República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021016264-0 A2

(22) Data do Depósito: 23/03/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 13/10/2021

(54) Título: MÉTODOS PARA OBTER CÉLULAS MUSCULARES LISAS INDUZIDAS

(51) Int. Cl.: C12N 5/077; C12N 5/074.

(30) Prioridade Unionista: 22/03/2019 EM 19164574.6.

(71) Depositante(es): INNOVACELL AG.

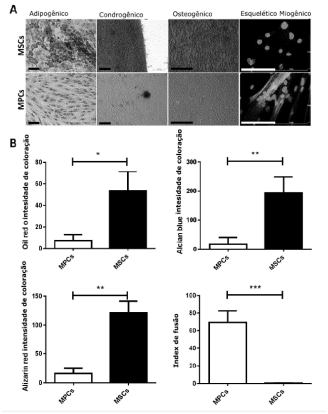
(72) Inventor(es): MARCO THURNER; RAINER MARKSTEINER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2020057940 de 23/03/2020

(87) Publicação PCT: WO 2020/193460 de 01/10/2020

(85) Data da Fase Nacional: 17/08/2021

(57) Resumo: MÉTODOS PARA OBTER CÉLULAS MUSCULARES LISAS INDUZIDAS. A presente invenção se refere a métodos para obter células musculares lisas induzidas (iSMCs), iSMCs, iSMCs para uso em um método de tratamento de uma doença ou distúrbio, bem como para o uso em engenharia de tecidos, além do uso de células derivadas do músculo esquelético para a obtenção de iSMCs.



“MÉTODOS PARA OBTER CÉLULAS MUSCULARES LISAS INDUZIDAS”

[001] A presente invenção se refere a métodos para obter células musculares lisas induzidas (iSMCs), iSMCs, iSMCs para uso em um método de tratamento de uma doença ou distúrbio, ou para uso em engenharia de tecidos, e o uso de células derivadas de músculo esquelético para a obtenção de iSMCs.

[002] A degeneração de músculos lisos, por exemplo nos esfíncteres, pode causar doenças debilitantes, como a incontinência fecal. As células derivadas do músculo esquelético (SMDCs) têm sido efetivamente utilizadas nas clínicas para regeneração dos esfíncteres do músculo esquelético, como o esfíncter anal externo ou urinário. No entanto, pouco se sabe sobre a diferenciação de músculo liso *in vitro* e o potencial regenerativo de músculo liso *in vivo* de células musculares lisas derivadas de SMDCs.

[003] Os esfíncteres são músculos circulares que controlam o movimento de sólidos e/ou líquidos, e podem consistir em músculo esquelético, tal como o esfíncter anal externo ou músculo liso, bem como o esfíncter anal interno e pilórico (Al-Ali et a1., 2009; Ramkumar & Schulze, 2005). O mau funcionamento dos músculos esfincterianos do ânus e do piloro está associado à incontinência fecal e à gastroparesia, respectivamente (Abrahamsson, 2007; Rao, 2004). A degeneração da musculatura lisa do esfíncter anal interno é uma causa conhecida de incontinência fecal passiva

(Vaizey et a1., 1997), o principal tipo de incontinência fecal, que afeta 78% de todos os pacientes com incontinência fecal (Mimura et a1., 2004). Embora não represente uma ameaça à vida, a incontinência fecal afeta gravemente a qualidade de vida dos pacientes (Meyer & Richter, 2015) e tem uma taxa de prevalência de até 12% em homens e mulheres (Goode et a1., 2005; Quander et a1., 2005). Os tratamentos conservadores, como a aplicação de agentes de volume, têm sucesso limitado em pacientes com alta gravidade de incontinência e as abordagens cirúrgicas apresentam altas taxas de morbidade e complicações (J. Y. Wang & Abbas, 2013).

[004] A funcionalidade do tecido muscular liso depende da existência de células musculares lisas altamente diferenciadas que expressam proteínas contráteis, como a actina alfa do músculo liso (aSMA), desmina e smootelina (SMTN) (Capetanaki et a1., 1997; van Eys et a1., 2007; J. Wang et a1., 2006), bem como canais de cálcio e potássio controlados por voltagem funcional, permitindo a indução da contração celular regulada (Sanders, 2008). O isolamento e o uso de células semelhantes para o tratamento de deficiências do músculo liso pode ser uma opção de tratamento promissora. No entanto, nenhuma terapia com células musculares lisas está atualmente disponível no mercado. O isolamento de células musculares lisas capazes de regenerar o tecido muscular liso deficiente é um primeiro pré-requisito para a abordagem do uso clínico dessas células. Um método avançado para derivar células musculares lisas é o uso de tecido de músculo liso como fonte. Essas células musculares lisas primárias foram efetivamente utilizadas para a regeneração de músculo liso

em um modelo animal de incontinência fecal passiva (Boh1 et a1., 2017), no entanto, células musculares lisas primárias são dificilmente acessíveis em humanos vivos para tratamento autólogo, são heterogêneas por natureza e podem ser limitadas na capacidade proliferativa (Sandison & McCarron, 2015), portanto, qualificam-se menos como candidato terapêutico celular para regeneração de músculo liso em humanos. Assim, o uso de células-tronco/progenitoras altamente proliferativas prontas para se diferenciar em células musculares lisas foi abordado.

[005] As células-tronco/progenitoras, tais como células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), demostraram abrigar potencial de transdiferenciação para a linhagem de músculo liso (Bajpai et a1., 2012; Park et a1., 2013), bem como potencial regenerativo de músculo liso *in vivo* (Li et a1., 2016). As iPSCs são especialmente promissoras em seu potencial de diferenciação de músculo liso e funcionalidade *in vitro* (Bajpai et a1., 2012) e células progenitoras de músculo liso derivadas de iPSCs demonstraram potencial regenerativo do esfíncter uretral *in vivo* (Li et a1., 2016), no entanto, algumas preocupações com a segurança, como instabilidade genética e formação de teratoma, limitam sua utilidade (Jung et a1., 2012). Os produtos de células derivadas de MSCs adultas não causaram maiores problemas de saúde na maioria dos ensaios clínicos (Y. Wang et a1., 2012). No entanto, sua eficácia clínica na regeneração do músculo liso permanece imprecisa.

[006] Descobriu-se que o tecido muscular esquelético é uma fonte de células-tronco e progenitoras, tais como as MSCs e progenitoras miogênicas derivadas de células satélites, ambas consideradas altamente regenerativas (Yin et a1., 2013). As células derivadas do músculo esquelético (SMDCs) enriquecidas com células CD56positivas demonstraram melhorar a fraqueza do esfíncter anal externo associada à incontinência fecal nas clínicas (A. Frudinger et a1., 2010, 2015; Andrea Frudinger et a1., 2018). Além disso, descobriu-se que células derivadas do músculo esquelético se enxertam no músculo detrusor da bexiga, melhorando a função da bexiga (Huard et a1., 2002). No entanto, existe conhecimento limitado sobre as SMDCs para a diferenciação e isolamento das células musculares lisas ou sua capacidade regenerativa *in vivo* (Lu et a1., 2011) e nenhum estudo avaliou o potencial terapêutico de células musculares lisas derivadas de SMDCs (células musculares lisas induzidas) para a regeneracao do músculo liso do esfíncter.

[007] As abordagens terapêuticas celulares para a regeneração do tecido muscular liso são altamente desejáveis e dependem do uso de células competentes para a regeneração do músculo liso. Tendo em vista as desvantagens dos métodos do estado da técnica, novos métodos para o fornecimento de células musculares lisas são necessários.

[008] Frudinger et a1. (2018) ensina o isolamento de células CD56+ derivadas de músculo esquelético, chamadas SMDCs, conforme é mostrado na Fig. 6 de Frudinger et a1. (2018) (Andrea Frudinger et a1., 2018). As referidas células são

caracterizadas, entre outras, por uma expressão negativa de aSMA, CD49a, e CD146, como é mostrado na Figura 17 da presente divulgação. Além disso, conforme afirmado em Frudinger et a1. (2018), as SMDCs são caracterizadas por uma expressão positiva de Pax-7 (Andrea Frudinger et a1., 2018). As SMDCs descritas em Frudinger et a1. (2018) são miogênicas esqueléticas, ou seja, são capazes de se fundir em miotubos multinucleados.

[009] O documento EP 2 206 774 Al refere-se a populações de células com capacidades de diferenciação que são obtidas por isolamento de um tecido muscular, mais particularmente de um tecido muscular esquelético e/ou cardíaco, de preferência do endomísio e/ou cardíaco (Marolleau et a1., 2010). A população de células de EP 2 206 774 Al compreende células ALDH-positivas e notavelmente têm capacidades de diferenciação miogênica e/ou adipogênica, e/ou osteogênica. Em particular, EP 2 206 774 Al divulga células ALDH+/CD34-, células ALDH+/CD34+ e células SMALD/34+, em que todas são CD146-, como mostrado nas Tabelas 1 e 3 e na Figure 8 do EP 2 206 774 Al. Além disso, o documento EP 2 206 774 Al divulga células SMALD/34-. As referidas células são CD146+ e competentes para a fusão, conforme é revelado na Figura 3 do EP 2 206 774 A1.

[010] investiga que o músculo esquelético humano é uma fonte essencial de vários progenitores celulares com potenciais perspectivas terapêuticas. Por um lado, são descritas células CD56+, que são CD49a- e CD49e+. Por outro lado, são descritas células CD56-, que são CD146- e SMA- (Lecourt et a1., 2010).

[011] Thurner et a1. (2018) divulga o desenvolvimento de

um ensaio de potência *in vitro* para células derivadas de músculo esquelético humano. Em particular, o isolamento de células derivadas de músculo esquelético (SMDCs) de CD56+ e CD56- é descrito. Conforme mostrado na Figura 17 da presente divulgação, ambas as SMDCs CD56+ e CD56- descritas em Thurner et a1. (2018) são aSMA-, CD146- e CD49a-. Além disso, como é mostrado na Fig. 2a em Thurner et a1. (2018), as células CD56+ apresentam uma atividade AChE de > 1000mUrel/g.

[012] A presente invenção fundamenta o problema técnico de fornecer um método para obter iSMCs que seja seguro e eficaz para uso em um método de tratamento de uma doença ou distúrbio em um sujeito. Um outro problema técnico subjacente à presente invenção é o fornecimento de células que sejam seguras e eficazes para utilização na regeneração do tecido muscular liso.

[013] Este problema técnico é resolvido pela matéria definida nas reivindicações.

[014] As seguintes figuras fazem parte da presente especificação e são incluídas para demonstrar ainda mais certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser mais bem compreendida por referência a um ou mais desses desenhos em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas aqui apresentadas.

[015] A Figura 1 ilustra a caracterização de MPCs e MSCs derivadas de músculo esquelético de acordo com seu potencial de

diferenciação. O potencial de diferenciação de MPCs e MSCs, avaliado após a diferenciação *in vitro* em linhagens adipogênicas, condrogênicas, osteogênicas e miogênicas esqueléticas por cultivo nos respectivos meios de diferenciação, e detectado por Oil Red O (adipócitos), Alcian Blue (condrócitos), Alizarin Red S (osteócitos) e coloração com solução Hoechst/Anti-Desmina (núcleos e miócitos), respectivamente. Imagens representativas (barra de escala = 100µm) de pelo menos três preparações individuais são mostradas (A). A quantificação do potencial de diferenciação adipogênico-, condrogênico-, osteogênico- e miogênico esquelético de MSCs e MPCs por cálculo da intensidade de coloração do meio por campo de Oil Red O, Alcian Blue ou Alizarin Red S, ou por cálculo do índice de fusão de pelo menos três amostras individuais, respectivamente (B). Os dados são apresentados como meio±SD de MPCs e MSCs de pelo menos três biópsias musculares individuais. A comparação estatística foi realizada por testes-t não pareados ($p<0,05$ considerado significativo).

[016] A Figura 2 ilustra a caracterização de MPCs e MSCs derivadas de músculo esquelético e as iSMCs derivadas destas por sua expressão de marcador de superfície celular. A expressão de superfície de marcadores linhagem mesenquimais (CD105, 90, 73), miogênicos (CD56), hematopoiéticos (CD34) e de músculo liso (CD146 e CD49a) em MPCs e MSCs derivadas de músculo esquelético, bem como iSMCs derivadas destas, de cada pelo menos três biópsias de músculo esquelético humano individuais avaliadas por citometria de fluxo. Como um controle, a expressão do marcador de linhagem de músculo

liso CDl46 e CD49a é demonstrada em populações de células de músculo liso derivadas da bexiga humana (SMCs hBd-). Os dados são apresentados como meio±SEM.

[017] A Figura 3 ilustra a expressão de marcadores intracelulares em SMDCs (MPCs e MSCs) e iSMCs. A detecção de marcadores miogênicos gerais (Desmina) e miogênicos de músculo liso (aSMA, Smootelina) em MPCs e MSCs, bem como em iSMCs derivadas destas, foi realizada por imunocitoquímica e imagens representativas (barra de escala = 100µm) são mostradas (A). A porcentagem de células positivas para aSMA, Smootelina ou Desmina dentro de MPCs, MSCs e iSMCs derivadas destas, conforme avaliado por quantificação de células que expressam o marcador correspondente em imagens de imunocitoquímica de culturas de, pelo menos, três biópsias de músculo humano individuais (B). Os dados são apresentados como meio±SEM.

[018] A Figura 4 ilustra as chances de expressão gênica durante a transdiferenciação de SMDCs (MPCs e MSCs) para iSMCs. As alterações na expressão gênica foram avaliadas por análise de *microarray* de MSCs e MPCs para iSMCs MSC- e iSMCs MPCs-, cultivadas em crescimento (MSCs e MPCs) ou meio de diferenciação de músculo liso (iSMCs MSCs- e iSMCs MPCs-) por 6 dias, respectivamente, derivadas de duas biópsias individuais de músculo humano. O agrupamento de genes regulados para cima (A) ou regulados para baixo (B) em ambas as MSCs e MPCs mediante diferenciação de iSMCs obtidas por agrupamento de *k-means* são representados em mapas de calor.

Os asteriscos (*) marcam os genes, que foram regulados para cima- (1og2 FC > 1) ou regulados para baixo (1og2 FC < -1) em ambos os tipos de células. A comparação estatística foi realizada pelo teste de Qui-quadrado, considerando um valor de p abaixo de 0,05 como significativo. Os resultados da mudança na expressão do gene são mostrados em (C).

[019] A Figura 5 ilustra a competência de fusão de MPCs e iSMCs. A formação de miotubos (competência de fusão) foi observada por microscopia de fluorescência após coloração Hoechst33342 para visualização dos núcleos. Com base nas imagens, foi determinado o índice de fusão (FI) (A) e o número de núcleos por tubo (B). As células com pelo menos 3 núcleos foram contadas como tubos. As medições foram comparadas entre MPCs e iSMCs derivadas.

[020] A Figura 6 ilustra a formação de canais de íons funcionais durante a transdiferenciação de MPCs para iSMCs.

[021] A análise de cálcio interno dependente de voltagem (A) e correntes externas de potássio (B) em MPCs e iSMCs derivadas destas, bem como células de músculo liso derivadas da bexiga (SMCs hBd-). Curvas de impedância-voltagem (IV) de cada pelo menos três células de MPCs, iSMCs (derivadas de MPCs) e SMCs hBd- demonstram a presença de canais funcionais Can (A) e Kg (B) em iSMCs (derivadas de MPCs) e SMCs hBd-, mas não MPCs.

[022] A Figura 7 ilustra a contratilidade de SMDCs e iSMCs em redes de colágeno de enguia.

[023] A contratilidade de SMDCs (MSCs e MPCs), iSMCs derivadas destas e células de músculo liso derivadas da bexiga (SMCs hBd-) quantificadas pela contração da rede de gel de colágeno. A contração de gel percentual do tamanho original dentro de 48 horas de células obtidas pela etapa (a) da presente invenção (MPCs ou MSCs) e células obtidas por transdiferenciação para iSMCs pela etapa (b) da presente invenção, bem como células de músculo liso de bexiga humana (SMCs hBd-) de controle, apresentadas como gráfico de barras (A). Os dados são apresentados como meio±SEM de preparações de células de cada, pelo menos, três biópsias individuais de músculo humano ou análise de SMC hBd-. Imagens estereomicroscópicas representativas dos géis de colágeno com MSCs e MSCs integradas, além de iSMCs, cada uma delas derivada destas, bem como SMCs hBd- em poços de uma placa de 24 poços (B).

[024] A Figura 8 ilustra o fenótipo de células de músculo liso de iSMCs derivadas de mMPCs e seu encapsulamento em tecido de músculo liso *in vivo.*

[025] A porcentagem de células positivas para Desmina e aSMA em iSMCs derivadas de MPCs murinas representadas como gráfico de barras (A). A detecção de sinal de fluorescência de esferas fluorescentes e transgene TdTomato expressando localização no músculo esfíncter pilórico intacto por imagem *in vivo* (B). A expressão da proteína actina de músculo liso alfa (aSMA), a expressão de TdTomato, de iSMCs enxertadas e sobreposição (MERGE) de TdTomato e proteína aSMA, foram detectadas por imuno-histoquímica em cortes histológicos do esfíncter pilórico 12 semanas após a implantação. A

contracoloração dos núcleos em cada imagem foi realizada por DAPI. Imagens representativas de n=8 camundongos injetados são mostradas (C).

[026] A Figura 9 ilustra imagens de microscopia eletrônica de varredura e de luz de anéis de tecido. Imagens microscópicas de luz de um anel de tecido obtidas por cultivo 3D de iSMCs derivadas de MPCs localizadas em torno do local central de um modelo de agarose em diferentes ampliações (A e B). Imagens de microscopia eletrônica de varredura de um anel de tecido obtido por cultivo 3D de iSMCs derivadas de MPCs em diferentes ampliações (C e D).

[027] A Figura 10 ilustra a expressão de proteínas contráteis em anéis de tecido derivados de SMDCs e iSMCs por imunofluorescência.

[028] A coloração de imunofluorescência de marcadores miogênicos gerais (Desmina) e miogênicos de músculo liso (aSMA), juntamente com contracoloração de núcleos (Hoechst) realizada em crio-seções de anéis de tecido obtidos do cultivo 3D de MPCs, bem como iSMCs derivadas destas.

[029] A Figura 11 ilustra imagens de microscopia eletrônica de transmissão de anéis de tecido.

[030] Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de anéis de tecido seccionados ultrafinos obtidos por cultivo 3D de iSMCs, mostrando cavéolas (pontas de flecha) na membrana celular de duas células adjacentes (A e B), estruturas filamentosas abundantes dentro do citoplasma (C) para filamentos acumulados (setas) de corpos

densos (D).

[031] A Figura 12 lista a quantificação das chances de expressão gênica durante a transdiferenciação de SMDCs (MPCs e MSCs) para iSMCs.

[032] As alterações na expressão gênica foram avaliadas por análise de *microarray* de MSCs e MPCs para iSMCs MSC- e iSMCs MPCs-, cultivadas em crescimento (MSCs e MPCs) ou meio de diferenciação de músculo liso (iSMCs MSCs- e iSMCs MPCs-) por 6 dias, respectivamente, derivando de duas biópsias individuais de músculo humano. São mostradas mudanças Log2 dobradas de genes associados ao músculo liso em amostras de MSCs vs. iSMCs MSC- (MSCs) e MPCs vs. iSMCs MPCs- (MPCs) para comparar a diferenciação de músculo liso entre MSCs e MPCs. Os asteriscos (*) marcam genes que são regulados para cima- (Log2 > 1) ou para baixo - (Log2 < -1).

[033] A Figura 13 ilustra a análise de citometria de fluxo do anticorpo anti-CD49e corado e iSMCs MPC- murinas coradas de controle de isotipo de acordo com o exemplo 15.

[034] Os gráficos de pontos de controle de isotipo IgG1 (A) e iSMCs MPC- positivas para anti-CD49e (B) demonstrando 0,14% de controle e 9,5% de células positivas para CD49e, respectivamente.

[035] A Figura 14 ilustra a análise da atividade AChE e CK de MPCs e iSMCs MPC-, em que as atividades enzimáticas foram medidas antes e após o cultivo de células em meio de diferenciação de músculo esquelético (SKDiff).

[036] A atividade de AChE (A) e a atividade de CK (B)

foram medidas e comparadas em MPCs e iSMCs MPC- antes e após o cultivo em meio de diferenciação de músculo esquelético (SKDiff) por 6 dias. Os dados foram apresentados como meio±SEM de células derivadas de pelo menos três biópsias individuais de músculo humano. Análise estatística realizada pelo teste-t pareado considerando p <0,05 como significativo.

[037] A Figura 15 fornece uma visão geral das propriedades e da expressão do marcador dos diferentes tipos de células aqui descritos.

[038] SMDC CD56+ e SMDC CD56- (Thurner et al 2018), e a SMDC (Frudinger et al. 2018) foram obtidas conforme descrito no Exemplo 18. As MPCs e MSCs foram obtidas conforme descrito no Exemplo 1. As iSMCs MPC- e iSMCs MSC- foram obtidas conforme descrito no Exemplo 2. A expressão de um determinado marcador é indicada como “+”, se pelo menos 50% das células da população de células testadas expressaram o respectivo marcador de células. A expressão de um determinado marcador é indicada como “-”, se menos de 50% das células da população de células testadas expressaram o respectivo marcador de células. A atividade enzimática de AChE de uma determinada população de células é indicada como "+" se a população de células tiver uma atividade de AChE de pelo menos 1000mUrel/mg de proteína, medida de acordo com o Exemplo 17. A atividade enzimática de AChE de uma certa população de células é indicada como "-", se a população de células tiver uma atividade AChE inferior a 1000mUrel/mg de proteína medida de acordo com o Exemplo 17. A atividade enzimática de CK de uma determinada população de células é indicada como "+" se

a população de células tiver uma atividade de CK de pelo menos 100 mUrel/mg de proteína, medido de acordo com o Exemplo 17. A atividade enzimática de CK de uma determinada população de células é indicada como "-", se a população de células tiver uma atividade de CK inferior a 100 mUrel/mg de proteína medida de acordo com o Exemplo 17.

[039] O uso da palavra "um" ou "uma", quando usado em conjunto com o termo "compreendendo" nas reivindicações e/ou no relatório descritivo, pode significar "um", mas também é consistente com o significado de "um ou mais", "pelo menos um" e "um ou mais do que um".

[040] O termo "cerca de" significa que são contemplados o valor declarado, mais ou menos 5% do valor declarado ou o erro padrão para medições de um determinado valor.

[041] O termo "incontinência anal", tal como aqui utilizado, refere-se a qualquer perda indesejada de conteúdo intestinal através do ânus, como flatulências, fezes líquidas ou sólidas. O termo compreende todos os três graus de gravidade: Grau 1 = apenas gasoso, grau 2 = fezes líquidas e moles, grau 3 = fezes sólidas e formadas.

[042] O termo "esfíncter anal" ou "aparelho do esfíncter anal", tal como aqui utilizado, refere-se em particular ao *Musculus sphincter ani externus* e ao *Musculus puborectalis* como uma parte do *Musculus levator ani*. No entanto, também inclui *M. pubococcygeus, M. ischiococcygeus, M. iliococcygeus* e *N. pudendus*.

[043] O termo "células derivadas de músculo esquelético" ou "SMDCs" refere-se a células obtidas de tecido de músculo esquelético compreendendo células competentes de fusão, como por exemplo, mioblastos ou células competentes de não-fusão, tais como células estromais mesenquimais multipotentes, que podem ser células primárias e/ou células cultivadas *in vitro* e, alternativamente, a outras células com potencial miogênico ou de diferenciação múltipla (por exemplo, de tecido lipoaspirado ou outras células-tronco que abrigam tecidos, como medula óssea). O termo também compreende células derivadas de tecido adiposo que podem ser isoladas e usadas para diferenciação em músculo liso células. O termo "células derivadas do músculo esquelético" ou "SMDCs" também se refere a uma população de células isolada do tecido muscular.

[044] O termo “células de músculo liso derivadas da bexiga humana (SMCs hBd-)” refere-se a populações de células que compreendem células de músculo liso da bexiga humana. As SMCs hBd- estão comercialmente disponíveis na PromoCell (número de catálogo: C-12571) e representam as características fenotípicas e funcionais das células do músculo liso que, na presente invenção, se prevê serem obtidas por iSMCs derivadas de células derivadas do músculo esquelético.

[045] O termo "injeção", tal como aqui utilizado, refere-se à expulsão de uma solução de injeção compreendendo

as células acima mencionadas de um dispositivo de injeção em um local específico dentro do corpo humano, particularmente em, ou adjacente ao, tecido muscular, proporcionando continência anal. O processo de injeção pode ser, mas não está limitado a, estático, ou seja, o dispositivo de injeção permanece na posição alcançada. Alternativamente, o processo de injeção é dinâmico. Por exemplo, em algumas modalidades da presente invenção, a injeção ocorre simultaneamente com a retração do dispositivo de injeção do local da injeção.

[046] O termo "local de injeção", tal como aqui utilizado, refere-se a um local dentro do corpo humano, como por exemplo próximo a, ou sendo, tecido muscular que fornece continência anal, no qual o processo de injeção é iniciado. O local da injeção não precisa ser idêntico ao local onde termina o processo de injeção.

[047] O termo "dispositivo de injeção", tal como aqui utilizado, refere-se a qualquer dispositivo adequado para penetrar no tecido humano a fim de atingir um local de injeção de interesse e capaz de entregar soluções, em particular soluções compreendendo células derivadas de músculo no local de injeção de interesse.

[048] O termo “incontinência de fezes”, conforme usado neste documento, refere-se apenas à perda indesejada de líquido ou fezes formadas através do ânus.

[049] O termo “incontinência passiva”, conforme usado neste documento, refere-se a uma falta de reconhecimento

sensorial da perda de fezes. Isso inclui valores baixos de pressão de linha de base anal, devido ao fato do músculo liso do esfíncter anal interno ser defeituoso e/ou à falta de capacidade sensorial da mucosa anal e retal.

[050] O termo "CD56+" ou "CD56 positivo", tal como aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador celular CD56. Os termos "CD56+" ou "CD56 positivo" também podem ser usados para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 por cento da população de células expressa o marcador celular CD56.

[051] O termo "CD56-" ou "CD56 negativo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular CD56. Os termos "CD56-" ou "CD56 negativo" também podem ser usados para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente menos de 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 por cento da população de células expressam o marcador de células CD56.

[052] O termo "multipotente", conforme aqui utilizado, refere-se ao potencial de diferenciação das células mesenquimais caracterizadas pelo potencial de diferenciação *in vitro* pelo menos para as linhagens adipogênica-, condrogênica- e osteogênica-.

[053] O termo "oligopotente", tal como aqui utilizado, refere-se ao potencial de diferenciação de células mesenquimais caracterizado pelo potencial de diferenciação *in vitro* limitado às linhagens miogênicas, tais como músculo liso, estriado e cardíaco.

[054] O termo "células mesenquimais", tal como aqui utilizado, refere-se a células positivas para CD105, CD90 e CD73, e negativas para CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR (MHCII).

[055] O termo "CD34+" ou "CD34 positivo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador celular CD34. Os termos "CD34+" ou "CD34 positivo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressam o marcador de células CD56.

[056] O termo "CD34-" ou "CD34 negativo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular CD34. Os termos "CD34-" ou "CD34 negativo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente menos de 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 por cento da população de células expressar o marcador de células CD34. Em uma modalidade particularmente preferida, o termo "CD34-" ou "CD34 negativo" também pode ser usado para uma população de células compreendendo células diferentes, se preferencialmente no máximo 19, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0

porcento de a população de células expressar o marcador de células CD34.

[057] O termo "CD146+" ou "CD146 positivo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador celular CD146. Os termos "CD146+" ou "CD146 positivo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se de preferência pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressa a célula marcador CD146.

[058] O termo "CD146-" ou "CD146 negativo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular CD146. Os termos "CD146-" ou "CD146 negativo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente, menos de 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 porcento da população de células expressam o marcador celular CD146.

[059] O termo "CD49a+" ou "CD49a positivo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador celular CD49a. Os termos "CD49a+" ou "CD49a positivo" também podem ser usados para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressa o marcador celular CD146.

[060] O termo "CD49a-" ou "CD49a negativo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular CD49a. Os termos "CD49a-" ou "CD49a negativo" também podem ser usados para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente menos que 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 porcento da população de células expressam o marcador celular CD49a.

[061] O termo "CD73+" ou "CD73 positivo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador celular CD73. Os termos "CD73+" ou "CD73 positivo" também podem ser usados para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressam o marcador celular CD73.

[062] O termo "CD73-" ou "CD73 negativo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular CD73. Os termos "CD73-" ou "CD73 negativo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente menos que 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 porcento da população de células expressam o marcador celular CD73.

[063] O termo "CD90+" ou "CD90 positivo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador

celular CD90. Os termos "CD90+" ou "CD90 positivo" também podem ser usados para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressam o marcador celular CD90.

[064] O termo "CD90-" ou "CD90 negativo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular CD90. Os termos "CD90-" ou "CD90 negativo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente, menos que 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 porcento da população de células expressam o marcador celular CD105.

[065] O termo "CD105+" ou "CD105 positivo", como aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador celular CD105. Os termos "CD105+" ou "CD105 positivo" também podem ser usados para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se de preferência pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressam o marcador celular CD105.

[066] O termo "CD105-" ou "CD105 negativo", como aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular CD105. Os termos "CD105-" ou "CD105 negativo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente menos que 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0

porcento da população de células expressam o marcador celular CD105.

[067] O termo "aSMA+" ou "aSMA positivo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador celular aSMA. Os termos "aSMA+" ou "aSMA positivo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressam o marcador celular aSMA.

[068] O termo "aSMA-" ou "aSMA negativo", tal como aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular aSMA. Os termos "aSMA-" ou "aSMA negativo" também podem ser usados para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente menos que 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 porcento da população de células expressam o marcador celular aSMA.

[069] O termo "desmina positivo" ou "desmina+", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador celular desmina. O termo "desmina positivo" também pode ser usado para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressa o marcador celular desmina.

[070] O termo "desmina negativo" ou "desmina-", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o

marcador celular desmina. O termo "desmina negativa" também pode ser usado para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente, menos que 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 porcento da população de células expressam o marcador celular desmina.

[071] O termo "smootelina positivo" ou "smootelina+", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador celular smootelina. O termo "positivo para smootelina" também pode ser usado para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressam o marcador celular smootelina.

[072] O termo "smootelina negativo" ou "smootelina-", tal como aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular smootelina. O termo "smootelina negativo" também pode ser usado para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente, menos que 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 porcento da população de células expressam o marcador celular smootelina.

[073] O termo "competente para fusão" ou "esquelético-miogênico", tal como aqui utilizado, refere-se a células capazes de se fundir a miotubos multinucleados com pelo menos 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 porcento dos núcleos dentro de miotubos multinucleados após cultivo em meio de

diferenciação de músculo esquelético por 5-7 dias.

[074] O termo "não competente para fusão" ou "não esquelético-miogênico", tal como aqui utilizado, refere-se a células não capazes de se fundir a miotubos multinucleados com, por exemplo, menos que 50% ou no máximo 49, 30, 20, 10 ou 0 porcento de núcleos dentro de miotubos multinucleados após cultivo em meio de diferenciação de músculo esquelético por 5-7 dias.

[075] O termo "meio de diferenciação de músculo esquelético", tal como aqui utilizado, refere-se a meios de cultura de células que induzem a fusão em células competentes de fusão multinucleadas ou células miogênicas, tais como mioblastos. No entanto, o referido termo refere-se também a meios de cultura de células que não compreendem quaisquer substâncias necessárias para a indução de fusão, caso as células competentes de fusão multinucleadas ou células miogênicas sejam capazes de se fundir sem uma respectiva indução.

[076] O termo "meio de diferenciação de músculo liso", tal como aqui utilizado, refere-se a meios de cultura de células que induzem a transdiferenciação de células para um fenótipo de músculo liso. No entanto, o referido termo refere-se também a meios de cultura de células que não compreendem quaisquer substâncias necessárias para a indução da transdiferenciação, caso as células sejam capazes de se transdiferenciar sem uma respetiva indução.

[077] O termo "meio de crescimento celular", tal como aqui utilizado, refere-se a qualquer meio adequado para a incubação de células de mamíferos, como SMDCs, que permite a fixação das referidas células de mamíferos na superfície de um recipiente de incubação, bem como sua proliferação.

[078] O termo "contrátil", tal como aqui utilizado, refere-se à contração da rede de gel de colágeno de pelo menos 40% do tamanho inicial do gel dentro de 48 horas.

[079] O termo "não contrátil", tal como aqui utilizado, refere-se à contração da rede de gel de colágeno inferior a 40% do tamanho inicial do gel em 48 horas.

[080] O termo "TGF-beta" é usado para o fator de crescimento transformador beta, que é uma citocina multifuncional pertencente à superfamília do fator de crescimento transformador que inclui três isoformas diferentes (TGF-β 1, 2 e 3) e muitas outras proteínas de sinalização produzidas por todos linhagens de glóbulos brancos. O termo "TGF-beta" é usado como sinônimo dos termos "TGF-B", "TGF-b", "TGFb" e "TGFB".

[081] O termo "AChE positivo" ou "AChE+", tal como aqui utilizado, refere-se a uma atividade enzimática de acetilcolinesterase de pelo menos $1*10^3$mUrel por mg de proteína celular medida em células que foram cultivadas em meio de diferenciação de músculo liso, tal como descrito nos exemplos aqui. Alternativamente, a atividade enzimática da acetilcolinesterase pode ser testada por qualquer teste

conhecido na técnica, tal como o descrito por Thurner et al., 2018.

[082] O termo "AChE negativo" ou "AChE-", tal como aqui utilizado, refere-se a uma atividade enzimática de acetilcolinesterase inferior a $1*10^3$mUrel por mg de proteína celular medida em células que foram cultivadas em meio de diferenciação de músculo liso, tal como descrito nos exemplos aqui. Alternativamente, a atividade enzimática da acetilcolinesterase pode ser testada por qualquer teste conhecido na técnica, tal como o descrito por Thurner et al., 2018.

[083] O termo "CK positivo" ou "CK+", conforme aqui utilizado, refere-se a uma atividade de creatina quinase de pelo menos $1*10^2$mUrel por mg de proteína celular medida em células que foram cultivadas em meio de diferenciação de músculo liso, tal como descrito nos exemplos aqui. Alternativamente, a atividade enzimática da acetilcolinesterase pode ser testada por qualquer teste conhecido na técnica, tal como o descrito por Thurner et al., 2018.

[084] O termo "CK negativo" ou "CK-", tal como aqui utilizado, refere-se a uma atividade enzimática da creatina quinase inferior a $1*10^2$mUrel por mg de proteína celular medida em células que foram cultivadas em meio de diferenciação de músculo liso, tal como descrito em os exemplos aqui. Alternativamente, a atividade da creatina quinase pode ser

testada por qualquer teste conhecido na técnica, como descrito em ou como um especialista na técnica conduziria a análise (Thurner et al. 2018).

[085] O termo "CD49e+" ou "CD49 positivo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador celular CD49e. Os termos "CD49e+" ou "CD49e positivo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressam o marcador celular CD49e.

[086] O termo "CD49e-" ou "CD49e negativo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular CD49e. Os termos "CD49e-" ou "CD49e negativo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente menos de 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 porcento da população de células expressam o marcador celular CD49e.

[087] O termo "Pax-7+" ou "Pax-7 positivo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o fator de transcrição Pax-7. Os termos "Pax-7+" ou "Pax-7 positivo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população celular expressam o marcador celular Pax-7.

[088] O termo "Pax-7-" ou "Pax-7 negativo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador celular Pax-7. Os termos "Pax-7-" ou "Pax-7 negativo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente menos de 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 porcento da população de células expressam o marcador celular Pax-7.

[089] O termo "SSEA4+" ou "SSEA4 positivo", conforme aqui utilizado, refere-se a uma célula que expressa o marcador de superfície celular SSEA4. Os termos "SSEA4+" ou "SSEA4 positivo" também podem ser usados para uma população de células que compreende diferentes tipos de células, se preferencialmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 ou 99 porcento da população de células expressa o marcador celular SSEA4.

[090] O termo "SSEA4-" ou "SSEA4 negativo", como aqui utilizado, refere-se a uma célula que não expressa o marcador de superfície celular SSEA4. Os termos "SSEA4-" ou "SSEA4 negativo" também podem ser usados para uma população de células compreendendo diferentes tipos de células, se preferencialmente menos de 50% ou no máximo 49, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0 porcento da população de células expressam o marcador celular SSEA4.

[091] O termo "MPC" ou "MPCs", conforme aqui utilizado, referem-se a células progenitoras miogênicas. Em particular,

o termo "MPC" refere-se a células progenitoras miogênicas que são caracterizadas por uma expressão negativa de aSMA, CD49a e CD146. As MPCs são miogênicas esqueléticas e não multipotentes. As MPCs podem ser, ainda, caracterizadas por uma expressão positiva de CD105, CD90, CD73, CD56, desmina, ACHE e/ou CK e/ou uma expressão negativa de CD34. Um exemplo de propriedades de MPCs é mostrado na Fig. 15.

[092] O termo "MSC" ou "MSCs", tal como aqui utilizado, refere-se a células estromais mesenquimais. Em particular, o termo "MSC" ou "MSCs" refere-se a células estromais mesenquimais que são caracterizadas por uma expressão negativa de aSMA, CD49a e CD146. As MSCs são competentes para não-fusão e não são miogênicas esqueléticas, mas são multipotentes. As MSCs podem ser ainda caracterizadas por uma expressão positiva de CD105, CD90, CD73 e/ou desmina e/ou uma expressão negativa de CD56, CD34, desmina, ACHE e/ou CK. Um exemplo de propriedades de MSCs é mostrado na Fig. 15.

[093] De acordo com a presente invenção, são fornecidos métodos para obter células de músculo liso induzidas (iSMCs) a partir de células derivadas de músculo esquelético (SMDCs).

[094] Células de músculo esquelético derivadas de células de músculo liso induzidas

[095] Um primeiro assunto da presente invenção é direcionado a um método para obter células de músculo liso induzidas (iSMCs), o método compreendendo as etapas de: (a) obtenção de células derivadas de músculo esquelético de um

sujeito; (b) transdiferenciação de células derivadas de músculo esquelético cultivando as células em um meio contendo TGF-beta, em particular TGFb1, TGFb2 e/ou TGFb3, e heparina para obter iSMCs. Em uma modalidade particularmente preferida, as células derivadas do músculo esquelético são transdiferenciadas na etapa (b), cultivando as células em um meio contendo TGFb1 e/ou TGFb3, mais preferencialmente TGFb1 e heparina para obter iSMCs. A etapa (b) da presente invenção é realizada *in vitro* ou *ex vivo*. Consequentemente, o método de acordo com a presente invenção é *in vitro* ou *ex vivo.*

[096] Em uma modalidade preferida da presente invenção, a etapa (b) é conduzida em um meio de cultura de células contendo 1-10µg/ml de TGFb1 e 10-30µg/ml de heparina ou 1-6U/ml de heparina.

[097] Em uma modalidade preferida, as iSMCs obtidas de acordo com um método da presente invenção, de preferência na etapa (b) do método de acordo com a presente invenção, são caracterizadas pela expressão positiva de aSMA, CD49a e CD146.

[098] Em uma modalidade preferida da presente invenção, as células derivadas do músculo esquelético são células progenitoras miogênicas (MPCs) caracterizadas pela expressão positiva de CD56 e desmina, e pela expressão negativa de CD34; alternativamente, as células derivadas do músculo esquelético são células estromais mesenquimais (MSCs) caracterizadas pela expressão positiva de CD105, CD73 e a expressão negativa de CD34 e CD56.

[099] Em uma modalidade preferida da invenção, as células derivadas do músculo esquelético são MPCs oligopotentes.

[100] Em uma outra modalidade preferida da presente invenção, as células derivadas do músculo esquelético são MSCs caracterizadas pela expressão negativa de desmina e/ou pela expressão positiva de CD90.

[101] Em uma outra modalidade preferida da presente invenção, as células derivadas do músculo esquelético são MSCs multipotentes.

[102] De preferência, no método de acordo com a presente invenção, é previsto que as iSMCs obtidas a partir de MPCs na etapa (b) sejam caracterizadas pela expressão positiva de aSMA, CD49a, desmina, CD56 e CD146, e a expressão negativa de CD34; e prevê que as iSMCs obtidas das MSCs na etapa (b) sejam caracterizadas pela expressão positiva de aSMA, CD49a e CD146, e pela expressão negativa de CD56.

[103] Em outra modalidade preferida da invenção, as iSMCs obtidas a partir de MPCs na etapa

[104] (b) são ainda caracterizadas por uma expressão positiva de smootelina.

[105] Em outra modalidade preferida da presente invenção, as

iSMCs obtidas a partir de MSCs na etapa

[106] (b) são ainda caracterizadas por uma expressão negativa de desmina e/ou CD34.

[107] A CD73 ou 5’-nuc1eotidase (5’-NT), também conhecida como ecto-5’-nuc1eotidase, é uma enzima que, em humanos, é codificada pelo gene NT5E. A CD73 normalmente serve para converter AMP em adenosina. A CD73 é expressa em linfócitos, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e mioblastos. A CD73 é um marcador multipotente de células estromais mesenquimais (MSCs), de acordo com os critérios mínimos para MSCs sugeridos pela sociedade internacional para terapia celular (ISCT) (Dominici et al., 2006).

[108] A CD105 também é conhecida como Endoglin. É uma proteína homodímero de membrana integral do tipo I com subunidades de 90kD encontradas em células endoteliais vasculares e sinciciotrofoblastos da placenta. A CD105 é fracamente expressa nos fibroblastos do estroma. Também é expressa em monócitos ativados e macrófagos teciduais. A expressão de CD105 é aumentada no endotélio ativado em tecidos submetidos a angiogênese, como em tumores, ou em casos de cicatrização de feridas ou inflamação dérmica. A CD105 é um componente do sistema receptor TGF-β em células endoteliais da veia umbilical humana, e se liga a TGF-β1 e β3 com alta afinidade. A CD105 é um marcador multipotente de células estromais mesenquimais (MSC) de acordo com os

critérios mínimos para MSC sugeridos pela sociedade internacional para terapia celular (ISCT) (Dominici et al., 2006). Como a presente invenção prevê o isolamento de iSMCs de MPCs e/ou MSCs pela incubação destas últimas com TGF-β, a expressão de CD105, em virtude do seu papel como uma correceptora de TGF-β, pode ser útil para o sucesso do método aqui descrito. A presente invenção, portanto, divulga o isolamento de MSCs ou MPCs (Exemplo 1) que são positivas para CD105 (Figura 2) e, portanto, úteis para o isolamento de iSMCs (Exemplo 2).

[109] A expressão de CD34 foi descrita em células-tronco derivadas de músculo e células satélites quiescentes (Qu-Petersen et al., 2002). Além disso, células derivadas de músculo esquelético CD34 positivas exibiram regeneração aumentada de distrofina no músculo esquelético distrófico (Jankowski et al., 2002). O estado da arte é o uso de células derivadas de músculo esquelético CD34+ para geração de células de músculo liso *in vitro* e o uso de células derivadas de músculo esquelético CD34+ para aumento de músculo liso (Capelli et al., 2002). No entanto, os músculos lisos endógenos normais são, geralmente, CD34 negativos (ver: https://www.proteinat1as.org/ENSG00000174059-CD34/tissue/primary+data), mas os músculos lisos em um estado tumorigênico frequentemente tornam-se CD34+ (van de Rijn et al., 1994). Assim, as células obtidas pelos métodos da presente invenção sem CD34 podem ser vantajosas para a regeneração do músculo liso, e menos propensas à transformação maligna. Seguindo os métodos da presente invenção, células derivadas de músculo esquelético negativas para CD34 são obtidas em uma primeira etapa e diferenciadas em iSMCs negativas para CD34 em

uma segunda etapa (Exemplos 1 e 2).

[110] CD146 é uma proteína de superfície e receptora da laminina alfa 4, que está presente na matriz extracelular do tecido muscular liso em desenvolvimento (livanainen et al., 1995). Além disso, CD146 mostrou ser expressa em células-tronco derivadas da medula óssea comprometidas com a linhagem do músculo liso (Espagnolle et al., 2014). Conforme ilustrado na Figura 2, as células de músculo liso derivadas da bexiga são positivas para CD146. Resumindo, as células CD146+ marcam uma população de células comprometidas de músculo liso como preferencial para o uso em regeneração de músculo liso e/ou engenharia de tecido. Os presentes métodos permitem o isolamento de iSMCs CD146+ de células derivadas de músculo esquelético.

[111] CD56, também conhecida como molécula de adesão de células neurais (NCAM), é um marcador de comprometimento miogênico expresso em mioblastos do músculo esquelético *in vitro* (Belles-Isles et al., 1993) e tecido muscular liso *in vivo* (Romanska et al., 1996). CD56 está presente em SMDC desmina+ de fusão competente (aqui denominadas MPCs), bem como em iSMCs originárias destas. CD56 é o principal marcador de discriminação entre as MPCs e as MSCs derivadas do músculo esquelético aqui descritas, visto que ambas as MSCs e as iSMCs originárias destas são CD56 negativas. iSMCs CD56+, conforme obtidas pela presente invenção, podem ser mais adequadas para a regeneração do músculo liso.

[112] A actina de músculo liso alfa (aSMA) é um dos primeiros marcadores para o comprometimento do músculo liso

durante o desenvolvimento (McHugh, 1995). Sua presença é essencial para a função e contratilidade, em virtude da mecanotransdução nas células musculares lisas (J. Wang et al., 2006). Assim, o uso de aSMA como marcador de iSMCs, destinado à regeneração da função do músculo liso, é essencial. Os presentes métodos (Exemplo 2) permitem a geração de células aSMA+ a partir de células derivadas de músculo esquelético (Figura 3).

[113] A desmina é um dos primeiros marcadores miogênicos conhecidos, presentes em todos os tipos de músculos. A falta de desmina pode resultar em degeneração e mau funcionamento muscular (Capetanaki et al., 1997). Assim, o uso de células desmina+ para regeneração muscular é preferível. Como é mostrado na figura 3, iSMCs derivadas de MPCs são desmina positivas.

[114] O CD49a ou proteína integrina alfa (ou, ainda, VLA-1), resultante da expressão e tradução do gene ITGA1, está presente durante o desenvolvimento do músculo liso, especialmente encontrado no tecido do músculo liso, como a aorta (Belkin et al., 1990). Os presentes métodos permitem o isolamento de iSMCs CD49a positivas de MPCs ou MSCs CD49a negativas. Conforme representado na Figura 2, as células de músculo liso derivadas da bexiga humana (SMCs hBd-) também são positivas para CD49a.

[115] A funcionalidade do tecido muscular liso depende da existência de células musculares lisas altamente diferenciadas que expressam proteínas contráteis, como a

smootelina (Niessen et al., 2005). Além disso, a smootelina é um marcador bem conhecido para células de músculo liso totalmente diferenciadas, e é o primeiro marcador a desaparecer quando o músculo liso está comprometido (van Eys et al., 2007). Assim, o uso de células smootelina+ na regeneração do tecido muscular liso pode ser favorável. Os métodos atuais (Exemplos 2 e 5) permitem o isolamento de iSMCs smootelina+ de MPCs smootelina- (Figura 3).

[116] Como descrito acima, os marcadores mencionados CD146, CD56, aSMA, CD34, desmina, CD49a, smootelina são importantes para a identificação e/ou função das células do músculo liso, e a combinação dos marcadores pode ser favorável para identificar iSMCs adequadas para a regeneração do músculo liso. Os métodos aqui demonstrados permitem o isolamento de iSMCs com combinações dos marcadores abordados (Exemplo 2).

[117] Em detalhes, a presente invenção fornece um método para obter iSMCs a partir de MPCs derivadas de músculo esquelético. As iSMCs obtidas de MPCs são CD56+, aSMA+, CD49a+, desmina+, CD146+ e CD34-. Os últimos marcadores, conforme descrito acima, são vantajosos para identificar células de músculo liso, tais como SMCs hBd-, positivas para CD146 e CD49a (Figura 2), e, portanto, são preferidas para células usadas como células regeneradoras de músculo liso. A combinação da expressão do marcador CD56+, aSMA+, CD49a+, desmina+, CD146+ e CD34- é vantajosa e nova para iSMCs geradas *in vitro* a partir de MPCs derivadas de músculo

esquelético humano.

[118] Além disso, a presente invenção fornece um método para obter iSMCs de MSCs derivadas de músculo esquelético. As iSMCs derivadas de MSCs do músculo esquelético são aSMA+, CD146+ CD49a+, CD56- e, de preferência, também desmina- e/ou CD34-. A expressão positiva de aSMA, CD49a e CD146, e a expressão negativa de CD56 e de preferência também de CD34, são adequadas para identificar essas células como células de músculo liso derivadas de MSC, e são relevantes para a função de iSMCs como células regeneradoras de músculo liso. A combinação da expressão do marcador aSMA+, CD146+, CD49a+ e CD56- em iSMCs de MSCs derivadas de músculo esquelético é vantajosa e nova em relação aos métodos anteriores da técnica.

[119] Em outra modalidade preferida da presente invenção, o método compreende que, após a etapa
[120] (a), uma etapa (a1) é conduzida, compreendendo a proliferação das células derivadas do músculo esquelético, de preferência para receber 20-40 x 10^6 células.

[121] Em uma modalidade particularmente preferida da presente invenção, as células derivadas do músculo esquelético são proliferadas para receber 50 x 10^6 células.

[122] Em uma outra modalidade preferida da presente invenção, a etapa (b) é conduzida durante um a seis dias. Em uma modalidade particular preferida da presente invenção, a etapa (b) é conduzida durante três a seis dias.

[123] Um outro aspecto da presente invenção é dirigido a células de músculo liso induzidas (iSMCs) obtidas por um método de acordo com a presente invenção.

[124] Em outra modalidade preferida da presente invenção, as células de músculo liso induzidas (iSMCs) obtidas a partir de MPCs, são caracterizadas pela expressão positiva de aSMA, CD49a, desmina, CD56 e CD146, e a expressão negativa de CD34.

[125] Como já esclarecido acima, a combinação de marcadores presentes, aSMA, CD49a, desmina, CD56 e CD146, ou ausente, CD34, em iSMCs de MPCs são vantajosas devido à fenocópia do perfil de expressão natural de células musculares lisas pelos métodos aqui descritos.

[126] Em uma outra modalidade preferida da presente invenção, as células de músculo liso induzidas (iSMCs) obtidas a partir de MPCs são competentes para não-fusão.

[127] A fusão de células progenitoras miogênicas de nucleação única (MPCs) ou outras células derivadas de músculo competente para fusão (por exemplo, mioblastos) em miotubos multinucleados, é um pré-requisito para a formação e regeneração do músculo esquelético (Rochlin et al., 2010). No entanto, como o tecido de músculo liso *in vivo* não consiste em miotubos multinucleados, mas sim em células de músculo liso de nucleação única diferenciadas,

[128] para a regeneração do músculo liso, as células competentes de não-fusão são vantajosas. Assim, a presente invenção prevê que iSMCs de MPCs, bem como iSMCs de MSCs, são competentes para a não-fusão. Enquanto as MPCs obtidas como mostrado no Exemplo 1 da presente invenção são competentes para a fusão, as iSMCs, obtidas como mostrado no exemplo 2 da presente invenção e, em última análise, destinadas à aplicação em tecido muscular liso, são competentes para a não-fusão. Isto aplica-se tanto a iSMCs MPC- como a iSMCs MSC- de acordo com a presente invenção, tal como mostrado na Figura 15.

[129] Em outra modalidade preferida da presente invenção, as células de músculo liso induzidas (iSMCs) obtidas a partir de MSCs, são caracterizadas pela expressão positiva de aSMA, CD49a e CD146, e a expressão negativa de CD56.

[130] De preferência, as iSMCs obtidas de MSCs são, ainda, caracterizadas pela expressão negativa de desmina e/ou CD34.

[131] Como as MSCs derivadas de músculo esquelético são diferentes das MPCs em termos de CD56, também as iSMCs derivadas de MSCs são CD56 negativas. No entanto, as iSMCs derivadas de MSCs são aSMA+, CD146+ e CD34-, que em linha com as iSMCs derivadas de MPCs são representativas para o comprometimento do músculo liso de iSMCs derivadas de MSCs e, portanto, vantajosas. Além disso, a expressão dos marcadores mesenquimais CD90, CD105, CD73 positivos em iSMCs

derivadas de MSCs pela presente invenção, é preferível devido à natureza mesenquimal do tecido de músculo liso em necessidade.

[132] A expressão dos vários marcadores, conforme descrito acima, é preferencialmente testada *in vitro*. Além disso, a expressão dos vários marcadores, conforme definido acima, refere-se à sua expressão nas respectivas células *in vitro*. Em uma modalidade preferida, a expressão *in vitro* de aSMA e desmina nas respectivas células, conforme definido acima, corresponde à sua respectiva expressão *in vivo*.

[133] De preferência, as células de músculo liso induzidas (iSMCs) expressam canais funcionais de cálcio e/ou potássio.

[134] A funcionalidade do tecido muscular liso depende da existência de canais de cálcio e potássio controlados por voltagem funcional, permitindo a indução da contração celular regulada e regulando o potencial de membrana, respectivamente (Sanders, 2008). Após a estimulação neurológica, as membranas das células musculares lisas se despolarizam, o que dispara os canais de cálcio com detecção de voltagem para abrir e permitir que os íons de cálcio entrem na célula a partir do espaço intercelular (Sanders, 2008). Este evento desencadeia cascatas de sinalização, conduzindo, finalmente, à contração induzida por actina/miosina da célula de músculo liso necessária em detalhe para, por exemplo, a função do esfíncter anal interno de contrair e reter líquidos, gases e sólidos da liberação involuntária do reto (Webb, 2003). Além disso, os canais de

potássio dependentes de voltagem abrem após a despolarização induzida por neurônios da membrana do músculo liso, a fim de repolarizar a membrana para permitir despolarizações adicionais no caso de sinais neuronais subsequentes. Assim, a presença de canais de cálcio e potássio em iSMCs é adequada para identificar iSMCs funcionais *in vitro*. As iSMCs funcionais, de fato, são necessárias para regenerar o mau funcionamento, por exemplo, do esfíncter anal interno que não é suficientemente funcional em pacientes com incontinência fecal. A presente invenção permite a geração de iSMCs a partir de células derivadas do músculo esquelético com canais de potássio e cálcio dependentes de voltagem funcionais, o que pode ser vantajoso para seu uso na regeneração do músculo liso.

[135] De preferência, as células de músculo liso induzidas (iSMCs) são contráteis *in vitro*. Uma das funções típicas do tecido muscular liso é a contração (Webb, 2003). Para testar a contratilidade *in vitro*, as células são semeadas em gel de colágeno e a redução no tamanho do gel de colágeno ao longo do tempo é quantificada como uma medida de contratilidade. Os inventores descobriram que iSMCs de MPCs e iSMCs de MSCs são contráteis, em comparação com MPCs e MSCs originárias destas.

[136] De preferência, as células de músculo liso induzidas (iSMCs), em particular as iSMCs MPC-, obtidas de acordo com um método da presente invenção, de preferência na etapa (b), são CD49e-. A expressão de CD49e é preferencialmente testada *in vitro*. CD49e, também conhecido

como integrina alfa 5, é uma molécula de adesão celular, que constrói um receptor heterodímero com integrina beta 1 para a ligação de fibronectina, fibrinogênio e fibrilina-1. Como os inibidores da fibronectina foram suficientes para aumentar a expressão do gene do músculo liso, a sinalização da fibronectina suportada por CD49e pode impedir a expressão do músculo liso. Os inventores descobriram que as iSMCs de MPCs murinas são deficientes em CD49e. A deficiência em CD49e pode ser útil na redução da sinalização de fibronectina e, portanto, iSMCs CD49e- obtidas de acordo com a presente invenção podem ser vantajosas em relação às células conhecidas na técnica em seu uso para regeneração de músculo liso.

[137] Em uma modalidade preferida alternativa, as células de músculo liso induzidas (iSMCs), em particular as iSMCs MPC-, obtidas de acordo com um método da presente invenção, de preferência na etapa (b), são CD49e+. A expressão de CD49e é preferencialmente testada *in vitro*.

[138] De preferência, as células de músculo liso induzidas (iSMCs), em particular as iSMCs MPC-, obtidas de acordo com um método da presente invenção, de preferência na etapa (b), são AChE-. A expressão de AChE é preferencialmente testada *in vitro*. Uma das funções típicas das células miogênicas esqueléticas é a expressão da enzima AChE ativa durante a fusão *in vitro* (Thurner et al., 2018), que seja necessária para a terminação dos sinais nervosos nas placas terminais motoras. No entanto, o músculo liso não é inervado por neurônios motores e, portanto, sua contração não é

regulada majoritariamente pela acetilcolina, necessitando de AChE para sua terminação. Os inventores analisaram as iSMCs isoladas de acordo com o Exemplo 3 para a atividade AChE de acordo com o Exemplo 17 e descobriram que as iSMCs são AChE- (Figura 14).

[139] De preferência, as células de músculo liso induzidas (iSMCs), em particular as iSMCs MPC-, obtidas de acordo com um método da presente invenção, de preferência na etapa (b), são CK-. A expressão de CK é preferencialmente testada *in vitro*. Uma das funções típicas das células miogênicas esqueléticas é a expressão da enzima CK ativa durante a fusão *in vitro* (Thurner et al., 2018), pois é necessária para a contração do músculo esquelético. No entanto, a contração do músculo liso não é regulada pela creatina quinase (CK) e, portanto, não é necessária para as células do músculo liso. Os inventores descobriram que as iSMCs (Exemplo 3), que foram analisadas quanto à atividade de CK (Exemplo 17), são CK- (Figura 14).

[140] Em uma modalidade preferida, as células de músculo liso induzidas (iSMCs), em particular as iSMCs MPC-, obtidas de acordo com um método da presente invenção, de preferência na etapa (b), são Pax-7 negativas, em particular se a expressão de Pax-7 é testada *in vitro*. Em uma outra modalidade preferida, as células de músculo liso induzidas (iSMCs), em particular as iSMCs MPC-, obtidas de acordo com um método da presente invenção, de preferência na etapa (b), são Pax-7 positivas, em particular se a expressão de Pax-7 é testada *in vitro*. Pax-7 é um fator de transcrição

encontrado em células comprometidas com a linhagem do músculo esquelético (Krauss et al., 2016). A deleção de Pax-7 na túnica muscular de camundongos leva a uma redução do músculo esquelético e aumento da massa muscular lisa (Wör1 et al., 2009).

[141] Em uma modalidade preferida, as células de músculo liso induzidas (iSMCs), em particular as iSMCs MPC-, obtidas de acordo com um método da presente invenção, de preferência na etapa (b), são SSEA4 negativas. Em uma outra modalidade preferida, as células de músculo liso induzidas (iSMCs), em particular as iSMCs MPC-, obtidas de acordo com um método da presente invenção, preferencialmente na etapa (b), são SSEA4 positivas. A expressão de SSEA4 é preferencialmente testada *in vitro*. SSEA4 é um marcador de superfície celular encontrado em células-tronco pluripotentes, que são conhecidas por seu extenso potencial proliferativo e, portanto, apresentam risco de tumorigênese.

[142] Tratamentos baseados em células de músculo liso induzidas

[143] Um outro aspecto da presente invenção é direcionado a células de músculo liso induzidas (iSMCs) para uso em um método de tratamento de uma doença ou distúrbio em um sujeito. De preferência, o sujeito é um humano ou um animal. Em particular, a presente invenção fornece células de músculo liso induzidas (iSMCs) para uso em um método para o tratamento do corpo humano ou animal por cirurgia ou terapia. Mais particularmente, a presente invenção fornece células de músculo liso induzidas (iSMCs) para uso em terapia

celular, em particular na terapia de células de músculo liso.

[144] Em uma outra modalidade preferida da presente invenção, a doença ou distúrbio são deficiências do músculo liso. De preferência, as deficiências do músculo liso são selecionadas do grupo que consiste em incontinência anal, incontinência urinária, doença de refluxo, gastroparesia, bexiga hiperativa e hipoativa.

[145] Em uma modalidade especificamente preferida da presente invenção, a doença ou distúrbio é a incontinência fecal, em particular a incontinência fecal passiva. Consequentemente, a presente invenção também se refere a iSMCs para uso em um método de tratamento de incontinência anal, incontinência urinária, doença de refluxo, gastroparesia, bexiga hiperativa e hipoativa e, em particular, de incontinência fecal, mais particularmente incontinência fecal passiva.

[146] De preferência, as iSMCs são injetadas no tecido muscular liso de um sujeito com necessidade de iSMCs. De preferência, as iSMCs são injetadas em uma quantidade eficaz para o tratamento da deficiência de músculo liso. A quantidade eficaz do composto a ser administrado pode ser facilmente determinada por aqueles versados na técnica durante os ensaios pré-clínicos e os ensaios clínicos por métodos familiares aos médicos e clínicos.

[147] A regeneração de tecido muscular liso necessitado, tal como músculo liso enfraquecido, atrófico ou danificado, tal como esfíncteres, como o anal interno, uretral interno,

esfíncter esofágico inferior ou superior por administração de células, requer que as células sejam administradas localmente no tecido em necessidade. A administração local de iSMCs pode regenerar o músculo liso por enxerto de iSMCs injetadas no local de administração. A técnica anterior (Chancellor et al., 2001) descreve células derivadas do músculo esquelético caracterizadas como desmina+, CD34+ e B1c-2+ e seu uso no aumento do tecido mole (por exemplo, músculo liso), como da bexiga ou esfíncter anal. Em contraste, a presente invenção divulga o isolamento de células MSCs derivadas de músculo esquelético CD34-, CD56+, desmina+ ou multipotentes, CD34-, CD56-, CD73+ e CD105+, em uma primeira etapa. A partir das referidas células do músculo esquelético, as iSMCs podem ser isoladas em uma segunda etapa, após o tratamento com TGFb1 e heparina. Tais iSMCs ganham, assim, um fenótipo de músculo liso por expressão de marcador de músculo liso, tal como aSMA e CD146, e, portanto, pode ser considerado vantajoso para a regeneração do músculo liso. De preferência, essas iSMCs são usadas em um método para tratar um sujeito em necessidade por injeção no referido sujeito. Os inventores descobriram que as iSMCs obtidas pelos métodos da presente invenção são administradas no tecido do músculo liso do esfíncter pilórico, enxertadas no local da injeção e integradas no tecido do músculo liso.

[148] De preferência, as iSMCs são administradas, por meio de injeções múltiplas, em um tecido mole em necessidade.

[149] Várias injeções de SMDCs no músculo esquelético provaram a melhora do enxerto de células no músculo (Skuk et

al., 2014). A presente invenção prevê a injeção de iSMCs em tecidos moles, como, por exemplo, músculo liso, em vários locais do mesmo tecido contínuo. Em particular, as células podem ser administradas usando várias agulhas, cada uma injetando um número definido de células

[150] As iSMCs de acordo com a presente invenção podem ser administradas na forma de uma composição farmacêutica compreendendo as iSMCs e um diluente, excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável. Consequentemente, a presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo iSMCs de acordo com a presente invenção e um diluente, excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

[151] Em outra modalidade da presente invenção, as iSMCs são usadas na fabricação de um medicamento para o tratamento de incontinência anal, incontinência urinária, doença de refluxo, gastroparesia, bexiga hiperativa e hipoativa e, em particular, de incontinência fecal, mais particularmente incontinência fecal passiva.

[152] Engenharia de tecidos

[153] Em um outro aspecto da presente invenção, células derivadas de músculo liso induzidas são adotadas para uso em engenharia de tecidos.

[154] O tecido muscular liso frequentemente forma estruturas em forma de anel/tubo dentro do corpo humano, tal como em vasos sanguíneos e o esfíncter anal interno. O uso de iSMCs, como aqui obtidas, para produzir estruturas em

forma de anel/tubo pode ser adotado para a engenharia *in vitro* de vasos sanguíneos ou músculos esfincterianos. Estruturas de músculo liso projetadas *in vitro* podem ser úteis para substituir estruturas de músculo liso com mau funcionamento, tais como esfíncteres de músculo liso em, por exemplo, pacientes com incontinência fecal. Os inventores descobriram que as iSMCs obtidas pela presente invenção podem reconstruir estruturas tridimensionais em forma de anel semelhantes às estruturas do esfíncter anal interno, por exemplo. As células dentro desses anéis de tecido expressam proteínas marcadoras de músculo liso, como aSMA e desmina. A expressão de proteínas contráteis aSMA e desmina dentro de anéis de tecido obtidos pelas células da presente invenção é necessária para a funcionalidade dos anéis de tecido e, portanto, vantajosa para o uso dos referidos anéis de tecido na substituição de tecido.

[155] Além disso, esfíncteres de engenharia *in vitro* derivados de iSMCs foram encontrados para abrigar propriedades ultraestruturais de músculos lisos naturais, como estruturas de actina altamente abundantes e corpos densos necessários para mecanotransdução e, portanto, funcionalidade de construções de músculo liso. Além disso, os esfíncteres de engenharia de tecido obtidos pela presente invenção permitem a formação de cavéolas dentro das células. Cavéolas são conhecidas por serem necessárias para o tratamento do cálcio, tal como por excitação-contração, excitação-transcrição e acoplamento farmacomecânico (Popescu et al., 2006). Portanto, as iSMCs obtidas pela presente invenção são promissoras para o uso em engenharia de tecidos.

[156] Controle de drogas

[157] Em um outro assunto da presente invenção, os iSMCs são para uso no rastreio de drogas.

[158] O uso de iSMCs para produzir estruturas de músculo liso *in vitro* pode ser útil para testar novos medicamentos e seus efeitos nas células musculares lisas *in vitro* antes que qualquer candidato a medicamento potencialmente prejudicial tenha de ser usado em estudos em animais ou humanos.

[159] Células derivadas de músculo esquelético para geração de células de músculo liso induzidas

[160] Um outro aspecto da presente invenção é direcionado ao uso de células derivadas de músculo esquelético para a obtenção de células de músculo liso induzidas (iSMCs).

[161] Os métodos do estado da técnica frequentemente usados adotam células-tronco pluripotentes induzidas (Dash et al., 2016), células estromais mesenquimais multipotentes derivadas de tecido adiposo (G. Wang et al., 2015) ou células estromais mesenquimais multipotentes derivadas da medula óssea (Espagnolle et al. 1. , 2014), a fim de obter células de músculo liso *in vitro*, que são claramente diferentes em origem das células derivadas de músculo esquelético usadas como fonte para obter células de músculo liso induzidas na presente invenção. A desvantagem do estado da técnica atual das células, como nas iPSCs usadas para obter células de músculo liso, é o risco de transformação maligna devido à

engenharia genética necessária para obter iPSCs. Outro método do estado da técnica descreve células derivadas de músculo esquelético CD34+ como uma fonte de células de músculo liso. Desse modo, as referidas células são cultivadas em um meio de diferenciação por 2-4 semanas (Lu et al., 2011). Na presente invenção, pela primeira vez, células derivadas de músculo esquelético CD34 isoladas de acordo com os métodos da presente invenção são usadas para obter iSMCs. As referidas células derivadas do músculo esquelético são bem adequadas para o isolamento de iSMCs, uma vez que o método da presente invenção leva menos de 1 semana.

[162] Em uma modalidade preferida de acordo com a presente invenção, as células derivadas do músculo esquelético são células progenitoras miogênicas oligopotentes (MPCs), caracterizadas pela expressão positiva de CD56 e desmina e a expressão negativa de CD34; ou em que as células derivadas do músculo esquelético são células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs), caracterizadas pela expressão positiva de CD105, CD73 e a expressão negativa de CD34 e CD56.

[163] Os exemplos seguintes explicam a presente invenção, mas não são considerados limitantes. Exemplos

[164] Exemplo 1 – Isolamento de células derivadas do músculo esquelético (SMDCs)

[165] Dependendo dos seguintes métodos de isolamento, as SMDCs foram enriquecidas para células progenitoras miogênicas humanas (MPCs), células progenitoras miogênicas

murinas (mMPCs) ou células estromais mesenquimais multipotentes humanas (MSCs).

[166] Isolamento de células progenitoras miogênicas derivadas do músculo esquelético humano (MPCs)

[167] Em detalhes, uma biópsia do músculo esquelético foi obtida de *M. pectoralis major* ou *M. biceps brachii* de um paciente incontinente. Para a realização da biópsia, primeiro a pele foi aberta por uma incisão de aproximadamente 1cm de comprimento acima do músculo até que a fáscia do *M. pectoralis major* fosse alcançada. Após a abertura da fáscia, foi retirado $1cm^3$ de tecido muscular (biópsia). A biópsia foi transferida diretamente para um meio de transporte de biópsia pré-resfriado a aproximadamente 4°C e composto de meio basal F10 de Ham suplementado com gentamicina (concentração final de 1-5µg/ml). A biópsia foi armazenada por aproximadamente 26 horas a 1-11°C dentro do meio de transporte de biópsia. Em seguida, a biópsia foi transferida para uma placa de Petri coberta com PBS 1X. O tecido muscular foi separado do tecido conjuntivo usando uma pinça estéril e um bisturi. Em seguida, o tecido muscular foi transferido para outra placa de Petri preenchida com PBS 1X e dissecado em pedaços de $2-3mm^2$ usando um bisturi. Após uma etapa de transferência adicional como acima, os pedaços de tecido foram, ainda, cortados em pedaços de 1mm. As peças foram finalmente transferidas para um tubo de centrifugação preenchido com PBS 1X e centrifugado por 10 minutos a 1300rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o tecido muscular ressuspenso em PBS 1X suplementado com 8µg/ml de gentamicina. A suspensão de tecido muscular foi

então resfriada a 2-8°C por 48 horas. Após o resfriamento, a suspensão de tecido muscular foi centrifugada por 10 minutos a 1300rpm, o sobrenadante foi então removido e 2,5ml de uma solução de digestão contendo 1-5mg/ml de colagenase, 2-4% v/v de solução-tampão Hepes, 0,1-10 % v/v de soro fetal de vitela e 5-10µg/ml de gentamicina em meio F10 de Ham. A suspensão de tecido muscular foi então incubada durante 6 a 20 horas a 37°C, 5% de COC. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 1300rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi removido, o sedimento ressuspenso em meio contendo 10-20% v/v de FCS, 1-3ng/ml de bFGF e 3-10µg/ml de gentamicina em meio F10 de Ham, e semeado em frascos de cultura de células. As SMDCs anexadas ao fundo do frasco de cultura foram, ainda, mantidas mudando o meio a cada 3-4 dias, e o subcultivo foi feito, seguido de desprendimento após a confluência ter sido atingida. O subcultivo foi realizado até que $1x10^7$ a $5x10^7$ de SMDCs fossem atingidas.

[168] Isolamento de células murinas progenitoras miogênicas derivadas do músculo esquelético (mMPCs)

[169] MPCs murinas foram obtidos a partir de biópsias de músculo esquelético de Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J, em resumo, ratos TdTomato (Jackson Laboratory, Maine, EUA). Camundongos adultos foram sacrificados por deslocamento cervical seguido de repuxamento da pele das costas e descolamento da pele. Em seguida, o músculo esquelético foi obtido dos músculos *longissimus dorsi*, *gastrocnemius* e *tibialis anterior* com uso de tesoura e bisturi. Os músculos foram transferidos para uma placa de Petri estéril e cobertos com PBS 1X. Em seguida, usando uma

pinça e um bisturi, o tecido conjuntivo remanescente foi removido do músculo esquelético e descartado. Posteriormente, o tecido muscular foi digerido usando o kit de dissociação do músculo esquelético (MiltenyiBiotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A fim de separar células progenitoras miogênicas (mMPCs) de SMDCs não miogênicas, um kit de isolamento de células satélite (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. As mMPCs coletadas e as SMDCs não miogênicas foram centrifugadas como acima e ressuspensas em meio de crescimento de camundongo, consistindo em DMEM/F12 de Ham suplementado com 20% de FCS e bFGF. As SMDCs murinas foram cultivadas em frascos de cultura revestidos com colágeno, preparados cobrindo a superfície dos frascos de cultura com colágeno I da cauda de rato diluído 1:10 de PBS 1X por 1 hora a 37°C. Os subcultivos foram realizados como para SMDCs humanas. Finalmente, as células foram destacadas das paredes do recipiente de cultura de células ressuspensas em meio e usadas imediatamente ou criopreservadas em nitrogênio líquido até uso posterior.

[170] Isolamento de células estromais mesenquimais multipotentes derivadas de músculo esquelético humano (MSCs)

[171] As MSCs foram isoladas de acordo com Thurner et al. 2018. Primeiro, as SMDCs foram isoladas de biópsias musculares (*Musculus pectoralis major* ou *Latissimus dorsi*) e expandidos em um ambiente cGMP. As células foram mantidas por métodos de cultura de células padrão. Resumidamente, as células foram cultivadas em meio de crescimento contendo meio basal F-10 de Ham suplementado com 10% de FCS (inativado

a 57°C, 40 minutos), bFGF e gentamicina e incubadas a 37°C, 5% de COC. O meio de crescimento foi trocado a cada 2 a 3 dias. Para subcultura e colheita, as células foram lavadas uma vez com PBS 1X e incubadas com solução de tripsina 1X por 5 minutos a 37°C. As células foram enxaguadas com meio de crescimento e centrifugadas a 400*g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio de crescimento. Next, Em seguida, as MSCs foram purificadas por classificação magnética de células ativadas (MACS). Portanto, o kit MicroBeads CD56 humano (MiltenyiBiotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemanha) foi usado. Em resumo, após a colheita e contagem, as células foram centrifugadas a 400*g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 10mL de tampão-MACS. Após outra etapa de centrifugação (400*g por 10 minutos), o sedimento foi ressuspenso em 80µL de tampão-MACS. Subsequentemente, 20µL de anticorpo CD56 magnético foram adicionados por $1*10^7$ células e incubadas por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, a triagem das células foi realizada com Mini MACS Separator e MSCs CD56- foram coletadas no fluxo. Finalmente as células foram ressuspensas em meio e criopreservadas em nitrogênio líquido até uso posterior ou usadas imediatamente.

[172] .

[173] Exemplo 2 - Transdiferenciação de SMDCs para iSMCs e isolamento destas

[174] MPCs, MPCs murinas ou MSCs conforme obtidas no

Exemplo 1, foram semeadas nas paredes de um recipiente de cultura e cultivadas com meio de crescimento até uma confluência de cerca de 70%. Então, as células foram lavadas com DMEM/F12 (Thermo Scientific, MA, EUA). Em seguida, as células foram cobertas com meio de diferenciação de músculo liso, consistindo de DMEM/F12 suplementado com TGFb1 humano recombinante (Thermo Scientific, MA, EUA), sal sódico de heparina da mucosa intestinal suína (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EUA), soro fetal de vitelo inativado por calor (57° C, 40 minutes) (Gibco, Thermo Scientific, MA, EUA) e gentamicina (Sandoz GmbH, Tirol, Áustria) para uma concentração final de 10ng/ml, 3,84µg/ml e 5% (v/v), respectivamente. Finalmente, as células foram cultivadas em meio de diferenciação de músculo liso por 3-6 dias a 37°C, 5% de COC. O meio foi trocado a cada 3-4 dias. Para o isolamento, as células foram destacadas das paredes dos recipientes de cultura e coletadas em suspensão.

[175] Exemplo 3 - Potencial de diferenciação de SMDCs

[176] Para a diferenciação *in vitro* adipogênica-, condrogênica- e osteogênica, cada 500.000 células obtidas pelo Exemplo 1 foram semeadas em placas de 6 poços (NUNC, Thermo Scientific, MA, EUA) e cultivadas em meio de crescimento por 24 horas a 37°C, 5% de COC. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com 5ml de DMEM/F12 de Ham e cobertas com 5ml de cada meio de diferenciação: adipogênico-, condrogênico- ou osteogênico. Os meios de diferenciação adipogênico, condrogênico e osteogênico consistindo em StemXVivo™ Osteogenic/Adipogenic Base Medium (R&D Systems Inc., MN, EUA), suplementado com StemXVivo Human/Mouse/Rat

Adipogenic (R&D Systems Inc., MN, EUA), StemXVivo Human Osteogenic Supplement (R&D Systems Inc., MN, EUA), ou STEMPro® Chondrogenesis Supplement (Gibco®, Thermo Scientific, MA, EUA), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. Os meios de diferenciação foram suplementados com gentamicina (Sandoz GmbH, Áustria) para atingir um resultado de concentração de 3,83µg/ml. As células foram cultivadas cada uma por 14 dias nos respectivos meios de diferenciação, que foram trocados a cada 2-3 dias. Após 14 dias de cultivo, a diferenciação bem-sucedida foi avaliada pela presença de adipócitos, condrócitos e osteócitos visualizados por coloração com Oil Red O (adipócitos), Alcian Blue (condrócitos) e Alizarin Red S (osteócitos), respectivamente. A quantificação da coloração com Oil Red O, Alcian Blue e Alizarin Red S foi realizada em imagens microscópicas de vários experimentos individuais pelo pacote do software ImageJ. Portanto, as imagens foram carregadas e os canais de cores divididos. Canais vermelhos foram usados para colorações de Oil Red O e Alizarin Red S, enquanto o canal azul foi utilizado para colorações de Alcian Blue. O fundo foi eliminado pela definição de um limite comum e a intensidade média de pixels por campo foi adquirida para quantificação por ImageJ. A comparação estatística foi realizada pelo teste-t não pareado, considerando um $p<0,05$ como significativo (*). $p<0,01$, $p<0,001$ visualizado como * ou **, respectivamente. A diferenciação do músculo esquelético foi iniciada em cultura de células em placas de plástico Nunc1on™ Delta Surface de 24 poços (Thermo Scientific, MA, EUA) substituindo o meio de crescimento por meio de diferenciação de células musculares esqueléticas (500mL, PromoCell GmbH, Alemanha), suplementado

com 10mL de Pacote de Suplemento de Meio de Diferenciação de Células Musculares Esqueléticas (PromoCell GmbH, Alemanha) e 240µL de gentamicina (8mg/mL, Sandoz GmbH, Áustria) conforme descrito anteriormente (Thurner et a1., 2018).

[177] MPCs e MSCs obtidas pelo Exemplo 1 foram testadas quanto à diferenciação *in vitro* em linhagem adipogênica, condrogênica, osteogênica e miogênica esquelética sob as condições de cultura apropriadas. A coloração para adipócitos, condrócitos, osteócitos e miotubos foi realizada como descrito acima. Células positivas para Oil Red O e Alizarin Red S estavam ausentes nas MPCs e apenas níveis baixos de células de Alcian Blue puderam ser detectados. Dentro das MSCs, células positivas para Oil Red O, Alcian Blue e Alizarin Red S foram encontradas após cultivo em meio de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, respectivamente (Figura 1A, B), confirmando seu enriquecimento de células multipotentes e status de células estromais mesenquimais multipotentes como definido pela International Society for Cellular Therapy (Dominici et a1., 2006). Miotubos multinucleados positivos para desmina foram detectados apenas dentro de MPCs (Figura 1A). A quantificação das intensidades de coloração de Oil Red O, Alcian Blue e Alizarin Red S após a diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica *in vitro*, respectivamente, bem como o cálculo do índice de fusão após a diferenciação miogênica esquelética de MSCs e MPCs, revelou uma intensidade de coloração significativamente maior em Oil Red O ($p=0,0117$), Alcian Blue ($p=0,0020$) e Alizarin Red S ($p=0,0012$) de MSCs comparadas a MPCs, ao passo que um índice de fusão significativamente maior ($p = 0,0007$) foi encontrado dentro das MPCs em comparação com

as MSCs (Figura 1B).

[178] Assim, as MPCs são células oligopotentes mesenquimais, comprometidas com a linhagem miogênica. Além disso, as MSCs são multipotentes e capazes de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica *in vitro*.

[179] Exemplo 4 - Expressão do marcador de superfície

[180] Para determinar a expressão do marcador de superfície, a citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo Guava easyCyte 6HT 2L (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Resumidamente, as células obtidas pelo Exemplo 1 foram colhidas cobrindo com 1X tripsina a 37°C por 5 minutos, centrifugadas a 400*g e ressuspensas em 1X PBS suplementado com 1% de FCS. 40 000 células foram ressuspensas em 195µ1 de 1X PBS e incubadas após adição de 5µL de CD34-PE, CD56-PE, CD146-PE, IgGl-PE, IgG1-FITC, CD90-PE, CD105-PE, (todos de Beckman Coulter, CA, EUA), CD49a- FITC (Miltenyi Biotec, Alemanha) ou CD73-PE (Becton Dickinson, NJ, EUA) por 30 minutos em um tubo Eppendorf de 1,5mL a 4°C no escuro. Em seguida, as células foram lavadas com 1mL de PBS, centrifugadas a 400*g por 10 minutos e ressuspensas em 195µL de 1X PBS em uma placa de fundo redondo de 96 poços. Em seguida, cada reação recebeu 5µL de corante de viabilidade 7- aminoactinomicina D (Beckman Coulter Inc., França) e a placa foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Finalmente, os eventos de células foram adquiridos com o software Guava InCyte™ v.2.3. Histogramas e gráficos de pontos foram gerados com um mínimo de 5000 eventos a uma taxa de fluxo de amostra de 1,8µL/mL. A coloração positiva

foi obtida por comparação com o controle de isotipo definido como pelo menos 95% negativo ou comparação com células de controle (negativas).

[181] A fim de caracterizar MPCs e MSCs, pelo menos 4 amostras de pacientes individuais obtidas por métodos usados no Exemplo 1, bem como iSMCs derivadas destas por métodos usados no Exemplo 2, foram testadas quanto à presença de marcadores de linhagem mesenquimal (CD105, CD90 e CD73), marcador hematopoiético (CD34), marcador miogênico (CD56) e marcador de linhagem de músculo liso (CD146). Uma porcentagem média de células positivas de > 50 foi considerada positiva, enquanto uma média de <50 foi considerada negativa. Portanto, todos os tipos de células foram considerados positivos para CD105, CD90 e CD73, mas foram negativos para CD34 (Figura 2). Além disso, as MPCs e iSMCs derivadas destas eram CD56+, mas as MSCs e iSMCs derivadas destas eram CD56-.

[182] Curiosamente, a expressão do marcador de superfície CD146, associado ao comprometimento do músculo liso vascular de MSCs (Espagnolle et al., 2014), e CD49a, expresso durante o desenvolvimento do músculo liso (Belkin et al., 1990), foi negativa em ambas as MPCs e MSCs, mas positivas em iSMCs derivadas destas (Figura 2).

[183] Exemplo 5 - Expressão de marcador intracelular

[184] A coloração de imunofluorescência foi realizada para detectar a expressão do marcador intracelular diretamente em

placas de 24 poços revestidas com gelatina ou lamínulas de vidro colocadas em placas de 6 poços, conforme descrito antes (Thurner et al., 2018). Para a marcação imunológica fluorescente de alfa-actina de músculo liso (aSMA), smootelina ou desmina, as células foram incubadas com um músculo liso anti-actina alfa de camundongo (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EUA), anti-smootelina de camundongo (Merck Millipore, MA, EUA), anticorpo anti-miosina de músculo liso de cadeia pesada (Merck Millipore, MA, EUA) ou anticorpo anti-desmina de coelho (Thermo Scientific, MA, EUA), respectivamente, cada um diluído 1:100 em meio de bloqueio, quando usados. Utilizaram-se anticorpos secundários conjugados de cabra anti-rato Alexa488 de ou de burro anti-coelho Alexa547 (Thermo Scientific, MA, EUA), diluídos a 1:200 em meio de bloqueio. A contracoloração dos núcleos foi realizada incubando as células com Hoechst33342 (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EUA), diluído para uma concentração final de 2µg/mL em PBST (0,1% de Triton X-100). As células foram montadas com Entellan (Merck Millipore, MA, EUA) e seladas com lamínulas de vidro. As colorações foram comparadas para (1) procedimentos sem anticorpos primários e (2) células negativas para os anticorpos testados. A fim de quantificar o número de células positivas, sobreposições de Hoechst e colorações de anticorpos foram realizadas e várias imagens de pelo menos três preparações de células independentes foram analisadas. O número total de células positivas para coloração de anticorpo foi dividido pelo número total de células (núcleos) conforme avaliado com coloração Hoechst. Os valores médios e de erro padrão foram calculados para comparar as células obtidas pelos Exemplos 1 e 2.

[185] MPCs e MSCs obtidas pelo Exemplo 1, bem como iSMCs derivadas destas, conforme descrito no Exemplo 2, foram analisadas quanto à expressão de proteínas do músculo liso contrátil intracelular (aSMA, Smootelina), bem como o marcador miogênico geral desmina por imunocoloração fluorescente. MPCs e MSCs eram aSMA- e Smootelina-. Em contraste, em iSMCs isoladas de ambas, MSCs e MPCs, foram encontradas aSMA+ (Figura 3). Além disso, em iSMCs isoladas de MPCs no Exemplo 2 foram encontradas Smootelina+. A análise da expressão intracelular de Desmina revelou que as MSCs e as iSMCs isolados destas são Desmina-. Em contraste, ambas as MPCs e iSMCs isoladas destas são Desmina+ (Figura 3).

[186] Exemplo 6 - Expressão gênica

[187] O RNA total de 1 x 10^6 MPCs ou MSCs, cada qual obtida como mostrado no Exemplo 1 e iSMCs derivadas destas como mostrado no Exemplo 2, foi isolado pelo RNEasy Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções dos fabricantes. A preparação da amostra para hibridização de *microarray* foi realizada conforme descrito nos manuais NuGEN Ovation PicoSL WTA System V2 e NUGEN Encore Biotin Module (NuGEN Technologies, Inc, San Carlos, CA, EUA). As matrizes hibridizadas foram lavadas e coradas em Affymetrix Fluidics Station FS450, e os sinais fluorescentes foram medidos com Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. A fluídica e as funções de varredura foram controladas pelo software Affymetrix GeneChip Command Console v4.1.3. O processamento da amostra foi realizado em Affymetrix Service Provider e Core Facility, “KFB - Center of Excellence for Fluorescent Bioanalytics”

(Regensburg, Alemanha).

[188] Sinais de conjunto de sondas resumidos em escala log2 foram calculados usando o algoritmo RMA com Affymetrix GeneChip Expression Console v1.4 Probeset IDs com a maior alteração de log2 entre MPCs e iSMCs MPCs-, e foram usados análise subsequente e comparação com as alterações de log2 entre MSCs e iSMCs MSCs-. A visão geral de todos os genes analisados e as respectivas alterações de log2 entre MSCs e iSMCs MSCs-, bem como entre MPCs e iSMCs MPC- é demonstrada na (Figura 12). Alteraçoes de Log2 >1 foram consideradas para marcar uma regulação positiva e, portanto, são marcadas com um asterisco (*). Os mapas de calor foram gerados com o software Multiple Expression Viewer (MeV 3.1.0), a fim de visualizar mudanças de log2 e realizar agrupamento hierárquico, bem como agrupamento de k-médias de acordo com a distância euclidiana.

[189] Uma análise de *microarray* foi realizada para estudar mudanças na expressão gênica associada ao isolamento de iSMCs na presente invenção. Smootelina (SMTN), calponina1 (CNNI), tropomiosina1 (TPMI), transgelina (TGLN, SM22), integrina-alpha-3 (ITGA3), integrina-alpha-1 (ITGA1, CD49a) vinculina (VCL) e molécula de adesão celular de melanoma (MCAM, CD146) (Espagnolle et a1., 2014; Miano, 2010; Xie et a1., 2011), bem como o gene de comprometimento miogênico desmina (DES) (Capetanaki et a1., 1997) junto com todos os genes necessários para a contração do músculo liso vascular (“KEGG PATHWAY: Vascular smooth muscle contraction - Homo sapiens (human),” n.d.) foram analisados em detalhe.

Mudanças na expressão gênica entre MPCs e iSMCs derivadas destas foram comparadas com aquelas entre MSCs e iSMCs derivadas destas. Considerando um log2 FC de 1 ou mais e um log2 FC de -1 ou menos como uma regulação para cima e para baixo, respectivamente, 20,33 porcento dos 123 genes testados foram para cima e somente 3,25 porcento foram regulados para baixo durante a diferenciação de MPCs para iSMCs MPCs-, sugerindo uma diferenciação para um fenótipo de célula de músculo liso. Genes regulados positivamente do agrupamento KEGG ou genes marcadores de músculo liso conhecidos em iSMCs MPC- em comparação com MPCs foram *PPP1R14A, KCNMB1, PLCB4, ACTG2, ITPR1, ADCY6, CALCRL, KCNMA1, GNA13, CNNI, ADCY2, KCNMB4, GUCY1A3, ARAF, ITGA1, PPP1R12A, MAPK1, CALD1, KCNMB2, PRKACB, ARHGEF11, PPP1R12 C, ITPR2, PLCB1* e *SMTN* (Figura 12).

[190] Considerando um log2 FC de 1 ou mais e um log2 FC de -1 ou menos como uma regulação para cima e para baixo, respectivamente, 12,20 porcento dos 123 genes testados foram regulados para cima, e apenas 3,25 porcento para baixo durante a diferenciação de MSC para iSMCs MSC-, sugerindo uma diferenciação em direção a um fenótipo de célula de músculo liso. Genes regulados positivamente do agrupamento KEGG ou genes marcadores de músculo liso conhecidos em iSMCs MSC- em comparação com MSCs foram *ACTA2, ACTG2, CALD1, GNAQ, ITPR1, MAPK1, MYL9, KCNMA1, PLCB4, PPP1R14A, PRKCE, CNNI, TPMI, TAGLN* e *ITGA1* (Figura 12). Os achados que revelam a expressão gênica da codificação ITGA1 para CD49a, e SMTN que codifica as proteínas smootelina, mostram regulação positiva

em iSMCs MPCs-, apoiando nossos resultados de aumento da porcentagem de células positivas para CD49a e células positivas para smootelina em iSMCs MPCs-, em comparação com MPCs, confirmando assim a expressão do marcador de músculo liso de iSMCs MPCs-. A descoberta de que a expressão gênica da codificação ITGA1 para CD49a foi encontrada regulada positivamente em MSCs-iSMCs, apoia nossas descobertas de aumento da porcentagem de células positivas para CD49a em iSMCs MSCs- em comparação com MSCs, confirmando assim a expressão do marcador de músculo liso de iSMCs MPCs-.

[191] Embora a expressão da proteína de superfície CD146 (MCAM) tenha sido regulada positivamente em iSMCs MPCs-, a expressão do gene MCAM não foi regulada positivamente nos experimentos de *microarray*, sugerindo uma regulação pós-transcricional da expressão de CD146. Além disso, a análise de agrupamento *k-means* de log2 FC alterou as expressões gênicas em MPCs e MSCs durante a diferenciação em iSMCs MPCs- e iSMCs MSCs-, levou à identificação de genes similarmente regulados para cima (Figura 4A) e para baixo (Figura 4B) entre MPCs e MSCs quando iSMCs foram isolados destas, respectivamente. Enquanto *PP1R14A, ACTG2, PLCB4, ITPR1, MAPK1, CNNI, ITGA1 e KCNMA1* foram regulados para cima em ambas MPCs e MSCs, *PLA2G2A* foi regulado para baixo em ambos os tipos de células. No geral, 75,61 porcento dos genes testados são similarmente regulados para cima, para baixo ou nenhum dos dois regulados dentro de MPCs e MSCs após a diferenciação para iSMCs. Embora mais genes regulados para cima e menos genes regulados para baixo tenham sido encontrados em MPCs (20,33% regulados para cima e 3,25%

regulados para baixo) do que em MSCs (12,20% regulados para cima e 5,69% regulados para baixo), nenhuma diferença significativa na porcentagem de genes regulados para cima ou para baixo foi encontrada entre as MPCs e as MSCs (Figura 4C).

[192] Exemplo 7 - Competência de fusão

[193] A competência de fusão de MPCs e iSMCs de acordo com os Exemplos 1 e 2, respectivamente, foi avaliada de acordo com seu índice de fusão (FI). A fim de determinar o índice de fusão (FI), as células induzidas para a diferenciação do músculo esquelético no Exemplo 3, foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com PFA a 4% durante 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS e coradas com solução Hoechst33342 de 2µg/mL por 20 minutos. Para cada amostra, pelo menos três campos foram capturados durante a imagem de imunofluorescência e sobrepostos com imagens de contraste de fase para permitir a detecção fácil de núcleos e limites celulares. O índice de fusão foi calculado para cada campo de visão capturado dividindo o número de núcleos dentro dos tubos com o número total de núcleos por campo após o cálculo da média para todos os campos analisados. Apenas células com pelo menos 3 núcleos foram consideradas miotubos. Para análise estatística, pelo menos 3 populações derivadas de pacientes diferentes foram analisadas para cada grupo.

[194] A quantificação do FI demonstrou significativamente que mais MPCs foram submetidas à

miogênese esquelética em comparação com iSMCs isoladas destas no Exemplo 2, sugerindo uma diminuição no potencial miogênico esquelético de MPCs após o isolamento de iSMCs de MPCs. (Figura 5A). Além disso, os tubos formados por iSMCs continham significativamente menos núcleos do que os tubos formados por MPCs (Figura 5B). Tomadas em conjunto, as MPCs parecem competentes para a fusão, enquanto as iSMCs derivadas destas são consideradas competentes para a não-fusão.

[195] Exemplo 8 – Eletrofisiologia

[196] A análise de *patch-clamp* foi realizada em MPCs e iSMCs obtidas de acordo com os Exemplos 1 e 2 respectivamente, de acordo com um protocolo publicado anteriormente (Park et al., 2013), com ligeiras adaptações específicas do experimento. Os procedimentos foram conduzidos da seguinte forma: o registro eletrofisiológico foi realizado em uma configuração de célula inteira usando um amplificador de patch clamp Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City). Pipetas de patch com resistências de 1 a 4 MΩ foram feitas de vidro de borosilicato (GC150F-7.5, Clark Electromedical Instruments, UK) e preenchidas com solução de pipeta. Todos os dados foram digitalizados em uma interface DIGIDATA 1200 (Axon Instruments, Foster City), suavizados por meio de um filtro Bessel de quatro pólos e salvos em disco. Traços de corrente foram amostrados em 10kHz e filtrados em 2kHz. O pacote de software pClamp (Versão 10.0 Axon Instruments, Inc.) foi usado para aquisição de dados. Microcal Origin 7.0 foi usado para análise. Se não mencionado de outra forma, os reagentes foram obtidos de Sigma-Aldrich.

A corrente interna de canais Cav dependentes de voltagem foi evocada pela aplicação de pulsos de despolarização de 500-ms de um potencial de retenção de -50 a 50mV. Traços de corrente sobrepostos de canais Kv foram evocados por pulsos de despolarização em etapas entre -80 e 60mV em etapas de 20mV a partir de um potencial de retenção de 80mV em MPCs, iSMCs MPCs- e SMCs hBd-.

[197] Verificou-se que as células obtidas pelo Exemplo 2 não exibiam correntes internas ou externas sensíveis à voltagem de canais de cálcio dependentes de voltagem ou de potássio dependentes de voltagem, respectivamente. Pelo contrário, as iSMCs derivadas de MPCs, no Exemplo 2, mostraram ambas, correntes internas e externas sensíveis à voltagem, como também foi encontrado em SMCs hBd- (Figura 6). Resumindo, o isolamento de iSMCs por incubação com TGFb1 e heparina resulta em maturação funcional.

[198] Exemplo 9 - Contração de celulose de colágeno

[199] A fim de medir a contratilidade de MSCs e MPCs obtidas de acordo com o Exemplo 1, bem como iSMCs derivadas destas pelo Exemplo 2, foram semeadas na rede de gel de colágeno, e a redução do tamanho percentual do gel foi quantificada. Em detalhes, os meios de cultura de células sub-confluentes em vasos de cultura de células padrão foram removidos e as células foram lavadas duas vezes com 1X PBS. Em seguida, as células foram cobertas com tripsina e incubadas por 5 minutos a 37°C. Posteriormente, as células foram destacadas por meio de batidas contra as paredes do recipiente de cultura e ressuspensas após a adição de meio basal DMEM/F12 de Ham. Em seguida, as células foram centrifugadas a 400*g por 10 minutos.

[200] O sobrenadante foi removido e o sedimento celular ressuspenso em DMEM/F12 de Ham para obter 6*105 células por ml. Para cada gel, 400µl de suspensão celular foram misturados com solução de colágeno de 200µl de pele bovina (Thermo-Fisher Scientific, MA, EUA). Em seguida, 3µl de NaOH 0,1 M foi adicionado seguido por ressuspensão imediata e transferência de 500µl da mistura para um poço de uma placa de 24 poços (NUNC, Thermo-Fisher Scientific, MA, EUA). A placa de 24 poços foi então incubada durante 30 minutos a 37°C para permitir a formação do gel. Posteriormente, cada gel foi coberto com 500µl de DMEM/F12 de Ham e liberado do fundo da placa de 24 poços para flutuar na superfície usando uma ponta de pipeta estéril. Finalmente, os géis foram incubados a 37°C, 5% de COC por 24 horas para permitir a contração do gel pelas células incluídas. Para quantificar a contração do gel, fotos estereomicroscópicas foram tiradas e a área do gel foi calculada aplicando o software FIJI (ImageJ).

[201] As MPCs e MSCs isoladas de acordo com a etapa (a) da presente invenção (Exemplo 1) foram consideradas não contráteis no ensaio de contração de rede de gel de colágeno. Em contraste, as iSMCs isoladas de acordo com a etapa (b) da presente invenção (Exemplo 2) de MPCs e MSCs, mostraram contratilidade significativamente maior do que células originárias de (MPCs, MSCs). Em resumo, as SMDCs transdiferenciadas para iSMCs e isoladas de acordo com a etapa (b) (Exemplo 2) foram consideradas contráteis em comparação com as células isoladas na etapa (a) (Exemplo 1; Figura 7).

[202] Exemplo 10 - Regeneração de músculo liso usando iSMCs

[203] Para testar o potencial de iSMCs obtidas de acordo com o Exemplo 2 em termos de regeneração suave, iSMCs derivadas de MPCs murinas (obtidas de acordo com o Exemplo 1) foram injetadas no esfíncter pilórico de ratos fêmeas adultos SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}. Para isso, os ratos foram primeiro anestesiados com a aplicação de 100mg/kg de cetamina; 10 mg/kg de xilazina e 3 mg/kg de acepromazina por via intraperitoneal. Um creme protetor ocular foi aplicado durante o procedimento. As células criopreservadas foram descongeladas de forma fresca, lavadas uma vez com 1X PBS e centrifugadas a 400*g por 10 minutos seguido de ressuspensão das células em 1X PBS para atingir uma concentração final de 40.000.000 células/ml. Enquanto isso, os ratos que receberam as células foram colocados em uma placa de aquecimento para manter a temperatura corporal a 37°C. 25µl da suspensão de células (contendo 1.000.000 células) foram então misturadas com esferas de poliestireno FluoSpheres de 5µl, 15µl, amarelo-esverdeado ou azul (Thermo-Fisher Scientific, MA, EUA), necessário para rastrear o local da injeção depois da cirurgia. Para injeção de iSMCs no esfíncter pilórico, uma laparotomia mediana foi realizada seguida pela localização da região do esfíncter pilórico e aplicação de uma mistura de células-fluosfera de 30µl usando uma agulha 28G acoplada a uma seringa de 1ml. O peritônio e a camada músculo-pele foram fechados separadamente por pontos consecutivos com PDS Ethicon 6-0 de monofilamentos mais absorvíveis. No pós-operatório, 200mg de Novalgin (Metamizol) por quilograma de peso corporal foram aplicados por via subcutânea durante três dias. 12 semanas após a injeção de células, os ratos

foram sacrificados por deslocamento cervical para obter uma imagem dos músculos do esfíncter pilórico.

[204] A imagem das regiões frescas do esfíncter pilórico isoladas foi realizada com um IVIS Spectrum (PerkinElmer, MA, EUA) usando o software Living Imaged versão 4.5.2 (PerkinElmer, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Resumindo, os esfíncteres pilóricos de ratos SHO injetados e de controle foram colocados em uma placa de Petri de vidro e colocados dentro do sistema IVIS. Foram tiradas fotos de fluorescência a uma altura de 2cm com tempos de exposição automatizados para os comprimentos de onda de absorção e emissão correspondentes de TdTomato e esferas amarelas da Fluosfera. No teste Post hoc, as intensidades do sinal foram ajustadas a fim de se livrar dos sinais de fundo, comparando com explantes de esfíncter de ratos de controle.

[205] Para análise histológica, os animais foram profundamente anestesiados com isoflurano e sacrificados por deslocamento cervical. O tecido de interesse foi imediatamente dissecado e crio-fixado mergulhando em 2-metilbutano resfriado com nitrogênio líquido. O tecido foi cortado a 15µm em um criostato Leica 1950 e as fatias foram coletadas em lâminas Superfrost plus e mantidas a -20°C até o processamento posterior. Para a análise imuno-histológica, as secções foram fixadas com PFA a 4% e lavadas com PBS contendo Tween-20 a 0,1% (Sigma-Aldrich). O bloqueio e a diluição dos anticorpos foram realizados com solução de PBS contendo fração de albumina sérica bovina 1% (Sigma-Aldrich), gelatina de pele de peixe 0,2% (Sigma-Aldrich) e

Tween-20 0,1% (Sigma-Aldrich). Os anticorpos primários contra tdTomato (Sicgen) ou aSMA (Thermo Scientific, MA, EUA) foram diluídos a 1:100 em meio de bloqueio após a incubação, realizada durante a noite a 4°C. Anticorpos secundários (Thermo Scientific) foram diluídos a 1:500 e aplicados em temperatura ambiente por 4 horas. Os núcleos foram corados com DAPI diluído para concentração de trabalho de 0,5µg/ml (Sigma-Aldrich). As fatias foram posteriormente montadas usando Prolong Gold Antifade (Life Technologies). Imagens de fluorescência foram adquiridas usando um microscópio confocal LSM 710 e ZEN 2011 Black Software (Carl Zeiss).

[206]Os inventores descobriram que as iSMCs isoladas de acordo com o Exemplo 2 da proteína relatada em TdTomato expressando MPCs obtidas de acordo com o Exemplo 1, eram detectáveis e co-localizadas com grânulos fluorescentes co-injetados no local do esfíncter pilórico 12 semanas após a implantação, sugerindo o enxerto de iSMCs no local da injeção. O exame histológico seguido por imunocoloração de fluorescência para TdTomato e aSMA sugeriu que células iSMCs positivas para TdTomato foram encontradas no músculo circular do esfíncter pilórico, bem como na mucosa muscular próxima a esferas fluorescentes co-injetadas (Figura 8). Células iSMCs TdTomato positivas localizadas dentro da camada de músculo liso do esfíncter pilórico também expressaram a proteína aSMA, sugerindo não apenas o enxerto no tecido muscular liso, mas também características fenotípicas conservadas das células musculares lisas após o enxerto necessário para a regeneração do músculo liso (Figura 8).

[207] Exemplo 11 - músculos lisos de engenharia de tecidos

[208] Para testar a adequação das células obtidas pelos métodos aqui descritos para uso em engenharia de tecidos, o cultivo de células 3D foi realizado. Um método que permite a produção de estruturas semelhantes a esfíncter em forma de anel já conhecido na técnica (Gwyther et al., 2011) foi empregado usando células obtidas de acordo com o Exemplo 1 ou 2. Para produzir vasos de cultura para cultivo 3D, um modelo com entalhes em formato de anel (diâmetro interno de 4mm; diâmetro externo de 10mm) foi feito de aço inoxidável a fim de produzir um molde negativo de PDMS resistente à autoclave. Em seguida, uma solução de agarose a 2% (p/v) foi preparada pesando em 5g de agarose de baixa gelificação (Sigma-Aldrich, MA, EUA) em um frasco Schott cheio até 250ml com meio basal F10 de Ham. Em seguida, tanto o modelo de PDMS quanto a solução de agarose foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. Posteriormente, o modelo de PDMS foi preenchido com a solução de agarose em condições estéreis, seguido de incubação em temperatura ambiente por 1 hora para deixar a agarose solidificar. Em uma próxima etapa, a agarose solidificada foi liberada do modelo de PDMS, em cubos contendo, cada um, um modelo em forma de anel, que foram cortados da agarose e transferidos para uma placa de 6 poços preenchida com 2ml de meio basal F10 de Ham seguido de armazenamento a 37°C até uso posterior. Para o cultivo 3D, as células obtidas no Exemplo 1 foram centrifugadas a 400*g durante 10 minutos e o sedimento celular foi ressuspenso em meio de cultura para atingir uma concentração de 5 x 10^6

células/ml. Em seguida, 200µl da suspensão de células foram adicionados ao molde de agarose, seguido por incubação a 37°C por 48 horas sem mais distúrbios para permitir a formação do anel das células. Após o tempo de incubação, o meio fora do molde dentro da placa de 6 poços foi descartado e a placa de 6 poços foi cuidadosamente preenchida com 5ml de meio conforme usado no Exemplo 1 para produzir MPCs ou MSCs cultivadas em 3D ou qualquer destas últimas conforme usado no Exemplo 2 para produzir culturas 3D de iSMCs. As células foram cultivadas por 6 dias para permitir a maturação a 37°C, em 5% de COC até a análise. Após 6 dias de cultivo, as células foram analisadas por microscopia de luz padrão, crio-corte seguido de imunocoloração (Exemplo 12) ou coloração H&E, microscopia eletrônica de varredura ou corte semi/ultrafino seguido por coloração com azul de toluidina ou microscopia eletrônica de transmissão. MPCs derivadas de acordo com o Exemplo 1, que foram transdiferenciadas para iSMCs como descrito no Exemplo 2, formaram esfíncteres em forma de anel, empregando os métodos descritos acima com base em Gwyther et al., 2014 (Figura 9).

[209] Exemplo 12 - Crio-seccionamento e imunocoloração

[210] Para análise histológica de culturas 3D em forma de anel (esfíncteres de bioengenharia) obtidas de acordo com o Exemplo 11, os anéis foram cuidadosamente removidos do molde de agarose e, usando uma colher estéril, lavados por transferência para um tubo Eppendorf preenchido com 1XPBS e, então, fixados e permeabilizados por submersão em MetOH pré-arrefecido a -20°C durante 5 minutos. Em seguida, os anéis foram lavados por diluição de MetOH três vezes com 1XPBS

após a remoção de metade da solução. Os esfíncteres modificados pela bioengenharia foram fixados por criogenia mergulhando em 2-metilbutano resfriado com nitrogênio líquido. Os espécimes foram cortados a 15µm em um criostato CM1950 (Leica, Alemanha), e as fatias foram coletadas em lâminas Superfrost plus (Thermo-Fisher Scientific, MA, EUA) e mantidas a -20°C até o processamento posterior. O bloqueio e a diluição do anticorpo foram realizados usando uma solução de PBS contendo 1% de fração de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EUA), 0,2% de gelatina de pele de peixe (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EUA) e 0,1% de Tween-20 (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EUA). O anticorpo primário aSMA (Thermo-Fisher Scientific, MA, EUA) foi diluído a 1:100 em meio de bloqueio seguido de incubação durante a noite a 4°C. Anticorpos secundários (Thermo-Fisher Scientific, MA, EUA) foram diluídos a 1:500 e aplicados em temperatura ambiente por 4 horas. Os núcleos foram corados com DAPI diluído à concentração de trabalho de 0,5µg/ml (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EUA), e os filamentos de actina foram corados por incubação com Phalloidin (Thermo-Fisher Scientific, MA EUA) diluído a 1:100 em PBS para 20 minutos à temperatura ambiente. As fatias foram posteriormente montadas usando Prolong Gold Antifade (Thermo-Fisher Scientific, MA, EUA). As imagens de fluorescência foram adquiridas usando um microscópio invertido Nikon Eclipse TE2000-U.

[211] Verificou-se que as células dentro dos anéis de tecido obtidos de acordo com o Exemplo 10 eram positivas para alfa actina de músculo liso e desmina (Figura 10).

Considerando que, dentro dos anéis de tecido derivados de MPCs, aSMA foi expressa especialmente por células na camada externa do anel, dentro de iSMCs contendo anéis de tecido, as células que expressam aSMA foram distribuídas ao longo do anel total. Em detalhe, mais células dentro dos anéis que se formaram a partir de MPCs diferenciadas para iSMCs durante o cultivo 3D de acordo com a combinação do Exemplo 2 e 10 foram encontrados para expressar aSMA do que células dentro de anéis que se formaram a partir de MPCs (Figura 10). Em contraste, a desmina foi expressa em todos os anéis de tecido em ambos os anéis de tecido derivados de MPCs e iSMCs (Figura 10).

[212] Exemplo 13 - Microcopia eletrônica de varredura

[213] A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no departamento de histologia e embriologia da Universidade Médica de Innsbruck, felizmente com a ajuda de Angelika Flörl e Kristian Pfaller. Para a análise de células cultivadas em 3D obtidas pelos Exemplos 1 e 2 (conforme descrito na seção 3.2.26) por microscopia eletrônica de varredura, os anéis foram liberados de modelos de agarose, lavados uma vez em um tubo Eppendorf de 1,5ml com 1x PBS e, em seguida, fixados com MetOH pré-resfriado (-20°C), seguido por 1 hora de pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1%, desidratação com EtOH e secagem de ponto crítico em secador Bal-Tec CPD 030 de ponto crítico (Balzers, Lichtenstein). Os espécimes foram montados com cimento de carbono condutor Leit-C, após Göcke (Plano GmbH, Wetzlar, Alemanha), em tocos de alumínio revestidos por pulverização catódica com 15nm de Au/Pd (Balzers) e examinados em um microscópio eletrônico de

varredura Gemini 982 (Carl Zeiss). As MPCs obtidas de acordo com o Exemplo 1 e transdiferenciadas para iSMCs como descrito no Exemplo 2 durante o cultivo 3D (Exemplo 2), pareceram alongadas e como parte integrante do anel de tecido na superfície dos anéis de tecido que se formaram no Exemplo 10 (Figura 9). As células pareciam intactas na superfície do anel e potencialmente viáveis (Figura 9).

[214] Exemplo 14 - Microscopia eletrônica de transmissão

[215] A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada em anéis de tecido obtidos de acordo com o Exemplo 10. Portanto, os anéis foram liberados do molde de agarose e transferidos para um tubo Eppendorf de 1,5ml cheio com 1XPBS para lavagem. Em seguida, as amostras foram transferidas para um tubo Eppendorf fresco cheio com glutaraldeído de 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) para fixação e armazenamento (4°C). Após pelo menos 24h de fixação, os anéis foram lavados duas vezes com tampão fosfato e fixados em OsO4 de 1% por 45 minutos. Em seguida, os anéis foram lavados três vezes com água destilada, a cada 15 minutos. Em seguida, os anéis foram desliquidificados em concentrações crescentes de EtOH (70, 80, 90, 100%), a cada 30 minutos e então incubados duas vezes em 100% de acetona fresca a cada 20 minutos. Em seguida, os espécimes foram incluídos em misturas a 2:1 de Aceton-Epon por 150 minutos, seguido de incubação em mistura a 1:2 de Aceton-Epon durante a noite. Finalmente, os anéis foram incubados em Epon puro girando em um rotador por 24 horas com uma troca de Epon após 8 horas. Para a polimerização de Epon, os anéis foram incubados a 60°C por 24 horas. Os espécimes incluídos em Epon foram aparados

usando um Ultratrim (Reichert) e seções ultrafinas foram obtidas usando um Ultracut S (Reichert). Os cortes ultrafinos foram visualizados a 80kV com um CM120 TEM (da Philips / FEI) equipado com uma câmera MORADA CCD (da Olympus / SIS).

[216] A microscopia eletrônica de transmissão de anéis de tecido obtidos de acordo com o Exemplo 10 revelou que as células formaram cavéolas perto de sua membrana plasmática (Figura 11 A e B). Além disso, verificou-se que as células dentro dos anéis de tecido tinham uma estrutura de actina dominante (Figura C), que em algumas partes das células formavam estruturas compactadas densas, como corpos densos (Figura D).

[217] Exemplo 15 - Expressão de marcador de superfície de iSMCs MPC- murinas

[218] Para determinar a expressão do marcador de superfície de iSMCs MPC- murinas, a citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo Guava easyCyte 6HT 2L (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Resumidamente, as iSMCs MPC- murinas obtidos pelo Exemplo 1 foram usadas para procedimentos de coloração de anticorpos de um painel de triagem de marcadores de superfície de células de camundongo comercialmente disponível (BD biosciences, NJ, EUA). Portanto, as células foram suspensas em meio de crescimento a uma concentração de $1,25*10^6$ células por ml e alíquotas de suspensão de células 100µl foram misturadas com todos os anticorpos primários em placas de 96 poços, de acordo com as instruções dos fabricantes. A mistura foi incubada por 30 minutos a 4°C seguida pela adição de meio de crescimento de

100µl a cada poço, centrifugação das placas por 5 minutos a 300*g, remoção do sobrenadante, adição de meio de crescimento 200µl a cada poço, outra centrifugação, remoção do sobrenadante e ressuspensão das células em anticorpos secundários biotinilados de 100µl (preparados de acordo com as instruções do fabricante). As células foram incubadas novamente por 30 minutos a 4°C, seguido pela adição de meio de crescimento de 100µl a cada poço, centrifugação das placas por 5 minutos a 300*g, remoção do sobrenadante, adição de meio de crescimento 200µl a cada poço, outra centrifugação, remoção do sobrenadante e ressuspensão das células em 100µl com estreptavidina conjugada com Alexa647 (preparada de acordo com as instruções do fabricante). As células foram incubadas novamente por 30 minutos a 4°C, seguido pela adição de meio de crescimento 100µl a cada poço, centrifugação das placas por 5 minutos a 300*g, remoção do sobrenadante, adição de meio de crescimento 200µl a cada poço, outra centrifugação, remoção do sobrenadante e ressuspensão das células em F10 de Ham a 200µl suplementado com FCS 10%. Finalmente, os eventos de células foram adquiridos com o software Guava InCyte™ v.2.3. Histogramas e gráficos de pontos foram gerados com um mínimo de 5000 eventos a uma taxa de fluxo de amostra de 1,8µL/mL. A coloração positiva foi obtida por comparação com o controle de isotipo definido como pelo menos 95% negativo ou por comparação com células de controle (negativas). Verificou-se que as iSMCs murinas do Exemplo 3 eram CD49e- (Figura 13).

[219] Exemplo 16 - Análise de marcador intracelular por citometria de fluxo

[220] Resumidamente, MPCs e iSMCs MPC- obtidas pelo Exemplo 1 foram colhidas cobrindo as células aderentes com 1X de tripsina a 37°C por 5 minutos, e após o desprendimento as células foram centrifugadas a 400*g. As células foram contadas e aliquotadas para atingir 50.000 células/reação, que então foram centrifugadas a 400 x g, e em seguida foram ressuspensas em solução de fixação e permeabilização BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, Pharmingen™) e incubadas a 4°C por 20 min. Em seguida, as células foram lavadas com BD Perm/Wash Buffer (diluído a 1:10 em água destilada) (BD Biosciences, Pharmingen™) e centrifugadas. As células foram, então, ressuspensas em 1x PBS e incubadas com IgG Isotype Control- Alexa488 (Bioss Antibodies Inc., MA, EUA) ou anti-Pax-7-Alexa488 (Bioss Antibodies Inc., MA, EUA) por 1h a 4°C no escuro. Posteriormente, as células foram centrifugadas, lavadas com tampão BD Perm/Wash (diluído a 1:10 em água destilada) e, após uma etapa final de centrifugação, ressuspensas em 1x PBS. Os eventos de células foram adquiridos usando o software Guava InCyte™ v.2.3. Os histogramas foram gerados com um mínimo de 3000 eventos com uma taxa de fluxo de amostra de 1,8µl/ml. A porcentagem de células positivas foi obtida por comparação com o controle de isotipo definido como 99% negativo.

[221] Exemplo 17 — Análise das atividades enzimáticas

[222] Medição da atividade da acetilcolinesterase

[223] Preparação de reagente e padrão:

[224] O tampão de fosfato da American Public Health Association (APHA), pH 7,2 (Sigma-Aldrich Co. LLC, Alemanha)

foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, 17g de mistura em pó (fosfato monopotássico a 22,66g/L e carbonato de sódio a 7,78g/L) foram adicionados a 400mL de água destilada. Após a adição de 0,5mL de Triton X-100, a mistura foi dissolvida em um agitador magnético por 30 minutos em temperatura ambiente. O volume final foi completado em 500mL em uma proveta e foi usado sem diluição adicional. O tampão foi armazenado a 4°C até o uso. O reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico, DTNB a 0,5mM) foi preparado de forma fresca para cada ensaio de AChE pesando 2mg em tubo Eppendorf de 1,5mL. Foi dissolvido em 1mL de tampão fosfato (pH 7,2 com 0,1% de triton X-100) por agitação em vórtex durante 1-2 minutos. O volume final foi feito para até 10mL em um tubo *falcon* de 15mL com tampão fosfato (pH 7,2, com 0,1% de triton X-100) e foi armazenado a 4°C até o uso. O tioiodeto de acetilcolina (ATI, 5,76mM) foi preparado de forma fresca para cada ensaio de AChE, pesando 2mg em tubo Eppendorf de 1,5mL. Foi dissolvido em 1,2mL de água destilada em vórtex durante 1-2 minutos e depois armazenado a 4°C até a utilização.

[225] As diluições padrão de AChE foram preparadas em tampão fosfato (pH 7,2 com triton X-100 0,1%) e imediatamente utilizadas. Um estoque de AChE de 50U/mL pronto para uso (da Electrophorus Electricus) foi comprado da AAT Bioquest Inc., Sunnyvale, CA, EUA. Foi diluído para preparar 1000mU/mL de AChE de acordo com as instruções do fabricante, que foi posteriormente diluído em uma proporção de 1:2 para obter 8 diluições diferentes variando de 4-500mU/mL.

[226] Medição colorimétrica:

[227] A fim de medir a atividade de AChE, as células obtidas por cultivo em meio de diferenciação de músculo esquelético de acordo com o Exemplo 3 foram tratadas como a seguir: O meio de diferenciação foi cuidadosamente removido da placa de 24 poços com a adição imediata de 300µL de solução de DTNB (preparo feito em tampão de fosfato, pH 7,2 com 0,1% de triton X-100). Após 2 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro, foram adicionados 50µL de 5,76mM ATI (preparado em água destilada). O conteúdo da reação foi incubado durante 60 minutos a 30°C no escuro, seguido pela medição de DO a 412nm em um leitor de microplaca Anthos Zenyth 340rt (Biochrom Ltd., Cambridge, UK).

[228] Para análise do padrão de enzima AChE: Diluições de padrão de enzima AChE (AAT Bioquest, Sunnyvale, EUA) variando de 500 a 4mU/ml foram preparadas conforme descrito acima, e 200µL de cada diluição de enzima padrão de AChE foram misturados com 300µL de 0,5mM de DTNB e 50 L de 5,76mM de ATI. A DO da mistura foi medida por 60 minutos em uma placa de 24 poços.

[229] Cálculo da proteína AChE mUrel/Mg:

[230] AChE mUrel foi calculado com base nos valores de OD412 obtidos a partir de medições colorimétricas de células de 60 min por extrapolação de curvas padrão lineares derivadas de medições padrão de AChE (OD a 4l2nm após 7 ou 8 minutos). Os valores de proteína de AChE mUrel/mg foram então calculados dividindo AChE mUrel com mg de proteína

total (calculada de acordo com o Exemplo 19) de células correspondentes cultivadas em meio de diferenciação de músculo esquelético.

[231] Medição da atividade da creatina quinase

[232] A fim de medir a atividade de AChE, as células obtidas por cultivo em meio de diferenciação de músculo esquelético de acordo com o Exemplo 3 foram tratadas como a seguir: O meio de células cultivadas em uma placa de 24 poços foi removido suavemente e as células foram lavadas com 1ml de solução de sal de Tryrode (Sigma-Aldrich Co. LLC, MO, EUA). Imediatamente depois, o tampão de lise 70µl foi adicionado diretamente nas células. O tampão de lise foi preparado adicionando 10µl de Triton-X-100 a 10ml de dHzO (LC-MS-Ultrachromasol, Fluka). Após 5 minutos de incubação a 4°C no escuro, foram adicionados 400µl de CK-NAC (Thermo Scientific, MA, EUA), previamente dissolvido pela adição de 10ml de dHzO. A reação foi analisada em um leitor de microplaca Anthos Zenith 340rt (Biochrom Ltd., Cambridge, UK), ajustado para 30° C, por medição de absorvância de DO a 340nm. Se não mencionados de outra forma, os valores de OD340 nm obtidos 21 minutos após a adição de CK-NAC foram usados para análises subsequentes. A atividade de CK em mUrel foi calculada de acordo com as instruções do fabricante e, se não mencionado de outra forma, normalizada, dividindo-a por mg de proteína total das células correspondentes.

[233] Enquanto as MPCs do Exemplo 3, analisadas quanto à

atividade de ACHE e CK de acordo com este exemplo, foram consideradas para ser AChE+ e CK+, as iSMCs da presente invenção (Exemplo 3) foram consideradas para ser AChE- e CK- (Figura 14).

[234] Exemplo 18 - Comparação de células de acordo com a presente invenção com células conhecidas no estado da técnica

[235] descreveu o isolamento de SMDC, que foram caracterizados como sendo CD56 + ou CD56-. Para comparar as células descritas por Thurner et al. 2018 com as células da presente invenção, os autores do referido estudo foram contactados e solicitados a disponibilizar amostras. Os autores concordaram em distribuir células isoladas de acordo com Thurner et al. 2018, e, assim, essas células puderam ser testadas de acordo com os Exemplos 3, 4, 5, 7, 8, 9, 16 e 17 da presente invenção, e foram comparadas com MPCs, MSCs, iSMCs MPC- e iSMCs MSC- isoladas pelo Exemplo 1. Os resultados são mostrados na Figura 15.

[236] Frudinger et al. 2018 descreveu o isolamento de SMDC, caracterizado como CD56+. Para comparar as células descritas por Frudinger et al. 2018 com as células da presente invenção, os autores do referido estudo foram contactados e solicitados a disponibilização de amostras. Os autores concordaram em distribuir células isoladas de acordo com Frudinger et al. 2018, e, portanto, essas células foram testadas de acordo com os Exemplos 3, 4, 5, 7, 8, 9, 16 e 17 da presente invenção e comparadas com MPCs, MSCs, iSMCs MPC- e iSMCs MSC- isoladas pelo Exemplo 1. Os resultados são mostrados na Figura 15.

[237] Exemplo 19 - Quantificação de proteína

[238] As células obtidas por cultivo em meio de diferenciação de músculo esquelético de acordo com o Exemplo 3 foram analisadas para quantificação de proteína total, de acordo com Thurner et al., 2018. Portanto, as células aderentes foram primeiro lavadas duas vezes com PBS, subsequentemente cobertas com PBST (0,1% Triton X-100) e então incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o lisado foi ressuspenso e transferido para um tubo Eppendorf, rapidamente agitado em vórtex e, em seguida, centrifugado por 4 minutos a 1200*g. Finalmente, o sobrenadante transparente foi transferido para um tubo Eppendorf fresco e a concentração de proteína foi determinada usando o kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, medindo a DO em 540nm com um leitor de microplacas Anthos Zenyth 340rt (Biochrom Ltd., Cambridge, UK).

Referências

[239] Abrahamsson, H. (2007). Got, 56(6), 877-883.

[240] Al-Ali, S., Blyth, P., Beatty, S., Duang, A., Parry, B., & Bissett, I. P. (2009). *Journal of Anatom y,* 215(2), 212-220.

[241] Bajpai, V. K., Mistriotis, P., Loh, Y.-H., Daley, G. Q., & Andreadis, S. T. (2012).

a. *Cardiovascular Research, 96(3),* 391-400.

[242] Belkin, V. M., Belkin, A. M., & Koteliansky, V. E. (1990). *The Journal of Cell Biolog y,* 777(5 Pt 1), 2159-2170.

[243] Boh1, J. L., Zakhem, E., & Bitar, K. N. (2017). *Stem*

Cells Translational Medicine, 6(9), 1795— 1802.

[244] Capelli, C. C., Chancellor, M. B., Huard, J., & Qu, Z. (2002). WO2001078754A3 Capetanaki, Y., Milner, D. J., & Weitzer, Ci. (1997). *Cell Structure and Function,* 22(1), 103—116.

[245] Chancellor, M. B., Huard, J., Capelli, C. C., & Qu, Z. (2001). WO2001078754 A2 Dash, B. C., Levi, K., Schwan, J., Luo, J., Bartulos, 0., Wu, H., Qiu, C., Yi, T., Ren, Y., Campbell, S., Rolle, M. W., & Qyang, Y. (2016). *Stem Cell Reports,* 7(l), 19-28.

[246] Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). *C ytotherap y,* 8(4), 315-317.

[247] Espagnolle, N., Guilloton, F., Deschaseaux, F., Gadelorge, M., Sensébé, L., & Bourin, P. (2014). *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 18(1),* 104-114.

[248] Frudinger, A., Kölle, D., Schwaiger, W., Pfeifer, J., Paede, J., & Halligan, S. (2010). *Gut,* 59(l), 55-61.

[249] Frudinger, A., Pfeifer, J., Paede, J., Kolovetsiou-Kleiner, V., Marksteiner, R., & Halligan, S. (2015). *Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctolog y of Great Britain and Ireland,* 17(9), 794-801.

[250] Frudinger, Andrea, Marksteiner, R., Pfeifer, J., Margreiter, E., Paede, J., & Thurner, M. (2018).

a. *Stem Cell Research & Therap y,* 9(l), 233.

[251] Goode, P. S., Burgio, K. L., Halli, A. D., Jones,

R. W., Richter, H. E., Redden, D. T., Baker, P. S., & Allman, R. M. (2005). *Journal of the American Geriatrics Society,* 53(4), 629-635.

[252] Huard, J., Yokoyama, T., Pruchnic, R., Qu, Z., Li, Y., Lee, J. Y., Somogyi, G. T., de Groat, W. C., & Chancellor, M. B. (2002). *Gene Therap y,* 9(23), 1617-1626.

[253] livanainen, A., Sainio, K., Sariola, H., & Tryggvason, K. (1995). *FEBS Letters,* 365(2-3), 183— 188.

[254] Jung, Y., Bauer, Ci., & Nolta, J. A. (2012). *Stem Cells (Dayton, Ohio),* 30(l), 42-47. Krauss, R. S., Chihara, D., & Romer, A. I. (2016). *Skeletal Muscle, 6.*

[255] Lecourt, S., Marolleau, J.-P., Fromigué, 0., Vauchez, K., Andriamanalijaona, R., Ternaux, B., Lacassagne, M.-N., Robert, I., Boumédiene, K., Chéreau, F., Marie, P., Larghéro, J., Fiszman, M., & Vilquin, J.-T. (2010). *Experimental Cell Research, 316(15),* 2513-2526.

[256] Li, Y., Wen, Y., Wang, Z., Wei, Y., Wani, P., Green, M., Swaminathan, G., Ramamurthi, A., Pera, R. R., & Chen, B. (2016). *STEM CELLS Translational Medicine,* 5(12), 1719—

[257] Lu, S.-H., Lin, A. T. L., Chen, K.-K., Chiang, H. S., & Chang, L. S. (2011). *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 15(3), 587-592.

[258] Marolleau, J.-P., Vauchez, K., & Vilquin, J.-T. (2010). EP2206774A1.

[259] McHugh, K. M. (1995). *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2*fi#(3), 278-290.

[260] Meyer, I., & Richter, H. E. (2015). *Women's Health (London, England),* 11(2), 225-238. Mimura, T., Kaminishi,

M., & Kamm, M. A. (2004). *Digestive Surgery, 21(3),* 235-241. Niessen, P., Rensen, S., Deursen, J. van, Man, J. D., Laet, A. D., Vanderwinden, J.-M., Wedel,

a. T., Baker, D., Doevendans, P., Hofker, M., Gijbels, M., & Eys, G. van. (2005).

b. *Gastroenterolog y,* 129(5), 1592-1601.

[261] Park, W. S., Heo, S. C., Jeon, E. S., Hong, D. H., Son, Y. K., Ko, J.-H., Kim, H. K., Lee, S. Y.,

a. Kim, J. H., & Han, J. (2013). *American Journal of Physiolog y. Cell Physiolog y,* 3fi5(4), C377-91.

[262] Popescu, L. M., Gherghiceanu, M., Mandache, E., & Cretoiu, D. (2006). *Journal of Cellular and*

a. *Molecular Medicine, 10(4),* 960-990.

[263] Quander, C. R., Morris, M. C., Melson, J., Bienias, J. L., & Evans, D. A. (2005). *The American Journal of Gastroenterolog y, 100(4),* 905-909.

[264] Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., & Huard, J. (2002). *The Journal of Cell Biolog y, 157(5),* 851-864.

[265] Ramkumar, D., & Schulze, K. S. (2005). *Neurogastroenterolog y and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society, 17 Suppl 1,* 22-30.

[266] Rao, S. S. C. (2004). *Gastroenterolog y,* 726(1 Suppl 1), S14-22.

[267] Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., & Baylies, M. K. (2010). *Developmental Biolog y,* 341(l), 66-83. Romanska, H. M.,

Bishop, A. E., Moscoso, G., Walsh, F. S., Spitz, L., Brereton, R. J., & Polak,

a. J. M. (1996). *Journal of Pediatric Gastroenterolog y and Nutrition,* 22(4), 351-358. Sanders, K. M. (2008). *Neurogastroenterolog y and Motility: The Official Journal of the*

b. *European Gastrointestinal Motility Society, 20 Suppl 1,* 39-53.

[268] Sandison, M., & McCarron, J. (2015). *The FASEB Journal,* 29(1 Supplement), 418.8. Skuk, D., Goulet, M., & Tremblay, J. P. (2014). *Cell Transplantation,* 23(l), 13-25. Thurner, M., Asim, F., Garczarczyk-Asim, D., Janke, K., Deutsch, M., Margreiter, E., Troppmair, J., & Marksteiner,

[269] R. (2018). *PLOS ONE, 13(3),* e0194561.

[270] Vaizey, C. J., Kamm, M. A., & Bartram, C. I. (1997). *Lancet (London, England),* 3#9(9052), 612-615.

[271] van de Rijn, M., Hendrickson, M. R., & Rouse, R. V. (1994). *Human Patholog y,* 25(8), 766— 771.

[272] van Eys, Ci. J., Niessen, P. M., & Rensen, S. S. (2007). *Trends in Cardiovascular Medicine,*

a. 17(l), 26-30.

[273] Wang, Ci., Jacquet, L., Karamariti, E., & Xu, Q. (2015). *The Journal of Physiolog y,* 593(14), 3013-3030.

[274] Wang, J. Y., & Abbas, M. A. (2013). *The Permanente Journal,* 17(3), 65-73.

[275] Wang, J., Zohar, R., & McCulloch, C. A. (2006). *Experimental Cell Research, 312(3),* 205-214. Wang, Y., Han, Z., Song, Y., & Han, Z. C. (2012). *Stern Cells International,*

2012.

[276] Webb, R. C. (2003). *Advances in Physiolog y Education, 27(4),* 201-206.

[277] Wör1, J., Breuer, C., & Neuhuber, W. L. (2009). *Developmental Dynamics, 238(4),* 864-874.

[278] Yin, H., Price, F., & Rudnicki, M. A. (2013). *Physiological Reviews,* 93(l), 23-67.

REIVINDICAÇÕES

1. Um método *in vitro* ou *ex vivo* para obtenção de células musculares lisas induzidas (iSMCs), tal método sendo **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

   (a) a obtenção de células derivadas do músculo esquelético a partir de um sujeito;

   (b) a transdiferenciação de células derivadas do músculo esquelético por meio da cultivação das células em um meio contendo TGF-beta, em particular TGFbl, TGFb2 e/ou TGFb3, mais preferencialmente TGFb1 e/ou TGFb3, ainda mais preferencialmente TGFbl, e heparina para obter iSMCs.

2. O método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que as iSMCs obtidas na etapa (b) são competentes para a não-fusão e/ou caracterizados pela expressão positiva de aSMA, CD49a, and CD146.

3. O método de acordo com as reivindicações 1 ou 2, **caracterizado pelo** fato de que as células derivadas do músculo esquelético são células progenitoras miogênicas (MPCs) definidas pela expressão positiva de CD56 e desmina, e a expressão negativa de CD34; ou pelo fato de que as células derivadas do músculo

esquelético são células estromais mesenquimais (MSCs) definidas pela expressão positiva de CD105, CD73 e a expressão negativa de CD34 e CD56.

4. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** fato de que as iSMCs obtidas a partir de MPCs na etapa (b) são definidas pela expressão positiva de aSMA, CD49a, desmina, CD56 e CD146, e a expressão negativa de CD34; e pelo fato de que as iSMCs obtidas a partir de MSCs na etapa (b) são definidas pela expressão positiva de aSMA, CD49a e CD146, e pela expressão negativa de CD56.

5. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** fato de que após a etapa (a), uma etapa (al) é conduzida, compreendendo a proliferação das células derivadas do músculo esquelético, de preferência para receber 20-40 x 10^6 células.

6. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** fato de que a etapa (b) é conduzida por um a seis dias.

7. Células musculares lisas induzidas (iSMCs), **caracterizadas por** serem obtidas pelo método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Células musculares lisas induzidas (iSMCs) obtidas a partir de MPCs, **caracterizadas pela** expressão positiva de aSMA, desmina, CD56, CD49a e CD146, e a expressão negativa de CD34.

9. Células musculares lisas induzidas (iSMCs) obtidas a partir de MSCs, **caracterizadas pela** expressão positiva de aSMA, CD49a e CD146, e a expressão negativa de CD56.

10. Células musculares lisas induzidas (iSMCs), de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, **caracterizadas pelo** fato de que as iSMCs expressam canais funcionais de cálcio e/ou potássio.

11. Células musculares lisas induzidas (iSMCs), de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, **caracterizadas pelo** fato de servirem para uso em um método de tratamento de uma doença ou distúrbio em um sujeito.

12. Células musculares lisas induzidas para uso de acordo com a reivindicação 11, **caracterizadas pelo** fato de que a doença ou distúrbio são deficiências de músculo liso preferencialmente selecionadas do grupo que consiste em incontinência anal, incontinência urinária, doença de refluxo, gastroparesia, bexiga hiperativa e hipoativa.

13. O uso de células musculares lisas induzidas, de acordo com as reivindicações 11 ou 12, **caracterizado pelo**

fato de que a deficiência de músculo liso é uma deficiência de um músculo esfíncter.

14. Células musculares lisas induzidas, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, **caracterizadas pelo** fato de servirem para uso em engenharia de tecidos ou terapia celular.

15. O uso de células derivadas de músculo esquelético, tal uso sendo **caracterizado por** compreender a obtenção células musculares lisas induzidas.

16. O uso de células derivadas de músculo esquelético, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de que as células derivadas de músculo esquelético são células progenitoras miogênicas (MPCs) caracterizadas pela expressão positiva de CD56 e desmina, e a expressão negativa de CD34; ou pelo fato de que as células derivadas do músculo esquelético são células estromais mesenquimais (MSCs) caracterizadas pela expressão positiva de CD105, CD73, CD90 e a expressão negativa de CD34 e CD56.

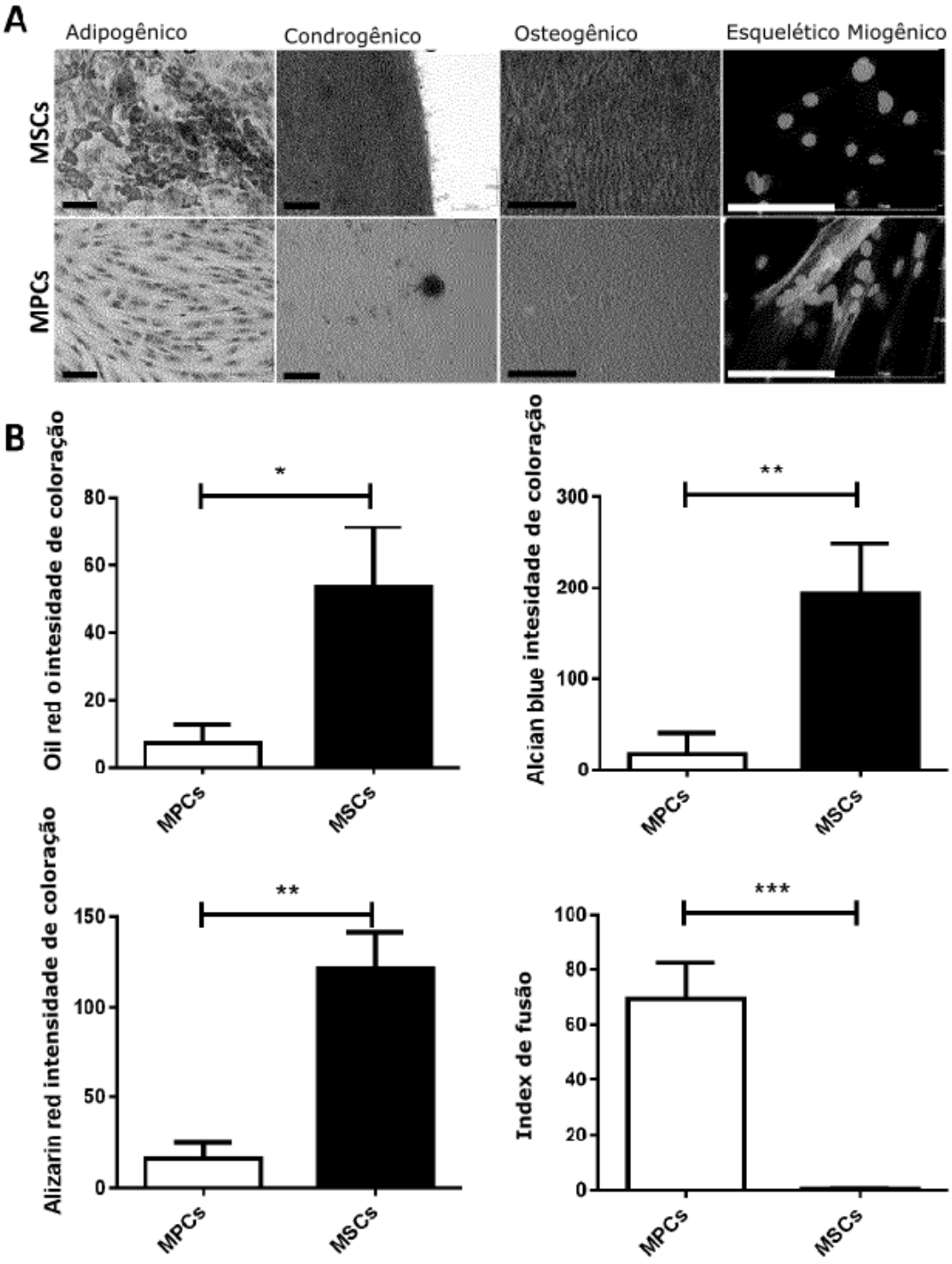

A
Adipogênico
Condrogênico
Osteogênico
Esquelético Miogênico
MSCs
MPCs
B
Oil red o intesidade de coloração
Alcian blue intesidade de coloração
Alizarin red intensidade de coloração
Index de fusão
MPCs
MSCs

Figura 1

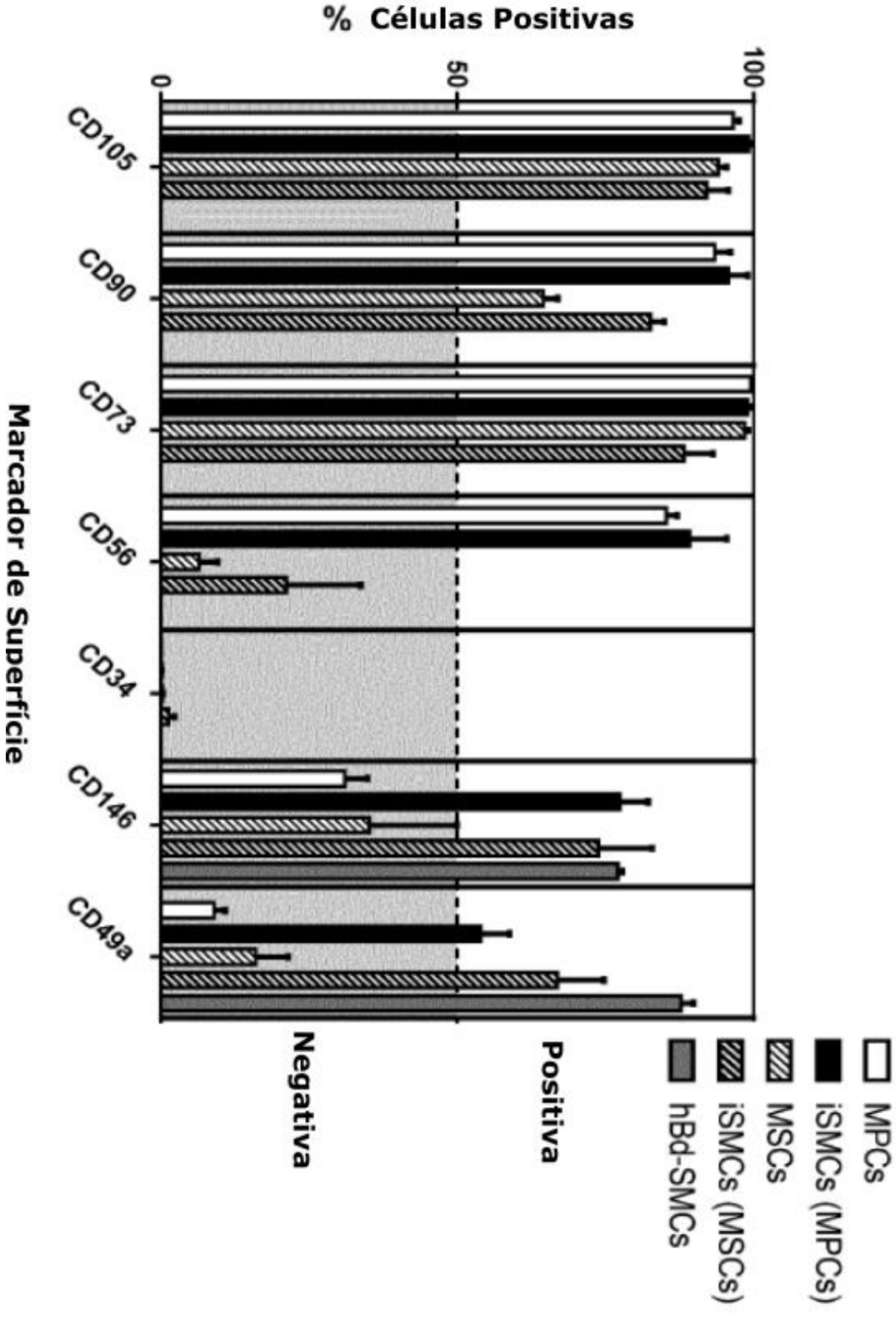

% Células Positivas
0
50
100
CD105
CD90
CD73
CD56
CD34
CD146
CD49a
Marcador de Superfície
Negativa
Positiva
MPCs
iSMCs (MPCs)
MSCs
iSMCs (MSCs)
hBd-SMCs

Figura 2

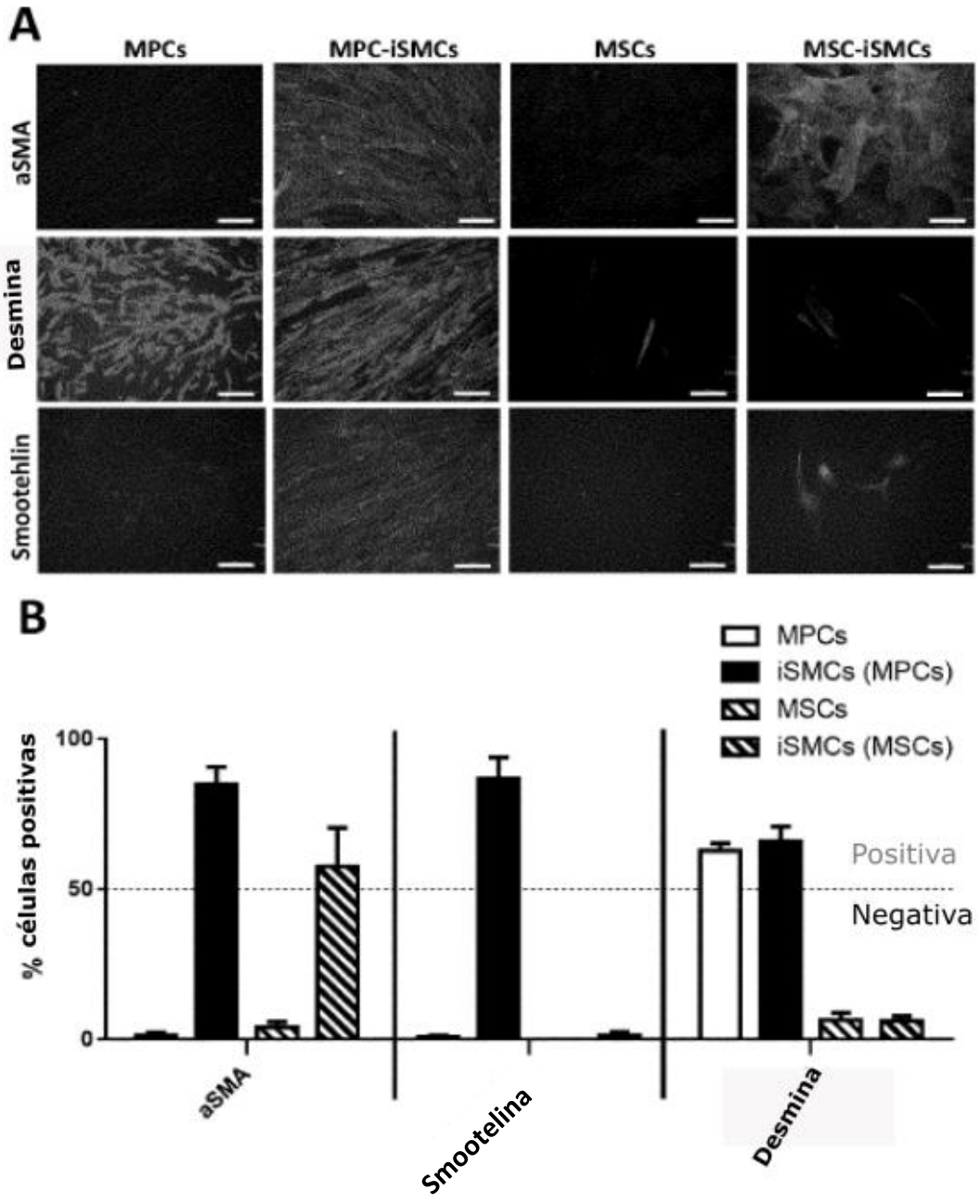

A
MPCs
MPC-iSMCs
MSCs
MSC-iSMCs
aSMA
Desmina
Smootehlin
B
MPCs
iSMCs (MPCs)
MSCs
iSMCs (MSCs)
% células positivas
100
50
0
Positiva
Negativa
aSMA
Smootelina
Desmina

Figura 3

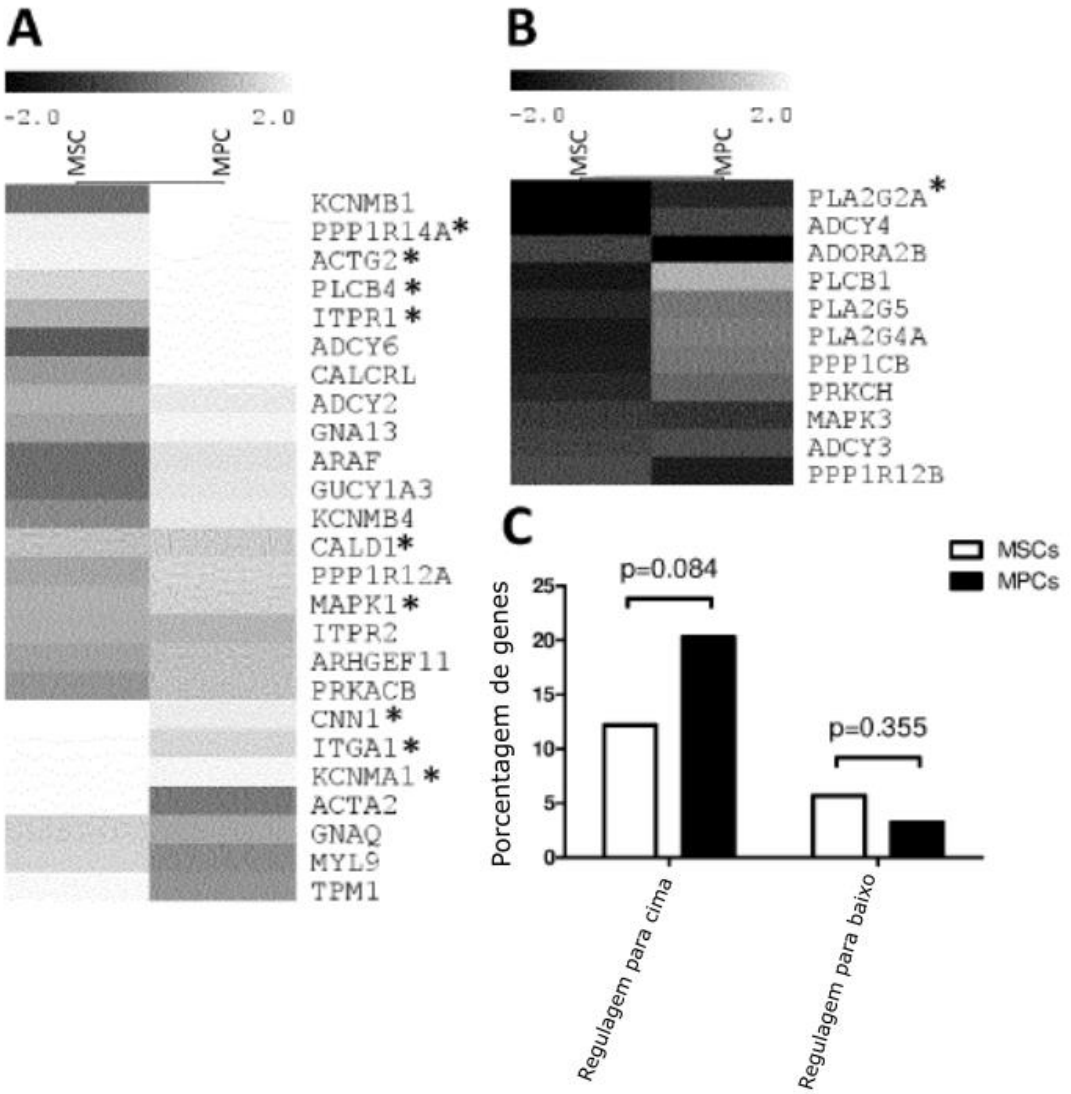

A
-2.0
2.0
MSC
MPC
KCNMB1
PPP1R14A*
ACTG2*
PLCB4*
ITPR1*
ADCY6
CALCRL
ADCY2
GNA13
ARAF
GUCY1A3
KCNMB4
CALD1*
PPP1R12A
MAPK1*
ITPR2
ARHGEF11
PRKACB
CNN1*
ITGA1*
KCNMA1*
ACTA2
GNAQ
MYL9
TPM1
B
-2.0
2.0
MSC
MPC
PLA2G2A*
ADCY4
ADORA2B
PLCB1
PLA2G5
PLA2G4A
PPP1CB
PRKCH
MAPK3
ADCY3
PPP1R12B
C
MSCs
MPCs
p=0.084
p=0.355
Porcentagem de genes
25
20
15
10
5
0
Regulagem para cima
Regulagem para baixo

Figura 4

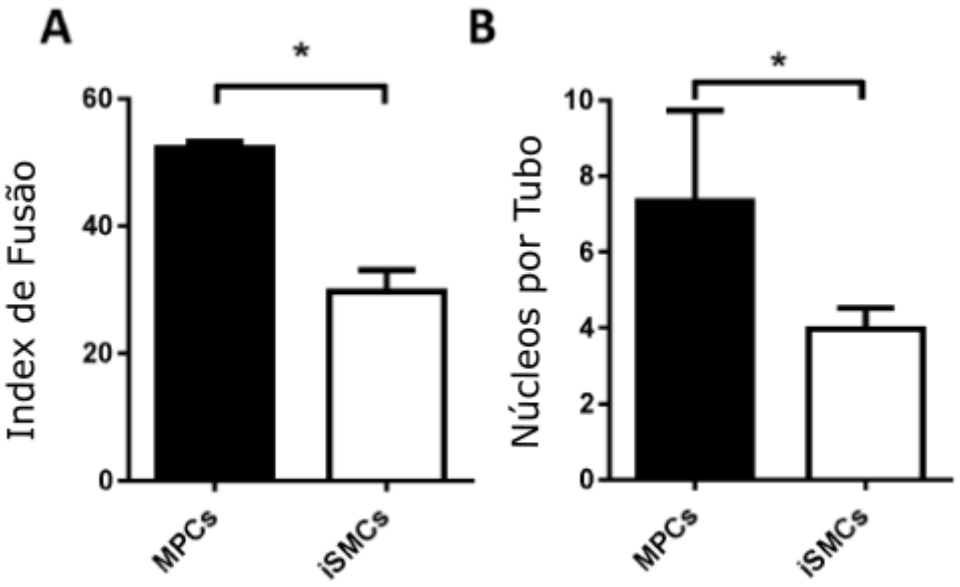

A
B
*
*
Index de Fusão
Núcleos por Tubo
60
40
20
0
10
8
6
4
2
0
MPCs
iSMCs
MPCs
iSMCs

Figura 5

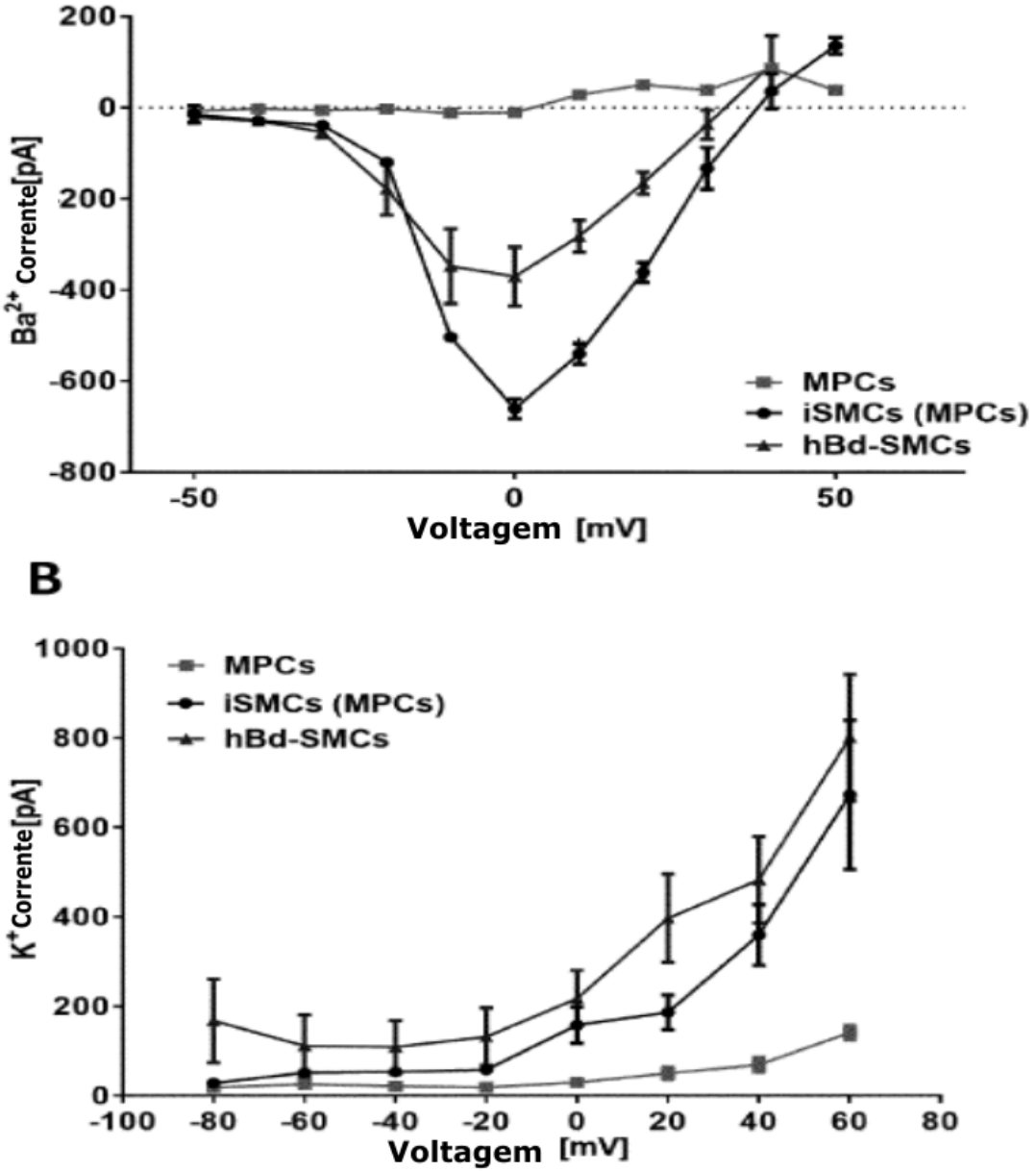

200
0
-200
-400
-600
-800
Ba2+ Corrente[pA]
-50
0
50
Voltagem [mV]
MPCs
iSMCs (MPCs)
hBd-SMCs
B
1000
800
600
400
200
0
K+Corrente[pA]
-100
-80
-60
-40
-20
0
20
40
60
80
Voltagem [mV]
MPCs
iSMCs (MPCs)
hBd-SMCs

Figura 6

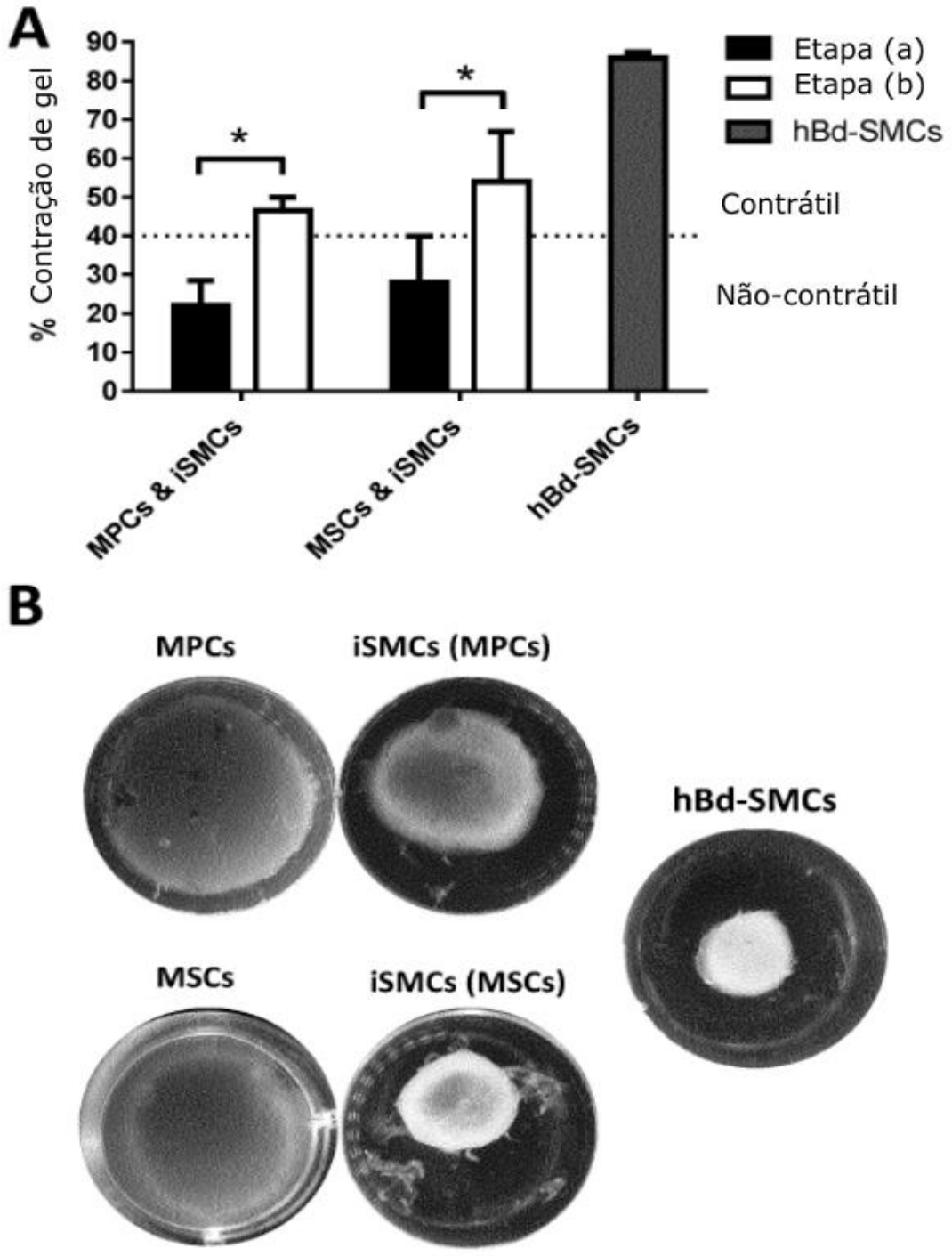

A
% Contração de gel
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
Etapa (a)
Etapa (b)
hBd-SMCs
Contrátil
Não-contrátil
MPCs & iSMCs
MSCs & iSMCs
hBd-SMCs
B
MPCs
iSMCs (MPCs)
hBd-SMCs
MSCs
iSMCs (MSCs)

Figura 7

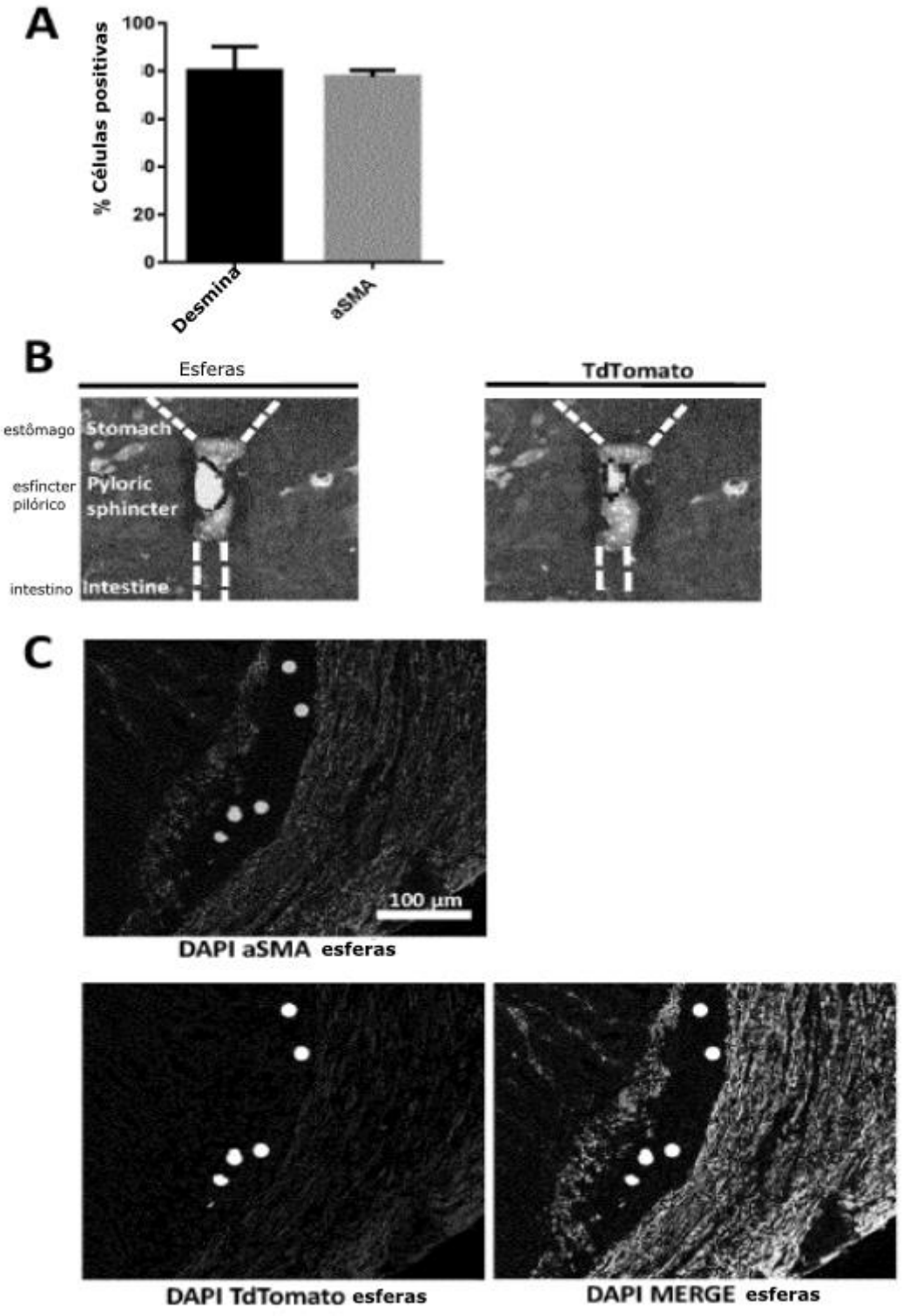

A
% Células positivas
100
0
0
0
20
0
Desmina
aSMA
B
Esferas
TdTomato
estômago
Stomach
esfíncter pilórico
Pyloric sphincter
intestino
Intestine
C
100 µm
DAPI aSMA esferas
DAPI TdTomato esferas
DAPI MERGE esferas

Figura 8

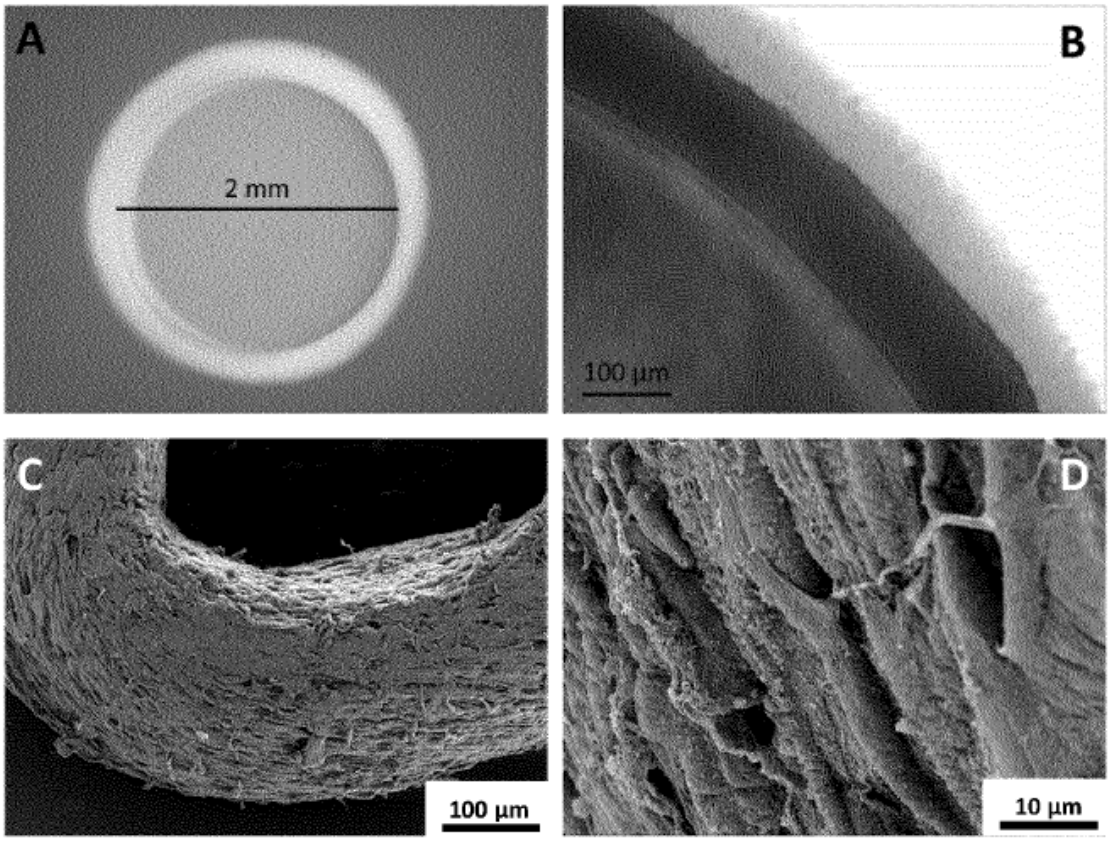


Figura 9

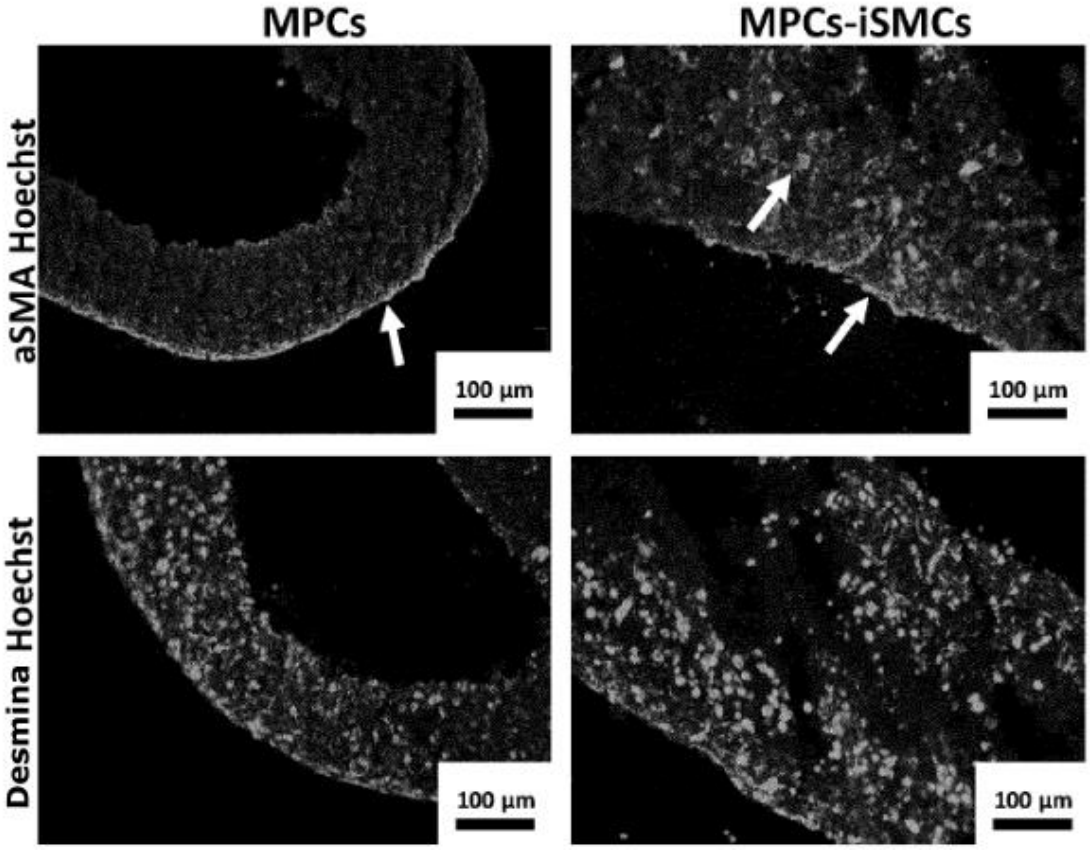

MPCs
MPCs-iSMCs
aSMA Hoechst
Desmina Hoechst
100 µm
100 µm
100 µm
100 µm

Figura 10

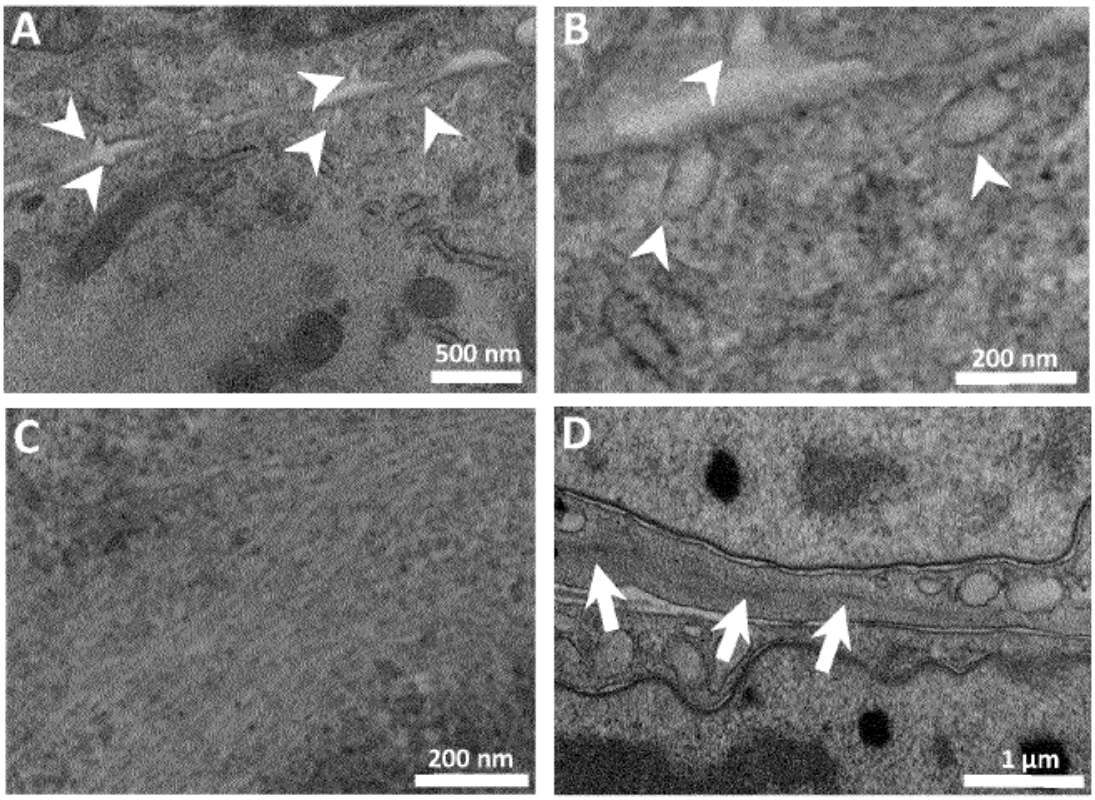


Figura 11

Gene	MSCs	MPCs
ACTA2	2.38*	0.22
ACTG2	1.89*	2.86
ADCY1	0.06	-0.02
ADCY2	0	1.76*
ADCY3	-0.68	-0.48
ADCY4	-3.34	-0.62
ADCY5	-0.52	0.14
ADCY6	-0.23	2.25*
ADCY7	0.32	0.24
ADCY8	0.11	0.12
ADCY9	0.14	0.68
ADORA2B	-0.66	-2.81
ADRA1A	0.16	0.22
ADRA1B	0.14	-0.41
ADRA1D	0.24	0.3
AGTR1	0.65	0.23
ARAF	0.04	1.65*
ARHGEF11	0.8	1.21*
ARHGEF12	0.38	0.01
AVPR1A	0.1	0.2
AVPR1B	-0.18	-0.26
CACNA1C	-0.06	0.23
CACNA1D	0.03	0.16
CACNA1F	0.39	0.17
CACNA1S	0.4	-0.41
CALCRL	0.69	2.22
CALD1	1.21*	1.36*
CALM2	0.42	0.42
CALML3	-0.07	0.2
CALML4	-0.66	0.4
CALML5	-0.2	-0.12
CALML6	0.56	-0.14
CYP4A11	0.16	0.38
EDNRA	0.19	-0.1
GNA11	0.48	0.01
GNA12	0.56	0.32
GNA13	0.83	1.88*
GNAQ	1.44*	0.88
GNAS	0.2	0.51
GUCY1A2	-0.11	-0.3
GUCY1A3	0.05	1.7*

Gene	MSCs	MPCs
GUCY1B3	-0.3	0.52
ITPR1	1.02*	2.86*
ITPR2	0.98	1.06*
ITPR3	-0.25	-0.04
KCNMA1	2.93*	1.91*
KCNMB1	0.03	3.85*
KCNMB2	-0.51	1.24*
KCNMB3	-0.26	0.08
KCNMB4	0.48	1.74*
KCNU1	0.49	0.08
MAP2K1	-0.22	0.59
MAP2K2	-0.25	-0.93
MAPK1	1*	1.44*
MAPK3	-0.82	-0.94
MRVI1	-0.13	-0.05
MYH11	-0.23	0.7
MYL6	0.11	0.37
MYL6B	-0.13	-1
MYL9	1.5*	0.49
MYLK	-0.28	-0.16
MYLK2	0.59	0.38
MYLK3	-0.15	0.52
MYLK4	-0.1	0.28
NPR1	0.53	0.21
NPR2	0.02	0.31
PLA2G10	-0.14	-0.34
PLA2G12A	0.09	0.79
PLA2G12B	-0.14	-0.02
PLA2G1B	-0.09	0.45
PLA2G2A	-4.99	-1.18
PLA2G2C	0.11	-0.21
PLA2G2D	0.08	0.39
PLA2G2E	0.01	0.02
PLA2G2F	0.51	-0.17
PLA2G3	-0.02	0.26
PLA2G4A	-1.46	0.26
PLA2G4C	-0.25	-0.1
PLA2G4D	-0.03	0.33
PLA2G4E	-0.37	0.07
PLA2G4F	-0.29	0.2
PLA2G5	-1.18	0.16

Gene	MSCs	MPCs
PLA2G6	-0.04	-0.15
PLCB1	-1.5	1.02*
PLCB2	0.42	0.55
PLCB3	-0.19	-0.31
PLCB4	1.52*	3.27*
PPP1CA	-0.01	-0.02
PPP1CB	-1.38*	0.16
PPP1CC	-0.21	0.53
PPP1R12A	0.85	1.47*
PPP1R12B	-0.52	-1.36
PPP1R12C	-0.1	1.16*
PPP1R14A	1.83*	4.03*
PRKACA	-0.13	0.29
PRKACB	0.62	1.22*
PRKACG	0.09	-0.38
PRKCA	0.23	-0.1
PRKCB	-0.1	0.44
PRKCD	0	0.68
PRKCE	1.02*	-0.32
PRKCG	0.39	0.13
PRKCH	-1.14	-0.1
PRKCQ	0.26	0.22
PRKG1	0.44	0.41
PTGIR	-0.37	0.41
RAF1	-0.43	-0.73
RAMP1	-0.36	-0.34
RAMP2	-0.1	-0.31
RAMP3	0.06	0.43
RHOA	0.63	0.56
ROCK1	-0.21	0.22
ROCK2	0.03	0.84
ROCK2	0.42	0.84
CNN1	4.06*	1.8*
DES	-0.36	0.08
TPM1	1.96*	0.61
SMTN	-0.29	1.02*
TAGLN	1.06*	0.14
VCL	-0.3	-0.16
ITGA3	0.74	0.84
ITGA1	2.77*	1.51*
MCAM	0.17	0.6

Figura 12

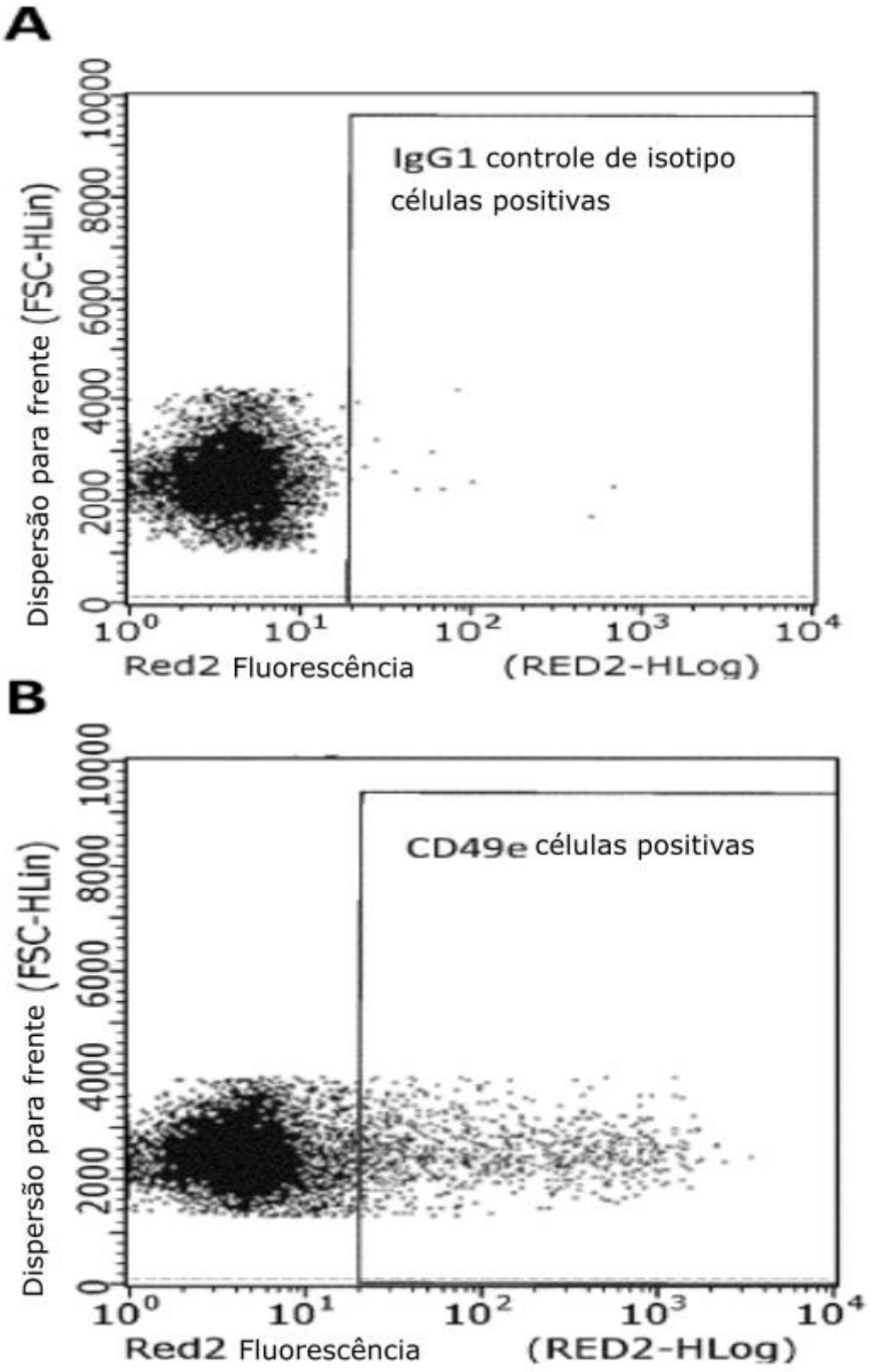

A
IgG1 controle de isotipo
células positivas
Dispersão para frente (FSC-HLin)
0
2000
4000
6000
8000
10000
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Red2 Fluorescência (RED2-HLog)
B
CD49e células positivas
Dispersão para frente (FSC-HLin)
0
2000
4000
6000
8000
10000
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Red2 Fluorescência (RED2-HLog)

Figura 13

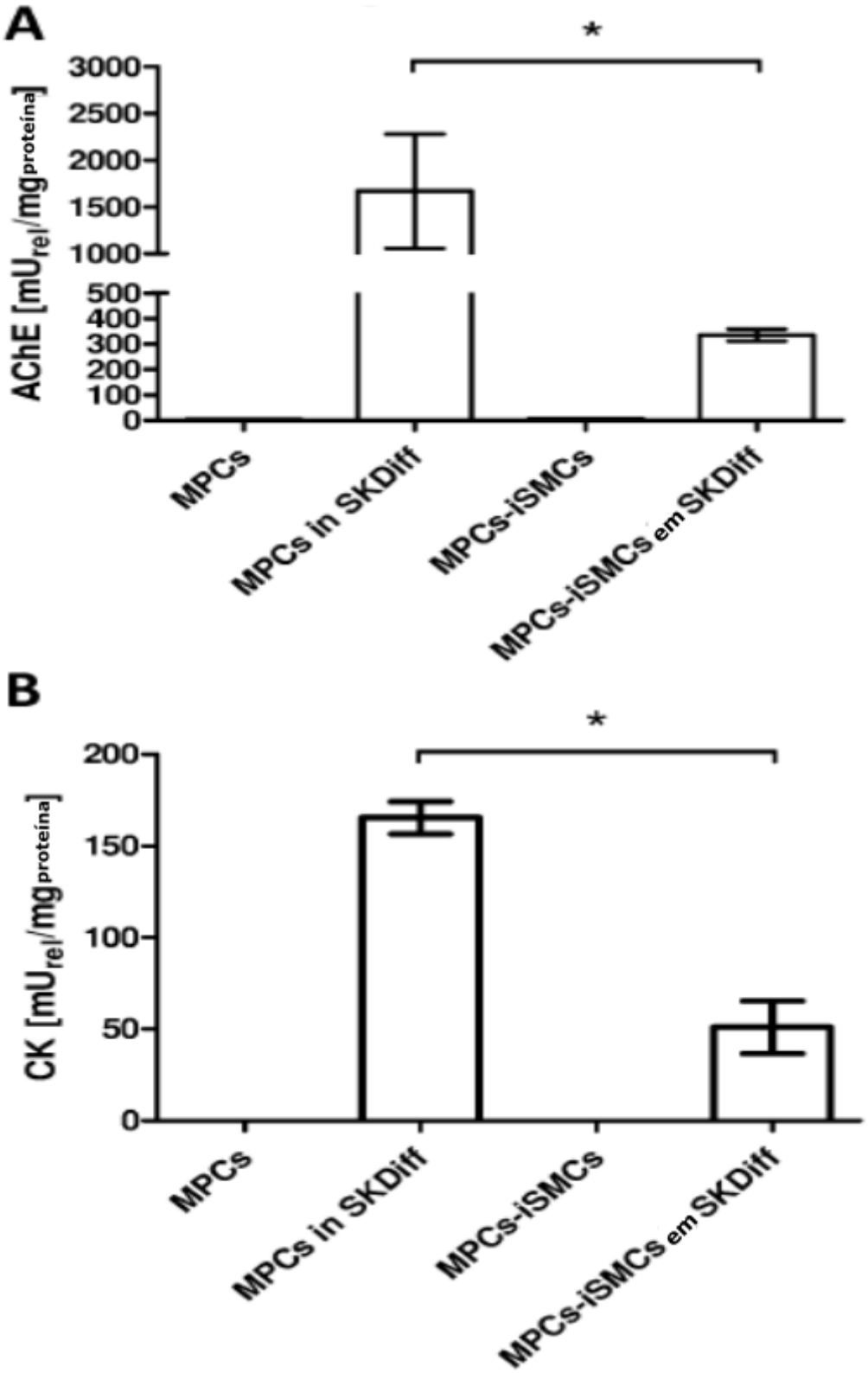

A
*
3000
2500
2000
1500
1000
500
400
300
200
100
0
AChE [mU$_{rel}$/mg$_{proteína}$]
MPCs
MPCs in SKDiff
MPCs-iSMCs
MPCs-iSMCs em SKDiff
B
*
200
150
100
50
0
CK [mU$_{rel}$/mg$_{proteína}$]
MPCs
MPCs in SKDiff
MPCs-iSMCs
MPCs-iSMCs em SKDiff

Figura 14

Marcador	CD56+ SMDC (Thurner et al 2018)	CD56- SMDC (Thurner et al. 2018)	SMDC (Frudinger et al. 2018)	MPCs	MSCs	MPC-iSMCs	MSC-iSMCs
Esquelético miogênico	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
Multipotente	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não
CD105	+	+	+	+	+	+	+
CD90	+	+	+	+	+	+	+
CD73	+	+	+	+	+	+	+
CD56	+	-	+	+	-	+	-
CD34	-	-	-	-	-	-	-
CD146	-	-	-	-	-	+	+
CD49a	-	-	-	-	-	+	+
aSMA	-	-	-	-	-	+	+
Desmina	+	-	+	+	-	+	-
ACHE	+	-	+	+	-	-	-
CK	+	-	+	+	-	-	-

Figura 15

RESUMO

"MÉTODOS PARA OBTER CÉLULAS MUSCULARES LISAS INDUZIDAS"

A presente invenção se refere a métodos para obter células musculares lisas induzidas (iSMCs), iSMCs, iSMCs para uso em um método de tratamento de uma doença ou distúrbio, bem como para o uso em engenharia de tecidos, além do uso de células derivadas do músculo esquelético para a obtenção de iSMCs.