **Alloreactive Immune Response Associated to Human Mesenchymal Stromal Cells Treatment: A Systematic Review.** *J. Clin. Med.* 2021, 10, 2991.

SCHOEMANS, H.M. et al. **EBMT—NIH—CIBMTR Task Force Position Statement on Standardized Terminology & Guidance for Graft-versus-Host Disease Assessment.** *Bone Marrow Transplant* 2018, 53, 1401–1415.

SHI, Y. et al. **Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases.** *Nat Rev Nephrol* 14, 493–507 (2018).

SNOWDEN, J.A. et al. **European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Indications for haematopoietic cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2022.** *Bone Marrow Transplant.* 2022 Aug;57(8):1217-1239.

THOMPSON, M. et al. **Cell Therapy with Intravascular Administration of Mesenchymal Stromal Cells Continues to Appear Safe: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis.** *EClinicalMedicine* 2020, 19, 100249.

VEGA, A. et al. **Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial.** *Transplantation.* 2015 Aug;99(8):1681-90.

ZAIA, J. et al. **Viral Disease Prevention after Hematopoietic Cell Transplantation.** Bone Marrow Transplant 2009, 44, 471–482.

ZEISER, R.; BLAZAR, B.R. **Acute Graft-versus-Host Disease Biology, Prevention and Therapy.** N Engl J Med 2017, 377, 2167–2179.

ZEISER, R.; BLAZAR, B.R. **Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets.** N Engl J Med. 2017 Dec 28;377(26):2565-2579.

ZEISER, R. et al. **Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease.** N Engl J Med 2020, 382, 1800–1810.

ZEISER, R.; LEE, S.J. **Three US Food and Drug Administration-approved therapies for chronic GVHD.** Blood. 2022 Mar 17;139(11):1642-1645.

ZHOU, X. et al. **Mesenchymal stem cells: a promising way in therapies of graft-versus-host disease.** Cancer Cell Int. 2020 Apr 7;20:114.

WESTIN, J.R. et al. **Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes.** Adv Hematol 2011, 2011, 601953.



Article

# Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease

Camila Derminio Donadel <sup>1</sup>, Bruno Garcia Pires <sup>2</sup>, Nathália Cristine André <sup>1</sup>, Thalita Cristina Mello Costa <sup>2</sup>, Maristela Delgado Orellana <sup>1</sup>, Sâmia Rigotto Caruso <sup>1</sup>, Adriana Seber <sup>3,4</sup>, Valéria Cortez Ginani <sup>3,4</sup>, Alessandra Araújo Gomes <sup>5</sup>, Yana Novis <sup>5</sup>, George Maurício Navarro Barros <sup>6</sup>, Neysimélia Costa Vilella <sup>6</sup>, Gláucia Helena Martinho <sup>7</sup>, Ana Karine Vieira <sup>7</sup>, Andrea Tiemi Kondo <sup>8</sup>, Nelson Hamerschlak <sup>8</sup>, Jayr Schmidt Filho <sup>9</sup>, Erick Menezes Xavier <sup>10</sup>, Juliana Folloni Fernandes <sup>8,11</sup>, Vanderson Rocha <sup>10</sup>, Dimas Tadeu Covas <sup>1,2</sup>, Rodrigo Tocantins Calado <sup>1,2</sup>, Renato Luiz Guerino-Cunha <sup>2,†,‡</sup> and Gil Cunha De Santis <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Regional Blood Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 05508-220, Brazil; camila.donadel@hemocentro.fmrp.usp.br (C.D.D.); nathalia.andre@hemocentro.fmrp.usp.br (N.C.A.); mdelgado@hemocentro.fmrp.usp.br (M.D.O.); samia@hemocentro.fmrp.usp.br (S.R.C.); dimas@hcrp.usp.br (D.T.C.); rtcalado@usp.br (R.T.C.)
  - <sup>2</sup> Department of Medical Imaging, Hematology and Oncology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 05508-220, Brazil; bgppsilva@hcrp.usp.br (B.G.P.); tmcosta@hcrp.usp.br (T.C.M.C.); rlgc@usp.br (R.L.G.-C.)
  - <sup>3</sup> Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer (GRAACC), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo 04021-001, Brazil; adrianaseber@gmail.com (A.S.); valeriaginani@gmail.com (V.C.G.)
  - <sup>4</sup> Hospital Samaritano, São Paulo 01232-010, Brazil
  - <sup>5</sup> Hospital Sírio Libanês, São Paulo 01308-050, Brazil; ale\_a\_gomes@hotmail.com (A.A.G.); yananovis@yahoo.com.br (Y.N.)
  - <sup>6</sup> Barretos Cancer Hospital, Barretos 14784-400, Brazil; georgenavarrobr@yahoo.com.br (G.M.N.B.); ncvillella@hotmail.com (N.C.V.)
  - <sup>7</sup> Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, Brazil; ghelenamar@gmail.com (G.H.M.); ana.karine@ebserh.gov.br (A.K.V.)
  - <sup>8</sup> Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo 05652-900, Brazil; andrea.kondo@einstein.br (A.T.K.); hamer@einstein.br (N.H.); julianafolloni@gmail.com (J.F.F.)
  - <sup>9</sup> Hospital A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo 01525-001, Brazil; jayr.filho@accamargo.org.br
  - <sup>10</sup> Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo 05403-010, Brazil; erick.xavier@hc.fm.usp.br (E.M.X.); vanderson.rocha@hc.fm.usp.br (V.R.)
  - <sup>11</sup> Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 01246-903, Brazil
- \* Correspondence: gil@hemocentro.fmrp.usp.br; Tel.: +55-16-21019300  
 † These authors contributed equally to this work.  
 ‡ Present affiliation: Grupo Oncoclínicas & Instituto Oncoclínicas, São Paulo 04543-906, Brazil.



**Citation:** Donadel, C.D.; Pires, B.G.; André, N.C.; Costa, T.C.M.; Orellana, M.D.; Caruso, S.R.; Seber, A.; Ginani, V.C.; Gomes, A.A.; Novis, Y.; et al. Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 512. <https://doi.org/10.3390/ph16040512>

Academic Editor: Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim

Received: 8 March 2023

Revised: 21 March 2023

Accepted: 29 March 2023

Published: 30 March 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Background: Steroid-refractory acute graft-vs.-host disease (SR-aGVHD) is a complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a dismal prognosis and for which there is no consensus-based second-line therapy. Ruxolitinib is not easily accessible in many countries. A possible therapy is the administration of mesenchymal stromal cells (MSCs). Methods: In this retrospective study, 52 patients with severe SR-aGVHD were treated with MSCs from umbilical cord (UC-MSCs) in nine institutions. Results: The median (range) age was 12.5 (0.3–65) years and the mean  $\pm$  SD dose ( $\times 10^6$ /kg) was  $4.73 \pm 1.3$  per infusion (median of four infusions). Overall (OR) and complete response (CR) rates on day 28 were 63.5% and 36.6%, respectively. Children ( $n = 35$ ) had better OR (71.5% vs. 47.1%,  $p = 0.12$ ), CR (48.6% vs. 11.8%,  $p = 0.03$ ), overall survival ( $p = 0.0006$ ), and relapse-free survival ( $p = 0.0014$ ) than adults ( $n = 17$ ). Acute adverse events (all of them mild or moderate) were detected in 32.7% of patients, with no significant difference in children and adult groups ( $p = 1.0$ ). Conclusions: UC-MSCs are a feasible alternative therapy for SR-aGVHD, especially in children. The safety profile is favorable.



**Keywords:** mesenchymal stromal cell; hematopoietic stem cell transplantation; acute graft-versus-host disease

## 1. Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) is a potential curative treatment option for many hematological diseases (Snowden et al., 2022). Nevertheless, it is commonly associated with complications such as infection, immunosuppression, and acute graft-versus-host disease (aGVHD) [1–3].

aGVHD affects approximately 40% of patients undergoing alloHSCT, varying according to the type of donor, cell source, and method of prophylaxis [4–9]. aGVHD is the leading cause of short-term death in patients undergoing alloHSCT and is characterized by acute inflammation and organ dysfunction [10]. The organs most frequently affected are the skin (maculopapular rash), the gastrointestinal tract (nausea, vomiting, anorexia, watery or bloody diarrhea, and abdominal cramps), and the liver (cholestasis, manifested by hyperbilirubinemia), typically occurring in the first 100 days of transplantation, but occasionally starting after this period, even superimposed to chronic GVHD, the so-called overlap syndrome [11]. The diagnosis of aGVHD is based on clinical and anatomopathological findings of the affected tissue or organ [12]. The most used classification for aGVHD severity is the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium (MAGIC) [13]. Each affected organ (skin, liver, upper gastrointestinal tract, and lower gastrointestinal tract) is individually graded based on the severity of involvement, ranging from stage 1 (mild) to stage 4 (very severe), and the disease is graded globally from grade I (mild) to IV (very severe). Grades III–IV confer, as expected, a higher mortality rate [10].

Corticosteroids (prednisone or methylprednisolone at a dose of 1–2 mg/kg/day) are the first-line therapy for this complication; however, 40–50% of patients are refractory to this class of drug [14,15]. Steroid-refractory aGVHD (SR-aGVHD) is associated with a dismal prognosis, with a survival rate, considering all grades, of 40% at six months [14], and as low as 17% for long-term survival for non-responders to therapy [16]. Recently, the inhibitor of JAK2 ruxolitinib was approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the second-line treatment of aGVHD, as it results in a response rate in approximately two-thirds of patients [17,18]. Several other agents were evaluated; however, none provided an entirely satisfactory clinical response [19]. An interesting alternative as a second-line treatment for SR-aGVHD could be the administration of mesenchymal stromal cells (MSCs).

MSCs are non-hematopoietic cells of mesodermal origin that are present in most body tissues, including bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta, from which they can be extracted and expanded *ex vivo* [20,21]. MSCs can basically be used for two purposes: to regenerate tissues and organs [22,23] and for immunomodulation in immune-mediated disorders, such as autoimmune diseases and aGVHD [24,25]. MSCs diminish inflammation intensity and induce immune suppression by, at least in part, suppression of the proliferation of T and NK cells and reduction of the number of pro-inflammatory monocytes. Additionally, MSCs promote regulatory T cell expansion [26]. In 2004, Le Blanc et al. reported a successful case of MSC use for aGVHD [27]. Later, the same group described a series of cases in which MSC administration for aGVHD provided excellent disease control [28]. Subsequently, Kurtzberg et al., in two important studies, showed benefits of MSC administration for children with aGVHD. The first study was a one-arm phase 3 clinical trial that showed encouraging (overall response in 70.4% of the patients at day 28) clinical benefits for patients treated with MSCs [29]. The second study, an expanded access program, included 241 patients with an overall response rate at day 28 and overall survival at day 100 of 63.1% and 66.9%, respectively, a result much better than those previously reported in the literature with other types of therapy [30]. Other studies also showed encouraging results, which contributed to the approval of MSC product use in children with SR-aGVHD in Canada, New Zealand, and Japan [31]. Because of

some encouraging results obtained so far, the European Society for Blood and Marrow Transplantation recommended MSC administration as second-line therapy (category 2A) for acute GVHD [32]. A retrospective study of bone marrow MSC use in SR-aGVHD developed by our group showed a 2-year survival rate of 17%, in which all survivors had a complete response [33]. These studies employed bone marrow as the source of MSC. Nevertheless, the use of the umbilical cord as a source seems to be associated with similar results [34].

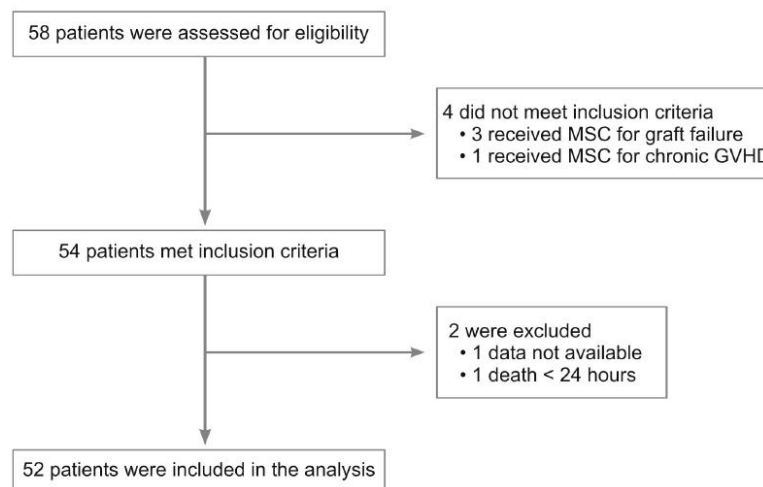
MSC administration has been associated with a few adverse events, usually of mild presentation [29,30,33]. Besides the favorable safety profile, MSC products can be manufactured relatively easily in centers that have a laboratory dedicated to cellular therapy. Additionally, MSC products can be manufactured in countries in which other biologicals for second-line therapy for this disease are not readily available or are totally unavailable.

In this study, we retrospectively analyzed the results of umbilical cord-derived MSC administration as a salvage therapy for patients with SR-aGVHD.

## 2. Results

### 2.1. Patients' Characteristics, Infused Cell Dose, and Schedule

A total of 52 patients with SR-aGVHD were included in the analysis according to the inclusion and exclusion criteria. Two patients were excluded from the analysis, one because of a lack of data and another one because he died of sepsis within 24 h of MSC infusion (Figure 1). The median (range) age at transplantation was 12.5 years (0.3–65), and males made up the majority (65.4%) of the study group. The median (range) follow-up was 4.6 (0–92) months. The median (range) time from diagnosis to MSC infusion, and the number of infusions were 36.5 (4–250) days and 4 (1–11), respectively. The mean  $\pm$  SD dose per infusion was  $4.73 \times 10^6/\text{kg} \pm 1.30 \times 10^6/\text{kg}$ . Time to infusion, number of infusions, and MSC dose had no statistical difference between children and adults.



**Figure 1.** Flowchart showing the reasons for the exclusion of 6 patients, which resulted in a total of 52 patients included in the analyses.

Table 1 summarizes the patient characteristics of the overall population, infused cell dose, and schedule, according to age, <18 years (children) and  $\geq 18$  years (adults).

**Table 1.** Clinical characteristics of patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease.

	Total (n = 52)	Children (n = 35)	Adults (n = 17)	p-Value
<b>Age (years), median (range)</b>	12.5 (0.3–65)	8 (0.3–16)	32 (20–65)	
<b>Male (%)</b>	34 (65.4)	23 (65.7)	11 (64.7)	1.0
<b>Diagnosis (%)</b>				0.02
Acute leukemia/MDS	39 (75.0)	30 (85.7)	9 (52.9)	
Lymphoma	3 (5.8)	0	3 (17.6)	
Aplastic anemia	4 (7.7)	2 (5.7)	2 (11.8)	
Others	7 (11.5)	3 (8.6)	3 (17.6)	
<b>Conditioning regimen (%)</b>				0.002
MAC	41 (78.8)	32 (91.4)	9 (52.9)	
RIC	11 (21.2)	3 (8.6)	8 (47.1)	
<b>Graft source (%)</b>				<0.0001
BM	30 (57.7)	27 (77.1)	3 (17.6)	
PBSC	20 (38.5)	6 (17.2)	14 (82.4)	
UCB	2 (3.8)	2 (5.7)	0	
<b>aGVHD severity (%)</b>				0.37
II	2 (3.8)	2 (5.7)	0	
III	13 (25.0)	10 (28.6)	3 (17.6)	
IV	37 (71.2)	23 (65.7)	14 (82.4)	
<b>Organs affected (%)</b>				0.79
Skin	39 (75.0)	23 (65.7)	16 (94.1)	
Gut	50 (96.2)	33 (94.3)	17 (100)	
Liver	21 (38.5)	13 (37.1)	8 (47.1)	
<b>Days to MSCs infusion *, median (range)</b>	36.5 (4–294)	39 (4–250)	27 (12–294)	0.6
<b>N° of MSCs infusions, median (range)</b>	4 (1–11)	4 (1–11)	3 (1–8)	0.06
<b>MSCs Dose (<math>\times 10^6</math>/kg), mean <math>\pm</math> SD</b>	4.73 $\pm$ 1.30	4.93 $\pm$ 1.4	4.31 $\pm$ 0.98	0.11

\* After aGVHD; MDS: myelodysplastic syndrome; MAC: myeloablative conditioning; RIC: reduced-intensity conditioning; BM: bone marrow; PBSC: peripheral blood stem cell; UCB: umbilical cord blood; aGVHD: acute graft-versus-host disease; MSC: mesenchymal stromal cells.

## 2.2. Efficacy

### 2.2.1. Overall Response (OR)

A total of 63.5% of the patients (children, 71.5%; adults, 47.1%) had a favorable response on day 28 after MSC infusion, which progressively declined throughout the period of evaluation (2 years) until reaching only 26.9% (children 34.3%; adults 11.8%) (Table 2).

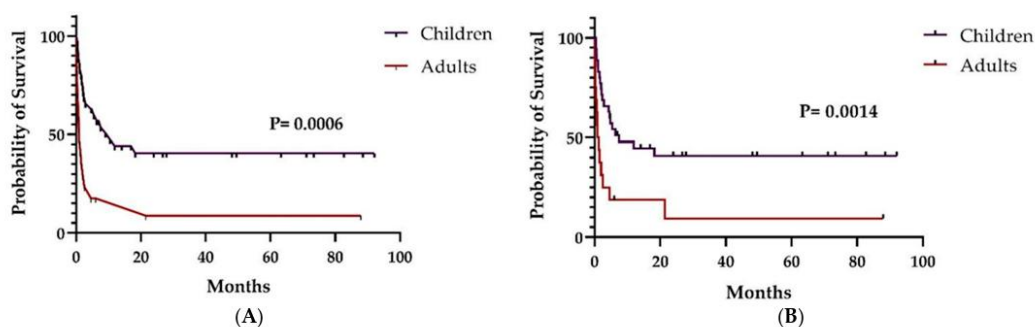
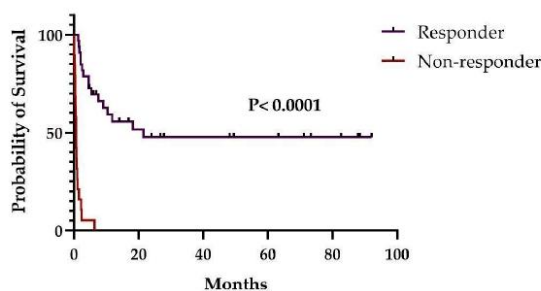
### 2.2.2. Overall (OS) and Relapse-Free Survival (RFS)

Children presented a much better OS and RFS than adults ( $p = 0.0006$  and  $p = 0.0014$ , respectively) (Figure 2). Moreover, the patients who had a favorable response on day 28 after MSC infusion had also a better OS ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3). Total OS at days 100 and 180 were 51.9% (27/54) and 38.5% (20/54), respectively. On day 100, OS in children and adults was 62.9% (22/35) and 29.5% (5/17), respectively ( $p = 0.038$ ). On day 180, OS in children and adults was 48.6% (17/35) and 17.6% (3/17), respectively ( $p = 0.038$ ). Finally, considering only patients who died (35/52; 67.3%), we observed that children and adults took 68.5 (12–547) days and 25.0 days (2–644) from the first MSC infusion to death, respectively ( $p = 0.02$ ).

**Table 2.** Overall response to MSC infusion according to the groups.

	Total (n = 52)	Children (n = 35)	Adults (n = 17)	p-Value
<b>OR day 28 (%)</b>	33 (63.5)	25 (71.5)	8 (47.1)	0.12
CR	19 (36.6)	17 (48.6)	2 (11.8)	0.03
PR	14 (26.9)	8 (22.9)	6 (35.3)	
<b>OR day 100 (%)</b>	19 (36.6)	16 (45.7)	3 (17.7)	0.06
CR	16 (30.8)	15 (42.8)	1 (5.9)	0.008
PR	3 (5.8)	1 (2.9)	2 (11.8)	
<b>OR day 180 (%)</b>	18 (34.6)	16 (45.7)	2 (11.8)	0.02
CR	17 (32.7)	15 (42.8)	2 (11.8)	0.05
PR	1 (1.9)	1 (2.9)	0	
<b>OR 1 year (%)</b>	15 (28.8)	13 (37.2)	2 (11.8)	0.1
CR	14 (26.9)	12 (34.3)	2 (11.8)	0.15
PR	1 (1.9)	1 (2.9)	0	
<b>OR 2 years (%)</b>	14 (26.9)	12 (34.3)	2 (11.8)	0.1
CR	14 (26.9)	12 (34.3)	2 (11.8)	
PR	0	0	0	

OR: overall response; CR: complete response; PR: partial response.

**Figure 2.** Overall (A) and relapse-free survival (B) in children and adults (after MSC infusion).**Figure 3.** Overall survival according to response (complete and partial) at day 28 after MSCs.

### 2.2.3. Chronic GVHD

The occurrence of chronic GVHD was evaluated in 44 of 52 patients (only those who survived beyond day 100 from HSCT), of which 7/34 (20.6%) children and 3/10 (30%) adults had this complication ( $p = 0.67$ ).

### 2.3. Safety

A total of 17 (32.7%) patients (12 children and 5 adults) presented acute AE associated with MSC infusion, of which only 2 were moderate/severe (1 angioedema and 1 seizure) (according to Common Terminology Criteria for Adverse Events-CTCAE) [35]. There was no difference between the two groups regarding this issue (Table 3). Additionally, cardiovascular acute AE (tachycardia/bradycardia and hypertension/hypotension) was observed in 11.4% of the children and in 54.5% of the adults ( $p = 0.06$ ).

**Table 3.** Adverse events associated with MSC infusion according to the groups.

	Total (n = 52)	Children (n = 35)	Adults (n = 17)	p-Value
<b>Adverse Events (%)</b>	17 (32.7)	12 (34.3)	5 (29.4)	1.0
Tachycardia/bradycardia	6 (11.5)	2	4	
Hypertension/Hypotension	4 (7.7)	2	2	
Dyspnea	2 (3.8)	1	1	
Nausea/vomit/abdominal cramps	7 (13.5)	7	0	
Headache/dizziness	5 (9.6)	4	1	
Seizures	1 (1.9)	1	0	
Fever/chills	5 (9.6)	4	1	
Rash/pruritus	2 (3.8)	1	1	
Angioedema	1 (1.9)	1	0	

## 3. Materials and Methods

### 3.1. Study Design

This is a multicenter (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto—USP, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo—USP, Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer—GRAACC, Hospital Samaritano, Hospital Sírio-Libanês, Hospital Israelita Albert Einstein, Fundação Pio XII—Barretos Cancer Hospital, Hospital A.C. Camargo Cancer Center, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais), retrospective study of the efficacy and safety of MSC administration for treatment of SR-aGVHD. The data were collected from the patients' medical charts.

This study was approved by the institutional review boards of the participating centers and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

### 3.2. Patients

Patients with SR-aGVHD grade  $\geq$  II after alloHSCT treated with MSCs between 2015 and 2022 were included in this study. Disease severity was classified by the MAGIC score [13]. SR-aGVHD was defined according to one of the following criteria: disease progression after three days of treatment (methylprednisolone 2 mg/kg/day or equivalent); failure to respond after seven days of treatment; involvement of a new site; or recurrence of GVHD during the corticosteroid tapering [19]. Death during the first 24 h of the MSC infusion and lack of clinical information in the patients' medical charts were considered exclusion criteria.

### 3.3. Mesenchymal Stromal Cells

MSCs were isolated from the umbilical cord of unrelated healthy neonates, expanded ex vivo and cryopreserved with dimethyl sulfoxide between the third and sixth passage. Each MSC dose was stored in the vapor phase of liquid nitrogen, thawed, and reconstituted in a human serum albumin, saline, and anticoagulant citrate dextrose solution prior to administration, and injected intravenously by central catheter. MSCs must meet the following criteria for clinical use: viability  $\geq$  70% (it was  $\geq$  95% at freezing and  $\geq$  80% after thawing); typical immunophenotyping with positive CD73, CD90, CD105, and CD166 markers and

absence of expression of hematopoietic and endothelial lineage markers D45, CD34, CD14, CD31, and HLA-DR; and no virus, fungus, bacteria, or mycoplasma contamination.

#### 3.4. Variables of Interest

We evaluated the patients' transplant and MSC infusion characteristics, such as age, sex, diagnosis, conditioning regimen, graft source, days of MSC infusion after a-GVHD diagnosis, number of infusions, and dose of MSCs. Conditioning regimens were classified as myeloablative (MAC) or reduced-intensity (RIC) according to the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) [36]. The severity of aGVHD and the organs affected were also evaluated.

#### 3.5. Endpoints

The primary endpoint in this study was the overall response rates, including partial and complete responses, defined according to what was previously described [29]. Response rates were evaluated at days 28, 100, and 180, and at 1 and 2 years after MSC infusion. Secondary endpoints were overall survival, relapse-free survival, frequency of chronic GVHD, and incidence and severity of acute ( $\leq 24$  h) and adverse events (AE) related to MSC infusion. Another secondary endpoint was the comparison of response rates and survival rates in the pediatric population and in the adult population.

#### 3.6. Statistical Analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation or median (range) according to distribution characteristics and proportions. When two groups were compared, a two-sided unpaired Student's *t*-test (for parametric data) or a Mann–Whitney test (for non-parametric data) was used. Categorical variables were presented as frequency (%) and compared using a chi-square test or Fisher's exact test. Overall survival (OS) estimates were calculated using the Kaplan–Meier method, and differences between the groups were assessed by the log-rank test. Time to events was calculated in days and months from the diagnosis of aGVHD to the day of the first MSC administration, and from this to death or the last date of follow-up, respectively. The results were considered to be statistically different when the *p*-value was below 0.05 (by two-tailed testing). Statistical analyses were performed using statistical GraphPAD Prism software, version 9.5.0.

## 4. Discussion

This non-randomized retrospective observational study showed that the administration of mesenchymal stromal cells obtained from umbilical cord results in substantial clinical benefits in steroid-refractory acute graft-versus-host disease, mainly in children. Approximately two-thirds of our patients presented a 28-day overall response to this therapy, which was in agreement with what was reported in previous studies [29,30,34,37,38] (Table 4). Moreover, the response rate was much higher in children than in adults, similar to that observed by others [37], and similar to the results of the study by Kurtzberg et al., in which the authors evaluated only children [29,30]. Most interestingly, almost half the children presented a 28-day complete response, a higher rate than that observed evaluated by Kurtzberg et al. [29]. A possible explanation for this finding could be the higher MSC dose (the double) than most of the studies, despite the late cell infusion (36.5 days after aGVHD diagnosis). It is possible that a higher cell dose offset the late therapy, the lower number of infusions, and the more severe aGVHD in our patients than the others, as depicted in Table 4. Finally, comparing MSC therapy with ruxolitinib, regarding response rates in children, we observed a similar OR/CR at day 28 in this study to Locatelli et al. (71.5/48.2% vs. 84.4/48.9%, respectively) [39]. Additionally, in the studies REACH1 and REACH2, which evaluated this drug, OR at day 28 was 54.9% and 62%, respectively, similar to our results [17,18].

**Table 4.** Recent studies that evaluated the use of MSC in steroid-refractory acute graft-vs-host disease.

	Kebriaei (2020) [37]	Kurtzberg (2020) [29]	Kurtzberg (2020) [30]	Murata (2021) [38]	Ding (2023) [34]	Donadel <sup>c</sup> (2023)
Type of study	phase 3	phase 3	expanded access	retrospective	retrospective	retrospective
Participants	163	54	241	309	54	52
Age <sup>a</sup>	43.8	7.0	9.6	49	12.5	12.5
Severe aGVHD <sup>b</sup> (%)	77.3	88.8	80.1	80.5	88.8	96.2
Source of MSC	BM	BM	BM	BM	UC	UC
Lines of therapy	≥3	2	≥2	≥1	≥3	≥3
N <sup>o</sup> of infusions <sup>a</sup>	8.8	9.9	11	8	2	4
Dose per infusion (×10 <sup>6</sup> /kg)	2	2	2	2	2.54	4.73
Time to infusion (days) <sup>a</sup>	-	12	23	29	19	36.5
OR day 28 (%)	58.3	70.4	65.1	56	59.3	63.5 (71.5) <sup>d</sup>
CR day 28 (%)	-	29.6	14.1	24	44.4	36.6 (48.6) <sup>d</sup>
OS day 100 (%)	-	74.1	66.9	-	-	51.9 (62.9) <sup>d</sup>
OS day 180 (%)	34	68.5	-	40	-	38.5 (48.6) <sup>d</sup>

aGVHD: acute graft-vs-host disease; MSC: mesenchymal stromal cell; OR: overall response; CR: complete response; OS: overall survival; BM: bone marrow; UC: umbilical cord; <sup>a</sup> Median or mean; <sup>b</sup> Grade III/IV or C/D; <sup>c</sup> present study; <sup>d</sup> (children).

In our study, OS at day 100 was lower than that observed in the two studies of Kurtzberg et al. [29,30]. Nevertheless, considering only the children of our study, the difference appears to be not significant (62.9% vs. 74.1% and 66.9%). Additionally, OS in children is much better than that observed in adults, which is in accordance with Kebriaei et al. [37]. Furthermore, OS at day 180 was inferior to that observed by Kurtzberg et al. [29] and similar to that found by others [37,38]. Nevertheless, all patients from the study by Kurtzberg et al. received MSC as second-line therapy and earlier than our cohort (12 vs. 36 days), which could be the explanation for the better outcomes [29]. This suggests that MSC infusion should be instituted as soon as possible. Additionally, as expected, OS in the responder group, defined as those who achieved a 28-day OR, was superior to that observed in the non-responder group, as had been previously shown by others [29,38].

It is possible that the administration of MSCs to SR-aGVHD in our patients could have resulted in a slight reduction in chronic GVHD, which affects approximately 50% of patients, a phenomenon that has already been suggested by others [40,41]. In this study, there was no difference between the incidence of chronic GVHD in children and adults.

To indicate MSC use for SR-aGVHD, one needs to take into consideration other agents with known efficacy and acceptable safety profiles. The most important one is the drug ruxolitinib, which was recently approved by the FDA for patients over 12 years of age with this condition; however, complete response rates are still not thoroughly satisfying [17,18]. Our results suggest that MSCs propitiate a similar response rate to that shown with this drug, and, perhaps, an even higher complete response rate considering all the patients herein described. Another important issue is the incidence rate of adverse events, which seems to be higher and more severe with ruxolitinib than with MSC.

Approximately one-third of our patients presented acute AE, mostly mild; however, this was a higher rate than that observed by others [29,34,42,43]. A possible explanation for this finding could be the fact that our patients had more advanced disease and received a higher dose of MSC than that reported in most studies, and later during the evolution of the disease. Despite this, we consider it important to emphasize that the occurrence of severe

AE was very low (observed in only two patients in our cohort). An interesting finding was that the adult group appears to be more vulnerable to cardiovascular AE. Additionally, the AE rate in our patients was lower than that observed with the use of ruxolitinib, despite the fact that we did not follow the patients for the occurrence of late-beginning AE [17,18]. MSC use has not been associated with hematological alterations, whereas cytopenia, especially thrombocytopenia, is a common complication of ruxolitinib use. Locatelli et al. observed that approximately half the patients (children) had dose changes or interruptions due to adverse events, which appear to be higher than those found in this study [39].

Another important aspect is the relatively limited access to other drugs for SR-aGVHD in the public health system in our country, such as, for example, the aforementioned ruxolitinib. Moreover, MSC products are administered for a short time, whereas ruxolitinib is usually used for longer periods. It is important to emphasize that ruxolitinib is not yet approved for children under 12 years of age, exactly the age group for which MSC administration was proved to be most efficacious.

MSCs obtained from the umbilical cord are a relatively new source of MSCs, and are considered to be associated with a number of advantages, such as higher MSC proliferative potential, lower risk of transmissibility of infection agents, higher production of units ready for use (off the shelf), and, presumably, a lower risk for the donor [44]. Other interesting sources seem to be pooled bone marrow and decidua MSCs, which are also used to treat aGVHD in children [45,46]. Decidua MSCs were used in only six patients, with durable complete responses seen in four of them [46]. The main disadvantage is that the separation of MSCs from the umbilical cord is more labor-intensive than using bone marrow as the source.

This study suffers from three main limitations, the first one being inherent to retrospective analyses. The other limitations are the relatively small sample size, especially for the adult group and after day 180 from MSC infusion, and the heterogeneity of the patient population, such as diagnosis, and patient care, such as graft source, conditioning regimens, prophylaxis, and second-line treatment for GVHD. Despite these limitations, we had a sample size large enough to show the difference between children and adults regarding the efficacy of MSC for aGVHD and the importance of the response evaluation at day 28.

In conclusion, we believe that umbilical cord mesenchymal stromal cells appear to be a valuable therapeutic modality for steroid-refractory acute graft-versus-host disease, especially for countries in which other agents are less available. Children present a better response rate than adults. Moreover, clinical response on day 28 appears to be fundamental to defining prognosis. Additionally, UC-MS administration seems to be safe. Our group believes that MSC therapy should be considered for second- or third-line therapy for SR-aGVHD in children. Finally, it would be interesting to investigate the association between the use of MSCs and ruxolitinib, mainly in adults, even as a bridge therapy until the ruxolitinib could be expected to provide beneficial effects.

**Author Contributions:** Conceptualization: C.D.D. and G.C.D.S.; Methodology: G.C.D.S.; Formal analysis: C.D.D. and G.C.D.S.; Investigation: C.D.D.; Resources: B.G.P., T.C.M.C., M.D.O., S.R.C., A.S., V.C.G., A.A.G., Y.N., G.M.N.B., N.C.V., G.H.M., A.K.V., A.T.K., N.H., J.S.F., E.M.X., J.F.F., V.R., D.T.C. and R.T.C.; Data curation: C.D.D., S.R.C. and N.C.A.; Writing—original draft preparation: C.D.D. and G.C.D.S.; Writing—review and editing: C.D.D. and G.C.D.S.; Visualization: C.D.D., N.C.A. and G.C.D.S.; Supervision: R.L.G.-C. and G.C.D.S.; Project administration: C.D.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by São Paulo Research Foundation 2013/08135-2.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (CAAE: 60732522.4.0000.5440; date of approval: 25 July 2022).

**Informed Consent Statement:** Patient consent was waived due to the fact that this is a retrospective study, especially considering that a substantial percentage of the patients had died.



**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available upon request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the privacy of participants.

**Acknowledgments:** The authors thank the center for cell-based therapy of the Regional Blood Center of Ribeirão Preto, which received, stored, thawed, and prepared the MSCs for infusion. The authors also thank the following persons: Ana Luiza Calmon Alves, Giancarlo Fatobene, Jaqueline Sapelli, Simone Ojima Ferreira, Taísa Risque Fernandes, and Vanessa dos Anjos Bovolenta.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Zaia, J.; Baden, L.; Boeckh, M.J.; Chakrabarti, S.; Einsele, H.; Ljungman, P.; McDonald, G.B.; Hirsch, H. Viral Disease Prevention after Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **2009**, *44*, 471–482. [\[CrossRef\]](#)
- Girmenia, C.; Raiola, A.M.; Picciocchi, A.; Algarotti, A.; Stanzani, M.; Cudillo, L.; Pecoraro, C.; Guidi, S.; Iori, A.P.; Montante, B.; et al. Incidence and Outcome of Invasive Fungal Diseases after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Prospective Study of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2014**, *20*, 872–880. [\[CrossRef\]](#)
- Girmenia, C.; Bertaina, A.; Picciocchi, A.; Perruccio, K.; Algarotti, A.; Busca, A.; Cattaneo, C.; Raiola, A.M.; Guidi, S.; Iori, A.P.; et al. Incidence, Risk Factors and Outcome of Pre-Engraftment Gram-Negative Bacteremia after Allogeneic and Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation: An Italian Prospective Multicenter Survey. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *65*, 1884–1896. [\[CrossRef\]](#)
- Anasetti, C.; Beatty, P.G.; Storb, R.; Martin, P.J.; Mori, M.; Sanders, J.E.; Donnall Thomas, E.; Hansen, J.A. Effect of HLA Incompatibility on Graft-versus-Host Disease, Relapse, and Survival after Marrow Transplantation for Patients with Leukemia or Lymphoma. *Hum. Immunol.* **1990**, *29*, 79–91. [\[CrossRef\]](#)
- Lee, S.J.; Klein, J.; Haagenson, M.; Baxter-Lowe, L.A.; Confer, D.L.; Eapen, M.; Fernandez-Vina, M.; Flomenberg, N.; Horowitz, M.; Hurley, C.K.; et al. High-Resolution Donor-Recipient HLA Matching Contributes to the Success of Unrelated Donor Marrow Transplantation. *Blood* **2007**, *110*, 4576–4583. [\[CrossRef\]](#)
- Flowers, M.E.D.; Pepe, M.S.; Longton, G.; Doney, K.C.; Monroe, D.; Witherspoon, R.P.; Sullivan, K.M.; Storb, R. Previous Donor Pregnancy as a Risk Factor for Acute Graft-versus-Host Disease in Patients with Aplastic Anaemia Treated by Allogeneic Marrow Transplantation. *Br. J. Haematol.* **1990**, *74*, 492–496. [\[CrossRef\]](#)
- Eisner, M.D.; August, C.S. Impact of Donor and Recipient Characteristics on the Development of Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease Following Pediatric Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **1995**, *15*, 663–668.
- Hahn, T.; McCarthy, P.L.; Zhang, M.-J.; Wang, D.; Arora, M.; Frangoul, H.; Gale, R.P.; Hale, G.A.; Horan, J.; Isola, L.; et al. Risk Factors for Acute Graft-Versus-Host Disease After Human Leukocyte Antigen-Identical Sibling Transplants for Adults With Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 5728–5734. [\[CrossRef\]](#)
- Holtick, U.; Albrecht, M.; Chemnitz, J.M.; Theurich, S.; Skoetz, N.; Scheid, C.; von Bergwelt-Baildon, M. Bone Marrow versus Peripheral Blood Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation for Haematological Malignancies in Adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2014**, *4*, 010189. [\[CrossRef\]](#)
- Zeiser, R.; Blazar, B.R. Acute Graft-versus-Host Disease Biology, Prevention and Therapy. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2167–2179. [\[CrossRef\]](#)
- Schoemans, H.M.; Lee, S.J.; Ferrara, J.L.; Wolff, D.; Levine, J.E.; Schultz, K.R.; Shaw, B.E.; Flowers, M.E.; Ruutu, T.; Greinix, H.; et al. EBMT–NIH–CIBMTR Task Force Position Statement on Standardized Terminology & Guidance for Graft-versus-Host Disease Assessment. *Bone Marrow Transplant.* **2018**, *53*, 1401–1415. [\[CrossRef\]](#)
- Ferrara, J.L.; Levine, J.E.; Reddy, P.; Holler, E. Graft-versus-Host Disease. *Lancet* **2009**, *373*, 1550–1561. [\[CrossRef\]](#)
- Harris, A.C.; Young, R.; Devine, S.; Hogan, W.J.; Ayuk, F.; Bunworasate, U.; Chanswangphuwana, C.; Efebera, Y.A.; Holler, E.; Litzow, M.; et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2016**, *22*, 4–10. [\[CrossRef\]](#)
- Martin, P.J.; Rizzo, J.D.; Wingard, J.R.; Ballen, K.; Curtin, P.T.; Cutler, C.; Litzow, M.R.; Nieto, Y.; Savani, B.N.; Schriber, J.R.; et al. First- and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2012**, *18*, 1150–1163. [\[CrossRef\]](#)
- MacMillan, M.L.; Robin, M.; Harris, A.C.; DeFor, T.E.; Martin, P.J.; Alousi, A.; Ho, V.T.; Bolaños-Meade, J.; Ferrara, J.L.M.; Jones, R.; et al. A Refined Risk Score for Acute Graft-versus-Host Disease That Predicts Response to Initial Therapy, Survival, and Transplant-Related Mortality. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2015**, *21*, 761–767. [\[CrossRef\]](#)
- Westin, J.R.; Saliba, R.M.; De Lima, M.; Alousi, A.; Hosing, C.; Qazilbash, M.H.; Khouri, I.F.; Shpall, E.J.; Anderlini, P.; Rondon, G.; et al. Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Adv. Hematol.* **2011**, *2011*, 601953. [\[CrossRef\]](#)
- Jagasia, M.; Perales, M.-A.; Schroeder, M.A.; Ali, H.; Shah, N.N.; Chen, Y.-B.; Fazal, S.; Dawkins, F.W.; Arbushites, M.C.; Tian, C.; et al. Ruxolitinib for the Treatment of Steroid-Refractory Acute GVHD (REACH1): A Multicenter, Open-Label Phase 2 Trial. *Blood* **2020**, *135*, 1739–1749. [\[CrossRef\]](#)
- Zeiser, R.; von Bubnoff, N.; Butler, J.; Mohty, M.; Niederwieser, D.; Or, R.; Szer, J.; Wagner, E.M.; Zuckerman, T.; Mahuzier, B.; et al. Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1800–1810. [\[CrossRef\]](#)

19. Abedin, S.; Hamadani, M. Experimental Pharmaceuticals for Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *J. Exp. Pharm.* **2020**, *12*, 549–557. [\[CrossRef\]](#)
20. Mizukami, A.; Swiech, K. Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization. *Stem Cells Int.* **2018**, *2018*, 4083921. [\[CrossRef\]](#)
21. Mushahary, D.; Spittler, A.; Kasper, C.; Weber, V.; Charwat, V. Isolation, Cultivation, and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cytom. A* **2018**, *93*, 19–31. [\[CrossRef\]](#)
22. De Santis, G.C.; de Macedo, L.D.; Orellana, M.D.; Innocentini, L.M.A.R.; Ferrari, T.C.; Ricz, H.M.A.; Caruso, S.R.; Fernandes, T.R.; Covas, D.T. Mesenchymal Stromal Cells Administration for Osteonecrosis of the Jaw Caused by Bisphosphonate: Report of Two Cases. *Acta Oncol.* **2020**, *59*, 789–792. [\[CrossRef\]](#)
23. Farina Junior, J.A.; De Santis, G.C.; Orellana, M.D.; Silva-Pinto, A.C.; de Oliveira Guirro, E.C.; de Carvalho, C.S.; Zampar, A.G.; Coltro, P.S.; Tirapeli, L.F.; Covas, D.T. Autologous Adipose-Derived Stem Cell for Painful Leg Ulcers in Patients with Sickle Cell Disease. A Preliminary Study. *Br. J. Haematol.* **2019**, *186*, e47–e50. [\[CrossRef\]](#)
24. Markov, A.; Thangavelu, L.; Aravindhnan, S.; Zekiy, A.O.; Jarahian, M.; Chartrand, M.S.; Pathak, Y.; Marofi, F.; Shamlou, S.; Hassanzadeh, A. Mesenchymal Stem/Stromal Cells as a Valuable Source for the Treatment of Immune-Mediated Disorders. *Stem Cell Res. Ther.* **2021**, *12*, 192. [\[CrossRef\]](#)
25. Burnham, A.J.; Daley-Bauer, L.P.; Horwitz, E.M. Mesenchymal Stromal Cells in Hematopoietic Cell Transplantation. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 5877–5887. [\[CrossRef\]](#)
26. Chung, T.S.; Bertolino, G.M.; Giacomini, C.; Bornhäuser, M.; Dazzi, F.; Galleu, A. Mesenchymal Stromal Cells for Graft Versus Host Disease: Mechanism-Based Biomarkers. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1338. [\[CrossRef\]](#)
27. Le Blanc, K.; Rasmusson, I.; Sundberg, B.; Götherström, C.; Hassan, M.; Uzunel, M.; Ringdén, O. Treatment of Severe Acute Graft-versus-Host Disease with Third Party Haploidentical Mesenchymal Stem Cells. *Lancet* **2004**, *363*, 1439–1441. [\[CrossRef\]](#)
28. Le Blanc, K.; Frassoni, F.; Ball, L.; Locatelli, F.; Roelofs, H.; Lewis, I.; Lanino, E.; Sundberg, B.; Bernardo, M.E.; Remberger, M.; 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. [\[CrossRef\]](#)
29. Kurtzberg, J.; Abdel-Azim, H.; Carpenter, P.; Chaudhury, S.; Horn, B.; Mahadeo, K.; Nemecek, E.; Neudorf, S.; Prasad, V.; Prockop, S.; et al. A Phase 3, Single-Arm, Prospective Study of Remestemcel-L, Ex Vivo Culture-Expanded Adult Human Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Pediatric Patients Who Failed to Respond to Steroid Treatment for Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2020**, *26*, 845–854. [\[CrossRef\]](#)
30. Kurtzberg, J.; Prockop, S.; Chaudhury, S.; Horn, B.; Nemecek, E.; Prasad, V.; Satwani, P.; Teira, P.; Hayes, J.; Burke, E.; et al. Study 275: Updated Expanded Access Program for Remestemcel-L in Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease in Children. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2020**, *26*, 855–864. [\[CrossRef\]](#)
31. Kelly, K.; Rasko, J.E.J. Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Graft Versus Host Disease. *Front. Immunol.* **2021**, *26*, 761616. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Penack, O.; Marchetti, M.; Ruutu, T.; Aljurf, M.; Bacigalupo, A.; Bonifazi, F.; Ciceri, F.; Cornelissen, J.; Malladi, R.; Duarte, R.F.; et al. Prophylaxis and Management of Graft versus Host Disease after Stem-Cell Transplantation for Haematological Malignancies: Updated Consensus Recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet Haematol.* **2020**, *7*, e157–e167. [\[CrossRef\]](#)
33. Dotoli, G.M.; De Santis, G.C.; Orellana, M.D.; de Lima Prata, K.; Caruso, S.R.; Fernandes, T.R.; Rensi Colturato, V.A.; Kondo, A.T.; Hamerschlag, N.; Simões, B.P.; et al. Mesenchymal Stromal Cell Infusion to Treat Steroid-Refractory Acute GvHD III/IV after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **2017**, *52*, 859–862. [\[CrossRef\]](#)
34. Ding, Y.; Liu, C.; Cai, Y.; Hou, C.; Chen, G.; Xu, Y.; Hu, S.; Wu, D. The Efficiency of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells as a Salvage Treatment for Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Clin. Exp. Med.* **2023**. [\[CrossRef\]](#)
35. Mendoza, T.R.; Dueck, A.C.; Bennett, A.V.; Mitchell, S.A.; Reeve, B.B.; Atkinson, T.M.; Li, Y.; Castro, K.M.; Denicoff, A.; Rogak, L.J.; et al. Evaluation of Different Recall Periods for the US National Cancer Institute’s Patient-Reported Outcomes Version of the Common Terminology Criteria for Adverse Events (PRO-CTCAE). *Clin. Trials* **2017**, *14*, 255–263. [\[CrossRef\]](#)
36. Bacigalupo, A.; Ballen, K.; Rizzo, D.; Giralt, S.; Lazarus, H.; Ho, V.; Apperley, J.; Slavin, S.; Pasquini, M.; Sandmaier, B.M.; et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2009**, *15*, 1628–1633. [\[CrossRef\]](#)
37. Kebriaei, P.; Hayes, J.; Daly, A.; Uberti, J.; Marks, D.I.; Soiffer, R.; Waller, E.K.; Burke, E.; Skerrett, D.; Shpall, E.; et al. A Phase 3 Randomized Study of Remestemcel-L versus Placebo Added to Second-Line Therapy in Patients with Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2020**, *26*, 835–844. [\[CrossRef\]](#)
38. Murata, M.; Terakura, S.; Wake, A.; Miyao, K.; Ikegame, K.; Uchida, N.; Kataoka, K.; Miyamoto, T.; Onizuka, M.; Eto, T.; et al. Off-the-Shelf Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Treatment for Acute Graft-versus-Host Disease: Real-World Evidence. *Bone Marrow Transplant.* **2021**, *56*, 2355–2366. [\[CrossRef\]](#)
39. Locatelli, F.; Kang, H.J.; Bruno, B.; Gandemer, V.; Riolland, F.; Faraci, M.; Takahashi, Y.; Koh, K.; Bittencourt, H.; Cleary, G.; et al. Ruxolitinib in Pediatric Patients with Treatment-Naïve or Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease: Primary Findings from the Phase I/II REACH4 Study. *Blood* **2022**, *140*, 1376–1378. [\[CrossRef\]](#)

40. Arai, S.; Arora, M.; Wang, T.; Spellman, S.R.; He, W.; Couriel, D.R.; Urbano-Ispizua, A.; Cutler, C.S.; Bacigalupo, A.A.; Battiwalla, M.; et al. Increasing Incidence of Chronic Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Transplantation—A Report from CIBMTR. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2015**, *21*, 266–274. [[CrossRef](#)]
41. Fisher, S.A.; Cutler, A.; Doree, C.; Brunskill, S.J.; Stanworth, S.J.; Navarrete, C.; Girdlestone, J. Mesenchymal Stromal Cells as Treatment or Prophylaxis for Acute or Chronic Graft-versus-host Disease in Haematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) Recipients with a Haematological Condition. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2019**, *2019*, CD009768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lalu, M.M.; McIntyre, L.; Pugliese, C.; Fergusson, D.; Winston, B.W.; Marshall, J.C.; Granton, J.; Stewart, D.J. Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47559. [[CrossRef](#)]
43. Thompson, M.; Mei, S.H.J.; Wolfe, D.; Champagne, J.; Fergusson, D.; Stewart, D.J.; Sullivan, K.J.; Doxtator, E.; Lalu, M.; English, S.W.; et al. Cell Therapy with Intravascular Administration of Mesenchymal Stromal Cells Continues to Appear Safe: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *EClinicalMedicine* **2020**, *19*, 100249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ringdén, O.; Moll, G.; Gustafsson, B.; Sadeghi, B. Mesenchymal Stromal Cells for Enhancing Hematopoietic Engraftment and Treatment of Graft-Versus-Host Disease, Hemorrhages and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kuçi, Z.; Böniq, H.; Kreyenberg, H.; Bunos, M.; Jauch, A.; Janssen, J.W.G.; Škifić, M.; Michel, K.; Eising, B.; Lucchini, G.; et al. Mesenchymal Stromal Cells from Pooled Mononuclear Cells of Multiple Bone Marrow Donors as Rescue Therapy in Pediatric Severe Steroid-Refractory Graft-versus-Host Disease: A Multicenter Survey. *Haematologica* **2016**, *101*, 985–994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ringdén, O.; Gustafsson, B.; Sadeghi, B. Mesenchymal Stromal Cells in Pediatric Hematopoietic Cell Transplantation a Review and a Pilot Study in Children Treated with Decidua Stromal Cells for Acute Graft-versus-Host Disease. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 567210. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.