

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2011.02.28	(73) Titular(es): FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND GMBH ELSE-KROENER-STRASSE 1 61352 BAD HOMBURG	DE
(30) Prioridade(s): 2010.03.02 EP 10425052		
(43) Data de publicação do pedido: 2013.01.09		
(45) Data e BPI da concessão: 2015.08.26 240/2015	(72) Inventor(es): STEFANIA BRUNO MARIA BEATRIZ HERRERA SANCHEZ VALENTINA FONSATO GIOVANNI CAMUSSI CIRO TETTA	IT IT IT IT IT
	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MICROVESÍCULAS (MVS) DERIVADAS DE CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS PARA USO NO TRATAMENTO TERAPÊUTICO DE UMA DOENÇA TUMORAL**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO SITUA-SE NO CAMPO DO TRATAMENTO TERAPÊUTICO DE TUMORES. OS INVENTORES DESCOBRIRAM QUE MICROVESÍCULAS DERIVADAS DE CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS EXERCEM UM ADMIRÁVEL EFEITO ANTI-TUMORAL QUANDO ADMINISTRADOS A UM PACIENTE AFETADO POR UMA DOENÇA TUMORAL. MICROVESÍCULAS PREFERENCIAIS SÃO DERIVADAS DE CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMATOSAS DA MEDULA ÓSSEA, UMA CÉLULA ESTAMINAL MESENQUIMATOSA GLOMERULAR OU UMA CÉLULA ESTAMINAL HEPÁTICA NÃO-OVAL.

RESUMO

"MICROVESÍCULAS (MVS) DERIVADAS DE CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS PARA USO NO TRATAMENTO TERAPÊUTICO DE UMA DOENÇA TUMORAL"

A invenção situa-se no campo do tratamento terapêutico de tumores. Os inventores descobriram que microvesículas derivadas de células estaminais adultas exercem um admirável efeito anti-tumoral quando administrados a um paciente afetado por uma doença tumoral. Microvesículas preferenciais são derivadas de células estaminais mesenquimatosas da medula óssea, uma célula estaminal mesenquimatosa glomerular ou uma célula estaminal hepática não-oval.

DESCRIÇÃO

"MICROVESÍCULAS (MVS) DERIVADAS DE CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS PARA USO NO TRATAMENTO TERAPÊUTICO DE UMA DOENÇA TUMORAL"

A presente invenção relaciona-se com o tratamento terapêutico de uma doença tumoral.

O transplante de células estaminais hematopoiéticas é conhecido por exercer efeitos inibitórios-tumorais em pacientes com tumores sólidos, assim como efeitos anti-tumorais em cancros metastizados da mama, fígado, ovários, próstata e pâncreas.

Células estaminais mesenquimatosas da medula óssea humana (BM-MSCs) foram demonstradas contribuírem para a reparação de uma grande variedade de órgãos e reparação de tecidos e estudos experimentais sugeriram que o transplante de MSCs possa ter um efeito benéfico na recuperação funcional e estrutural em vários órgãos incluindo coração, fígado e rim.

O microambiente das células estaminais aparenta desempenhar um papel essencial na prevenção de carcinogénese através do fornecimento de sinais para inibir a proliferação e promover a diferenciação.

Contudo, o uso de células estaminais em indicações terapêuticas é menos aconselhável dado que um risco tumorigénico potencial foi reportado relativamente a terapia com células estaminais (Amariglio N et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell

transplantation in an ataxia telangiectasia patient. PLoS Med. 2009 Feb 17;6(2))

Microvesículas (MVs) derivadas de células são pequenos vesículos libertados pelas células que expressam os antígenos característicos das células das quais são originárias e possuem membrana e constituintes citoplasmáticos e foram descritos como um novo mecanismo de comunicação celular. Recentemente, os presentes inventores demonstraram que microvesículas derivadas de células progenitoras endoteliais humanas (EPCs), BM-MSCs e células estaminais hepáticas (fígado) podem servir como veículos para a transferência de material genético (mRNA) que pode reprogramar células-alvo diferenciadas, como células endoteliais, células epiteliais tubulares e hepatócitos (Deregibus MC et al. Endothelial progenitor cell derived microvesículas activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. Blood. 2007 Oct 1;110(7):2440-8; Bruno S et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesículas protect against acute tubular injury. J Am Soc Nephrol. 2009 May;20(5):1053-67; Herrera MB et al. Human liver stem cell-derived microvesículas accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. J Cell Mol Med. 2009 Jul 24) e contribuir para a regeneração e reparação de tecidos.

O pedido de patente internacional WO2009/087361 divulga a produção de células diferenciadas através da aplicação de um indutor a uma primeira população de células indiferenciadas e depois o isolamento de microvesículas de células diferenciadas. Ver, a esse respeito, o primeiro parágrafo da página 30 da patente WO2009/087361. A primeira população de células indiferenciadas é p.ex., células

estaminais mesenquimatosas da medula óssea. Contudo, WO2009/087361 não divulga como se procede para a obtenção de microvesículas diretamente de células indiferenciadas.

Os presentes inventores descobriram que microvesículas (MVs) derivadas de células estaminais adultas preferencialmente da medula óssea ou células estaminais mesenquimatosas glomerulares ou de células estaminais hepáticas não-ovais, apresentam uma admirável atividade anti-tumoral tanto em *in vitro* como *in vivo*, assim representando uma alternativa vantajosa sob a totalidade das células estaminais correspondentes para o tratamento terapêutico de cancro. A atividade anti-tumoral das microvesículas derivadas de células estaminais de acordo com a presente invenção foi demonstrada *in vitro* através da medição do efeito das microvesículas na proliferação e apoptose de uma variedade de linhas celulares tumorais humanas assim como o seu efeito na formação de estruturas semelhantes a capilares. A atividade anti-tumoral das microvesículas foi também confirmada num modelo de ratinho *in vivo* através da medição do efeito de tratamento com MVs no crescimento do tumor.

As atividades antitumorais observadas das microvesículas derivadas de células estaminais adultas são particularmente inesperadas relativamente ao estado da técnica anterior. Preparações de células estaminais mesenquimatosas (MSCs) são de facto conhecidas por exercerem um efeito regenerador nalguns tecidos. Por exemplo, MSCs derivadas da medula óssea são conhecidas pela promoção natural da hematopoiese através da secreção de um número de moléculas tróficas, incluindo glicoproteínas solúveis da matriz extracelular, citocinas e fatores de crescimento. Adicionalmente, microvesículas derivadas de células estaminais endoteliais

foram demonstrados em WO2009/050742 promoverem a angiogénese e resistência à apoptose, tanto *in vitro* como *in vivo*. Em WO2009/057165, microvesículas derivadas de células estaminais foram demonstrados induzirem regeneração endotelial e epitelial de tecidos ou órgãos danificados.

Em WO2009/10504 microvesículas derivadas de células estaminais são especulativamente referidos como sendo adequados para uso no tratamento de um grande número e uma grande variedade de doenças. Nenhuma evidência experimental, e nenhuma explicação teórica e nenhum método específico para o tratamento de cancro é fornecida.

Assim, um primeiro aspeto da presente invenção é um microvesícula derivada de uma célula estaminal adulta pluripotente ou multipotente para uso no tratamento terapêutico de uma doença tumoral.

Nesta ligação, deverá ser entendido que as microvesículas não são necessariamente derivadas de células estaminais adultas retiradas do mesmo paciente para o qual serão administradas. Em vez disso, eles podem ser derivados de um sujeito diferente, preparados e mantidos na forma de um medicamento e depois administrados a um paciente com sua necessidade relacionada. Esta é a chamada abordagem alogénica.

Numa forma de realização preferencial, a células estaminal adulta é uma célula estaminal mesenquimatosa humana ou uma célula estaminal hepática humana. Uma célula estaminal hepática humana preferida é uma célula estaminal hepática humana não-oval (HLSC) expressando ambos os marcadores de células estaminais mesenquimatosas e embrionárias divulgados em WO 2006/126219. Esta linha

celular encontra-se particularmente caracterizada dado tratar-se de uma linha celular progenitora pluripotente hepática humana não-oval isolada de tecidos adultos que expressa os marcadores celulares hepáticos e que é capaz de se diferenciar em hepatócitos adultos, células produtoras de insulina, células osteogénicas e células epiteliais e preferencialmente expressa marcadores selecionados do grupo consistindo de albumina, α -fetoproteína, CK18, CD44, CD29, CD73, CD146, CD105, CD90 e preferencialmente não expressa marcadores selecionados do grupo consistindo de CD133, CD117, CK19, CD34, citocromo P450.

Noutra forma de realização preferencial, a célula estaminal mesenquimatosa humana é derivada de medula óssea adulta (BM-MS). Noutra forma de realização, a célula estaminal mesenquimatosa humana é derivada de glomérulos descapsulados adultos humanos (Gl-MS), como divulgado no pedido de patente europeia no. 08425708,8. Estas células são adicionalmente caracterizadas pelo facto de serem CD133 negativas, CD146 positivas e CD34 negativas e serem capazes de se diferenciarem em podócitos, células endoteliais e células mesangiais e podem também preferencialmente expressar marcadores selecionados do grupo compreendendo CD24, Pax-2, CD31, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, nanog, musashi, vimentina, nestina e preferencialmente não expressam marcadores selecionados do grupo compreendendo α -SMA, Oct-4, CD45, citoqueratina, CD80, CD86, CD40.

De acordo com uma forma de realização a doença tumoral é selecionada do grupo consistindo de tumor hepático (p.ex., hepatoma), tumor epitelial (p.ex., sarcoma de Kaposi), tumor da mama (p.ex., adenocarcinoma da mama),

tumor do pulmão, tumor da próstata, tumor gástrico, tumor do cólon e tumor dos ovários.

Outro aspecto da presente invenção é o uso de um microvesícula derivada de uma célula estaminal adulta como acima definido, para a preparação de um medicamento para o tratamento terapêutico de uma doença tumoral como acima definida.

Numa forma de realização, o tratamento terapêutico compreende a administração de um ou mais agentes citotóxicos ou citostáticos. Agentes citotóxicos e citostáticos adequados incluem por exemplo Paclitaxel, Lenalidomida, Pomalidomida, Epirubicina, 5FU, Sunitiniba, La-patiniba, Canertiniba, ciclofosfamida, doxorubicina, Lenalidomidena/Dexametasona, Pomalidomida/Dexametasona, Carboplatina, Rapamicina, mitoxantrona, oxaliplatina, docetaxel, vinorelbina, vincristina e qualquer combinação derivada. A administração de uma combinação de doxorubicina e/ou vincristina com MVs derivadas de células estaminais adultas é altamente preferencial, uma vez que tal combinação foi demonstrada exercer um efeito sinérgico (ver figura 13).

A microvesícula é administrada a um paciente com sua necessidade relacionada seja localmente ou sistemicamente. Uma forma de dosagem farmacêutica adequada para administração local e sistêmica é, p.ex., uma forma de dosagem injetável. Por via de exemplo, a microvesícula é administrada por injeção intra-tumoral (i.t.) local num tumor sólido, ou por injeção ou infusão intravenosa (i.v.), ambas no caso de um tumor sólido e no caso de metástase. Uma dose de MV adequada a ser administrada depende de uma diversidade de fatores, mas é geralmente compreendida entre

0,1 a 200 microgramas/kg de peso corporal do recetor, preferencialmente 1-150 microgramas/kg de peso corporal do recetor, ainda mais preferencialmente 3-120 microgramas/kg de peso corporal do recetor.

A expressão "microvesícula (MV) derivada de uma célula estaminal adulta" como aqui usada refere-se a uma partícula membranar que é pelo menos em parte derivada de uma célula estaminal adulta. Por sua vez, o termo "célula estaminal adulta" inclui qualquer célula indiferenciada ou parcialmente indiferenciada que é capaz de proliferar (auto renovação) e diferenciar (plasticidade), assim substituindo células maduras de uma linhagem celular especializada que atingiram o fim do seu ciclo de vida. O termo "célula estaminal adulta" como usado na presente descrição inclui células estaminais possuindo capacidade de auto-renovação ilimitado e plasticidade pluripotente, e células progenitoras com plasticidade pluripotente e, nalgumas circunstâncias, uma capacidade de auto-renovação limitada. As "células estaminais adultas" possuem plasticidade pluripotente ou multipotentem significando que são capazes de se diferenciarem em pelo menos dois, mais preferencialmente três, tipos distintos de células maduras, totalmente diferenciadas.

Dentro do contexto da presente descrição, a expressão "célula estaminal adulta" pretende designa uma célula estaminal que é isolada de um tecido adulto, em contraste com uma "célula estaminal embrionária" que é isolada da massa celular interna de um blastocisto. As células estaminais adultas são também conhecidas por células somáticas.

Dentro do contexto da presente descrição, a expressão "microvesículas (MVs) derivadas de uma célula estaminal adulta" pretende mostrar que as microvesículas são diretamente derivados de células estaminais indiferenciadas.

Dentro do contexto da presente invenção, a expressão "diretamente" significa que as microvesículas são derivadas de células estaminais adultas indiferenciadas sem qualquer passo de diferenciação a ser realizado ou a ter lugar antes da obtenção dos microvesículas.

As microvesículas derivadas de células estaminais adultas usadas na presente invenção são geralmente esferoides em forma e possuem um diâmetro que se encontra na gama de 100 nm a 5 μ m, mais tipicamente entre 0,2 e 1 μ m. Se a partícula não é esferoide em forma, os valores acima mencionados devem referir-se à maior dimensão da partícula.

As células estaminais a partir das quais as microvesículas usadas nesta invenção são obtidas podem ser isoladas como descrito na secção experimental da descrição. As microvesículas (MVs) podem então ser obtidas a partir dos sobrenadantes das células estaminais isoladas, p.ex., por ultracentrifugação como descrito na secção experimental da descrição. As MVs isoladas podem então ser armazenadas até uso por congelamento até temperaturas muito baixas, p.ex., a -80°C , numa suspensão com um ou mais agentes crioprotetores. Agentes crioprotetores adequados são, p.ex., dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol. O uso de DMSO a uma concentração de 1% do volume da suspensão celular garante boa preservação das células e um efeito tóxico limitado em paciente re-infundidos. Outras substâncias que podem ser mencionadas como agentes crioprotetores são agentes de crioproteção extracelulares, que são o mesmo que

dizer substâncias de elevado peso molecular atuando na superfície celular através da formação uma barreira sólida que reduz a desidratação intracelular.

Outros objetos e vantagens da invenção tornar-se-ão mais claros dos seguintes exemplos, que são fornecidos por via de ilustrações apenas. Nos exemplos, referência é feita às seguintes figuras:

As Figuras 1A e 1B mostram que a incubação de células HepG2 (Figura 1A) e células KS (Figura 1B) com diferentes doses de microvesículas (MVs) significativamente inibe a proliferação quando comparada com as células de controlo incubadas com veículos sozinhos. A proliferação de células HEPG2 e KS foi avaliada pelo ensaio de incorporação de BrdU 48 horas após a incubação com diferentes doses de MVs (1, 10 e 30 mg/ml) a partir de BM-MSCs ou a partir de GlMSCs pré-tratadas ou não com RNase. Os resultados são expressos como uma média +/- DP de 3 experiências.

As Figuras 2A e 2B mostram que a incubação de células HEPG2 e células KS com MVs promove significativamente a apoptose quando comparada com o controlo incubado com o veículo sozinho e do mesmo modo com estimulação via doxorubicina. A apoptose de células HEPG2 e células KS foi avaliada pelo ensaio TUNEL como a percentagem de células apoptóticas após 24 horas e/ou 48 horas de incubação com diferentes doses de MVs provenientes de BM-MSC (pré-tratadas ou não com RNase) ou Gl-MSC. Os resultados são expressos como a média +/- DP de 3 experiências.

As Figuras 3A e 3B mostram que a incubação de células MCF-7 (Figura 3A) e células SKOV-3 (Figura 3B) com 30 mg/ml de MVs de BM-MSCs durante 48 horas

significativamente inibe a proliferação quando comparado com células de controlo incubadas com o veículo sozinho. A proliferação de células MCF7 e SKOV-3 foi avaliada pelo ensaio de incorporação BrdU 48 horas após a incubação com 30 mg/ml de MVs provenientes de BM-MSCs ou de Gl-MSCs. Os resultados são expressos como a média +/- DP de 3 experiências.

A Figura 4 mostra que MVs de BM-MSCs induzem um aumento de células na fase G0/G1, especialmente em células SKOV-3. O conteúdo de DNA foi medido em células SKOV-3 cultivadas com 10% FCS, privadas de FCS (inaninação) e na presença de 30 mg/ml de MVs durante 24 horas. Um aumento no número de células na fase G0/G1 na presença de MVs é observado.

As Figuras 5A and 5B mostram os resultados de experiências realizadas para avaliar o efeito de MVs na angiogénese *in vitro*. A capacidade de HUVECs e TECs para formar estruturas semelhantes a capilares com Matrigel foi avaliada.

A Figura 6 mostra os resultados de experiências realizadas para avaliar o efeito de MVs na apoptose *in vitro*. A apoptose de HUVECs e TECs foi avaliada pelo ensaio TUNEL como a percentagem de células apoptóticas 48 horas após a incubação com diferentes doses de MVs.

A Figura 7 mostra os resultados de experiências realizadas para avaliar o efeito de MVs na proliferação de TECs. A proliferação de TECs foi avaliada pelo ensaio de incorporação de BrdU 48 horas após a incubação com diferentes doses de MVs (10 e 30 mg/ml) provenientes de BM-MSCs pré-tratados ou não com RNase. Os resultados são expressos como média +/- DP de 2 experiências.

A Figura 8 mostra a atividade anti-tumoral *in vivo* de MVs, tratados ou não com RNase, administrados por via intra-tumoral em ratinhos SCID transplantados com xenoenxertos HepG2. A massa tumoral foi determinada por medição com compasso de dois diâmetros perpendiculares do implante em cada semana. Os resultados estão representados como a percentagem de aumento da massa tumoral: a massa tumoral no primeiro tratamento (1 semana após injeção HepG2) é fixa por convenção como correspondendo a um valor de 100%.

A Figura 9 mostra que MVs derivadas de BM-MSCs reduzem o crescimento tumoral *in vivo*. A) Exemplos representativos de ratinhos com tumores HepG2 tratados (à direita) ou não (à esquerda) com MVs de BM-MSCs. B) Exemplos representativos de tumores HepG2 excisados tratados (à direita) ou não (à esquerda) com MVs de BM-MSCs. C) Coloração com Hemotoxilina e Eosina de tumor HepG2 tratados (à direita) ou não (à esquerda) com MVs de BM-MSCs.

A Figura 10 mostra que o pré-tratamento de MVs com RNase anula a atividade anti-tumoral de MVs derivadas de NM-MSCs. A) Exemplos representativos de tumores HepG2 excisados tratados com MV-RNase. B) Coloração com Hemotoxilina e Eosina de tumores HepG2 tratados com MV-RNase.

A Figura 11 é um gráfico mostrando os resultados do ensaio de proliferação baseado em BrdU em células HepG2. As células HepG2 foram cultivadas em meio DMEM simples ou suplementado com diferentes doses de MVs derivadas de HLSCs. Após 3 dias, a proliferação de HepG2 foi quantificada usando o ensaio de incorporação BrdU.

A Figura 12 é um gráfico mostrando os resultados do ensaio de apoptose em células HepG2. As células HepG2 foram cultivadas em meio DMEM simples ou suplementado com 10% FCS e suplementado com vincristina (100 ng/ml) ou MV-HLSC (30 mg/ml) ou MV-HLSC (pré-tratados com RNase, 30 mg/ml). A análise foi realizada após 24 horas.

A Figura 13 é um gráfico mostrando os resultados dos ensaios de apoptose em células HepG2 sob condições basais ou células HepG2 tratadas com vincristina, doxorubicina, MV-HLSCs, ou com vincristina + MV-HLSCs e doxorubicina + MV-HLSCs.

A Figura 14 é um gráfico mostrando os dados obtidos pela medição do volume de tumor de tumores HepG2 recuperados após tratamento de MV-HLSC (n=3), veículo (n=2) ou MVHLSC (n=3) com RNase, i.t., tratamento fornecido aquando do sacrifício do ratinho. O volume do tumor foi determinado através da medição com um compasso de dois diâmetros perpendiculares do implante a cada semana.

A Figura 15 mostra micrografias mostrando a inibição *in vivo* do crescimento do tumor após tratamento com HLSC-MV e consequente apoptose intra-tumoral induzida. A) Micrografias representativas mostrando apoptose, coloração PCNA e Hemotoxilina & Eosina de tumores HepG2 recuperados após 4 semanas. B) Micrografias representativas mostrando apoptose, coloração PCNA e Hemotoxilina & Eosina de tumores HepG2 recuperados de ratinhos tratados com MVs. C) Micrografias representativas mostrando apoptose, coloração PCNA e Hemotoxilina & Eosina de tumores HepG2 recuperados de ratinhos tratados com MV-RNase.

A Figura 16 é um gráfico mostrando os resultados dos ensaios de proliferação *in vitro* realizados em células MCF7 incubadas com diferentes concentrações de HLSC-MVs. A proliferação de células MCF-7 foi avaliada por ensaio de incorporação de BrdU 48 horas após a incubação com 2, 10, 15 e 30 mg/ml de MVs derivadas de células HLSC. A experiência foi realizada em triplicado. $P < 0,05$.

A Figura 17 é um gráfico mostrando os resultados dos ensaios de proliferação *in vitro* realizados através da incubação de células de Kaposi (KS) com diferentes concentrações de HLSC-MVs. A proliferação de células Kaposi foi avaliada pelo ensaio de incorporação de BrdU 48 horas após a incubação com 2, 10, 15 e 30 mg/ml de MVs derivadas de células HLSC. A experiência foi realizada em triplicado. $P < 0,05$.

A Figura 18 é um gráfico mostrando os resultados dos ensaios de apoptose *in vitro* realizados através da incubação de células MCF-7 e células Kapsi com HLSC-MVs. A apoptose foi avaliada pelo ensaio TUNEL como a percentagem de células apoptóticas após 48h de incubação com diferentes doses de MVs (2 ; 10; 15; e 30 mg/ml e 30 mg/ml de MVs tratados com RNase). Doxorubicina foi usada como controlo positivo de indução de apoptose. No controlo negativo, células MCF-7 e células de Kaposi foram tratadas com o veículo sozinho. A experiência foi realizada em triplicado. $P < 0,05$.

1. MICROVESÍCULAS (MVs) DE CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMATOSAS (MSCs)

1.1 Isolamento e caracterização de MSCs

Células da medula óssea foram colocadas num gradiente de Ficoll (densidade: 1022 g/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e centrifugadas a 1500 rpm durante 30 minutos. As células mononucleadas foram cultivadas na presença de meio basal para células estaminais mesenquimatosas (MSCBM, Lonza). Após 5 dias de cultura, o meio foi mudado. Para expandir as células isoladas, a monocamada aderente foi destacada por tratamento com tripsina durante 5 minutos a 37° C, no dia 15 para a primeira passagem e a cada 7 dias para passagens subsequentes. As células foram plaqueadas a uma densidade de 10,000 células/cm² e usadas a passagens não superiores à passagem 6.

Populações de MSC de glomérulos (Gl-MSC) foram obtidas da porção normal de córtex de rins cirurgicamente removidos, como descrito em Bruno S et al. Isolation and characterization of resident células estaminais mesenquimatosas in human glomeruli. Stem Cells Dev. 2009;18:867-880. Após dissecação do córtex, a suspensão glomerular foi recolhida usando uma técnica estandardizadamente estabelecida: após passagem através de uma série de redes graduadas (redes de 60 e 120), os glomérulos foram recuperados no topo da rede 120. Os glomérulos foram então recolhidos no fundo de um tubo cônico por precipitação espontânea (10 minutos à temperatura ambiente) e foram privados da camada visceral da cápsula de Bowman tanto mecanicamente, por várias rondas de espiração/expulsão usando uma pipeta de 10 mL, como

enzimaticamente, por digestão de 2 minutos com Colagenase I (Sigma, St. Louis, MO). Os glomérulos foram então recolhidos no fundo de um tubo cónico por precipitação espontânea de forma a remover as células e as cápsulas de Bowman, e foram transferidos para frascos T25 revestidos com fibronectina (Falcon, BD Bioscience, Two Oak Park, Bedford, MA). Os glomérulos foram cultivados na presença de meio para células estaminais mesenquimatosas (MSCBM, Lonza). As células foram mantidas até atingirem confluência antes da sua passagem; o intervalo entre passagens variou (3-7 dias) até à passagem 4, e a partir daí foi estabelecido em redor dos 7 dias.

Em cada passagem, as células foram contadas e analisadas quanto ao seu imunofenótipo por análise citofluorimétrica e imunofluorescência. Análise citofluorimétrica foi realizada com os seguintes anticorpos, todos conjugados de ficoeritrina (PE) ou isocianato de fluoresceína (FITC): anticorpos monoclonais anti-CD105, -CD29, -CD31, -CD 146, -CD44, -CD90 (Dakocytomation, Copenhagen, Denmark); -CD73, -CD34, -CD45, -CD80, -CD86, -CD166, HLA-I (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Jose, CA); -CD133 (Miltenyi Biotec, Auburn); KDR (R&D Systems, Abington, U.K.); -HLA-II (Chemicon International Temecula, CA), -CD40 (Immunotech, Beckman Coulter), -CD154 (Serotec, Raleigh, NC USA). Controlos isotípicos IgG murinos foram utilizados de Dakocytomation. Todas as incubações foram realizadas em 100 mL de tampão fosfato salino (PBS) contendo 0,1% de albumina do soro bovino e 0,1% de azida de sódio, a 4° C. Para cada amostra, 10 000 células foram analisadas num citómetro FACSCalibur (BD Biosciences Pharmingen). O *acoplamento* foi construído com base nos controlos negativos e controlos de compensação foram incluídos em todas as análises realizadas. As

percentagens e números da população foram produzidos por populações combinadas de cada experiência usando o software Cell Quest (BD Biosciences Pharmingen).

A imunofluorescência indireta foi realizada em MSCs cultivadas em *slides* de câmara (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA), ficadas em 4% de paraformaldeído contendo 2% de sacarose e, se necessário, permeabilizadas com tampão Hepes-Triton X 100 (Sigma, St. Louis, MO). Os seguintes anticorpos foram utilizados: anticorpo monoclonal anti-vimentina (Sigma) e anticorpo policlonal anti-fator de vonWillebrand (Dakocytomation). A omissão dos anticorpos primários ou substituição com IgG não-imune de coelho ou ratinho foram usados como controlos quando apropriado. Alexa Fluor 488 anti-coelho e Vermelho de Texas anti-murino (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) foram usados como anticorpos secundários. Análise por microscopia confocal foi realizada usando um microscópio confocal Zeiss LSM 5 Pascal Model (Carl Zeiss International, Germany). O corante Hoechst 33258 (Sigma) foi adicionado para coloração do núcleo.

Preparações BM-MSc e GL-MSc não expressaram marcadores hematopoiéticos tais como CD45, CD14 e CD34. Elas não expressaram moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40) nem os marcadores endoteliais (CD31, fator vonWillebrand, KDR). Todas as preparações de células a diferentes passagens de cultura expressaram os típicos marcadores MSC: CD105, CD73, CD44, CD90, CD166 e CD146. Eles também expressaram HLA Classe I.

As propriedades de diferenciação adipogénicas, osteogénicas e condrogénicas das MSC foram determinadas

como descrito em Pittenger MF, Martin BJ. mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circ. Res 2004;95:9-20. Sucintamente, MSCs foram cultivadas com meio adipogénico (Lonza) durante 3 semanas. Para avaliar a diferenciação, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído durante 20 minutos à temperatura ambiente e coradas com 0,5% de óleo Red O (Sigma) em metanol (Sigma) durante 20 minutos à temperatura ambiente.

A diferenciação osteogénica foi avaliada através da cultura de MSCs em meio osteogénico (Lonza). O meio foi mudado duas vezes por semana durante 3 semanas. Para avaliar a diferenciação, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído durante 20 minutos e coradas com Vermelho de Alizarina, pH 4,1 (Lonza) durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Para a diferenciação condrogénica, $2,5 \times 10^5$ MSCs foram centrifugados num tubo cónico de propileno de 15 mL (Falcon BD Bioscience) a 150g durante 5 minutos e lavadas duas vezes com DMEM. Os *pellets* foram cultivados em meio condrogénico (Lonza) suplementado com 10 ng/mL de Fator de Crescimento Transformante $\beta 3$ (Lonza). O meio foi mudado a cada 3 dias durante 28 dias. Os *pellets* foram fixados com 4% de paraformaldeído *overnight*, e as secções embebidas em parafina foram coradas para glucosaminoglicanos usando 0,1% safranina O (Sigma) e para proteoglicanos sulfatados usando 1% de azul de Alcian.

1,2 Isolamento e caracterização de MVs derivadas de MSCs

As microvesículas (MVs) foram obtidos de sobrenadantes de BM-MSCs ou GL-MSCs obtidos como acima descrito e cultivados em RPMI privado de FCS e suplementado com 0,5% de BSA (Sigma). Após centrifugação a 2000 g durante 20 minutos para remover o *debris*, sobrenadantes livres de células foram centrifugados a 100 000g (Beckman Coulter Optima L-90K ultracentrifuge) durante 1 hora a 4 °C, lavados com meio desprovido de soro 199 contendo ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico (HEPES) 25mM (Sigma) e sujeitos a uma segunda ultra-centrifugação sob as mesmas condições. A contaminação de MVs por endotoxinas foi excluída pelo teste de Limulus de acordo com as instruções do fabricante (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA, USA) e as MVs foram armazenados a -80°C.

Em experiências selecionadas, MVs foram tratado com 1U/ml RNase (Ambion Inc., Austin, TX, USA) durante 1 hora a 37°C, a reação foi terminada pela adição de 10 U/ml de inibidor de RNase (Ambion Inc.) e as MVs foram lavadas por ultracentrifugação.

1.3 Experiências *In vitro* realizadas com MVs derivadas de MSCs

Cultura de linhas celulares tumorais. A linha celular tumoral hepática humana (HepG2), a linha celular do adenocarcinoma da mama humano (MCF-7) e a linha celular do cancro do ovário humano (SKOV-3) foram cultivadas em meio DMEM com baixo teor de glucose suplementado com soro fetal bovino (FCS, Euroclone), 100U/ml penicilina, 100mg/ml

estreptomicina e 1% glutamina (todos da Sigma) e mantidas numa incubadora com uma atmosfera humidificada de CO₂ 5% a 37°C. Uma cultura primária de células do sarcoma de Kaposi (células KS) foi obtida de uma lesão cutânea de um paciente transplantado com um aloenxerto renal com terapia imunossupressiva e cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FCS, 100 mg/ml penicilina, e 100 mg/ml estreptomicina.

Células endoteliais tumorais (TECs): isolamento e cultura.

TECs foram isoladas de espécimes de carcinomas celulares renais usando Anticorpo anti-CD105 acoplado a contas magnéticas por separação celular magnética usando o sistema MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). As linhas celulares TEC foram estabelecidas e mantidas em cultura em meio completo basal endotelial (EBM) suplementado com fator de crescimento epidérmico (10 ng/ml), hidrocortisona (1 mg/ml), extrato de cérebro bovino (todos da Lonza) e 10% FCS. As TECs foram caracterizadas como células endoteliais por morfologia, coloração positiva para o antigénio vWF, CD105, CD146, e caderina endotelial vascular e coloração negativa para citoqueratina e desmina (Bussolati B et al. Altered Angiogenesis and survival in endothelial cells derived from renal carcinoma. FASEB J 2003;17:1159-1161).

Células Endoteliais do Cordão Umbilical Humano (HUVECs):

Isolamento e cultura. Células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVECs) foram obtidas a partir do cordão umbilical, como previamente descrito (Bussolati B et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated Angiogenesis via nitric oxide. Am J Pathol. 2001Sep;159(3):993-1008) e mantidas em EBM e 10% de FCS.

As experiências foram realizadas em HUVECs da segunda ou terceira passagem.

Proliferação Celular. Células HepG2, MCF-7, SKOV-3, KS ou HUVECs foram plaqueadas a 2 000 ou 4 000 células/poço em microplacas de 96-poços com DMEM (Sigma) privado de FCS com diferentes concentrações de microvesículas pré-tratadas ou não com RNase. A síntese de DNA foi detetada através da incorporação de 5-bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU) no DNA celular após 48 horas de cultura. As células foram então fixadas com 0,5 M etanol/HCl e incubadas com nucleasse para digerir o DNA. A incorporação de BrdU no DNA foi detetada usando um anticorpo murino anti-BrdU conjugado a peroxidase e visualizado com um substrato cromogénico solúvel (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). A densidade ótica foi medida com um leitor ELISA a 405 nm.

Análise do ciclo celular. Linhas celulares tumorais humanas foram estimuladas durante 24 horas com 30 mg/ml de diferentes preparações de MVs, destacadas por tripsina e fixadas em etanol 80% a baixa temperatura. As células foram mantidas durante pelo menos 24 horas a 20° C e depois lavadas com PBS. Depois, as células foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com iodeto de propídio (50 mg/ml) (Sigma) para corar o DNA numa solução contendo RNase (200 mg/ml) (Sigma) e 0,5% de Nonidet P40 (Sigma). Para cada amostra, 50 000 células foram analisadas num citómetro FACSCalibur (BD Biosciences Pharmingen).

Ensaio apoptótico. Células HepG2, MCF-7, SKOV-3, KS, HUVECs ou TECs foram plaqueadas a 8 000 células/poço em microplacas de 96-poços com DMEM (Sigma) suplementado com

10% FCS e na presença de doxorubicina (100 ng/ml, Sigma) ou diferentes concentrações de MVs (10 and 30 mg/ml) pré-tratadas ou não com RNase. A apoptose foi avaliada pelo ensaio TUNEL (ApopTag Oncor, Gaithersburg, MD, USA). Após 24 ou 48 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS, fixadas em 1% de paraformaldeído pH 7,4 durante 15 minutos a 4°C, lavadas duas vezes em PBS e depois fixadas em mistura etanol:ácido acético (2:1) durante 5 minutos a -20°C. As amostras foram tratadas com a Desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT). As células foram então tratadas com conjugado anti-digoxigenina com fluoresceína e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram montadas em meio contendo 1 mg/ml de iodeto de propídio e as células analisadas por imunofluorescência. Os resultados são expressas como a percentagem de células emitindo fluorescência no comprimento de onda do verde (células apoptóticas) *versus* células emitindo fluorescência no comprimento de onda do vermelho (células totais).

Angiogénese *in vitro*. Microplacas de 24-poços foram revestidas com Matrigel com fator de crescimento reduzido (BD Biosciences) a 4°C e incubadas durante 30 minutos a 37°C, 5% CO₂, numa atmosfera humidificada. HUVECs ou TECs foram plaqueadas nos poços revestidos com Matrigel em RPMI ou EBM com 5% FCS à densidade de 5×10^4 células/poço, na presença ou na ausência de diferentes concentrações de MVs tratados ou não com RNase. Após 6 horas de incubação, as células foram observadas sob um microscópio invertido Nikon (Nikon) e os resultados experimentais foram registados. Os resultados foram expressos como a média do comprimento do tubo, como medida pelo sistema de análise MicroImage (Cast Imaging), expressa em unidades arbitrárias e avaliada em 5

diferentes campos a uma magnificação de 20X com poços em duplicado de 3 diferentes experiências.

Análise estatística. Todos os dados de diferentes procedimentos experimentais são expressos como a média +/- DP. A análise estatística foi realizada por ANOVA com um teste multi-comparativo Newmann-Keuls quando apropriado.

1.4 Resultados *In vitro*

1.4.1 Efeitos biológicos *In vitro* de MVs derivadas de BM-MSCs e Gl-MSCs em linhas celulares tumorais

A atividade anti-tumoral de MVs derivadas de BM-MSCs humanas, foi avaliada *in vitro* através da medição da sua capacidades para inibir proliferação e para induzir apoptose nas linhas celulares HepG2, MCF-7, SKOV-3 e KS.

A Figura 1 mostra que a incubação de células HepG2 (Figura 1A) e células KS (Figura 1B) com diferentes doses de MVs durante 48 horas significativamente inibiu a proliferação quando comparada com células de controlo incubadas com o veículo sozinho.

A Figura 2 mostra que a incubação de células HepG2 (Figura 2A) com MVs durante 24 e 48 horas significativamente promoveu a apoptose quando comparada com células de controlo incubadas com o veículo sozinho e da mesma forma com estimulação via doxorubicina.

Quando as MVs foram incubadas com RNase para induzir degradação completa do RNA transportado, os efeitos anti-

proliferativos e pro-apoptóticos promovidos por MVs em células HepG2 e KS eram reduzidos (Figuras 1 e 2). O tratamento de MVs com RNase não interferiu *per se* com a apoptose da linha celular tumoral induzida por doxorubicina (Figura 2).

Pelo contrário, a incubação de células MCF-7 e células SKOV-3 com 30 mg/ml de MVs provenientes de BM-MSCs durante 48 horas significativamente inibiu a proliferação quando comparado com células de controlo incubadas com o veículo sozinho (Figura 3A e 3B), mas não promoveu a apoptose. Nessas duas linhas celulares tumorais os inventores também estudaram o ciclo celular pela técnica de coloração com iodeto de propídio, de forma a avaliar a percentagem de células na fase G0/G1 em comparação com as células nas fases S e G2. Os inventores também observaram que MVs provenientes de BM-MSCs induziam um aumento de células na fase G0/G1, especialmente nas células SKOV-3 (Figura 4), o que pode explicar a inibição da proliferação observada pela incorporação de BrdU.

Os inventores também testaram os efeitos de MVs derivadas de Gl-MSCs na proliferação e apoptose de linhas celulares tumorais. Gl-MSCs não afetaram a proliferação e a apoptose na linha celular HepG2. Pelo contrário, MVs derivadas de Gl-MSCs inibiram a proliferação e induziram a apoptose de células KS (Figuras 1 e 2). Adicionalmente, a incubação de células MCF-7 e SKOV-3 com 30 mg/ml de MVs derivadas de Gl-MSCs durante 48 horas inibiu a proliferação quando comparado com células de controlo incubadas com o veículo sozinho (Figura 3), mas não promoveu apoptose.

1.4.2 MVs derivadas de fibroblastos humanos

MVs derivadas de fibroblastos humanos não inibiram a proliferação e não induziram apoptose nas diferentes linhas celulares tumorais (dados não mostrados).

1.4.3 Efeitos *In vitro* de MVs derivadas de BM-MSCs em células endoteliais

Os inventores também estudaram os efeitos *in vitro* de MVs derivadas de BM-MSCs na proliferação, apoptose e formação de estruturas semelhantes a capilares de HUVECs e células endoteliais tumorais (TECs).

O tratamento com MV não afetou a proliferação (dados não mostrados) e a capacidade de formação de estruturas semelhantes a capilares de HUVECs (Figura 5A). Adicionalmente, a incubação de HUVECs com diferentes doses de MVs durante 48 horas não induziu apoptose (Figura 6).

Em contraste, a incubação de TECs com diferentes doses de MVs durante 48 horas, significativamente inibiu a proliferação (Figura 7) e promoveu a apoptose (Figura 6) comparativamente às células de controlo incubadas com o veículo sozinho. A proliferação de TECs foi avaliada pelo ensaio de incorporação de BrdU após 48 horas de incubação com diferentes doses de MVs (10 e 30 mg/ml) de BM-MSCs pré-tratadas ou não com RNase. Os resultados na Figura 7 são expressos como a média +/- DP de 2 experiências.

Quando as MVs foram incubadas com RNase, o efeito apoptótico promovido por MVs em TECs foi significativamente reduzido. A incubação de TECs plaqueados em Matrigel com diferentes de MVs significativamente inibiu a capacidade de TECs de formarem estruturas semelhantes a capilares *in vitro*. Pré-tratamento de MVs com RNase anulou o efeito inibitório em MVs na formação de túbulos (Figura 5B).

1.5 Experiências *In vivo* com MVs derivadas de MSCs

Formação de Tumores. Células 3×10^6 HepG2 foram recolhidas e implantadas subcutaneamente em ratinhos SCID (Charles River, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). As células cultivadas, recolhidas usando tripsina-EDTA, foram lavadas com PBS, contadas numa câmara de microcitómetro e ressuspensas em 100 mL de DMEM e 100 mL de Matriz Matrigel (Becton Dickinson). As células foram colocadas em gelo, e injetadas subcutaneamente no lado esquerdo do dorso de ratinhos SCID via uma agulha de calibre 26 usando uma seringa de 1mL. Os animais foram monitorizados diariamente para a sua atividade e condições físicas, e a determinação do peso corporal e a medição da massa tumoral foi feita a cada 3 dias. A massa tumoral foi determinada por medição com compasso em dois diâmetros perpendiculares do implante e calculada usando a fórmula $1/2a \times b^2$, onde a é o diâmetro longo e b o diâmetro curto (Hou J et al. Experimental therapy of hepatoma with artemisin and its derivatives: *in vitro* and *in vivo* activity, chemosensitization and mechanism of action. Clin Cancer Research. 2008;14:5519-5530)). Após 1 semana, quando os tumores implantados alcançaram o volume de aproximadamente 15 mm³, os inventores começaram a injeção intra-tumoral semanal de MVs. O primeiro tratamento foi com 100 mg de MVs (tratados

ou não com RNase) para um volume máximo de 20 mL. Nos ratinhos de controlo, os inventores injetaram através de via intra-tumoral o mesmo volume de veículo sozinho. Os ratinhos foram randomizados em três grupos de tratamento: a) o grupo injetado intra-tumoralmente com MVs (n=8); b) o grupo injetado intra-tumoralmente com MVs tratados com RNase (n=8); e c) o grupo de controlo injetado com o mesmo volume de veículo sozinho (n=5). Após três semanas com injeção de Matrigel, os ratinhos foram sacrificados e os tumores recuperados e processados para histologia.

1.6 Resultados *In vivo*

1.6.1 Efeitos biológicos *In vivo* de MVs derivadas de BM-MSCs no crescimento de tumores HEPG2

A formação e crescimento de tumor são inibidos por MVs derivadas de BM-MSCs em ratinhos SCID. Para determinar o efeito de MVs derivadas de BM-MSCs na formação e crescimento de tumores *in vivo*, ratinhos SCID foram injetados subcutaneamente com HepG2 na presença de Matrigel. Uma semana após a injeção, quando o volume dos tumores foi de aproximadamente 15 mm³, os inventores começaram a injeção intra-tumoral semanal de ratinhos com MVs (tratados ou não com RNase), com um volume máximo de 20 mL. O primeiro tratamento foi com 100 mg de MVs; as injeções intra-tumorais subsequentes foram de 50 mg de MVs. Nos ratinhos de controlo, os inventores injetaram intra-tumoralmente 20 ml do veículo sozinho.

Após três semanas da injeção de Matrigel, todos os tumores foram recuperados e analisados. No modelo de xenoenxerto HepG2, a injeção intra-tumoral de MVs mostrou um efeito inibitório no crescimento tumoral (Figura 8). O tamanho e o

volume do tumor foram significativamente reduzidos em ratinhos SCID tratados com MVs (Figura 9A e 9B) e as análises histológicas mostraram área de necrose em tumores HepG2 tratados com MVs (Figura 9C). Tumores injetados com MVs pré-tratados com RNase não diferiram em tamanho e histologia dos tumores de controle (Figura 10A e 10B).

2. MICROVESÍCULAS (MVs) DE CÉLULAS HEPÁTICAS ESTAMINAIS

2.1 Isolamento e caracterização de células estaminais hepáticas adultas humanas (HLSCs)

HLSCs foram isolados de hepatócitos criopreservados normais obtidos de Cambrex Bio Science Verviers S.p.r.l. (Verviers, Belgium) cultivados em meio mínimo essencial/meio-1 basal para células endoteliais (α -MEM/EBM) (3:1) (Gibco/Cambrex) suplementado com L-glutamina (5 μ M), Hepes (12 μ M, pH 7,4), penicilina (50 IU/ml), estreptomicina (50 mg/ml) (todos de Sigma, St. Louis), FCS (10%). As células expandidas foram transferidas para um frasco T75 e analisadas quando atingiram a confluência.

A linha celular hepática HepG2 foi cultivada em meio Dulbecco's modified Eagle (DMEM) (baixo teor de glucose) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS).

2.2 Isolamento de MVs derivadas de HLSCs

MVs foram obtidos de sobrenadantes de HLSCs cultivados em MEMalfa suplementado com 2% de soro fetal bovino (FBS). A

viabilidade de células incubadas *overnight* com soro foi detetada por exclusão de azul de tripano. Após centrifugação a 2000 g durante 20 minutos para remover o *debris*, sobrenadantes desprovidos de células foram centrifugados a 100 000g (ultra-centrífuga Beckman Coulter Optima L-90K) durante 1h a 4 °C, lavados com meio desprovido de soro 199 contendo ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 25mM (Sigma) e sujeito a uma segunda ultra-centrifugação nas mesmas condições. Para seguir, *in vitro* e *in vivo*, MVs por microcopia de fluorescência ou análise FACS, MVs de células estaminais foram marcados com o cromóforo alifático intercalador de bicamadas lipídicas PKH26 (emissão de fluorescência no vermelho, Sigma). Após marcação, as MVs foram lavados e ultracentrifugados a 100 000 G durante 1h a 4 °C. Os pellets de MVs foram ressuspensos em meio 199, e o conteúdo proteico foi quantificado pelo método de Bradford (BioRad, Hercules, CA). A contaminação por endotoxinas das MVs foi excluída através do teste de Limulus de acordo com as instruções do fabricante (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA), e as MVs foram armazenados a -80 °C. A análise morfológica realizada na suspensão MV após a coloração com iodeto de propídio não mostrou a presença de corpos apoptóticos.

Em experiências selecionadas, MVs de HLSCs foram tratados com 1 U/ml RNase (Ambion Inc., Austin, TX) durante 1 h a 37 °C, a reação foi terminada pela adição de 10 U/ml do inibidor de RNase (Ambion Inc.) e MVs foram lavados por ultracentrifugação. A eficácia do tratamento por RNase foi avaliada após extração de RNA usando o reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) por análise

espectrofotométrica do RNA total extraído (MV's não-tratados por RNase: 1,3 +/- 0,2 mg RNA/mg proteína; MV's tratados por RNase: <0,2 mg RNA/mg proteína). Adicionalmente, o RNA extraído de MV's tratados e não-tratados com RNase foi marcado pelo marcador oligo dT de retro-transcrição e analisado num gel de agarose 0,6% para mostrar a degradação completa de RNA pelo tratamento com RNase. Como controlo, MV's foram tratados com 1 U/ml DNase (Ambion Inc.) durante 1h a 37 °C.

2.3 Experiências *In vitro* realizadas com MV's isoladas de HLSCs

Ensaio de proliferação. A síntese de DNA foi detetada através da incorporação de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) no DNA celular usando um kit de ensaio imunoabsorvente acoplado a enzima (Chemicon, Temecula, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, após lavagem, as células foram incubadas com 10 mol/l BrdU durante 6 a 12 horas a 37°C, 5% CO₂, numa atmosfera humidificada, fixadas com 0,5 mol/L etanol/HCl e incubadas com nucleasse para digerir o DNA. BrdU incorporado no DNA foi detetado usando um anticorpo monoclonal anti-BrdU conjugado a peroxidase e visualizado com um substrato cromogénico solúvel. A densidade ótica foi medida com um leitor de ensaio imunoabsorvente acoplado a enzima a um comprimento de onda de 405 nm.

Ensaio de apoptose. A apoptose foi avaliada usando o ensaio de marcação de terminal com dUTP (ApoTag; Oncor, Gaithersburg, MD). Células (8x10³/poço) foram cultivadas em microplacas de 96-poços, ressuspensas em tampão fosfato

salino (PBS) e fixadas em 1% de paraformaldeído em PBS, pH 7,4, durante 15 minutos a 4°C seguida pela adição de mistura etanol/ácido acético (2:1) durante 5 minutos a -20°C. As células foram tratadas com enzima desoxinucleotidil-transferase-terminal e incubada numa câmara humidificada durante 1 hora a 37°C e depois tratada com anti-digoxigenina conjugada a isocianato de fluoresceína durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem, as amostras foram montadas num meio contendo 1 g/ml de iodeto de propídio e as células foram analisadas por imunofluorescência.

Análise estatística. Todos os dados de diferentes procedimentos experimentais são expressos como a média +/- DP. A análise estatística foi realizada por ANOVA com teste multi-comparativo de Newmann-Keuls quando necessário.

2.4 Resultados *In vitro*

2.4.1 Efeitos de MVs derivadas de HLSCs na proliferação da linha celular hepática tumoral HepG2

Os inventores avaliaram os efeitos de MVs derivadas de HLSCs na proliferação de HepG2. Sucintamente, células HepG2 foram incubadas com diferentes doses (10, 20 e 30 mg/ml) de MVs derivadas de HLSCs tratados ou não-tratados com RNase durante 3 dias. No final da incubação, as culturas HepG2 foram contadas ou fixadas em 0,5 M etanol/HCl e incubadas com nucleasse para digerir o DNA. O BrdU incorporado no DNA foi detetado usando um anticorpo murino anti-BrdU conjugado a peroxidase e visualizado com um substrato cromogénico solúvel. A densidade ótica foi medida com um leitor ELISA a

405 nm. Como mostrado na Figura 11, MVs derivadas de HLSCs são capazes de inibir significativamente a proliferação de HepG2. Isto também se aplica da MVs tratados com RNase.

2.4.2 Efeitos de MVs derivadas de HLSCs na apoptose da linha celular hepática tumoral HepG2

A capacidade de MVs derivadas de HLSCs para induzirem apoptose em HepG2 foi avaliada. Sucintamente, HepG2 foram plaqueadas a uma densidade de 8 000 células/poço em microplacas de 96-poços em DMEM com 10% FCS e a apoptose foi induzida por cultura na ausência de FCS, por tratamento com vincristina (100 ng/ml) ou doxorubicina (50 ng/ml), dois inibidores mitóticos usados na quimioterapia de cancro, ou por tratamento com MV (30 mg/ml). Como controlo, MVs foram também tratadas com 1 U/ml RNase18 (Ambion, Austin, TX) durante 1 hora a 37°C para avaliar se a contribuição para a inibição do crescimento de células tumorais é dependente de uma transferência horizontal de mRNA entregue por MVs para as células tumorais. A apoptose foi avaliada usando uma análise com ensaio TUNEL às 24 e 72 horas. Como mostrado na Figura 12, MVs derivadas de HLSCs foram capazes de induzir a apoptose em HepG2 comparável aquela induzida por vincristina. Pelo contrário, o tratamento com RNase falhou na indução de apoptose. Adicionalmente, o tratamento de HepG2 com vincristina + MV-HLSCs ou doxorubicina + MV-HLSCs resulta num efeito aditivo como mostrado na Figura 13.

2.5 Experiências *In vivo* realizadas com MVs isoladas de HLSCs

Cultura de células. Células da linha celular hepática tumoral HepG2, foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 mg/ml penicilina, e 100 mg/ml estreptomicina e mantidas numa incubadora com atmosfera humidificada de 5% CO₂ a 37°C.

Células estaminais hepáticas humanas (HLSCs) foram cultivadas em α -MEM/EBM (3:1), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 mg/ml penicilina, e 100 mg/ml estreptomicina. EBM foi reconstituído com hEGF (fator de crescimento epitelial humano), hidrocortisona, GA (gentamicina), BBE (extracto de cérebro bovino).

Isolamento de microvesículas (MVs) de HLSCs. MVs foram obtidos de sobrenadantes de HLSCs cultivados em meio α -MEM suplementado com 25 de soro fetal bovino. Após centrifugação a 2000 g durante 20 minutos para remover o *debris*, sobrenadantes desprovidos de células foram centrifugados a 100 000g durante 1 hora a 4°C, lavados com meio desprovido de soro 199 contendo ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 25mM e submetidos a uma segunda ultra-centrifugação nas mesmas condições. Os pellets de MVs foram ressuspensos em meio 199 em 0,1% de DMSO e o conteúdo proteico foi quantificado pelo método de Bradford.

Design experimental. Ratinhos SCID macho de 4 a 5 meses de idade foram obtidos dos laboratórios Charles River. Todos os ratinhos foram colocados em instalações limpas e mantidos durante 1 semana para aclimatização. No dia 0, duas injeções de 3×10^6 células tumorais HepG2 ressuspensas

em meio DMEM desprovido de soro com matriz Matrigel a um rácio 1:1 foram aplicados. A suspensão celular foi injetada num volume total de 0,2 mL na área inguinal esquerda dos ratinhos SCID. Todos os ratinhos foram randomizados em três grupos de tratamento: 20 µl de injeção de MV intratumoral (i.t.) (n = 3); 20 µl de injeção de PBS i.t. (n=2) e 20 µl de injeção de MV tratados com RNase (n=3). No dia 7 pós-tumor, o tratamento de transplante celular foi iniciado. Os tumores tornaram-se palpáveis a partir do dia 7; 50 ou 100 mg de MV, ressuspenso em M199 suplementado com 0,1% de DMSO, foram injetados 7, 12, 14 e 18 dias após o transplante do tumor. O tratamento iniciou-se quando os tumores atingiram um volume de aproximadamente 15 mm³. Os animais foram monitorizados para a sua atividade e condição física todos os dias, e a determinação do peso corporal e medição da massa tumoral foram feitos a cada 3 dias.

Os tumores foram medidos com compassos. A massa tumoral foi determinada por compasso, com a medição de dois diâmetros perpendiculares do implante e calculada usando a $1/2a \times b^2$, onde a é o diâmetro longo b é o diâmetro curto. Os animais foram sacrificados no dia 28, e os tumores foram recolhidos para análise posterior.

Estudos morfológicos. Os tumores foram fixados em formalina neutral 10% tamponizada, rotineiramente processada, embebidos em parafina, seccionados a 5 µm, e corados com H&E para examinação microscópica. A imunohistoquímica para a deteção da proliferação foi realizada usando o anticorpo monoclonal anti-PCNA. As secções foram bloqueadas e marcadas com o anticorpo secundário HRP anti-murino (diluição 1:300). Omissão dos anticorpos primários ou substituição com IgG não-imune

murina foi usada como controlo. A apoptose foi avaliada em secções de tumor embebidas em parafina por análise TUNEL. 10 secções não-consecutivas foram contadas para células tumorais apoptóticas-positivas a uma magnificação de 630X. O corante Hoechst 33258 foi adicionado para marcação nuclear.

Análise estatística. Todos os dados dos diferentes procedimentos experimentais são expressos como média \pm DP. A análise estatística foi realizada por ANOVA com Teste multi-comparativo Newmann-Keuls quando apropriado.

2.6 Resultados In vivo

2.6.1 Crescimento e proliferação tumoral foram inibidos por MVs derivadas de HLSCs num modelo de xenoenxerto de hepatoma em ratinhos SCID

Para determinar o efeito de MVs derivadas de HLSC no crescimento do tumor *in vivo*, ratinhos SCID foram subcutaneamente transplantados com a linha celular do hepatocarcinoma HepG2. Uma e duas semanas após a injeção de HepG2, quando o volume dos tumores era de cerca de 15 mm³, os ratinhos foram tratados com injeção intra-tumoral de MVs (50 ou 100 mg), para um máximo de 20 ml de volume. Nos ratinhos de controlo, os tumores foram injetados com 20 ml de veículo sozinho. Após três e quatro semanas da injeção de HepG2, todos os tumores foram recuperados e analisados. Neste modelo de xenoenxerto, a injeção intra-tumoral de MVs (Figura 14) mostrou um efeito inibitório no

crescimento tumoral. Adicionalmente, análises histológicas mostraram áreas de necrose em tumores tratados com MVs (Figura 15B) e um efeito anti-proliferativo foi observado usando coloração PCNA (Figura 15B).

2.6.2 Indução de Apoptose por MVs derivadas de HLSCs num modelo de xenoenxerto de hepatoma em ratinhos SCID

Para determinar o efeito na apoptose intra-tumoral, secções de parafinas dos tumores tratados com MVs foram analisadas por TUNEL. O tratamento com MVs induziu apoptose comparativamente com tumores tratados com veículo sozinho (Figura 15A).

2.7 Efeito biológico *In vitro* de MVs derivadas de HLSCs em células MCF-7 do adenocarcinoma da mama e células KS do sarcoma de Kaposi

2.7.1 Materiais e Métodos

Cultura de Células. Células estaminais hepáticas humanas não-ovais (HLSC) foram cultivadas em α -MEM/EBM (3:1), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 mg/ml penicilina e 100 mg/ml estreptomicina. EBM foi reconstituído com hEGF (fator de crescimento epitelial humano), hidrocortisona, GA (gentamicina), BBE (extracto de cérebro bovino).

As linhas celulares MCF-7 de adenocarcinoma da mama foram obtidas da American Type Culture Collection (Manassas,

VA) e foram cultivadas em DMEM suplementado com % de FCS, 100 mg/ml penicilina e 100 mg/ml estreptomicina e mantidas numa incubadora com uma atmosfera humidificada de 5% CO₂ at 37°C.

Uma cultura primária de células de sarcoma de Kaposi (KS) foi obtida de uma lesão cutânea de um paciente transplantado com um aloenxerto renal sob terapia imunossupressiva e foi cultivado em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FCS, 100 mg/ml penicilina e 100 mg/ml estreptomicina.

Isolamento de MVs. MVs foram obtidos de sobrenadantes de HLSCs cultivados em MEM-alfa suplementado com 2% de soro fetal bovino (FBS) durante 18 horas. Em experiências selecionadas, MVs foram recolhidos na ausência de FBS. A viabilidade de células incubadas *overnight* a 2% de FBS e sem soro foi detetada por exclusão com azul de tripano (mais de 90%, dados não mostrados). Após centrifugação a 2000g durante 20 minutos para remover o *debris*, os sobrenadantes desprovidos de células foram centrifugados a 100 000g (ultra-centrifuga Beckman Coulter Optima L-90K) durante 1 h a 4 °C, lavados em meio 199 desprovido de soro contendo ácido hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 25mM e submetidos a uma segunda ultra-centrifugação nas mesmas condições. Os pellets de MV foram ressuspensos em meio 199, e o conteúdo proteico foi medido pelo método de Bradford. MVs foram armazenados a -80 °C. A análise morfológica realizada numa suspensão MV após coloração com iodeto de propídio não mostrou a presença de corpos apoptóticos.

Tratamento com RNase. Em experiências selecionadas, MVs de HLSCs foram tratados com 1 U/ml RNase durante 1 h a

37°C. A reação foi neutralizada pela adição de 10 U/ml de inibidor de RNase e MVs foram lavados por ultracentrifugação.

Proliferação celular. De forma a investigar se as MVs derivadas de HLC exerceram a sua atividade anti-tumoral em linhas celulares derivadas de uma variedade de tumores, células MCF-7 do adenocarcinoma da mama e células do sarcoma de Kaposi foram plaqueadas a 8000 células/poço em microplacas de 96-poços em DMEM e RPMI, respetivamente, com diferentes concentrações de MVs (2; 10; 15; e 30 mg/ml e 30 mg/ml de MVs tratados com RNase). A síntese de DNA foi detetada através da incorporação de 5-bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU) no DNA celular após 48 horas de cultura. As células foram então fixadas com 0,5 M etanol/HCl e incubadas com nuclease para digerir o DNA. O BrdU incorporado no DNA foi detetado usando um anticorpo murino anti-BrdU associado a peroxidase e visualizado com um substrato cromogénico solúvel. A densidade ótica foi medida com um leitor ELISA a 405 nm.

Ensaio apoptótico. Células MCF-7 e KS foram plaqueadas a 8 000 células/poço em microplacas de 96-poços com DMEM com baixo teor em glucose suplementado com 10% FCS e na presença de doxorubicina (100 ng/ml) ou diferentes concentrações de MVs (2 ; 10; 15; e 30 mg/ml e 30 mg/ml of MVs tratados com RNase). A apoptose foi avaliada usando o ensaio TUNEL.

2.7.2 Resultados: MVs derivadas de HLSCs inibem a proliferação *in vitro* de células MCF-7 e células KS

A incubação durante 48 horas de células MCF-7 do adenocarcinoma da mama e células do sarcoma de Kaposi com 2, 10, 15 e 30 mg/ml de MVs (Figuras 16 e 17) derivados de células HLSC-6B inibe significativamente a proliferação celular quando comparado com as células de controlo incubadas com o veículo sozinho. Estes resultados mostram que os efeitos anti-tumorais de células estaminais provenientes de tecidos não são específicos contra tumores originados do mesmo tecido. Adicionalmente, a incubação de células MCF-7 do adenocarcinoma da mama e células do sarcoma de Kaposi durante 48 horas com 2, 10, 15 e 30 mg/ml of MVs (Figura 18) derivados de células HLSC-6B induziram apoptose, comparativamente às células de controlo incubadas com o veículo sozinho, com efeitos que são similares aos da doxorubicina, uma droga quimioterapêutica. Isto adicionalmente confirma que os efeitos anti-tumorais de células provenientes de tecidos não são específicos contra tumores originados no mesmo tecido.

Lisboa, 25 de novembro de 2015

REIVINDICAÇÕES

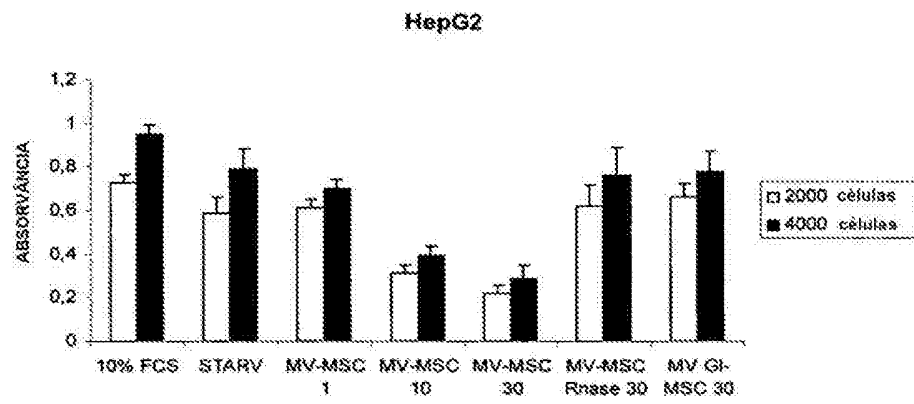
1. Uma microvesícula (MV) derivada de uma célula estaminal adulta pluripotente ou multipotente para uso no tratamento terapêutico de uma doença tumoral.
2. A microvesícula (MV) para uso de acordo com a reivindicação 1, onde a célula estaminal adulta pluripotente ou multipotente é selecionada do grupo consistindo de célula estaminal mesenquimatosa e célula estaminal hepática.
3. A microvesícula (MV) para uso de acordo com a reivindicação 2, onde a célula estaminal adulta pluripotente ou multipotente é selecionada do grupo consistindo de célula estaminal mesenquimatosa humana derivada da medula óssea (BM-MS), célula estaminal mesenquimatosa humana derivada de glomérulos descapsulados (Gl-MS) e célula estaminal hepática humana não-oval (HLSC).
4. A microvesícula (MV) para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, onde a doença tumoral é selecionada do grupo consistindo de tumor hepático, tumor epitelial, tumor da mama, tumor do pulmão, tumor da próstata, tumor gástrico, tumor do cólon e tumor dos ovários.
5. A microvesícula (MV) para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, onde o tratamento terapêutico de uma doença tumoral compreende a administração a um paciente com sua necessidade relacionada de uma dose de MV compreendida entre 0,1 a 200 microgramas/kg de peso corporal do paciente, preferencialmente 1-150 microgramas/kg de peso corporal do paciente, ainda mais

preferencialmente 3-120 microgramas/kg de peso corporal do paciente.

6. A microvesícula (MV) para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, que se encontra numa forma de dosagem farmacêutica adequada para administração local ou sistémica.
7. A microvesícula (MV) para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 to 6, onde o tratamento terapêutico compreende a administração de um ou mais agentes citotóxicos e/ou citostáticos.
8. A microvesícula (MV) para uso de acordo com a reivindicação 7, onde os agentes citotóxicos e/ou citostáticos são selecionados do grupo consistindo de Paclitaxel, Lenalidomida, Pomalidomida, Epirubicina, 5FU, Sunitiniba, La-patiniba, Canertiniba, ciclofosfamida, doxorubicina, Lenalidomide/Dexametasonae, Pomalidomida/Dexametasona, Carboplatina, Rapamicina, mitoxantrona, oxaliplatina, docetaxel, vinorelbina, vincristina e qualquer combinação derivada.
9. A microvesícula (MV) para uso de acordo com a reivindicação 8, onde os agentes citotóxicos e/ou citostáticos são doxorubicina ou vincristina.

Lisboa, 25 de novembro de 2015

A



B

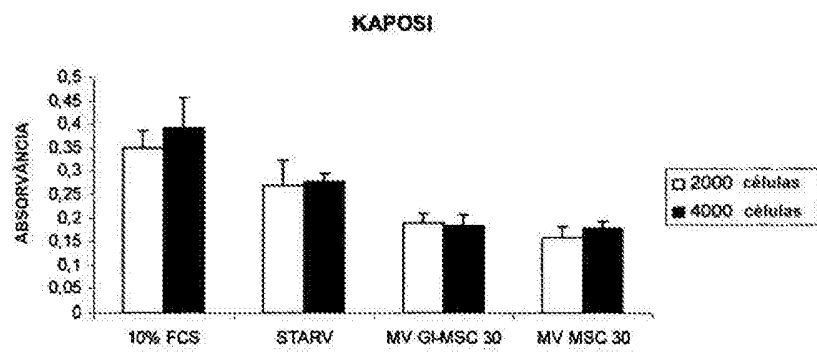
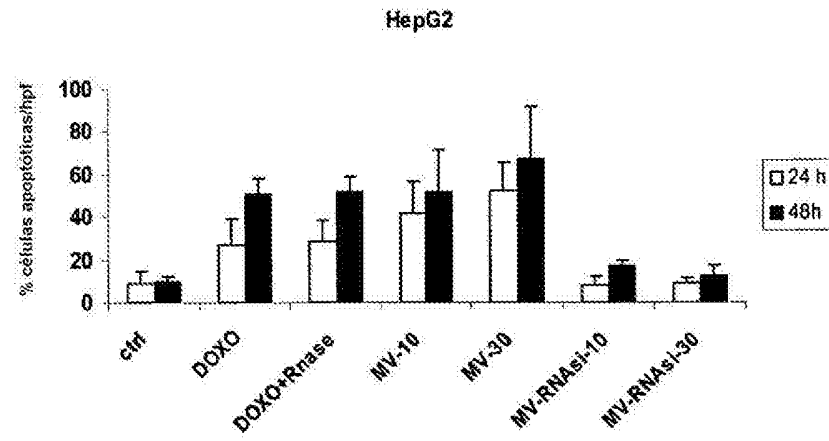


FIG. 1

A



B

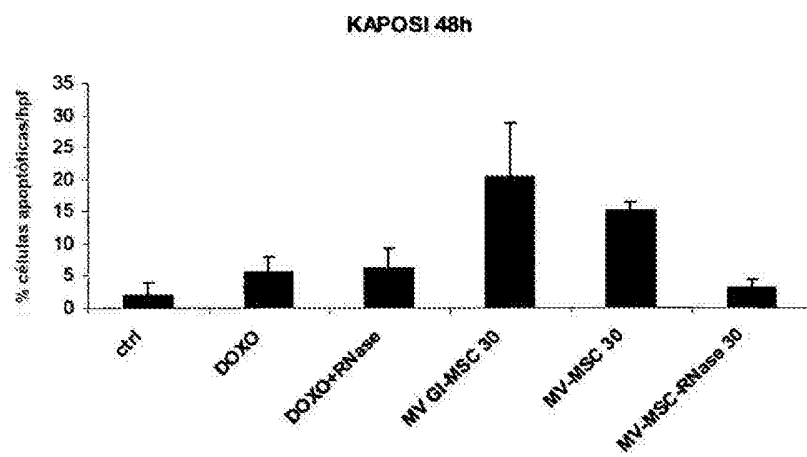
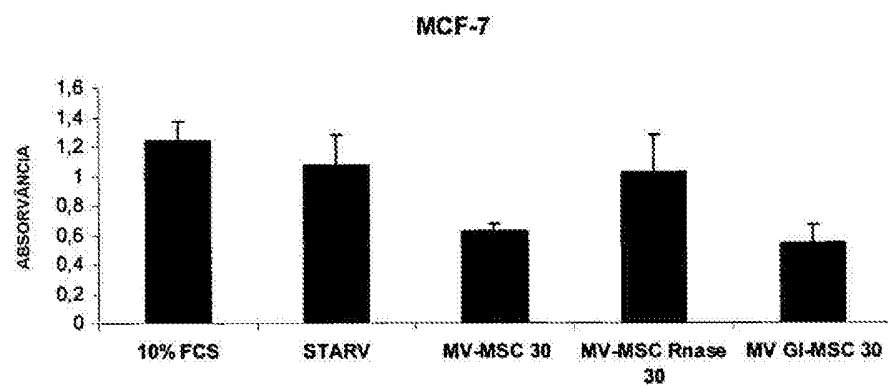


FIG. 2

A



B

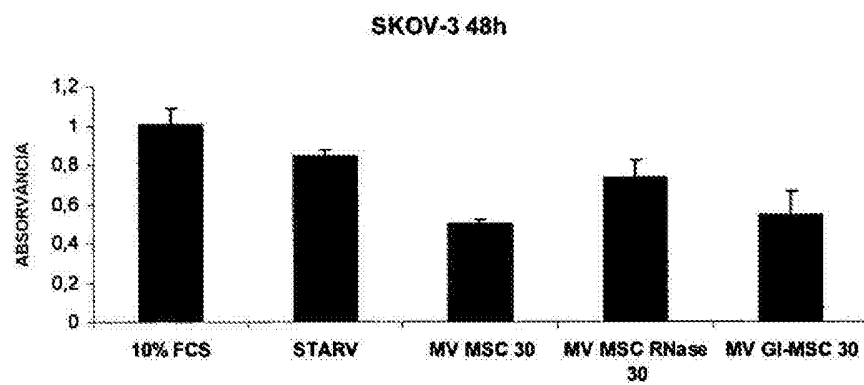
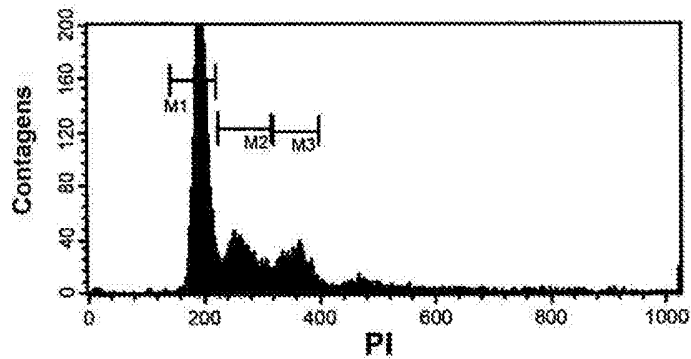
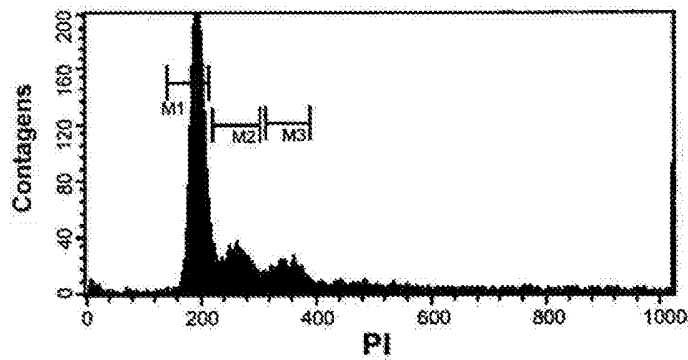


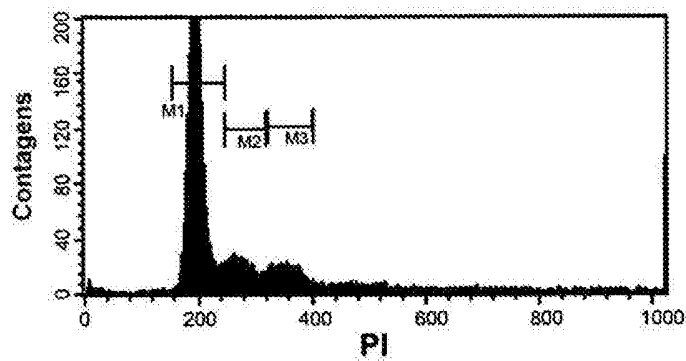
FIG. 3

SKOV-3**Marcador % Total**

All	100.00
M1	50.90 G1/G0
M2	22.34 S
M3	15.61 G2

INANINAÇÃO**Marcador % Total**

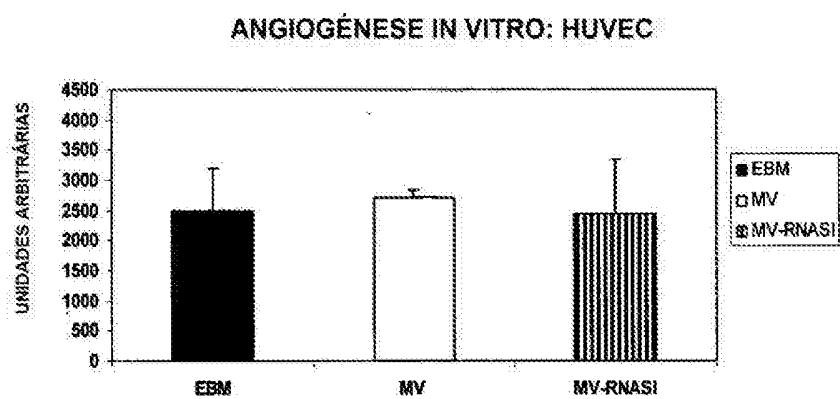
All	100.00
M1	54.37 G1/G0
M2	16.47 S
M3	11.12 G2

+ 30 µg/ml BM-MSC MV:**Marcador % Total**

All	100.00
M1	64.77 G1/G0
M2	11.78 S
M3	10.15 G2

FIG. 4

A



B

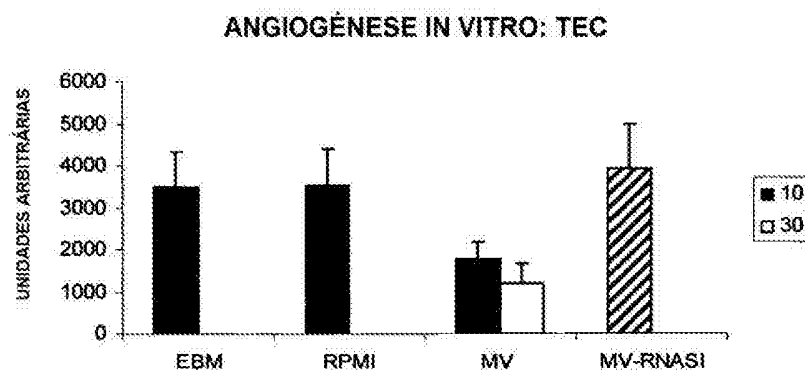


FIG. 5

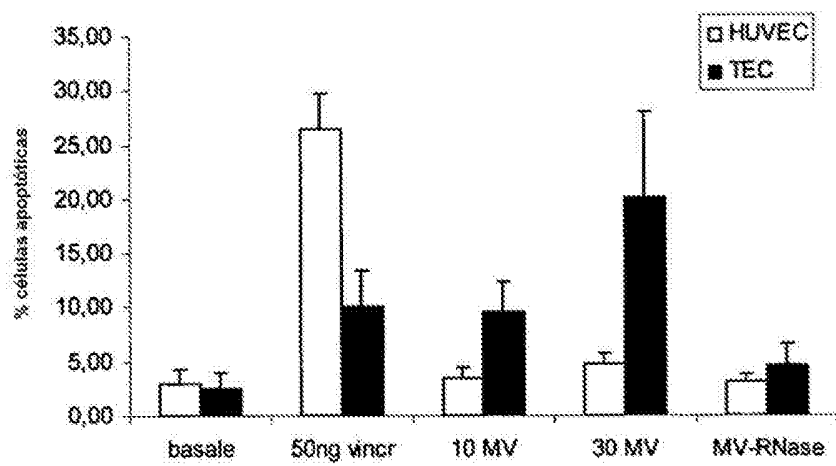


FIG. 6

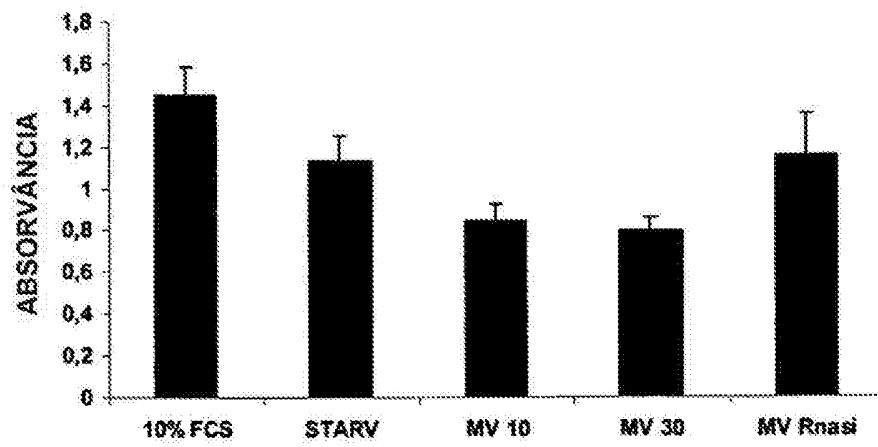


FIG. 7

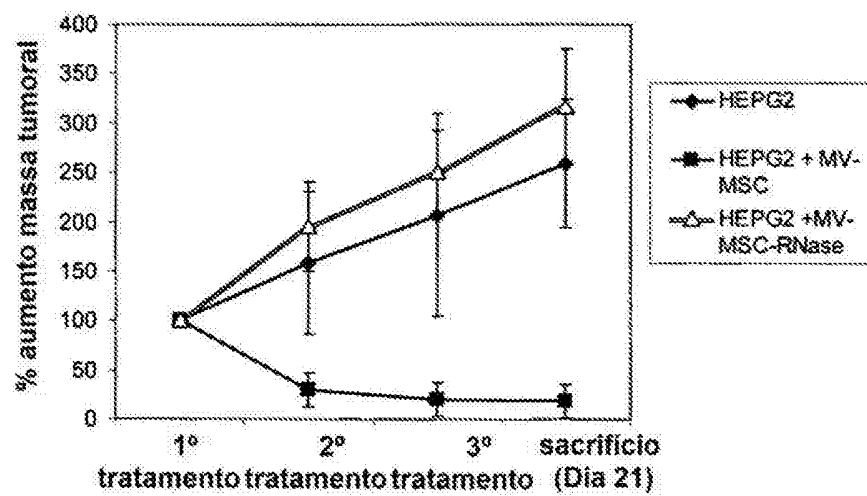


FIG. 8

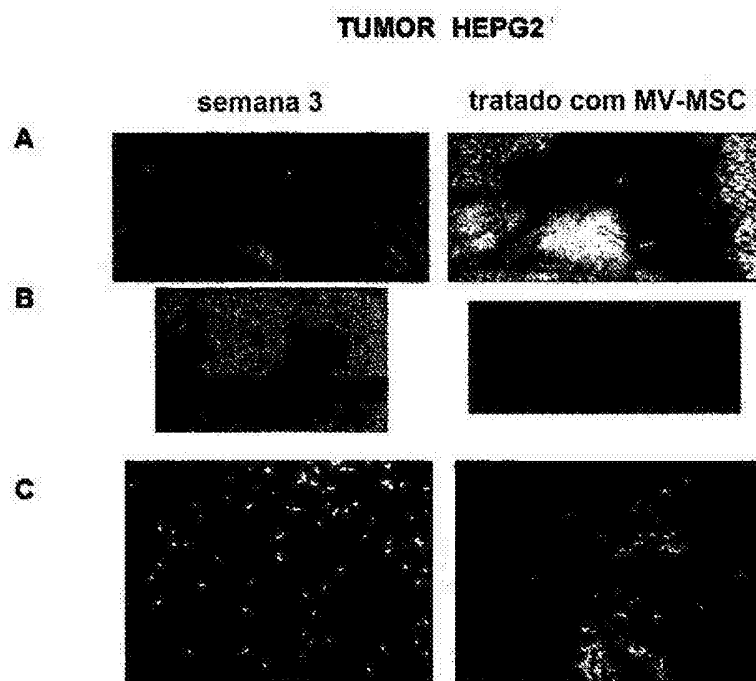


FIG. 9

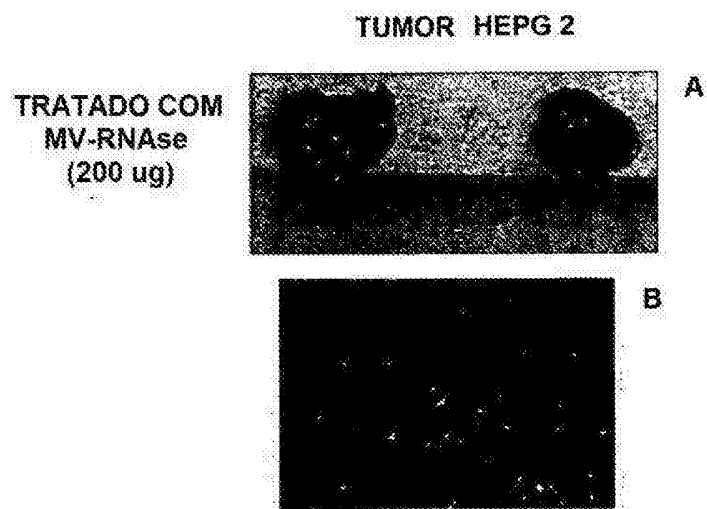


FIG. 10

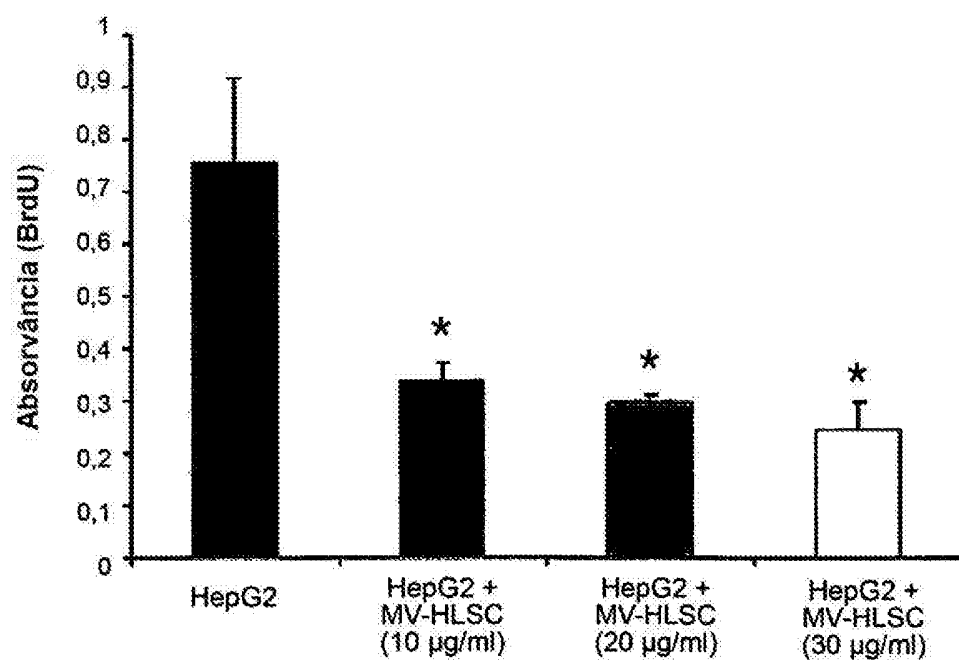


FIG. 11

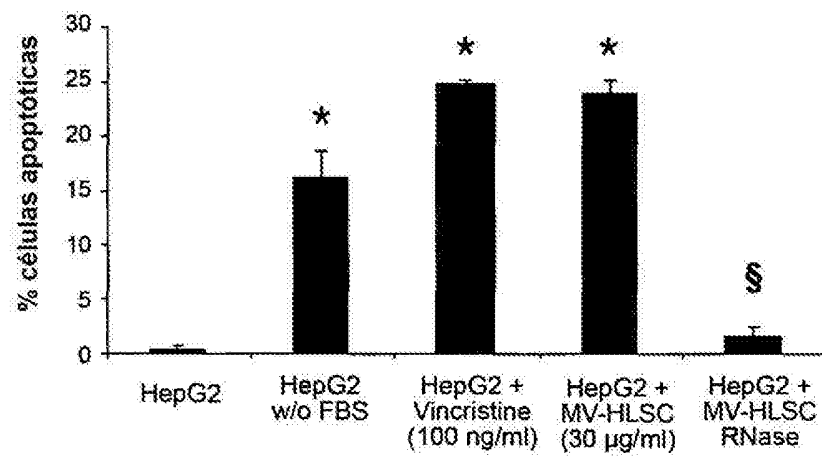


FIG. 12

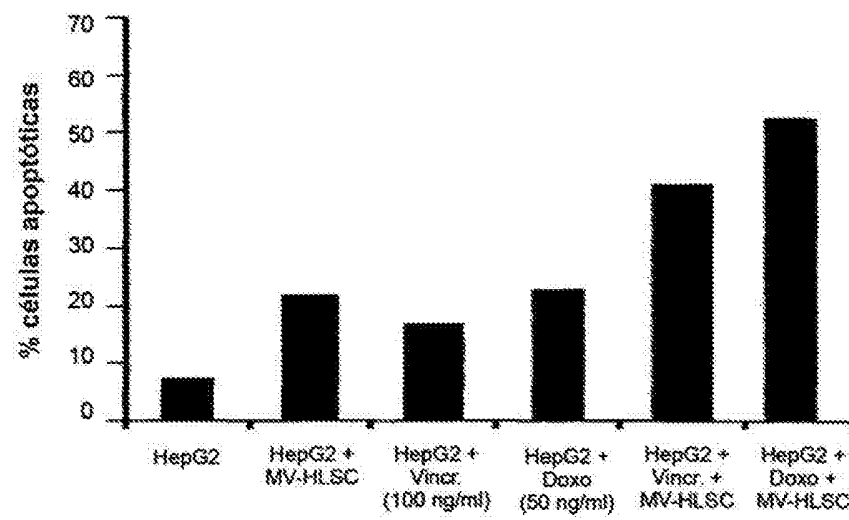


FIG. 13

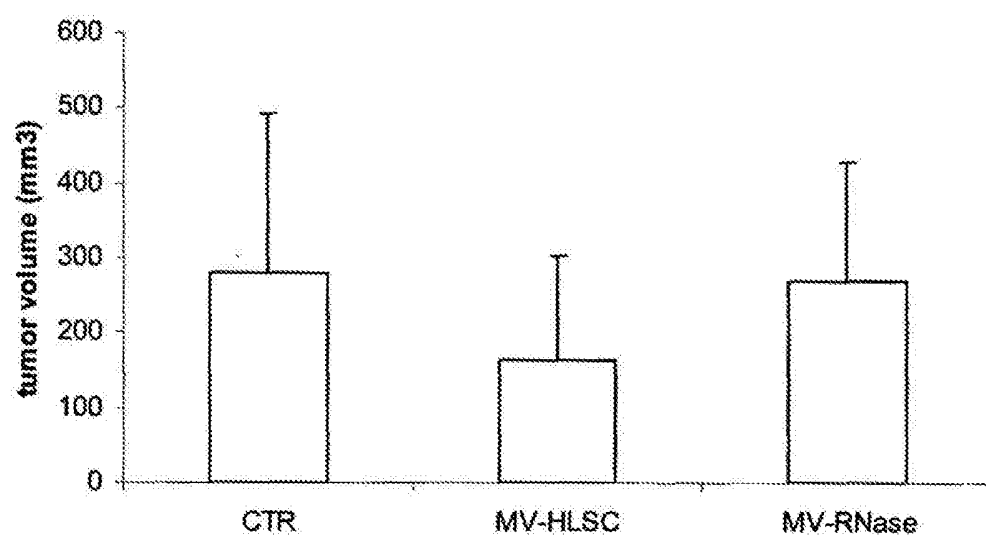


FIG. 14

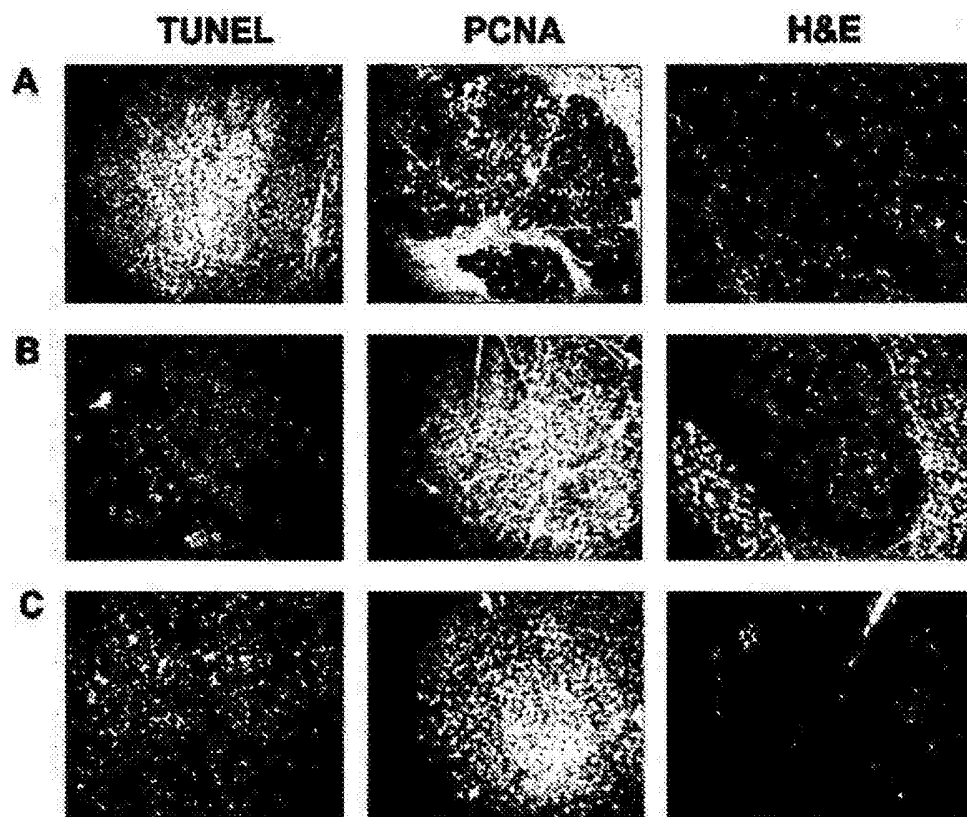


FIG. 15

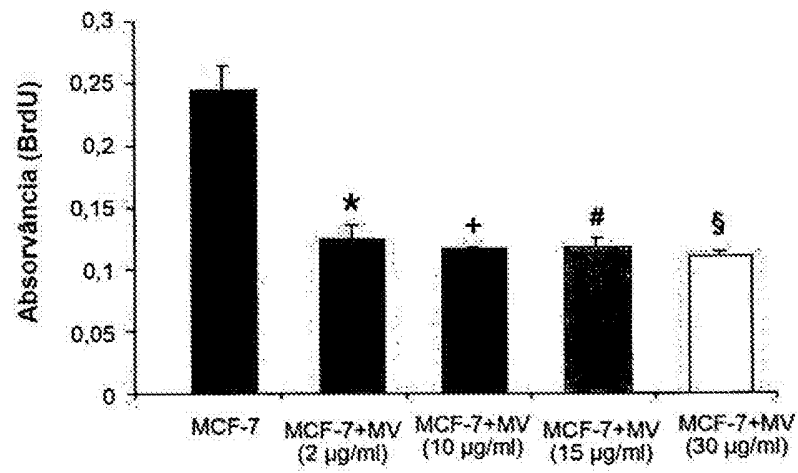


FIG. 16

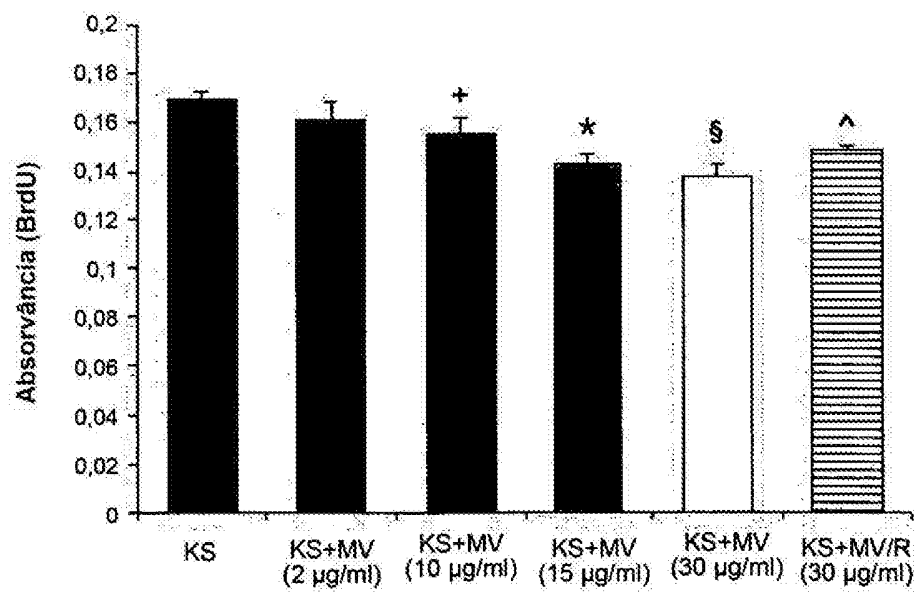


FIG. 17

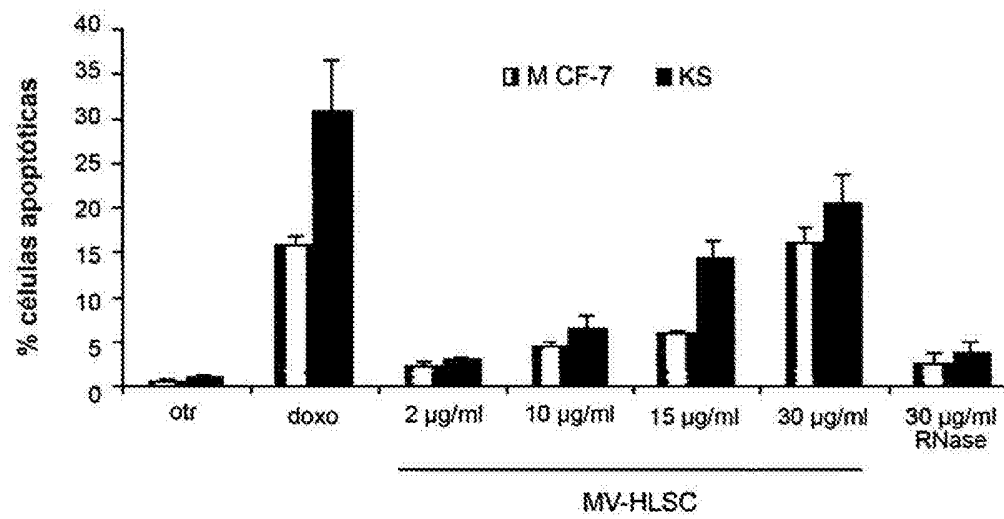


FIG. 18