(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 523 098**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/22 (2006.01)
A61K 35/28 (2006.01)
A61K 35/407 (2006.01)
A61K 35/44 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2007** **E 13151814 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014** **EP 2604271**

(54) Título: **Microvesícula (MV) derivada de células madre para su uso en la inhibición de la apoptosis inducida por un agente citostático**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2014

(73) Titular/es:

FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND GMBH (100.0%)
Else-Kröner-Strasse 1
61352 Bad Homburg v.d.H., DT

(72) Inventor/es:

CANTALUPPI, VINCENZO;
DEREGIBUS, MARIA CHIARA AMILDE y
CAMUSSI, GIOVANNI

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 523 098 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microvesícula (MV) derivada de células madre para su uso en la inhibición de la apoptosis inducida por un agente citostático.

La presente invención generalmente está comprendida en el campo de la regeneración de los tejidos, y en particular, se refiere a la regeneración endotelial y epitelial.

En los órganos complejos, la diafonía entre los compartimentos endoteliales y epiteliales es relevante en la diferenciación, función y reparación. Después de una lesión, la reparación morfológica y la recuperación funcional dependen de la regeneración tanto de las células endoteliales como epiteliales, restaurando de este modo la interacción de célula a célula.

Las células endoteliales se originan a partir de la capa germinal ectodérmica y representan la primera interfase entre la sangre y la pared vascular. Ellas representan el 1% de toda la masa corporal, con una superficie de aproximadamente 28 m^2 para las arterias y 280 m^2 en los capilares. Se sabe que el endotelio vascular tiene una amplia gama de actividades biológicas tales como la secreción de mediadores, la detección de la tensión mecánica, vasorregulación, el control y la regulación neuro - humoral de la adhesión de células inflamatorias y la extravasación.

Las células epiteliales se originan a partir de la capa germinal endodérmica y en gran parte están representadas en la mayoría de los órganos, en donde han adquirido funciones específicas. En el riñón, las células epiteliales se han diferenciado en estructuras específicas (células tubulares proximales y distales con la función especializada de reabsorción y secreción de la orina previa y células epiteliales glomerulares con la función especializada de la regulación de la permeabilidad selectiva). En el hígado, las células epiteliales constituyen principalmente la unidad funcional anatómica del lóbulo hepático. Esta estructura está especializada en la producción de bilirrubina y sales biliares que se encuentran entre otros productos neo-sintéticos específicos. En el páncreas, varios tipos de células epiteliales están especializadas en la secreción y la manipulación de diferentes hormonas (es decir, las células beta para secreción de insulina).

Las células epiteliales y endoteliales son el objetivo de diferentes mecanismos nocivos que pueden conducir a una disfunción orgánica aguda o crónica. El proceso de reparación a nivel del órgano depende de la capacidad de las células endoteliales y epiteliales para desdiferenciarse, proliferar y finalmente migrar hacia el sitio de la lesión y, eventualmente, volver a diferenciarse, asegurando así la completa recuperación morfológica y funcional. Por ejemplo, después de una necrosis tubular aguda, que es un evento clínicamente relevante después de eventos isquémicos o tóxicos, los eventos reparativos requieren de la proliferación y diferenciación final en células maduras de ambos tipos de células (1, 2). En las enfermedades glomerulares renales, la recuperación de la lesión se relaciona esencialmente con la remodelación vascular de las estructuras de los glomérulos. Más en detalle, la neoangiogénesis que ocurre durante la fase regenerativa de la enfermedad glomerular se ha demostrado que afecta también a la recuperación funcional de los podocitos, unas células epiteliales altamente diferenciadas que regulan la permeabilidad selectiva glomerular (3). En muchos modelos de lesión vascular aguda, la regeneración de las células endoteliales contribuye en forma decisiva a la restauración de las funciones de tejidos y órganos que también está asociada a la reparación del componente funcional epitelial del órgano. Las células madre mesenquimales y las células progenitoras endoteliales (CPE) derivadas de la médula ósea son preferentemente reclutadas a los sitios de isquemia vascular a través de señales de moléculas de adhesión (4, 5).

Hasta la fecha, los enfoques existentes para el tratamiento de los daños o lesiones endoteliales / epitelial se han basado en el uso de: 1) factores de crecimiento que actúan sobre uno o ambos de los dos tipos de células; 2) terapia celular utilizando células madre mesenquimales o EPC. Sin embargo, los enfoques existentes tienen una serie de inconvenientes.

El uso de factores de crecimiento tiene la desventaja de los altos costos de producción y de la necesidad de obtener efectos biológicos a partir de una adecuada combinación de diferentes factores de crecimiento. El uso de terapia de células madre tiene riesgos intrínsecos dados por la pérdida de control sobre las células administradas una vez que han sido implantadas en el receptor con riesgo tumorigénico potencial o diferenciación inapropiada. Por ejemplo, se ha reportado diferenciación adipogénica en glomérulos lesionados en un modelo experimental de glomerulonefritis (6).

Los presentes inventores han encontrado ahora que microvesículas (MV) derivadas de células madre representan una alternativa ventajosa sobre los enfoques existentes para el tratamiento del daño o lesiones endoteliales / epiteliales, en que su uso no entraña los inconvenientes anteriormente mencionados. Por otra parte, el hecho de que las microvesículas derivadas de células madre tengan la capacidad de regenerar tanto tejido epitelial como endotelial dañado o lesionado es bastante inesperado. En realidad, se conoce en el estado del arte (7) que microvesículas derivadas de células progenitoras endoteliales (CPE) son capaces de promover angiogénesis y la formación de estructuras de tipo capilar a partir de células endoteliales. También se conoce por ejemplo a partir del

documento WO2005121369 que se pueden emplear una microvesícula de una célula donante o una microvesícula sintética para modificar una célula que se ponga en contacto con la microvesícula. Típicamente, la modificación es al menos en parte efectuada por ARN de la microvesícula, pero también puede ser efectuada por un componente lipídico de la microvesícula, un péptido de la microvesícula asociado a la membrana, o un péptido citosólico de la microvesícula.

Sin embargo, la capacidad combinada de microvesículas derivadas de una cantidad de tipos de células madre, incluyendo las CPE, para promover la regeneración tanto de tejido epitelial como endotelial nunca había sido divulgada ni sugerida.

Gracias a su capacidad de regeneración, las MV derivadas de las células madre utilizadas en la invención pueden ser empleadas en la reparación de tejidos, particularmente para la regeneración endotelial / epitelial después de un daño o lesión del tejido. Las MV empleadas en la invención se pueden usar tanto para aplicaciones *in vitro* como en *in vivo*.

En cuanto a la aplicaciones *in vivo*, las MV derivadas de células madre han mostrado que comparten una cantidad de efectos biológicos comunes, que las vuelven particularmente adecuadas para uso como un medicamento en aplicaciones humanas para reparación renal y hepática, particularmente para el tratamiento de insuficiencia renal aguda (IRA) e insuficiencia hepática aguda (IHA). En realidad, las MV empleadas en la invención han demostrado ser efectivas en la recuperación de una lesión tubular aguda, la recuperación de glomerulonefritis aguda, y en la promoción de la regeneración de capilares glomerulares y proliferación de hepatocitos, siendo por lo tanto muy beneficiosas en el tratamiento de IRA e IHA.

La capacidad del riñón para recuperarse después de episodios de lesiones agudas tiene un impacto crítico sobre la morbilidad y mortalidad en los pacientes en el ámbito hospitalario (8, 9). Las células tubulares renales son particularmente susceptibles a las lesiones cuando se exponen a citoquinas endógenas, tales como en la sepsis, a toxinas endógenas o exógenas, tales como la mioglobina o aminoglucósidos y agentes radio contrastantes, o a episodios de isquemia renal (10). La recuperación de una lesión renal aguda depende de la capacidad de los túbulos renales para regenerarse y recuperar su función normal (2). La edad del paciente y la severidad de la lesión pueden condicionar la recuperación. Después de episodios severos o repetidos de una lesión renal, la recuperación puede verse afectada o incluso fallar conduciendo a la necesidad de diálisis a largo plazo y a un incremento de la mortalidad de los pacientes (11). La necrosis y la pérdida de células epiteliales tubulares es el evento más común en insuficiencia renal aguda (IRA) y la recuperación de la función renal después de una insuficiencia renal aguda depende del remplazo de las células tubulares necróticas con epitelio tubular funcional (2). La ausencia o reducción de la regeneración epitelial y endotelial puede predisponer a la cicatrización túbulo-intersticial y a enfermedad renal crónica. Los estudios sobre la respuesta fisiológica a una lesión renal indican que las células tubulares, después de haber ocurrido la lesión, se desdiferencian y adquieren un fenotipo mesenquimal. Las células desdiferenciadas entonces migran en las regiones donde las células tubulares experimentaron necrosis, apoptosis o desprendimiento con denudación de la membrana basal tubular. Este proceso es seguido por proliferación celular y, eventualmente, por su posterior diferenciación en células epiteliales funcionales con el restablecimiento de la integridad del tejido (2). También se ha sugerido que el intersticio del riñón contiene células madre renales adultas capaces de contribuir a la reparación renal (12). Una lesión glomerular es frecuentemente seguida por la progresión hasta lesiones escleróticas ya que las células glomerulares tienen una regeneración limitada con respecto a los túbulos. La pérdida de capilares es un evento común en varias enfermedades glomerulares diferentes que progresan hasta una insuficiencia renal en etapa terminal (13).

Un aspecto de la presente divulgación es por lo tanto el uso de una microvesícula derivada de una célula madre para preparar un medicamento para regeneración endotelial / epitelial.

El medicamento puede estar dirigido al tratamiento de lesiones renales, tales como insuficiencia renal aguda (IRA).

El medicamento también puede estar dirigido al tratamiento de una lesión hepática, tal como insuficiencia hepática aguda (IHA).

Dada la capacidad de las microvesículas derivadas de células madre (MV) para inhibir la apoptosis y promover la proliferación celular, tales MV son también particularmente adecuadas para uso en la inhibición de apoptosis inducida por agentes citostáticos, reduciendo así los efectos secundarios de la quimioterapia del cáncer.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una microvesícula (MV) derivada de células madre para su uso en la reducción de los efectos secundarios de la quimioterapia del cáncer, mediante la inhibición de la apoptosis inducida por un agente citostático, en la que la célula madre no es una célula madre embrionaria humana.

Agentes citostáticos son, por ejemplo, paclitaxel, lenalidomida, Pomalidomida, epirubicina, 5-FU, sunitinib, lapatinib, canertinib, ciclofosfamida, doxorrubicina, Lenalidomiden/dexametasona, Pomalidomida/dexametasona, carboplatino,

mitoxantrona, oxaliplatino, docetaxel, vinorelbina.

El medicamento de la invención se administra adecuadamente por infusión intravenosa y puede ser preparado en una forma de dosificación adecuada para la administración de una cantidad de microvesículas comprendidas entre aproximadamente 30 a 120 μg/kg de peso corporal del receptor. El receptor es cualquier paciente que requiera de un tratamiento capaz de efectuar una regeneración endotelial/epitelial, tal como por ejemplo un humano afectado por IRA o IHA.

La expresión "microvesícula (MV) derivada de una célula madre" como se utiliza aquí, se refiere a una partícula de la membrana que se deriva al menos en parte de una célula madre. A su vez, el término "célula madre" incluye cualquier célula no diferenciada o parcialmente no diferenciada que sea capaz de proliferar (auto-renovación) y diferenciación (plasticidad), reemplazando por lo tanto las células maduras de linajes de células especializadas que han alcanzado el final de su ciclo de vida. El término "célula madre" como se utiliza en la presente descripción incluye tanto células madre que tienen capacidad ilimitada de auto-renovación y plasticidad pluripotente y células progenitoras con plasticidad unipotente o multipotente y, en algunos casos, una capacidad de auto-renovación limitada.

En una forma de realización preferida de la invención, las MV derivadas de células madre utilizadas en la invención se derivan de células madre seleccionadas de entre el grupo que consiste de células progenitoras endoteliales (CPE), células madre mesenquimatosas (CMM), progenitores renales CD133+, células madre de hígado humano adulto (CMHH).

Las microvesículas derivadas de células madre usadas en la presente invención son generalmente de forma esferoidal y tienen un diámetro en el rango de 100 nm a 5 μm, más típicamente entre 0,2 y 1 μm. Si la partícula no tiene forma esferoidal, los valores anteriormente mencionados se refieren a la dimensión mayor de la partícula.

Las células madre a partir de las cuales se obtienen las microvesículas utilizadas en la invención se pueden aislar como se describe en la sección experimental de la descripción. Las microvesículas (MV) se pueden obtener luego de los sobrenadantes de las células madre aisladas, por medio de ultracentrifugación como se divulga en la sección experimental de la descripción.

Las MV aisladas se pueden almacenar luego hasta su uso por medio de congelación a una temperatura muy baja, típicamente a -80ºC, en una suspensión con uno o más agentes de crioprotección. Las sustancias crioprotectoras adecuadas son, por ejemplo dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol. El uso del DMSO en una concentración de 1% del volumen de la suspensión celular garantiza una buena preservación de las células y un efecto tóxico limitado sobre los pacientes reinyectados. Otras sustancias que pueden ser citadas son agentes de crioprotección extracelulares, es decir, sustancias de alto peso molecular que actúan en la superficie de la célula formando una barrera hermética que reduce la deshidratación intracelular. El almidón hidroxietílico puede ser citado como ejemplo. Las MV aisladas pueden ser luego utilizadas para la preparación del medicamento.

Las MV derivadas de células madre aisladas fueron probadas por los presentes inventores, tanto *in vivo* como *in vitro*. La experimentación llevada a cabo *in vivo* incluyó un modelo de IRA tóxico de múrido y un modelo experimental de glomerulonefritis de rata inducida por inyección intravenosa de anticuerpo anti-Thy-1.

La siguiente sección experimental se proporciona únicamente a modo de ilustración.

Materiales y métodos

Preparaciones celulares

Aislamiento y caracterización de células progenitoras endoteliales (CPE), células madre mesenquimales (CMM) y células progenitoras renales CD 133

Las CPE se aislaron de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos por medio de centrifugación por densidad y sembradas en placa sobre matraces de cultivo recubiertos con fibronectina en medio basal celular endotelial 2 (Clonetics, Biowhittaker, Walkersville, MD) suplementado con FBS al 5%, VEGF, FGF-2, EGF, y factor de crecimiento 1 tipo insulina. La identidad endotelial se estudió por medio de FACS, transferencias tipo Western, análisis de microarreglos génicos, y evaluación funcional de propiedades angiogénicas sobre placas recubiertas de Matrigel como se describió anteriormente (5). Se aislaron y cultivaron células madre mesenquimales humanas (CMMh) como se describió anteriormente (4). Las CMM de múrido (CMMm) de fémures y tibias de ratones de 8 semanas de edad se obtuvieron como se describió anteriormente (14). Se sembraron las células en placa con una densidad de 20 - 40 x 10^6 células por 9,5 cm^2 en medio α-MEM (Invitrogen, Paisley, Escocia), suplementado con FCS al 10%, suero de caballo al 10% (ambos de Euroclone, Wetherby, RU), L-glutamina 2 mM, 100 μg/ml de estreptomicina y 100 IU/ml de penicilina (todos de Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). Se removió la población de

células no adherentes después de 72 horas y se lavó la capa adherente una vez con medio fresco. Las células tenían una apariencia típica en forma de huso, y se confirmó del fenotipo de CMM por medio de la expresión de marcadores de células madre mesenquimales y por medio de la capacidad de diferenciarse en osteocitos y adipocitos, como se describió (14). Las células progenitoras renales se obtuvieron a partir de una porción normal de la corteza obtenida de riñones removidos quirúrgicamente. Después de la disección y el paso a través de una serie graduada de mallas, se aislaron células $CD133^+$ a partir de la fracción tubular por medio de la clasificación magnética de las células, usando el sistema MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, California). Se sembraron en placa las células $CD133^+$ sobre fibronectina en presencia de DMEM LG al 60% (Invitrogen, Paisly, Reino Unido), MCDB-201 al 40%, con 1x insulina-transferrina-selenio, 1x ácido linoleico 2-fosfato, dexametasona 10^{-9} M, ácido ascórbico 2-fosfato 10^{-4} M, penicilina 100 U, estreptomicina 1000 U, 10 ng/ml de EGF y 10 ng/ml de PDGF-BB (todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) y FCS al 2% (EuroClone, Wetherby, Reino Unido) (12). Las células seleccionadas carecían de la expresión de marcadores hematopoyéticos, y PAX-2 expresada, un marcador renal embrionario, sugiriendo su origen renal. Las células $CD133^+$ derivadas de tejido renal y clones de células individuales fueron capaces de expansión y de una auto-renovación y diferenciación limitada *in vitro* en células epiteliales o endoteliales. La diferenciación epitelial *in vitro* se obtuvo en presencia de FGF-4 (10 ng/ml) y el HGF (20 ng/ml) (Sigma). La diferenciación endotelial se obtuvo cultivando las células en medio EBM (Cambrex Bio Science, Baltimore, Maryland) con VEGF (10 ng/ml) (Sigma) y FCS al 10% sobre el factor de unión de las células endoteliales (Sigma) (12). Después de la implantación subcutánea en ratones SCID, las células no diferenciadas formaron estructuras tubulares que expresan marcadores epiteliales renales.

Aislamiento y caracterización de las MV a partir de células madre

Las MV se obtuvieron a partir de sobrenadantes de diferentes cultivos de células progenitoras cultivadas en medio privado de FCS (7). Después de centrifugación a 2000 g durante 20 minutos para eliminar los residuos, se centrifugaron los sobrenadantes libres de células a 100.000 g (ultracentrífuga Optima L-90K de Beckman Coulter) durante una hora a 4ºC, se lavó en medio libre de suero y se envió a una segunda ultracentrifugación en las mismas condiciones. Se excluyó la contaminación de endotoxina por medio del ensayo de Limulus de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Las MV obtenidas se analizaron de la siguiente manera:

Análisis FACS: se determinó el tamaño de las MV por medio de FACS (Becton Dickinson). Se utilizaron lechos de diferentes tamaños (1, 2, 3, 4, 6, 10 y 15 µm, Molecular Probes, Invitrogen) como marcadores de tamaño, y se llevaron a cabo análisis utilizando una escala logarítmica para los parámetros FSC y SSC.

Microscopía electrónica de transmisión y barrido:

Se fijaron las MV en fijador Karnowski, deshidratas en alcohol, secadas sobre una superficie de vidrio y recubiertas con oro por medio de recubrimiento por chisporroteo. Se examinaron los especímenes en un microscopio electrónico de barrido Jeol T300. Se obtuvieron las imágenes a través de electrones secundarios a una distancia de trabajo de 15 - 25 mm y a un voltaje de aceleración de 20 - 25 kV. La microscopía electrónica de transmisión se realizó sobre tejidos fijados de Karnovsky, fijados posteriormente con tetraóxido de osmio y embebidos en resina epóxica de acuerdo con procedimientos estándar. Se colorearon secciones ultrafinas con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico JEM 1010.

Análisis de arreglos de genes: se utilizó el kit de GEArray humano para el estudio de apoptosis (apoptosis humana serie Q GEArray, SuperArray Inc., Bethesda, MD) para caracterizar la expresión génica en células tubulares tratadas con las MV. Se utilizó el ARN reunido de diferentes experimentos como molde para la síntesis de la sonda biotinilada. Se detectó la expresión génica por medio de una señal de quimioluminiscencia utilizando el sustrato de fosfatasa alcalina, CDP-Star y adquirida directamente de acuerdo con el fabricante. Se llevaron a cabo análisis densitométricos utilizando el programa Quantity One (Life Science) y se analizaron los datos de la fila con el análisis del programa Analizador GEArray.

Modelos *in vivo*

Modelo IRA tóxico de múrido

Se indujo una lesión tubular tóxica aguda en ratones C57B1/6 por medio de una inyección intramuscular de 7,5 ml/kg de peso corporal de una solución de glicerol al 50% (Sigma, St. Louis, MO), como se describió anteriormente (14). Se evaluó la función renal por medio de la determinación de urea y creatinina en suero (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). El pico de lesión tubular se presentó 3 días después de la inyección de glicerol (14). Se sacrificaron los ratones después de 3, 6, 10 y 15 días de la inducción de IRA, con el propósito de evaluar las fases de lesión máxima y de regeneración tubular. Se fijaron los riñones en formalina y se embebieron en parafina para análisis histológico y e inmunohistoquímico.

Modelo experimental de glomerulonefritis Thy-1

Se indujo la glomerulonefritis (GN) por medio de administración intravenosa el día 0 de 250 μg/100 g en peso de anticuerpo anti-ThyI-1 (Ab) en la vena femoral de ratas Lewis hembra de 6 semanas de edad. Los animales de control recibieron el mismo volumen de inyección de solución salina en vez de Ab anti-ThyI-1. El día 2, cuando ya era detectable la proteinuria, se inyectaron 30 μg de las MV derivadas de CPE en la vena femoral contralateral. Los animales de control recibieron una inyección de la misma cantidad de vehículo solo (medio M199 Hepes modificado más DMSO al 1%). Se evaluaron en forma diaria la proteinuria, el suero y la creatinina en orina/urea (recolección de orina durante 24 horas). Se sacrificaron los ratones los siguientes días D4, D7, D14. Cada grupo experimental incluía 9 ratas.

Experimentos *in vitro*

Aislamiento y cultivo de células tubulares humanas

Se obtuvieron cultivos primarios de TEC humana (PTEC) de los riñones removidos por procedimientos quirúrgicos de pacientes afectados por carcinomas renales (15). Se utilizó una línea de células inmortalizadas de PTEC generada por infección con un virus Adeno5/SV40 híbrido para confirmar y para extender los experimentos llevados a cabo con células tubulares primarias. Se cultivaron las células con RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) que contenía FCS al 10% (Hyclone, Logan, Utah) y Glutamina 2 mM (GIBCO).

Ensayo de proliferación celular

Se sembraron las células a razón de 8000 células/pozo en placas de 96 pozos en medio DMEM que contenía FCS al 10% y se dejó que se adhirieran. Se detectó la síntesis de ADN como la incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) en el ADN celular utilizando un kit ELISA (Roche Applied Science). Se fijaron luego las células con etanol/HCl 0,5 M y se incubaron con nucleasa para digerir el ADN. Se detectó el BrdU incorporado en el ADN utilizando un mAb conjugado de peroxidasa anti-BrdU y se visualizó con un sustrato cromogénico soluble. Se midió la densidad óptica con un lector de ELISA a 405 nm.

Ensayos de apoptosis

Se evaluó la apoptosis utilizando el análisis de ensayo de TUNEL (ApopTag de Oncor, Gaithersburg, MD). Después de diferentes estímulos pro-apoptóticos, se suspendieron las células en PBS, se fijaron en para formaldehído al 1% en PBS, pH 7,4 durante 15 minutos a 4ºC, se las lavó dos veces en PBS y luego se las fijo posteriormente en etanol-ácido acético previamente enfriado en proporción 2:1 durante 5 minutos a -20ºC. Se trataron las muestras con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Se trataron luego las células con conjugado anti-digoxigenina caliente con fluoresceína y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se montaron las muestras en medio que contenía 1 μg/ml de yoduro de propidio y se analizaron las células por medio de inmunofluorescencia. Los resultados se expresan como porcentaje de las células que emiten fluorescencia verde (células apoptóticas) versus las células que emiten fluorescencia roja (células totales).

Detección de la actividad caspasa 3-8-9

Se evaluó la actividad de la caspasa-3-8-9 por medio de ELISA (Chemicon, Temecula, CA) con base en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilida (pNA) después de la escisión del sustrato marcado con DEVD-pNA, que es reconocido por las caspasas. Se diluyeron los lisados tubulares con un amortiguador de reacción apropiado y se añadió DEVD-pNA hasta una concentración final de 50 M. Se analizaron luego las muestras en un lector automatizado de ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Cada experimento se realizó por triplicado.

Análisis FACS

Para el análisis FACS, se separaron células de las placas de cultivo de tejidos con EDTA, se las lavó dos veces con 1x PBS y se tiñeron durante 1 hora a 4ºC con anticuerpos primarios dirigidos a las diferentes moléculas o con un anticuerpo de control irrelevante. Se incubaron las células con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor durante 45 min a 4ºC. Se fijaron las células en paraformaldehído al 1% y se las sometieron a análisis FACS (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Análisis de transferencia tipo Western

Para los análisis de transferencias tipo Western, se separaron las células con EDTA y se lisaron con un amortiguador de lisis Tris-HCl 50 mM que contenía Triton-X-100 al 1%, 10 μM/ml de leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 10 μM y 100 U/ml de aprotinina. Después de la centrifugación de los lisados tubulares a

15.000 x g, se midieron los contenidos de proteína de los sobrenadantes por medio del método de Bradford: se sometieron 30 μg de proteína por senda a electroforesis en gel de poliacrilamida al (PAGE) 10%-dodecil sulfato de sodio (SDS) y luego a una electrotransferencia sobre filtros de membrana de nitrocelulosa. Se bloquearon posteriormente las transferencias con leche sin grasa al 5% en Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 500 mM, más Tween al 0,1%. Se incubaron las membranas durante la noche a 4ºC con anticuerpos dirigidos a Akt, P-Akt, Bcl-xL (todos de Santa Cruz Biotechnology) o Pax-2 a una concentración de 500 ng/ml. Después de un lavado extensivo con Tween al 0,1%, se tiñeron las transferencias durante 1 hora, RT con proteína A conjugada con HRP (200 ng/ml, Amersham, Buckingamshire, RU), se lavó nuevamente con Tween al 0,1%, desarrollada con reactivos de detección ECL (Amersham) y expuestas a una película X-Omat (Eastman Kodak, Rochester, NY).

Evaluación de resistencia eléctrica transepitelial (RET)

Se usó la resistencia eléctrica transepitelial (RET) como un indicador de la polaridad epitelial. Se sembraron las células en pozos de transferencia sobre membranas de policarbonato recubiertos con colágeno (Corning Costar Corp., Cambridge, MA) y se permitió que alcanzaran la confluencia antes de la adición de diferentes estímulos. Se utilizó un medidor de voltaje y de resistencia epitelial (EVOM; World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) para determinar los valores de RET como se describió anteriormente (12). Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se normalizaron para el área de la membrana.

Detección de la absorción de albumina conjugada con FITC

Se estudió la absorción de proteína después de incubación de las células tubulares con 50 mg/ml de albumina humana conjugada con FITC a 37ºC durante 2 horas. Después del reto con albumina FITC, se lavaron extensamente las células 3x con PBS enfriado con hielo y se analizaron por FACS.

Ensayos de migración y la morfogénesis

Se evaluó la migración como la velocidad a la cual las células tubulares migraron en una lesión generada en una monocapa confluente con el propósito de simular una condición de estrés mecánico. Se observó la motilidad de las células bajo un microscopio invertido Nikon en una incubadora herméticamente sellada a 37ºC. Se analizó la migración después de guardar en forma digital diferentes imágenes a los 30 minutos del intervalo utilizando el sistema de análisis de micro-imagen (Casti imagine srl, Venecia, Italia). Se evaluó la migración celular marcando la posición del núcleo de más de 30 células por campo. Se calculó la velocidad promedio como la relación de la distancia en línea recta entre el punto de partida y el punto final de la observación dividido por el tiempo de la observación. En experimentos seleccionados y para ensayo de morfogénesis, se sembraron células tubulares dispersas sobre placas previamente recubiertas con 20 μg/ml de fibronectina, colágeno tipo IV o Matrigel.

Implantes subcutáneos de Matrigel de PTEC en ratones SCID

Se llevó a cabo un implante subcutáneo de PTEC en tapones de Matrigel para evaluar el efecto tubulogénico de las MV derivadas de células madre *in vivo*. En resumen, se mantuvo Matrigel desprovista de factores de crecimiento (Becton Dickinson) a -20ºC hasta su uso y se descongelaron a 4ºC durante la noche inmediatamente antes del implante. Se resuspendieron 5000 células en 250 μl de medio fresco sin FCS y se mezclaron con 500 μl de Matrigel sobre hielo usando puntas de pipeta enfriadas en presencia de diferentes estímulos. Se implantaron todas las muestras en forma subcutánea en las extremidades posteriores de ratones SCID. Después de 1 semana, se sacrificaron los ratones y se recuperaron los tapones de Matrigel para su examen.

Co-cultivo tipo sándwich endotelial-tubular

Para examinar el efecto de HMEC incubado con diferentes estímulos sobre la viabilidad tubular, se aplicó un modelo de co-cultivo. Se sembraron HMEC sobre placas de 24 pozos durante 24 horas en condiciones de cultivo estándar. Se sometieron luego las HMEC a privación de suero durante 24 o 48 horas en presencia o en ausencia de 10 μg / ml de las MV derivadas de CPE. Después de la incubación bajo las condiciones mencionadas anteriormente, se aspiró el medio, las células adheridas fueron lavadas extensamente por medio de 1x PBS y 200 μl de Matrigel reducido en factor de crecimiento; se utilizó (BD) diluido en proporción 1:1 con RPMI como una superposición y se permitió la gelificación durante 30 minutos a 37ºC. Después de eso, se añadieron 1 x 10^4 células tubulares a cada pozo para completar el co-cultivo tipo sándwich. Se incubaron los co-cultivos durante 24 a 48 horas adicional en condiciones de privación de suero. Al final de las incubaciones, se sometieron las células tubulares a un ensayo con base en XTT (Sigma). Los datos se suministran como promedias ± desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Inmunofluorescencia e inmunocitoquímica

Se realizó el análisis citofluorimétrico utilizando los siguientes anticuerpos, todos conjugados con FITC o PE: Ab

monoclonal anti-CD133-1 (mAb) (Miltenyi Biotec), mAbs anti-CD44 y HLA anti-humano clase I (Sigma), mAbs anti-CD31 y anti-CD105 (Serotec Inc, Oxford, Reino Unido), mAb anti-KDR (R&D system, Minneapolis, Minnesota), mAb anti-Muc-18 (Chemicon Internacional, Temecula, California), mAbs anti-CD29, anti-CD33, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD90, anti-CDL17 (Becton Dickinson, San Jose, California). El mAb Anti-VE cadherina fue gentilmente proporcionado por Guido Tarone (Universidad de Torino). Se utilizaron como control IgG isotópicos no inmunes de ratón FITC o PE (Dako, Copenhagen, Dinamarca). Se realizó inmunofluorescencia indirecta sobre las células cultivadas en portaobjetos de cámara, fijadas en paraformaldehído al 4% que contenía sacarosa al 2% y, cuando fuera necesario, permeabilizadas con amortiguados Hepes-Triton-X-100. También se llevó a cabo la inmunofluorescencia sobre tejidos humanos o de ratón congelados rápidamente en nitrógeno líquido, cortados en secciones de 3 μm y fijados en paraformaldehído al 3,5% que contenía sacarosa al 2%. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Abs de cabra policlonales co-transportadores anti-Na-Cl, anti-aminopeptidasa A y anti-fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), Ab policlonal anti-zónula occludens (ZO)-1 (Santa Cruz Biotechnology), Abs anti-pan-citoqueratina de conejo y anti-vWF de cabra (Sigma), mAbs anti-vimentina y anti-cadherina (Dako), mAb anti-EMA (Chemicon Internacional), Ab anti-PAX2 policlonal de conejo (Covance, Princeton, Nueva Jersey) anti-CD133 conjugado con PE (Miltenyi Biotec) y antígeno nuclear celular anti-proliferante (PCNA), mAbs anti-HLA 1 conjugado con FITC y anti-calbindina D-28K (Sigma). Se utilizaron como controles inmunoglobulinas no inmunes de ratón, conejo o cabra de control. Se utilizaron como anticuerpos secundarios, cuando fue necesario, IgG anti-ratón, conejo o cabra (Sigma) conjugados con FITC. Se llevó a cabo una Inmunocitoquímica como se describe (7) sobre tejido fijado en formalina amortiguada al 10% y embebido en parafina. Se realizó microscopía confocal utilizando un microscopio confocal modelo TCS SP2 de Leika (Heidelberg, Alemania). Se añadió para la coloración nuclear el Colorante Hoechst 33258 (Sigma).

Análisis estadístico

Todos los datos de los diferentes procedimientos experimentales se expresan como la media ± DE. Se llevó a cabo el análisis estadístico por medio de ANOVA con pruebas de comparación múltiple de Newmann-Keuls según el caso.

Resultados

Características de las MV

Se utilizó análisis FACS con perlas de 1, 2, 4 y 6 μm como el tamaño de los estándares internas para las MV derivadas de progenitores renales de CPE, CMM y CD133 para determinar su tamaño, y esto demostró que las MV derivadas de diferentes poblaciones de células madre/progenitoras tienen tamaño similar. La mayoría de las MV observadas estaban por debajo de la señal de FSC correspondiente a perlas de 1 μm (Fig. 1A). La microscopía electrónica de trasmisión y de barrido mostró la morfología esferoidal de las MV y confirmó que su tamaño estaba entre 0,2 - 1 μm (Fig. 1B). Se obtuvieron las imágenes a través de un electrón secundario a una distancia de trabajo de 15 - 25 mm y un voltaje de aceleración de 20 - 30 kV. Por medio del análisis FACS, las MV mostraron la expresión de las moléculas de adhesión que se sabe que son expresadas por la membrana plasmática de las células madre/progenitoras correspondientes (Fig. 1C). Las MV derivadas de CPE, CMM y los progenitores $CD133^+$ renales residentes compartieron la expresión de CD44, CD29, pero difirieron de la expresión de ICAM-1, integrina α4 e integrina α5. Estos resultados indican que las MV expresan sobre su superficie diferentes determinantes de membranas plasmáticas de células a partir de las cuales se originan. Se ha demostrado previamente que la expresión de las moléculas de adhesión es instrumental en la incorporación de las MV en células objetivo.

Efecto biológico *in vitro* de las MV sobre células renales

Una lesión tubular es una característica de insuficiencia renal aguda (IRA) de origen isquémico o tóxico. Además, se ha demostrado que el daño de las células endoteliales de capilares peritubulares contribuye a la extensión del daño renal después de una isquemia (16). Por lo tanto, se investigaron los efectos de las MV liberadas a partir de las células madre sobre una línea de células epiteliales tubulares proximales (PTEC).

Las MV derivadas de células madre mesenquimales de múrido (CMMm) inhiben la apoptosis de la PTEC inducida por cisplatino.

Se encontró que la incubación de la PTEC con dosis crecientes de las MV derivadas de células madre mesenquimales de múrido (CMMm) redujo significativamente la apoptosis inducida por cisplatino con respecto a los controles incubados con el vehículo solo. La incubación de las MV con ARNasa anuló la resistencia a la apoptosis. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. Se evaluó la apoptosis por medio del ensayo TUNEL como un porcentaje de las células apoptóticas después de 24 horas de incubación con 0,5 μg/ml de cisplatino (columnas oscuras). Se incubaron las PTEC solamente con vehículo o con diferentes dosis de las MV. La columna sombreada muestra el control no tratado con cisplatino. Los resultados se expresan como la media ± 1 DE de 3 experimentos. Se realizó el análisis de la varianza con la prueba de comparación múltiple de Dunnet: *$p < 0,05$ MV versus el

vehículo solo.

La expresión de PCNA (antígeno nuclear de células proliferantes) por medio de las PTEC tratadas con las MV indica inducción de proliferación celular

Las MV derivadas de CMMm inducen la expresión de PCNA por las PTEC. Se incubaron 5 x 10^4 células/pozo de células tubulares durante 24 horas en DMEM + BSA al 5% con 10 μg/ml de las MV o el vehículo solo y se evaluó la expresión de PCNA por medio de microscopía confocal. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de coloración nuclear por PCNA en PTEC cultivada en medio libre de suero y la expresión nuclear de PCNA por PTEC después de incubación con las MV derivadas de CMMm. Se llevaron a cabo tres experimentos con resultados similares.

Las MV derivadas de $CD133^+$ progenitoras renales adultos humanos son capaces de inhibir la apoptosis de las PTEC inducidas por cisplatino y de favorecer la proliferación de células epiteliales tubulares

La incubación de PTEC con diferentes dosis (1, 5 y 10 μg/ml) de las MV derivas de $CD133^+$ progenitores de riñón adulto $CD133^+$ inhibió significativamente la apoptosis inducida por cisplatino con respecto a los controles incubados con vehículo solo (Figura 3). Se evaluó la apoptosis por medio del ensayo TUNEL como un porcentaje de las células apoptóticas después de 24 horas de incubación con 0,5 μg/ml de cisplatino (columnas oscuras). La columna sombreada muestra el control tratado con cisplatino. Los resultados se expresan como la media ± 1 DE de 3 experimentos. Se llevó a cabo el análisis de la varianza con la prueba de comparación múltiple de Dunnet: *$p < 0,05$ MV versus el vehículo solo.

Las MV derivadas de $CD133^+$ progenitoras renales humanas son capaces de inducir la proliferación de las PTEC

La incubación durante 48 horas de PTEC con dos dosis diferentes de las MV (15 y 30 μg/ml) derivadas de $CD133^+$ progenitoras de riñón humano promueven significativamente la proliferación celular de la células epiteliales tubulares con respecto a los controles. Se añadieron 8.000 células/pozo en placas de 96 pozos con BrdU 10 μM, se incubó en DMEM con vehículo solo o con diferentes dosis de las MV. Se fijaron luego las células con etanol/HCl 0,5 M y se incubó con nucleasa para digerir el ADN. Se detectó el BrdU incorporado en el ADN utilizando un mAb conjugado de anti-BrdU peroxidasa y se visualizó con un sustrato cromogénico soluble. Se midió la densidad óptica con un lector de ELISA a 405 nm. Los resultados se expresan como media ± 1 DE de 3 experimentos. Los resultados se ilustran en la Figura 4.

Incubación con las MV indujo la expresión de PAX2 y vimentina por PTEC después de 48 horas de incubación, indicando una des-diferenciación de PTEC que adquirió un fenotipo inmaduro

Las MV derivadas de CD133 progenitoras de riñón humano indujeron desdiferenciación de las PTEC. Se incubaron 5 x 10^4 células/pozo de las PTEC durante 24 horas en DMEM + BSA al 5% con 10 μg/ml de las MV derivadas de CD133 progenitoras de riñón humano o vehículo solo y se evaluó la expresión PAX2 y vimentina por medio de microscopía confocal.

Ensayos de proliferación celular y apoptosis de hepatocitos humanos tratados con las MV derivadas de CMM o CMHH

Las MV derivadas de células madre mesenquimales (CMM) o células madre de hígado humano adulto (CMHH) fueron capaces de favorecer la proliferación de hepatocitos humanos.

La incubación de hepatocitos con diferentes dosis (10, 25 y 50 μg/ml) de MV derivado de CMM o CMHH durante 72 horas promovió la proliferación celular con respecto al control incubado con el vehículo solo. Como se muestra en la Figura 5, se añadieron 5000 células/pozo en placas de 96 pozos con BrdU 10 μM, incubadas en DMEM con vehículo solo o con diferentes dosis de MV. Se fijaron luego las células con etanol/HCl 0,5 M y se incubaron con nucleasa para digerir el ADN. Se detectó el BrdU incorporado en el ADN utilizando un mAb conjugado de anti-BrdU peroxidasa y se visualizó con un sustrato cromogénico. Se midió la densidad óptica con un lector de ELISA a 405 nm. Los resultados se expresan como media ± 1 DE de 3 experimentos. Se llevó a cabo el análisis de la varianza con la prueba de comparación múltiple de Dunnet: *$p < 0,05$ MV versus el vehículo solo. Los resultados muestran claramente que las MV de las CMM y las CMHH son capaces de estimular la proliferación *in vitro* de hepatocitos humanos maduros, lo que sugiere un efecto potencial sobre regeneración hepática.

Ensayo de apoptosis de células tubulares humanas tratadas con las MV derivadas de CMHH

La apoptosis de células epiteliales tubulares humanas, se evaluó utilizando el análisis del ensayo TUNEL como se describió anteriormente. En resumen, se sometieron al análisis del ensayo de marcación del extremo amellado

mediado por desoxinucleotidiltranstransferasa terminal [TdT] (TUNEL) usando cisplatino (2 μg/ml) como control positivo para la inducción de apoptosis. Se lavaron las células en PBS, se fijaron en paraformaldehído al 1% en PBS, pH 7,4, se las incubó con enzima TdT y digoxigenina-dNTP, se las lavó en PBS, y se las contrastó con anticuerpo anti-digoxigenina-FITC y con yoduro de propidio (1 μg/ml) en PBS. Los fragmentos de ADN marcado con FITC en las células apoptóticas se visualizaron por medio de microscopía UV invertida. Se hizo un recuento de las células por medio de análisis digital de las imágenes obtenidas utilizando una cámara de vídeo, se expresaron las células apoptóticas positivas como un porcentaje de las células total contadas en un campo de microscopio invertido 10X. La concentración de las MV utilizadas en este ensayo fue de 10, 15, 30 μg/ml durante 48 horas.

La Figura 6, muestra el % de apoptosis de células epiteliales tubulares humanas estimulados con las MV de las CMHH o a 10, 15 y 30 μg/ml. Las MV derivadas de las CMHH estimularon la proliferación de las células epiteliales tubulares humanas, que es un cultivo de células primario, limitado a muy pocas pasadas, en una manera dependiente de la dosis. Las concentraciones de las MV que estimularon la proliferación fueron: 10, 15, 30 μg/ml. En el caso de la apoptosis inducida por cisplatino, las MV derivadas de las CMHH inhibieron la apoptosis de células epiteliales tubulares humanas a la misma concentración que la proliferación estimulada.

Las MV derivadas de CPE ejercieron un efecto anti-apoptótico y proliferativo sobre PTEC

Se incubaron PTEC con dosis crecientes de las MV (1 - 5 μg/ml) 1. Las MV indujeron un efecto proliferativo después de 12 horas de incubación con un incremento adicional después de 24 a 48 horas en PTEC (Fig. 7). La proliferación inducida por MV se incrementó significativamente con la dosis de 1 μg/ml y alcanzó un pico con la dosis de 50 μg/ml (Fig. 7). La Figura 7 muestra el efecto proliferativo inducido por las MV sobre PTEC. Los datos del ensayo basado en XTT de la proliferación durante el transcurso de tiempo de PTEC. Las MV indujeron un incremento significativo dependiente de la dosis de la proliferación en todos los momentos considerados (12, 24, 48 horas). Los datos se expresan como la media ± DE de tres experimentos diferentes. Se llevó a cabo un ANOVA con un ensayo de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Se investigó el efecto anti-apoptótico de las MV sobre PTEC cultivadas en diferentes condiciones perjudiciales. Como se muestra por medio del ensayo TUNEL (Fig. 8), las MV reducen significativamente la apoptosis de las PTEC cultivadas en condición de privación de suero, con 5 μg/ml de cisplatino, 1 μg/ml de FK506, o con citoquinas inflamatorias (20 ng/ml de TNF-alfa y 20 ng/ml de IFN-gamma). La Figura 8 ilustra los resultados de los ensayos TUNEL realizados, que muestran el efecto anti-apoptótico de 10 μg/ml de las MV sobre las PTEC expuestas a privación de suero (vehículo/FCS), cisplatino (CIS 5 μg/ml), FK 506 (1 μg/ml) o citoquinas inflamatorias (séptico: 20 ng/ml de TNF-alfa y 20 ng/ml de IFN-gamma). Los datos se expresan como el promedio ± DE de tres experimentos diferentes. Se llevó a cabo un ANOVA con un ensayo de comparación múltiple de Newman-Keuls.

El análisis de disposición de los genes demostró que las MV modularon la expresión de los genes que codifican para las moléculas de las rutas apoptóticas mitocondrial y del receptor de muerte. En particular, las MV indujeron el aumento de la expresión de Bcl-XL, Bcl-2 y FLIP anti-apoptóticos y la disminución de la expresión de diferentes genes pro-apoptóticos tales como Fas, Fas-ligando (Fas-L), Bax, TNF y TRAIL. Además, disminuyó la expresión del gen CD40 que se sobreexpresa en células epiteliales tubulares renales durante una lesión inflamatoria, sugiriendo una acción anti-inflamatoria de las MV sobre PTEC. La disminución de la expresión de CD40 se confirmó por medio de análisis FACS. La Figura 9 muestra los resultados del análisis de la disposición de los genes de las PTEC estimuladas con cisplatino (5 μg/ml) en presencia o en ausencia de 10 μg/ml de las MV. La variación del porcentaje de expresión de los genes involucrados en la apoptosis de la PTEC. Los resultados se presentan como la relación entre el análisis densitométrico de la expresión de los genes en PTEC expuestas a cisplatino + las MV con respecto al cisplatino solo. Los genes de mantenimiento (beta-actina, GAPDH) se utilizaron como referencia para análisis densitométrico. Se llevaron a cabo tres experimentos con resultados similares.

La incubación con 10 ng/ml de las MV indujo una reducción significativa de la actividad de la caspasa 3, 8 y 9 en PTEC tratadas con cisplatino. Estos resultados indican la inhibición concomitante de las rutas apoptóticas mediadas por el receptor y mitocondriales. La Figura 10 muestra los resultados de los ensayos de ELISA que muestran la reducción significativa en la actividad de la caspasa 3, 8 y 9 inducidas por 10 μg/ml de las MV sobre PTEC tratadas con cisplatino durante 24 horas. Los datos se expresan como el promedio ± DE de tres experimentos diferentes. Se llevó a cabo un ANOVA con un ensayo de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Se evaluó el efecto paracrino de factores producidos en forma endotelial sobre la supervivencia de PTEC en un modelo de co-cultivo caracterizado por una capa de células endoteliales separadas por Matrigel a partir de una capa superior de PTEC. Se indujo una lesión epitelial por medio de privación de suero durante 24 o 48 horas en presencia o ausencia de 10 μg/ml de las MV seguido por la estratificación del Matrigel reducido en factor de crecimiento o cuyas PTEC fueron sembradas. En ausencia de las MV, la vitalidad de la PTEC se redujo significativamente después de 24 y 48 horas. En contraste, la estimulación endotelial con las MV impidió la disminución de la vitalidad. Estos resultados sugieren que las MV estimularon una acción paracrina de las células endoteliales, que promueven la supervivencia de las PTEC. Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 11, referentes a la evaluación de la

vitalidad de las PTEC en el modelo de co-cultivo de las PTEC del endotelio. La lesión endotelial fue inducida por privación de suero durante 24 o 48 horas en presencia o en ausencia de 10 μg/ml de las MV seguido por la estratificación del Matrigel reducido en factor de crecimiento sobre el cual se sembraron las PTEC. Los datos se expresan como el promedio ± DE de tres experimentos diferentes. Se llevó a cabo un ANOVA con un ensayo de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Se investigó el efecto de las MV sobre la expresión de la vimentina marcadora mesenquimal y de Pax-2, una proteína presente en riñones embrionarios en PTEC humanas cultivadas durante 24 horas sin FCS en presencia de 10 μg/ml de las MV. Las MV indujeron la expresión de vimentina y Pax-2 en PTEC. Se incubaron 5 x 10^4 células/pozo de PTEC durante 24 horas en DMEM + BSA al 5% con 10 μg/ml de las MV derivadas de CPE y se evaluó la expresión de PAX2 y vimentina por medio de microscopía confocal.

Migración de PTEC inducida por MV

Se evaluó la motilidad de PTEC dispersa sembradas sobre placas recubiertas de fibronectina, colágeno de tipo IV o Matrigel, una condición que imita el microambiente en el cual las PTEC deben migrar para restablecer la integridad tubular. Se estudió el efecto de las MV sobre la migración de las células por medio de microscopía de lapso de tiempo sobre PTEC dispersa. Se encontró que la tasa de migración de referencia correspondiente a la motilidad espontánea de PTEC permanece constante durante todo el período de la observación (12 horas), nunca excediendo de 3 - 4 μm/hora. Las MV indujeron un incremento significativo de la migración espontánea que alcanzó su punto máximo tan pronto como a las 2 horas y permaneció significativamente más alto a lo largo de todo el período de observación en todas las matrices extracelulares. La Figura 12 muestra el efecto de las MV sobre la migración de PTEC cultivada sobre matrices extracelulares. La incubación con 10 μg/ml de PEM aumentó significativamente la migración de PTEC cultivada sobre placas previamente recubiertas con 20 μg/ml de fibronectina humana, colágeno de tipo IV o Matrigel. Los datos se expresan como el promedio de velocidad (μm/hr) ± DE de tres experimentos diferentes.

Las MV mantienen la integridad funcional de la monocapa epitelial en PTEC tratada con cisplatino

La adición de las MV a la PTEC tratada con cisplatino restableció la polaridad de las células, como se evaluó por medio del análisis de resistencia transepitelial. La Figura 13 muestra el efecto de las MV sobre la alteración inducida por cisplatino de la resistencia transepitelial (RTE). El análisis de la RTE de PTEC, un marcador de la polaridad de las células, en diferentes condiciones experimentales: el cisplatino (CIS 5 μg/ml) redujo significativamente los valores de RTE (*$p < 0,05$ CIS versus vehículo), mientras que las MV (10 o 50 μg/ml) restituyeron los valores normales de RTE. Los datos se expresan como los valores promedio de RTE de tres experimentos diferentes ± DE. Los valores de RTE se normalizaron para el área de la membrana utilizada en el procedimiento experimental. Se llevó a cabo un ANOVA con un ensayo de comparación múltiple de Newman-Keuls.

Además, en presencia de las MV, la PTEC tratada con cisplatino conservó la expresión de las moléculas típicas de túbulos completamente diferenciados tales como fosfatasa alcalina y aminopeptidasa A y restableció la presencia de la megalina del receptor endocítico, un fenómeno probablemente responsable de la capacidad mantenida de estas células para internalizar la albumina marcada con FITC. Se estudió la expresión de la megalina del receptor de endocítico por parte de la PTEC tratada con MV por inmunofluorescencia, comparando la expresión de megalina en presencia de 5 μg/ml de cisplatino o 5 μg/ml de cisplatino + 10 μg/ml de las MV. Aumento 100x. Se contrastaron los núcleos con 0,5 mg/ml de Hoechst. Se llevaron a cabo tres experimentos con resultados similares.

La Figura 14 muestra el efecto de las MV sobre la internalización de la FITC-albumina por las PTEC. La absorción de proteína se estudió después de la incubación de monocapas de PTEC con 50 mg/ml de FITC-albumina humana conjugada a 37ºC durante 2 horas. Después del reto con FITC-albúmina, se lavaron extensamente las PTEC 3X con PBS enfriado en hielo y se analizaron por medio de FACS. Las curvas oscuras mostraron la internalización de la albúmina con respecto al control (curvas abiertas). A muestra la captación de FITC-albúmina por PTEC tratada con 5 μg/ml de cisplatino; B muestra la captación de FITC-albúmina por las PTEC tratadas con 5 μg/ml de cisplatino estimuladas con 10 μg/ml de las MV. Se llevó a cabo el análisis estadístico de Kolomogorov Smirnov. Se llevaron a cabo tres experimentos diferentes con resultados similares.

Las MV inducen morfogénesis de ramificación de PTEC cultivadas sobre placas recubiertas de Matrigel y tubulogénesis *in vivo*

Las PTEC cultivadas durante 24 horas sin FCS sobre placas recubiertas de Matrigel formaron estructuras tipo quistes. La adición de 10 μg/ml de las MV resultó en una morfogénesis de ramificación de las PTEC. Se inyectaron las PTEC en forma subcutánea en tapones de Matrigel en ratones SCID. Estas células formaron espontáneamente un bajo número de estructuras tipo tubular que aumentaron significativamente en presencia de 10 μg/ml de las MV. En contraste, el cisplatino inhibió completamente la morfogénesis de ramificación activando la apoptosis que se

restableció por estimulación con MV. Se evaluó la morfogénesis de las PTEC cultivadas sobre placas recubiertas de Matrigel en presencia o ausencia de 10 μg/ml de las MV. Después de 24 horas, las PTEC no estimuladas formaron estructuras tipo quiste, mientras que las MV indujeron la morfogénesis de dispersión y ramificación. Se evaluó también la tubulogénesis *in vivo* de PTEC inyectadas en forma subcutánea en tapones de Matrigel en ratones SCID. Las células no estimuladas formaron únicamente unas pocas estructuras de tipo tubular que aumentaron significativamente en presencia de 10 μg/ml.

El efecto tubulogénico de las MV *in vivo* dependía de la dosis. La Figura 15 muestra la cuantificación de la tubulogénesis *in vivo* inducida por MV. El recuento de estructuras de tipo tubular se realizó en 10 secciones de Matrigel no secuenciales (aumento 100X) de PTEC tratadas con diferentes dosis de las MV e inyectas en forma subcutánea en ratones SCID. Se sacrificaron los ratones después de 7 días y se observaron los tapones de Matrigel por medio de microscopía de fluorescencia. Los datos se expresan como el número promedio de estructuras/campo de tipo tubular (aumento 100x) contadas en tres experimentos diferentes. Se utilizó proteína de estimulación de macrófagos (PEM 10 ng/ml), un factor trófico para PTEC, como control positivo.

Disminución de la adhesión de linfocitos a las monocapas de PTEC

La adhesión mejorada de linfocitos a la PTEC tratada con citoquinas, que imita la reacción inflamatoria que se presenta *in vivo* en el transcurso de la IRA. La adición de las MV a PTEC estimulada con citoquinas inhibió significativamente la adhesión de linfocitos a las PTEC, sugiriendo una acción anti-inflamatoria de las MV.

Figura 16: se incubaron monocapas de PTEC durante 6 horas con vehículo solo o citoquinas inflamatorias (20 ng/ml de TNF-alfa y 20 ng/ml de IFN-gamma) en presencia o en ausencia de 10 μg/ml de las MV. Después de un extenso lavado de la monocapa de PTEC se añadieron 1 x 10^4 linfocitos humanos marcados con PKH2 y se incubó en condiciones de agitación suave durante 1 hora a 37ºC. Se removieron las células no adherentes por medio de tres lavados con PBS y se contaron las células adherentes por medio de microscopía de fluorescencia con aumento 100x y se expresaron como el número de células/campo. Los datos son la medias ± DE de tres experimentos diferentes.

Las MV derivadas de CPE son capaces de inducir la proliferación celular y de angiogénesis *in vitro* de las células endoteliales glomerulares (CEG).

Las MV derivadas de CPE fueron capaces de inducir proliferación celular y angiogénesis *in vitro* de células endoteliales glomerulares (CEG). La incubación durante 48 horas de las CEG con diferentes dosis de MV (10, 15 y 30 μg/ml) derivadas de CPE promovieron significativamente la proliferación celular de CEG, con respecto al control. Como se muestra en la Figura 17, se añadieron CEG (8000 células/pozo en placas de 96 pozos) BrdU 10 μM, se incubó en DMEM con vehículo solo o con diferentes dosis de MV. Se fijaron luego las células con etanol/HCl 0,5 M y se incubó con nucleasa para digerir el ADN. El BrdU incorporado en el ADN se detectó utilizando un mAb conjugado de anti-BrdU peroxidasa y se visualizó con un sustrato cromogénico soluble. Se midió la densidad óptica con un lector de ELISA a 405 nm. Los resultados se expresan como la media ± 1 DE de 3 experimentos.

Además diferentes dosis de MV (10, 15 y 30 μg/ml) indujeron angiogénesis *in vitro* en CEG incubadas durante 6 horas sobre Matrigel.

Efectos biológicos *in vivo* de las MV sobre la reparación renal

Las MV promueven la regeneración de lesiones tubulares agudas inducidas experimentalmente

Para determinar si las MV derivadas de las CMM de médula ósea de adulto de ratones C57/BL6 fueron capaces de promover la recuperación de una lesión renal aguda, se indujo IRA en ratones hembra C57/BL6 con una inyección intramuscular de glicerol hipertónico. El glicerol indujo miólisis y hemólisis exponiendo por lo tanto los tejidos, especialmente el riñón, a grandes cantidades de mioglobina y hemoglobina. En este modelo de múrido, la función renal como la medida por la creatinina y el NUS en suero, se deteriora entre 1 - 4 días después de la administración del glicerol. En nuestro medio, la inyección intramuscular de 7,5 ml/kg de glicerol indujo un aumento significativo en la creatinina y el NUS en suero, que alcanzó un máximo el día 3, declinó el día 10, y se normalizó el día 21. La inyección intravenosa de MV derivadas de CMM o 1 x 10^6 CMM el día tres después de recibir glicerol redujo significativamente la creatinina y el NUS en suero en el día 5 con respecto a los ratones tratados con glicerol que recibieron solución salina (Figura 18 y Figura 19).

La Figura 18 muestra que las MV protegieron a los ratones tratados con glicerol del deterioro de la función renal. La evaluación del nitrógeno ureico en sangre (NUS) en ratones con IRA inducido por glicerol tratados o no tratados (columna oscura) el día tres con 6 μg de las MV (columnas blancas) o 1 x 10^6 de CMM (columnas sombreadas). Los datos se expresan como la media ± DE de tres experimentos individuales y se realizó un ANOVA: *$p < 0,05$.

La Figura 19 se refiere a la evaluación de creatinina en ratones con IRA inducido por glicerol, tratados o no tratados (columna oscura) el día tres con 6 μg de las MV (columnas blancas) o 1 x 10^6 de CMM (columnas sombreadas). Los datos se expresan como la media ± DE de tres experimentos individuales y se realizó un ANOVA: *p < 0,05.

Se evidenció una marcada lesión epitelial tubular el día 5 en ratones con IRA inducida por glicerol. Las alteraciones morfológicas observadas en ratones con IRA inducida por glicerol incluyeron vacuolización, pérdida del borde de cepillo y necrosis generalizada de células epiteliales tubulares y formación de molde hialino tubular. Cuando se inyectaron las MV en ratones tratados con glicerol, las lesiones tubulares fueron menos severas con aspectos de la regeneración tubular y tubos que expresaron nuevamente un borde de cepillo.

Las MV promueven la regeneración de una lesión glomerular inducida experimentalmente

Para determinar si las MV derivadas de CPE humanas eran capaces de inducir regeneración glomerular, se usó el modelo Thy-1 de glomerulonefritis, que caracteriza una lesión glomerular aguda mediada por anticuerpos: en este modelo, los anticuerpos anti-Thy-1 inducen mesangiolisis con pérdida de capilares glomerulares y acumulación de células inflamatorias. Una lesión glomerular se asocia con proteinuria. La glomerulonefritis (GN) fue inducida por medio de administración intravenosa el día 0 de 250 μg/100 g en peso de anticuerpo (Ab) anti-Thy-1 en la vena femoral de ratas hembra de Lewis de 6 semanas de edad. Los animales de control recibieron el mismo volumen de inyección de solución salina en vez de Ab anti-Thy-1. El día 2, cuando ya era detectable la proteinuria, se inyectaron 30 μg de MV derivadas de CPE en la vena femoral contralateral. Los animales de control recibieron una inyección de la misma cantidad de vehículo solo (medio M199 Hepes modificado más DMSO al 1%). Se evaluaron diariamente la proteinuria, la creatinina en orina y en suero/urea (recolección de orina de 24 horas). Se sacrificaron los ratones en los siguientes días D4, D7, D14. Cada grupo experimental incluía 9 ratas.

Como se muestra en la Figura 20 la administración de MV redujo significativamente la proteinuria en ratas con GN Thy-1. El análisis histológico mostró que en ratas con GN Thy-1 estaba presente una lesión difusa de paredes capilares con formación microaneurismática y presencia de células inflamatorias. La pérdida de capilares glomerulares también se indicó por medio de la coloración reducida para el antígeno RECA que es un marcador endotelial. Además, se observó una lesión difusa de túbulos proximales y distales con moldes de proteína dentro del lumen del túbulo. El examen histológico de los riñones de las ratas tratadas con MV demostró una lesión glomerular y tubular reducida el día 4 y una regeneración de los capilares glomerulares como se detecta de la distribución normal de antígeno RECA y del borde de cepillo de células tubulares el día 7. La inhibición de la lesión capilar por medio del tratamiento con MV fue confirmado por microscopía electrónica que demostró la presencia de capas celulares endoteliales intactas y distribución normal de pedicelos en ratas tratadas con MV. En contraste, en ratas no tratadas con MV se observó hinchamiento y desprendimiento de las células endoteliales con aspectos de fagocitosis de endotelio lesionado por células inflamatorias. Además, estaba presente el borramiento de pedicelos.

En conclusión, el tratamiento de GN Thy-1 con MV inhibió la proteinuria, las lesiones inflamatorias glomerulares y la regeneración y recuperación capilar glomerular promovida.

Conclusiones

Los resultados experimentales obtenidos sugieren que las MV derivadas de células madre de diferentes orígenes, tales como células madre progenitoras endoteliales, mesenquimales, hepáticas y renales, son capaces de transferir señales biológicas a células maduras renales, lo que resulta en la desdiferenciación de las células objetivo que adquieren un fenotipo inmaduro junto con la resistencia a los estímulos apoptóticos y migratorios y capacidades proliferativas. La desdiferenciación de células residentes, su migración y proliferación es un requisito clave para eventos reparadores después de una lesión glomerular y tubular renal. En realidad, el tratamiento de necrosis tubular aguda experimental y de una lesión glomerular mediada por anticuerpos resulta en una recuperación funcional y morfológica acelerada. Por lo tanto, las MV derivadas de células madre pueden ser propuestos para terapia regenerativa en diferentes condiciones patológicas tubulares y glomerulares renales. Una ventaja del uso de las MV en vez de células madre es evitar los efectos tumorigénicos potenciales de las células madre, evitar la necesidad de inmunosupresión y la posibilidad de una producción ilimitada *in vitro*.

REFERENCIAS

1. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. J Am Soc Nephrol. 2003 Aug; 14(8): 2199 - 210.

2. Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. J Am Soc Nephrol. 2003 Jun; 14 Suppl 1: 555 - 61.

3. Iruela-Arispe L, Gordon K, Hugo C, Duijvestijn AM, Claffey KP, Reilly M, Couser WG, Alpers CE, Johnson RJ. Participation of glomerular endothelial cells in the capillary repair of glomerulonephritis. Am J Pathol. 1995 Dec;

147(6): 1715 - 27.

4. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, Stamenkovic I, Biancone L, Camussi G. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. Kidney Int. 2007 Aug; 72(4): 430 - 41.

5. Biancone L, Cantaluppi V, Duo D, Deregibus MC, Torre C, Camussi G. Role of L-selectin in the vascular homing of peripheral blood-derived endotelial progenitor cells. J Immunol. 2004 Oct 15; 173(8): 5268 - 74.

6. Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Muller-Newen G, Djuric Z, van Roeyen CR, Konieczny A, Ostendorf T, Villa L, Milovanceva-Popovska M, Kerjaschki D, Floege J. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. J Am Soc Nephrol. 2007 Jun; 18(6): 1754 - 64.

7. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, lolacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles activate an angiogenic program in endotelial cells by an horizontal transfer of mRNA. Blood 2007, 110: 2440 - 2448.

8. Chertow GM, Soroko SH, Paganini EP, Cho KC, Himmelfarb J, Ikizler TA, Metha RL. Mortality after acute renal failure: models for prognostic stratification and risk adjustment. Kidney Int. 2006; 70: 1120 - 1126.

9. Metha RL, Pascual MT, Soroko S, Savage BR, Himmelfarb J, Ikizler TA, Paganini EP, Chertow GM. Program to Improve Care in Acute Renal Disease. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. Kidney Int. 2004; 66: 1613 - 1621.

10. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2002; 11: 301 - 308.

11. Tonelli M, Manns B, Feller-Kopman D. Acute renal failure in the intensive care unit: a systematic review of the impact of dialytic modality on mortality and renal recovery. Am J Kidney Dis. 2002 Nov; 40 (5): 875 - 85.

12. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, Camussi G. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. Am J Pathol. 2005 Feb; 166(2): 545 - 55.

13. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. J Am Soc Nephrol. 2006 Jan; 17(1): 17 - 25.

14. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Mauriello Romanazzi G, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. Int J Mol Med 2004; 14: 1035 - 1041.

15. Conaldi PG, Biancone L, Bottelli A, Wade-Evans A, Racusen LC, Boccellino M, Orlandi V, Serra C, Camussi G, Toniolo A. HIV-1 kills renal tubular epitelial cells in vitro by triggering an apoptotic pathway involving caspase activation and Fas upregulation. J Clin Invest. 1998 Dec 15; 102(12): 2041 - 9.

16. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. Kidney Int. 2004 Aug; 66(2): 496 - 9.

REIVINDICACIONES

1. Una microvesícula (MV) derivada de células madres para su uso en la reducción de los efectos secundarios de la quimioterapia del cáncer, mediante la inhibición de la apoptosis inducida por un agente citostático, en la que la célula madre no es una célula madre embrionaria humana.

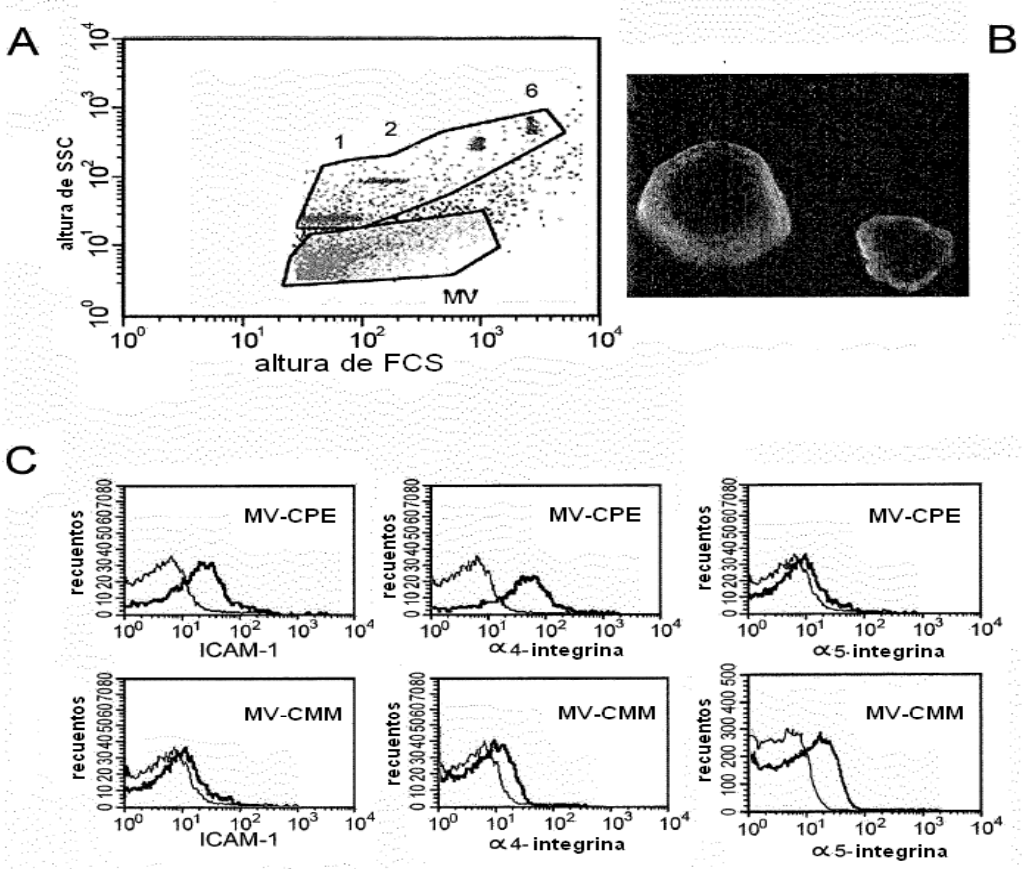
2. La microvesícula (MV) derivada de células madre para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente cistostático se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, lenalidomida, Pomalidomida, epirubicina, 5-FU, sunitinib, lapatinib, canertinib, ciclofosfamida, doxorrubicina, Lenalidomiden/dexametasona, Pomalidomida/dexametasona, carboplatino, mitoxantrona, oxaliplatino, docetaxel, vinorelbina y cualquier combinación de los mismos.

3. La microvesícula (MV) derivada de células madre para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la célula madre se selecciona del grupo que consiste de células progenitoras endoteliales (CPE), células madre mesenquimatosas (CMM), progenitores renales CD133+, células madre de hígado humano adulto (CMHH) y cualquier combinación de los mismos.

4. La microvesícula (MV) derivada de células madre para uso de acuerdo con cualquiera de reivindicaciones 1 a 3, que es una forma de dosificación adecuada para administración por medio de infusión intravenosa.

5. La microvesícula (MV) derivada de células madre para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una forma de dosificación adecuada para administración de las microvesículas en una cantidad desde 30 μg/kg hasta 120 μg/kg de peso corporal.

FIG.1


A
B
C
altura de SSC
altura de FCS
1
2
6
MV
recuentos
MV-CPE
MV-CMM
ICAM-1
α4-integrina
α5-integrina

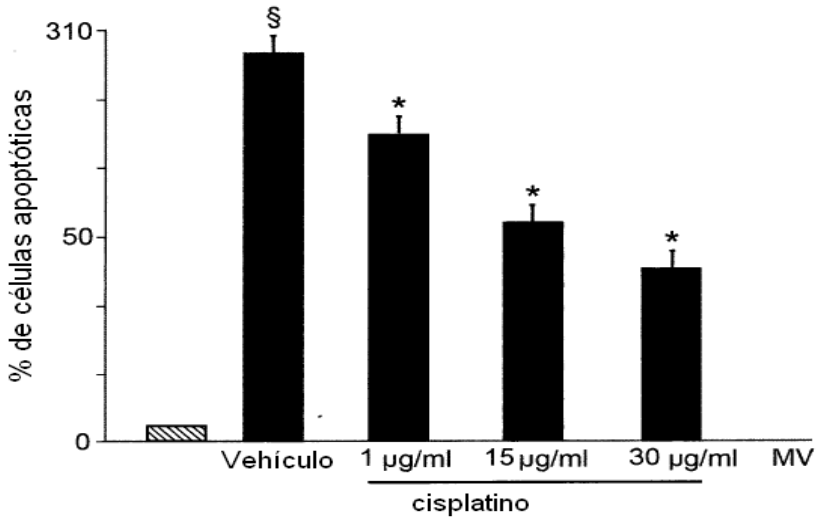

310
50
0
% de células apoptóticas
§
*
*
*
Vehículo
1 µg/ml
15 µg/ml
30 µg/ml
MV
cisplatino

FIG.2

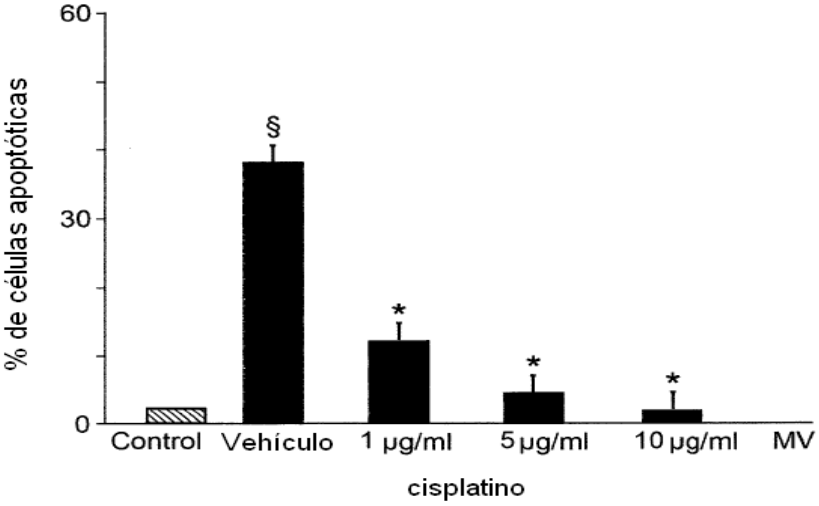

60
30
0
% de células apoptóticas
§
*
*
*
Control
Vehículo
1 µg/ml
5 µg/ml
10 µg/ml
MV
cisplatino

FIG.3

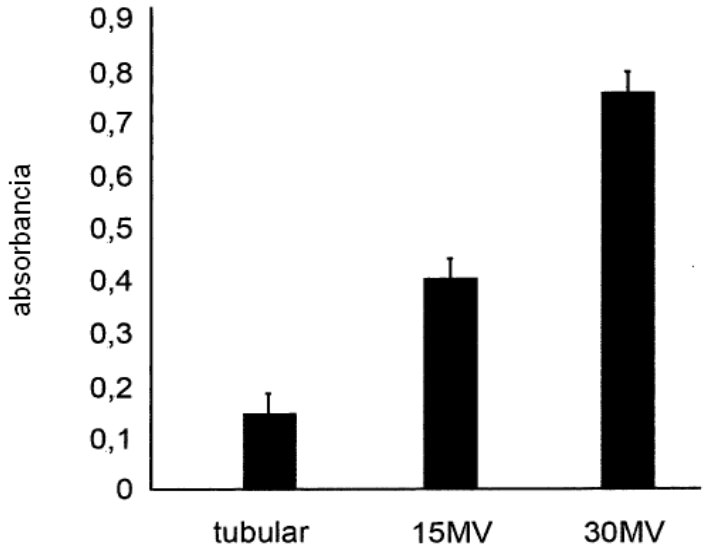

0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
absorbancia
tubular
15MV
30MV

FIG.4

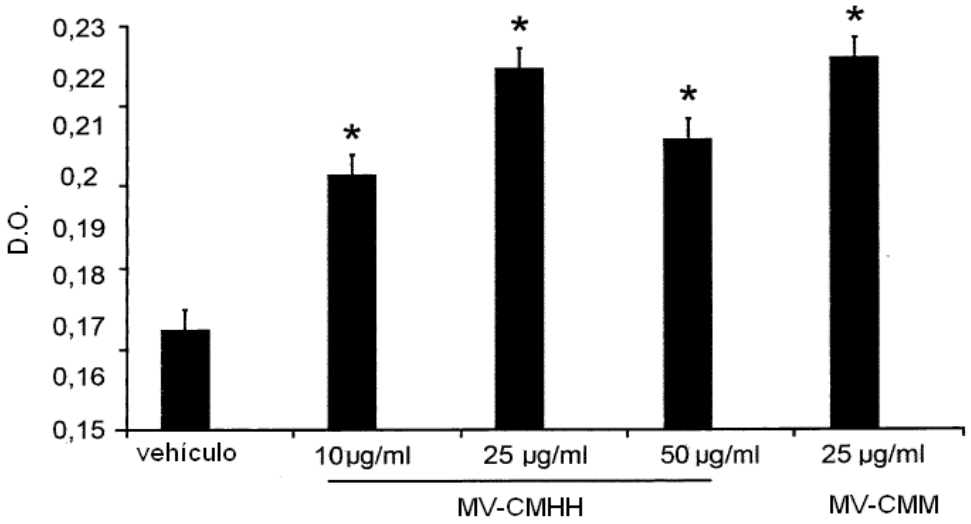

0,23
0,22
0,21
0,2
0,19
0,18
0,17
0,16
0,15
D.O.
*
*
*
*
vehículo
10µg/ml
25 µg/ml
50 µg/ml
25 µg/ml
MV-CMHH
MV-CMM

FIG.5

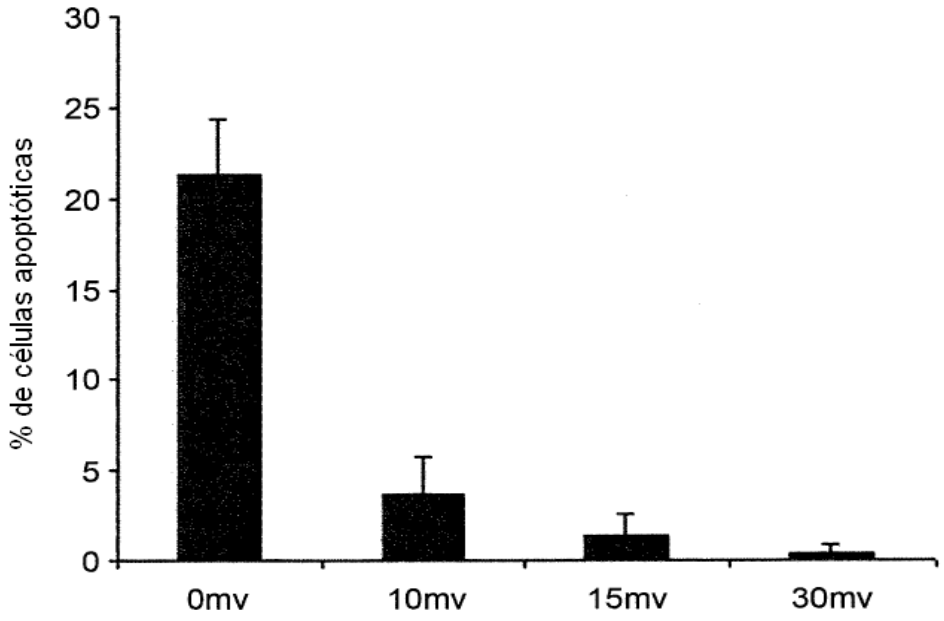

% de células apoptóticas
30
25
20
15
10
5
0
0mv
10mv
15mv
30mv

FIG.6

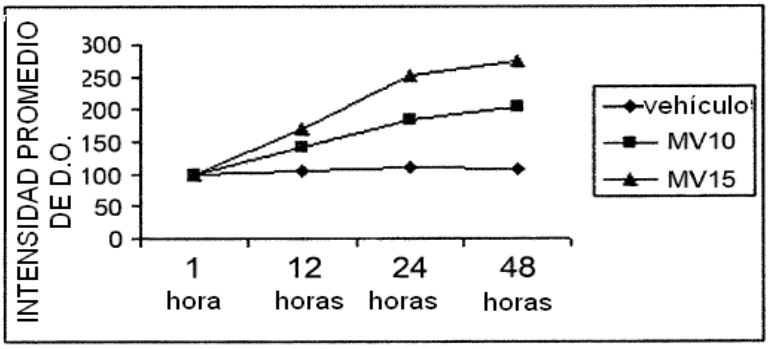

INTENSIDAD PROMEDIO DE D.O.
300
250
200
150
100
50
0
1 hora
12 horas
24 horas
48 horas
vehículo
MV10
MV15

FIG.7

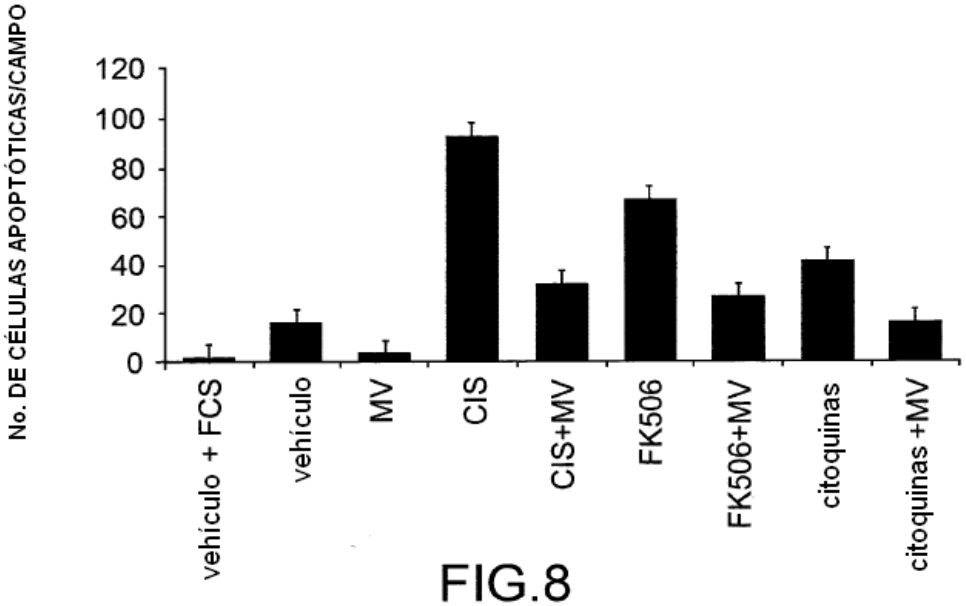

No. DE CÉLULAS APOPTÓTICAS/CAMPO
120
100
80
60
40
20
0
vehículo + FCS
vehículo
MV
CIS
CIS+MV
FK506
FK506+MV
citoquinas
citoquinas +MV

FIG.8

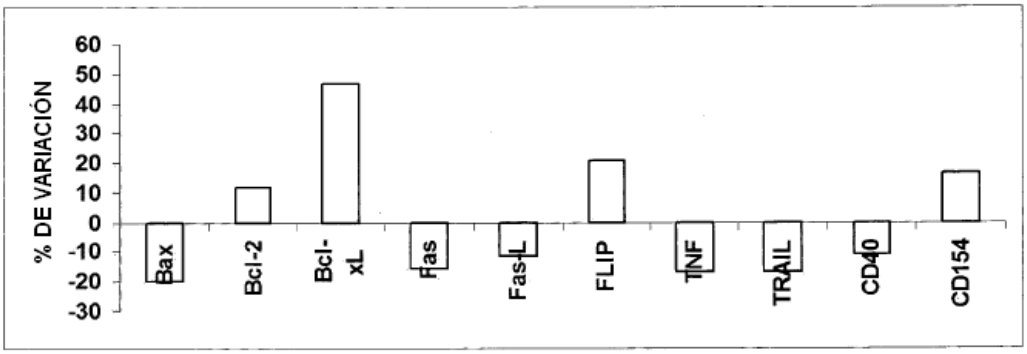

% DE VARIACIÓN
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
Bax
Bcl-2
Bcl-xL
Fas
Fas-L
FLIP
TNF
TRAIL
CD40
CD154

FIG.9

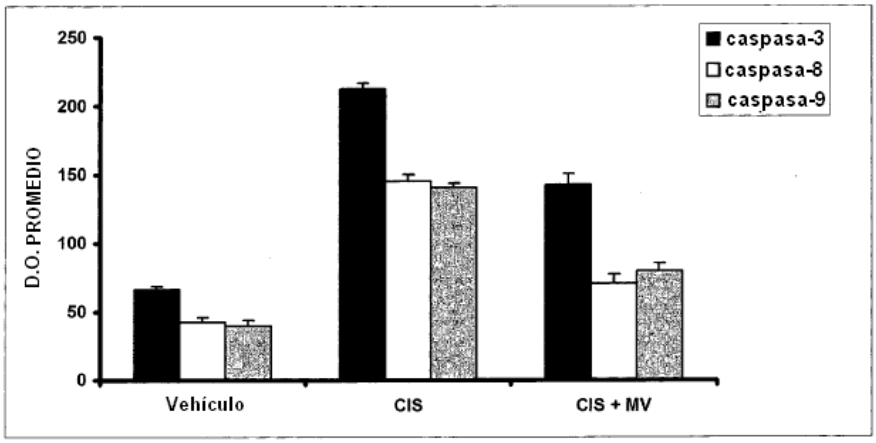

caspasa-3
caspasa-8
caspasa-9
D.O. PROMEDIO
250
200
150
100
50
0
Vehículo
CIS
CIS + MV

FIG.10

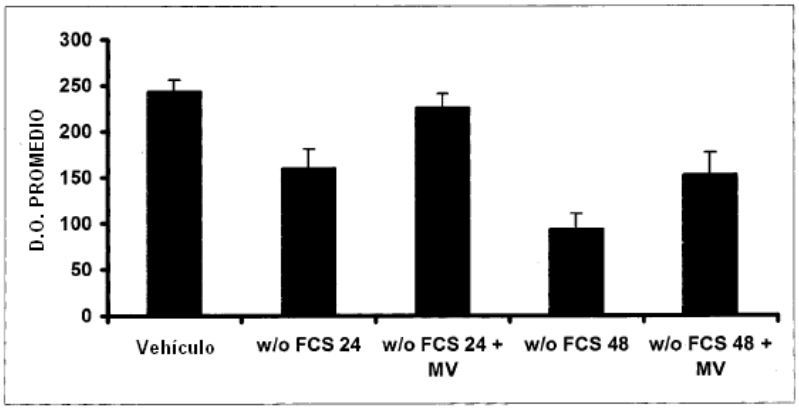

D.O. PROMEDIO
300
250
200
150
100
50
0
Vehículo
w/o FCS 24
w/o FCS 24 + MV
w/o FCS 48
w/o FCS 48 + MV

FIG.11

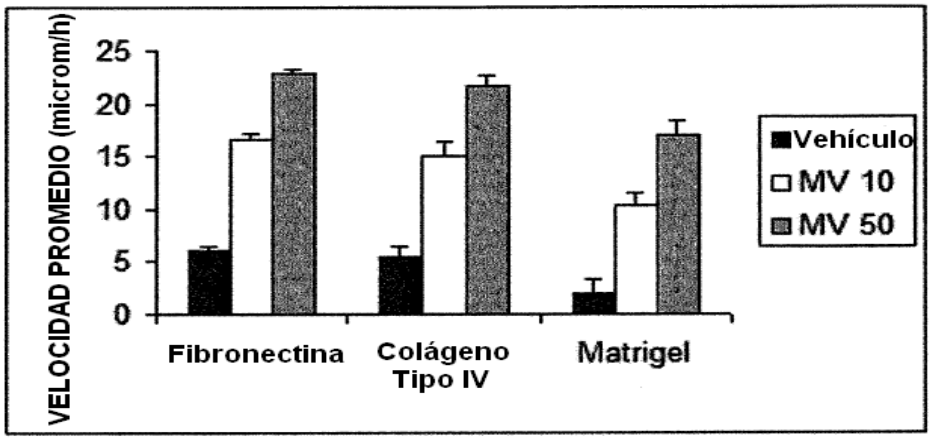

VELOCIDAD PROMEDIO (microm/h)
25
20
15
10
5
0
Fibronectina
Colágeno Tipo IV
Matrigel
Vehículo
MV 10
MV 50

FIG.12

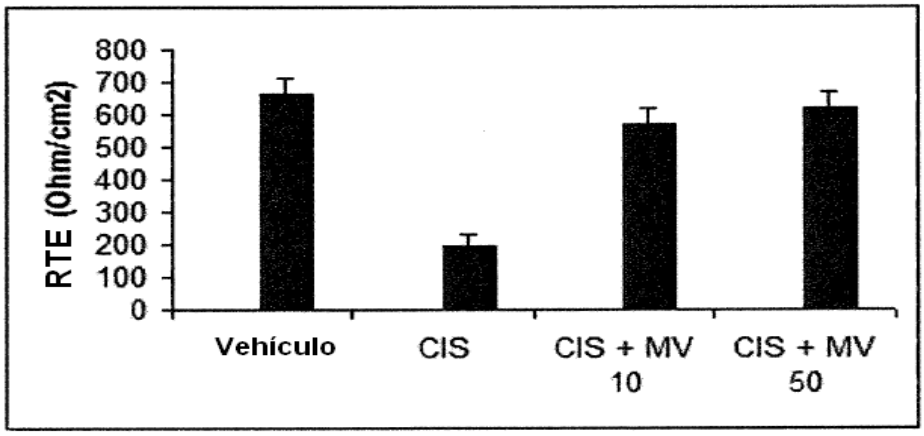

RTE (Ohm/cm2)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Vehículo
CIS
CIS + MV 10
CIS + MV 50

FIG.13

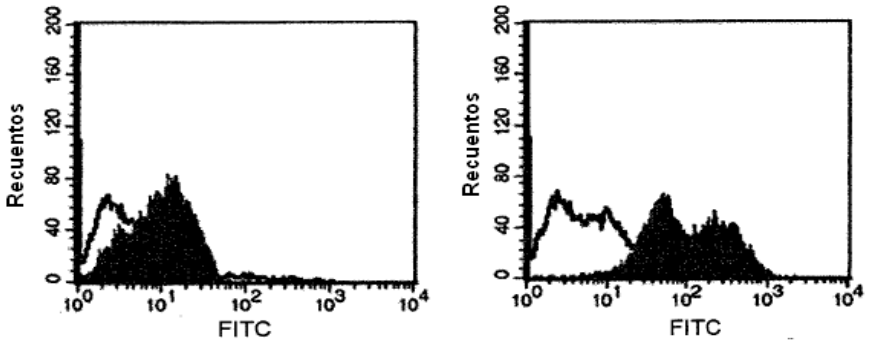


FIG.14

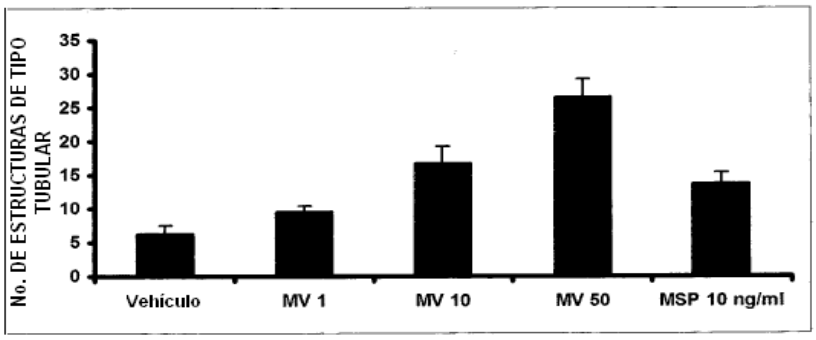


FIG.15

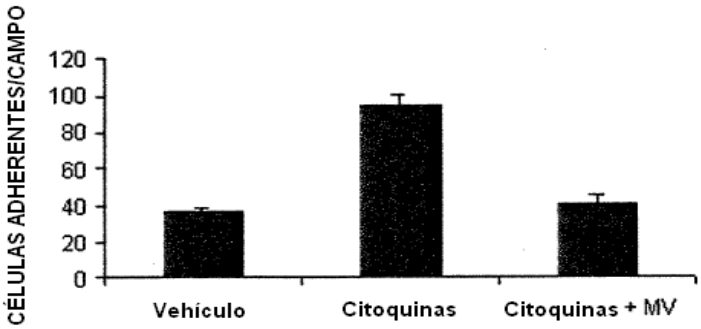


FIG.16

FIG.17

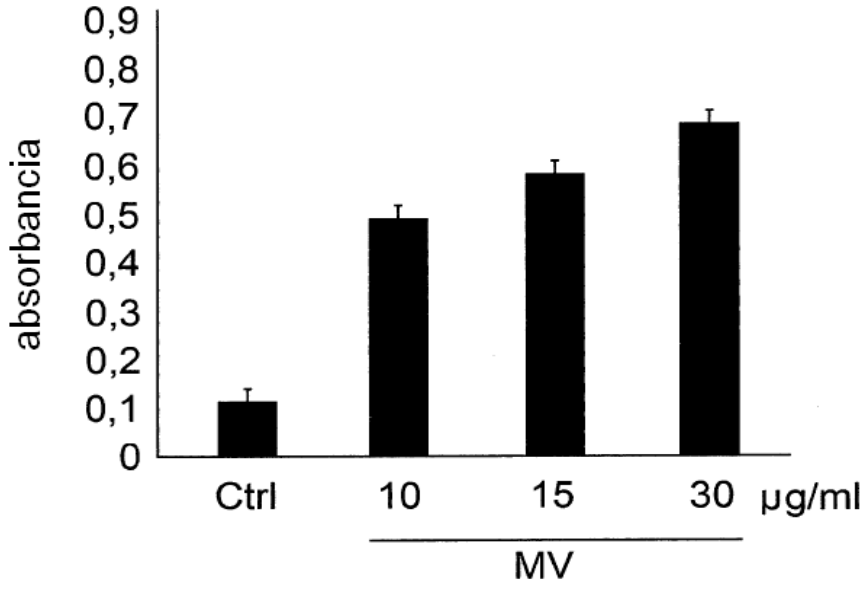
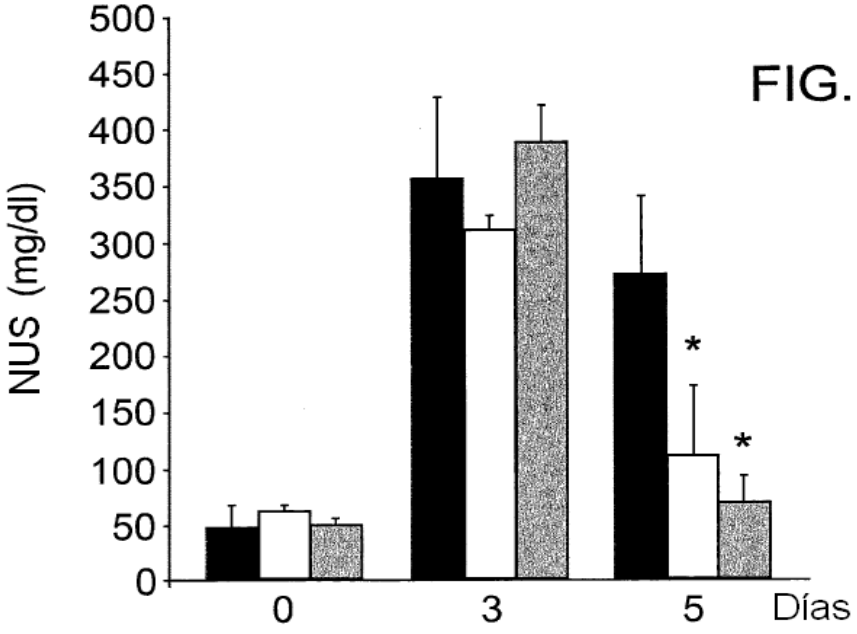

absorbancia
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Ctrl
10
15
30
µg/ml
MV

FIG.18


NUS (mg/dl)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
0
3
5
Días

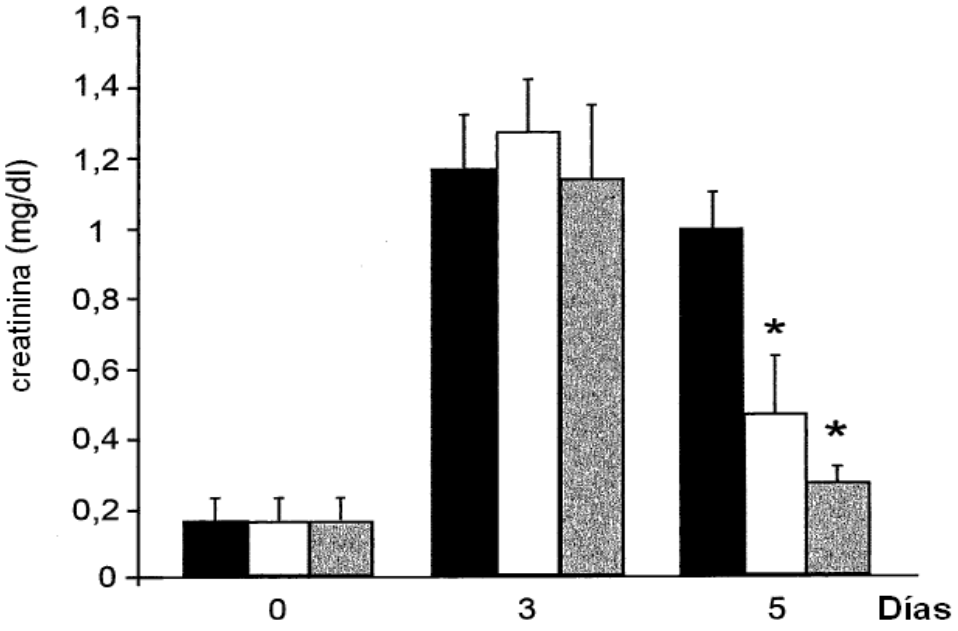

1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
creatinina (mg/dl)
*
*
0
3
5
Días

FIG.19

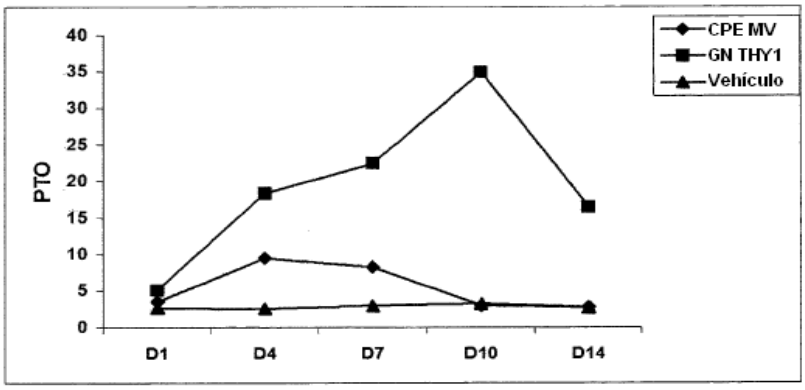

CPE MV
GN THY1
Vehículo
PTO
40
35
30
25
20
15
10
5
0
D1
D4
D7
D10
D14

FIG.20