



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

(11) PI 0909866-6 B1



(22) Data do Depósito: 11/06/2009

(45) Data de Concessão: 24/08/2021

(54) Título: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS PROGENITORAS DE FÍGADO, MEIO CONDICIONADO E COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 35/12; A61K 38/18; A61K 38/20; C12N 5/00.

(30) Prioridade Unionista: 11/06/2008 EP 08010651.1.

(73) Titular(es): FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND GMBH.

(72) Inventor(es): MARIA BEATRIZ HERRERA SANCHEZ; VALENTINA FONSATO; CIRO TETTA; GIOVANNI CAMUSSI.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009057232 de 11/06/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/150199 de 17/12/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/12/2010

(57) Resumo: Meio condicionado de células progenitoras de fígado. O presente invento está no campo da medicina regenerativa. Foi descoberto que o meio condicionado de células progenitoras pluripotentes do fígado não ovais exerce um efeito regenerador de tecido. Uma preparação do meio condicionado livre de células é portanto útil no tratamento de ferimentos e falha do órgão, preferencialmente do fígado, e/ou ferimento ou falha.

**MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS
PROGENITORAS DE FÍGADO, MEIO CONDICIONADO E COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA**

5 O presente invento pertence ao campo das preparações farmacêuticas biológicas e medicina regenerativa.

Os preparados de células tronco mostraram exercer um efeito regenerativo em tecidos humanos ou animais. Testes clínicos testando a eficácia de suporte de fígado bio-artificial no tratamento de falha hepática fulminante (FHF) produziram alguns resultados promissores, ainda que a geração atual de dispositivos não
10 tenha demonstrado confiabilidade e eficácia suficientes para uso rotineiro, primeiramente devido à falta de uma fonte de hepatócitos humanos funcionalmente estável (Kobayashi N, Okitsu T, Tanaka N. Cell choice for bioartificial livers. Keio J Med. 2003;52(3):151-7). As células tronco do fígado, ou mesmo células tronco derivadas de outros tecidos, poderiam potencialmente prover uma fonte alternativa de hepatócitos humanos. Em adição à
15 medula óssea, as células tronco residem em tecidos adultos tais como fígado e sistema nervoso central, e tem uma plasticidade muito maior que aquela conhecida anteriormente.

As células tronco/progenitoras pluripotentes do fígado humano descritas no pedido de patente internacional WO2006/126236 mostraram sofrer
20 diferenciação numa variedade de tipos de células de tecidos e exercer efeitos de regeneração de órgãos. Estas células são derivadas de uma linhagem celular progenitora pluripotente de fígado humano não oval que expressa marcadores de células hepáticas.

O pedido de patente internacional WO2006/126236 também descreve um método para isolar as células tronco/progenitoras pluripotentes de fígado
25 humano mencionadas acima, capazes de sofrer diferenciação numa variedade de tipos de células, o método compreendendo as etapas de:

- (i) cultivar hepatócitos humanos maduros derivados de fígado adulto num meio de cultura celular até a morte dos hepatócitos maduros e seleção de uma população de células sobreviventes tendo morfologia epitelióide;
- 30 (ii) expandir a população de células sobreviventes tendo morfologia epitelióide por cultura num meio de cultura contendo soro e glicose suplementado com hEGF (fator de crescimento epitelial humano) e bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico) e compreendendo os usuais sais inorgânicos, aminoácidos e vitaminas necessários para o crescimento de células de mamíferos e em particular em que os hepatócitos
35 maduros são congelados em um meio de cultura contendo soro na presença de um agente crio-protetor e então descongelados antes da cultura de acordo com a etapa (i).

As células progenitoras pluripotentes humanas do pedido de

patente internacional WO2006/126236 (designadas como HLSCs na descrição da patente) e o método de sua preparação são completamente incorporados aqui por referência.

5 Preparações de células tronco mesenquimais (MSCs) mostraram exercer um efeito regenerativo em tecidos. Por exemplo, sabe-se que as células tronco mesenquimais naturalmente suportam a hematopoiese secretando várias moléculas tróficas, incluindo glicoproteínas de matriz extracelular solúveis, citocinas e fatores de crescimento.

10 Entretanto, as preparações de células troncas têm a desvantagem principal de causar reações imunes quando administradas. Algumas preparações de células troncas têm até o potencial de causar câncer.

15 Parekkadan et al. (Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. PLoS ONE. 2007 Sep 26;2(9):e941) avaliaram primeiro vários tratamentos com MSC, tais como a entrega de um meio condicionado (CM), para testar a eficácia em um modelo de ratos de dano grave induzido no fígado. Nesta publicação, foram administradas intraperitonealmente aos ratos um total de duas injeções de D-galactosamina (GalN). Num segundo estudo (Van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. Hepatology. 2008 Jan 24;47(5):1634-1643) o grupo de Parekkadan investigou se a infusão sistêmica de MSC-CM poderia levar a uma resposta hepatoprotetora no fígado agudamente ferido, especificamente inibindo a morte celular e estimulando programas reparativos. Este grupo usou um regime sub-letal de indução D-galactosamina, demonstrando um benefício de sobrevivência significativo e prevenção de liberação de enzima no fígado após o tratamento MSC-CM.

20 Em vista das desvantagens mencionadas acima dos tratamentos com células tronco, o fato de os preparados altamente eficientes no campo da medicina regenerativa usualmente conterem células é um problema técnico que deve ser superado.

25 Assim, o objetivo do presente invento é o de prover uma preparação que seja efetiva como uma composição farmacêutica no campo da medicina regenerativa mas que não contenha células, evitando com isso as desvantagens causadas pelas preparações do estado da técnica que contêm células, particularmente células tronco.

30 Um outro objetivo do presente invento é prover um método para preparar uma composição farmacêutica que seja efetiva no campo da medicina regenerativa mas que não contenha células, evitando com isso as desvantagens

causadas pelas preparações do estado da técnica que contêm células, particularmente células tronco.

Estes e outros objetivos são alcançados pelas preparações e pelo método como definido nas reivindicações independentes. As reivindicações dependentes se referem a formas de realização preferidas do presente invento. A matéria objeto de ambas reivindicações dependentes e independentes forma uma parte integral da descrição.

Usando um modelo de camundongo de falha hepática fulminante (FHF), o meio condicionado livre de células (CM livre de células) produzido pela cultura de uma linhagem de células progenitoras do fígado, tais como p.ex. a linhagem de células progenitoras pluripotentes de fígado humano não ovais descrita no pedido de patente internacional WO2006/126236, foi mostrado pelos inventores exercer um efeito regenerativo sobre o fígado. O meio condicionado livre de células (CM livre de células) produzido pela cultura da linhagem de células progenitoras do fígado mostrou ser efetivo na terapia de falha do órgão, em particular na terapia de falha do fígado e rins. Surpreendentemente, também foi verificado que um CM de linhagem de células progenitoras do fígado é significativamente mais efetivo que um CM de células tronco mesenquimais preparado sob as mesmas condições.

Em particular, nos estudos descritos no exemplo 1 da presente descrição, camundongos SCID machos de 6 a 7 semanas de idade receberam uma injeção intraperitoneal de 500 μ L de tampão salino contendo 0,125 μ g de LPS e 18 mg de D-galactosamina (GalN) para induzir FHF. 30 minutos, 1 hora e 3 horas após a administração de LPS e GalN, os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 3 mL de meio condicionado derivado de HLSCs cultivadas em um bio-reator rotatório. A análise preliminar do meio condicionado revelou uma grande fração de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Os níveis de soro de transaminase alanina e transaminase aspartato aumentaram notavelmente após a indução do dano e diminuíram significativamente após 6 dias da injeção com o tratamento de meio condicionado. Por um lado, a análise histopatológica do tecido do fígado avaliada por ensaios BrdU, PCNA e Túnel revelou um índice diminuído de apoptose e necrose e uma recuperação da morfologia do tecido.

Estes estudos proveram a primeira evidência experimental de uso terapêutico potencial de meio condicionado derivado de HLSCs no tratamento de condições inflamatórias e regeneração de órgãos.

Assim, um primeiro aspecto do presente invento é um preparado consistindo de um meio condicionado livre de células obtido pela cultura de uma linhagem de células progenitoras do fígado, preferencialmente uma linhagem de células progenitoras pluripotentes de fígado humano não ovais, mais preferencialmente a

linhagem de células progenitoras pluripotentes de fígado humano não ovais descrita no pedido de patente internacional WO2006/126236, que é aqui incorporada por referência.

Uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade efetiva da preparação definida acima também cai dentro do escopo do presente invento.

A seguir, o meio condicionado livre de células derivado de uma linhagem de células progenitoras do fígado que forma o objetivo do presente invento deve ser chamado de "CM-HLSC livre de células"

O termo "HLSC" se refere a uma linhagem de células progenitoras/tronco pluripotentes de fígado. Preferencialmente, o termo "HLSC" se refere a uma linhagem de células pluripotentes de fígado não ovais, mais preferencialmente à linhagem de células progenitoras pluripotentes de fígado humano não ovais descrita no pedido de patente internacional WO2006/126236. Mais preferencialmente, a linhagem de células HLSC tem as características definidas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10 de WO2006/126236 e/ou as características resumidas na Tabela I, página 7, do pedido de patente internacional WO2006/126236. Tais características são aqui incorporadas por referência.

O CM-HLSC livre de células que forma a matéria-objeto do presente invento é adequado para uso como uma composição farmacêutica como tal ou numa forma concentrada. Uma forma concentrada é concentrada por exemplo pelo menos 5 vezes, preferencialmente pelo menos aproximadamente 10 vezes, mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 20 vezes, ainda mais preferencialmente aproximadamente 25 vezes.

Preferencialmente o CM-HLSC livre de células do presente invento é obtido a partir de células progenitoras/tronco pluripotentes de fígado, preferencialmente a linhagem de células HLSC descrita no pedido de patente internacional WO2006/126236, cultivadas sob condições GMP (boas práticas de fabricação), que são conhecidas dos técnicos da área. Alternativamente, ele pode ser obtido a partir de células progenitoras/tronco pluripotentes de fígado, preferencialmente a linhagem de células HLSC descrita no pedido de patente internacional WO2006/126236, cultivadas num sistema BAL (fígado bio-artificial), que também é conhecido dos técnicos da área.

Um exemplo de condições GMP para crescimento de células progenitoras/tronco pluripotentes de fígado e coletar o seu meio condicionado livre de células (CM) é como segue.

As células progenitoras/tronco pluripotentes do fígado são isoladas por um método descrito no pedido de patente internacional WO2006/126236, em que a etapa de expansão é executada cultivando-se as células tronco progenitoras na

uma mistura de pelo menos um fator de crescimento de hepatócito (HGF), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

5 Numa outra forma preferida de realização, a composição farmacêutica simplificada compreende uma quantidade farmacologicamente efetiva de uma mistura de pelo menos fator de crescimento de hepatócito (HGF), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e proteína estimulante de macrófago (MSP) e opcionalmente fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

10 Numa outra forma de realização preferida, a composição farmacêutica simplificada compreende uma quantidade farmacologicamente efetiva de uma mistura de proteínas de acordo com qualquer uma das formas de realização definidas acima e pelo menos uma proteína adicional escolhida dentre o grupo que consiste de Activina C, molécula de adesão celular ativada por leucócito (ALCAM), quimiocina (motivo C-C) receptor 4 (CCR4), regulador 1 (similar a cordina) BMP transmembrana rico em cisteína (CRIM), decorina, ectodisplasina A2 (EDA-A2),
15 endotelina, fator de crescimento de fibroblasto 1 similar a receptor (FGF R5), glipicano 3, oncoproteína relacionada ao crescimento (GRO), proteína de ligação 6 de fator de crescimento similar a insulina (IGFBP-6), fator de crescimento similar a insulina 1 (IGF-1), receptor interleucina 20, alfa (IL-20 R alfa), Kremen-2, proteína de ligação 1 do fator de crescimento de transformação beta latente, proteína principal intrínseca de fibra de lentes
20 (MIP-2), cadeia beta MSP, osteoprotegerina / TNFRSF11B (membro 11b da superfamília de receptores do fator de necrose de tumor), gp130 solúvel (sgp130), proteína secretada, acídica, rica em cisteína (osteonectina) (SPARC).

A concentração preferida de citocina varia na composição farmacêutica simplificada como segue:

- 25 - HGF: de 1 a 100 ng/mL, preferencialmente de 5 a 80 ng/mL, mais preferencialmente de 10 a 65 ng/mL;
- IL-6: de 10 a 200 ng/mL, preferencialmente de 20 a 100 ng/mL, mais preferencialmente de 30 a 50 ng/mL;
- IL-8: \geq 35 ng/mL, preferencialmente de 50 a 600 ng/mL, mais preferencialmente de
30 100 a 300 ng/mL;
- VEGF (se presente): de 10 a 400 ng/mL, preferencialmente de 20 a 250 ng/mL, mais preferencialmente de 35 a 175 ng/mL; e
- MSP (se presente): de 1 a 100 pg/mL, preferencialmente de 5 a 80 pg/mL, mais preferencialmente de 5 a 65 pg/mL.

35 Entretanto, o escopo do presente invento também inclui qualquer forma diluída ou concentrada da composição farmacêutica simplificada. Uma forma concentrada é concentrada, por exemplo, em aproximadamente 5 vezes, preferencialmente pelo menos aproximadamente 10 vezes, mais preferencialmente pelo

menos aproximadamente 20 vezes, ainda mais preferencialmente aproximadamente 25 vezes. Uma forma diluída é diluída, por exemplo, pelo menos aproximadamente 5 vezes, preferencialmente pelo menos aproximadamente 10 vezes, mais preferencialmente pelo menos aproximadamente 20 vezes, ainda mais preferencialmente aproximadamente 25.

5 A composição farmacêutica simplificada do presente invento é adequada para uso como um medicamento, particularmente para o tratamento de falha e/ou ferimento em órgão, preferencialmente falha e/ou ferimento no fígado e/ou rins. De acordo com uma forma preferida de realização, a composição farmacêutica é formulada para administrar as seguintes doses de citocina:

- 10 - HGF: de 0,01 a 1 mg/kg, preferencialmente de 0,03 a 0,8 mg/kg, mais preferencialmente de 0,05 a 0,5 mg/kg;
- interleucina 6 (IL-6): de 0,01 a 1 mg/kg, preferencialmente de 0,03 a 0,8 mg/kg, mais preferencialmente de 0,05 a 0,5 mg/kg;
- 15 - interleucina 8 (IL-8): de 0,01 a 1 mg/kg, preferencialmente de 0,02 a 0,8 mg/kg, mais preferencialmente de 0,03 a 0,5 mg/kg;
- VEGF (se presente): de 0,01 a 1 mg/kg, preferencialmente de 0,02 a 0,8 mg/kg, mais preferencialmente de 0,04 a 0,5 mg/kg;
- MSP (se presente): de 0,01 a 1 mg/kg, preferencialmente de 0,02 a 0,8 mg/kg, mais preferencialmente de 0,08 a 0,5 mg/kg.

20 Numa forma de realização particularmente preferida, estas doses de citocina são administradas uma vez ao dia.

Deve ser entendido que as composições farmacêuticas simplificadas definidas acima são providas puramente como exemplos não limitativos de composições farmacêuticas simplificadas capazes de mimetizar, pelo menos em parte, as capacidades de regeneração de órgãos de um CM obténível pela cultura de HLSCs como descrito acima.

Objetivos adicionais e vantagens do presente invento aparecerão mais claramente a partir dos exemplos a seguir, que são providos puramente a título de ilustração.

30 Também deve ser entendido que formas de realização adicionais das composições farmacêuticas reivindicadas e métodos podem ser previstas com base nos exemplos providos aqui a seguir, sem com isso fugir ao escopo do presente invento.

Exemplo 1 - Estudos *in vivo* preliminares

Preparação das culturas de células HLSC e MSC

Células progenitoras de fígado humano (HLSCs) foram isoladas como descrito no pedido de patente internacional WO2006/126236. As células foram deixadas a crescer a de 60 a 70% de confluência (aproximadamente 2×10^6

HLSCs por frasco de 75 cm²), lavadas cuidadosamente, e cultivadas em 10 mL de meio alfa-MEM (meio mínimo essencial alfa) livre de soro suplementado com 0,05% de albumina de soro humano (produzida em grau GMP). As células tronco mesenquimais humanas (MSCs) foram isoladas a partir de aspirados de medula óssea e cresceram e foram caracterizadas como previamente relatado. As MSCs foram cultivadas em meio MesenPRO RS™ que é um meio de soro reduzido (2% FCS) especificamente formulado para suportar o crescimento de MSCs.

Preparação do meio condicionado

O meio condicionado livre de células foi preparado coletando-se o meio após 24 horas de cultura de MSCs e HLSCs por centrifugação. Os experimentos foram realizados com uma massa celular de 2×10^6 células. O meio foi então concentrado, aproximadamente 25 vezes, usando unidades de ultrafiltração (Amicon Ultra-PL 3, Millipore) com um corte de peso molecular de 3 kDa. Foi obtido um total de 250 µL de meio condicionado. O meio concentrado foi diluído em 3 mL de α-MEM (sem FCS) até um volume final de 3 mL. 1 mL de meio condicionado foi administrado intraperitonealmente 30 minutos, 1 hora e 3 horas após a indução de dano ao fígado.

Modelo FHF *in vivo*

Para indução de falha hepática fulminante (FHF), a toxicidade letal de lipopolisacarídeo (LPS) em animais em tratamento com D-galactosamina (2-amino-2-desoxi-D-galactose) foi desenvolvida como descrito previamente (Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. J Exp Med. 1987;165(3):657-63). Brevemente, um grupo de 10 camundongos SCID recebeu uma injeção intraperitoneal de D-galactosamina (GalN) (600 mg/kg) e 0,125 µg de LPS por animal. Os inventores determinaram previamente que 100% de letalidade foram induzidos em camundongos tratados com GalN (600 mg/kg) e LPS (0,125 µg por animal) dentro de 8 horas. GalN e LPS foram administrados como uma mistura em 500 µL de solução NaCl livre de pirogênio. As mortes foram registradas até 24 horas após a injeção. A 30 minutos, 1 hora e 3 horas após a injeção de LPS e GalN, os camundongos foram injetados intraperitonealmente três vezes com 1 mL de meio condicionado concentrado de HLSC e MSC. Como mostrado na figura 1, quatro dentre 5 ratos injetados com o CM derivado de HLSC sobreviveram, enquanto nenhum dos ratos tratados com o CM derivado de MSC sobreviveu.

Composição de citocinas de meio condicionado HLSC e MSC

Para estudar a composição do meio condicionado obtido pela cultura de HLSCs e MSCs como descrito acima, um painel de 31 citocinas diferentes foi medido por múltiplos testes ELISA (Bioclarma). Ambos tipos de células foram cultivados em um meio com 10% de FCS. Os meios condicionados foram coletados após

24 horas de cultura. A composição de citocinas do meio sozinho também foi medida. Os resultados são providos abaixo na Tabela 1.

Tabela 1. HLSCs vs. MSCs: Produção de citocinas*

	HLSCs	MSCs	condição de cultura 10% FCS
IL1 β	0	0	0.86
ILra	0	0	0
IL-2	0	0	0
IL-4	0	0	0.73
IL-5	0	0	0
IL-6	1130.89	2434.4	0
IL-7	0	0	0
IL-8	>4205.64	51.65	0.36
IL-9	0	0	0
IL-10	0.12	0.36	0.85
IL-12	0	0.47	0.24
IL-13	0	0	0
IL-15	0	0	0
IL-17	0	0	0
Eotaxina	5.1	3.96	0
bFGF	0	0	0
G-CSF	43.17	11.06	0
GM-CSF	1.75	0	0.03
IFN γ	38.46	104.73	0
IP-10	0	0	0
MCP-1	514.43	256.03	0
MIP-1 α	0	0	0
MIP-1 β	0	0	0
PDGF	0	0	0
Rantes	5.97	0	0
TNF α	3.7	13.04	0.19
VEGF	896.9	4961.43	0
HGF	5179	2.3	0
M-CSF	17.79	4.48	0
MIF	159.26	32.51	5.29
SCF	5.1	0.11	0

- 5 * (a concentração de citocina foi expressa em pg/mL x 10⁶ células de ambas culturas HLSC e MSC cultivadas em condição de cultura 10% de FCS por 24 horas)

Exemplo 2 - Efeito de CM HLSCs e MSCs obtidos a partir de cultura em frasco-T e de misturas de proteína num modelo *in vivo* de D-galactosamina/endotoxina (FHF)

- 10 Os seguintes estudos experimentais num modelo *in vivo* (camundongos SCID) de falha hepática fulminante (FHF) foram executados.

- 1) O primeiro protocolo experimental consistiu na injeção intraperitoneal de 1 mL de um sobrenadante concentrado 25 vezes obtido a partir da cultura de HLSC em frasco T. A concentração a 25 vezes foi obtida usando membranas 3 kDa (Millipore). O sobrenadante foi submetido à ultracentrifugação antes do uso. A injeção foi

administrada em 30 minutos, 1 hora e 3 horas após a indução de FHF por injeção de D-GalN/LPS. Doze camundongos SCID foram tratados no total.

- 2) O segundo protocolo experimental consistiu na injeção de uma mistura de citocinas. Um total de 10 camundongos SCID foram injetados com a seguinte mistura de citocina recombinante. HGF: 870,75 ng/mL x 30 mL de alfa-MEM (injeções i.v.) = 26 µg. IL-6: 340,5 ng/mL x 30 (injeções i.v.) = 10,4 µg. IL-8: 261 ng/mL x 30 (injeções i.v.) = 8 µg. VEGF: 202 ng/mL x 30 (injeções i.v.) = 6 µg. 30 mL desta mistura foram preparados a fim de ter 3 mL de mistura para um total de 10 camundongos SCID. Cada camundongo SCID foi injetado com 1 mL desta mistura de citocinas em 30 minutos, 1 hora e 3 horas após a injeção intraperitoneal de GALN/LPS. Cada camundongo SCID recebeu: [HGF]: 2,59 µg, [IL-6]: 1,02 µg, [IL-8]: 0,79 µg, [VEGF]: 0,6 µg. Esta mistura foi designada como MIX 4.
- 3) O terceiro protocolo experimental consistiu na injeção do MIX 4 mais MSP-1. Um total de 5 camundongos SCID foram injetados. Cada camundongo SCID recebeu: [HGF]: 2,59 µg, [IL-6]: 1,02 µg, [IL-8]: 0,79 µg, [VEGF]: 0,6 µg (que são as concentrações de citocinas obtidas dos experimentos BAL) mais [MSP-1]: 2 µg.
- 4) O quarto protocolo experimental consistiu na injeção de CM-MSC ou CM-HLSC. A fim de obter CM-MSCs, as MSCs foram deixadas a crescer até 90% de confluência (aproximadamente 2×10^6 MSCs por frasco de 75 cm²), lavadas cuidadosamente e cultivadas em 10 mL de MesenPRO RS™, um meio de cultura com 2% de FCS. O meio condicionado foi coletado 24 horas mais tarde e concentrado 25 vezes usando unidades de ultrafiltração (Millipore, Bedford, MA), com um corte de 3 kDa. Para produzir CM-HLSCs, as HLSCs foram deixadas a crescer até de 60 a 70% de confluência (aproximadamente 2×10^6 HLSC por frasco de 75 cm²), lavadas cuidadosamente e cultivadas em 10 mL de meio alfa-MEM livre de soro suplementado com 0,05% de albumina de soro humano (produzida em grau GMP). O meio condicionado foi coletado 24 horas mais tarde e concentrado 25 vezes usando unidades de ultrafiltração (Millipore, Bedford, MA) com um corte de 3 kDa.

O peso médio dos camundongos SCID usados nestes experimentos foi de cerca de 25 g.

Materiais e métodos

Modelo FHF *in vivo*. Para indução de FHF, a toxicidade letal de lipopolissacarídeo (LPS) nos animais em tratamento com D-galactosamina (2-amino-2-desoxi-D-galactose) foi desenvolvida como previamente descrito (Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. J Exp Med. 1987;165(3):657-63). Brevemente, os camundongos SCID receberam uma injeção intraperitoneal de D-galactosamina (GalN) (600 mg/kg, 18 mg por animal) e 0,125 µg de LPS por animal. Os inventores

determinaram previamente que 100% de letalidade foram induzidos em camundongos tratados com GalN (600 mg/kg) e LPS (0,125 µg por animal) dentro de 8 horas. GalN e LPS foram administrados como uma mistura de 500 µL de solução NaCl livre de pirogênio. As mortes foram registradas até 24 horas após a injeção. A 30 minutos, 1 hora e 3 horas após a injeção de LPS e GalN, os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 1 mL de meio condicionado HLSC, meio condicionado MSC ou mistura de citocinas.

Cultura de células. As células tronco mesenquimais humanas (MSCs) foram isoladas de aspirados de medula óssea e cresceram e foram caracterizadas como relatado anteriormente. As MSCs foram cultivadas em meio MesenPRO RS™ que é um meio de soro reduzido (2% de FCS) especificamente formulado para suportar o crescimento de MSC. As células foram usadas para experimentos durante as passagens de 3 a 5.

Preparação do meio condicionado (CM) de MSCs. As MSCs humanas foram cultivadas e caracterizadas para expressão de marcador de superfície e capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica como previamente descrito. Para obter o CM-MSCs, as células foram deixadas a crescer até 90% de confluência (aproximadamente 2×10^6 MSCs por frasco de 75 cm²), lavadas cuidadosamente e cultivadas em 10 mL de MesenPRO RS™, um meio de cultura com 2% de FCS. O meio condicionado foi coletado 24 horas mais tarde e concentrado 25 vezes usando unidades de ultrafiltração (Millipore, Bedford, MA) com um corte de 3 kDa.

Preparação de CM-HLSCs. As HLSCs foram obtidas a partir de hepatócitos humanos congelados. As HLSCs humanas foram cultivadas e caracterizadas para expressão de marcador de superfície e capacidade de diferenciação como previamente descrito. Para obter o CM-HLSCs, as células foram deixadas a crescer até de 60 a 70% de confluência (aproximadamente 2×10^6 MSCs por frasco de 75 cm²), lavadas cuidadosamente e cultivadas em 10 mL de meio alfa-MEM livre de soro suplementado com 0,05% de albumina de soro humano (produzida em grau GMP). O meio condicionado foi coletado 24 horas mais tarde e concentrado 25 vezes usando unidades de ultrafiltração (Millipore, Bedford, MA) com um corte de 3 kDa.

Concentração do meio condicionado. Os sobrenadantes foram coletados a partir do frasco T após 24 horas de cultura. O sobrenadante foi então concentrado, aproximadamente 25 vezes, usando unidades de ultrafiltração com um corte de peso molecular de 3 kDa de Millipore.

Análise histológica. A necrose do fígado foi analisada através de manchamento H&E (manchamento com hematoxilina e eosina), proliferação (manchamento PCNA) e TUNEL (células apoptóticas).

Análise bioquímica. Os níveis de transaminase alanina (ALT) e transaminase aspartato (AST) no soro foram medidos usando um analisador automático clínico padrão.

Western Blot. O ensaio *Western Blot* foi realizado para a detecção de BAX e BclXS/L. Os fígados foram homogeneizados e lisados a 4°C por 1 hora em tampão de lise (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3, 1% de Triton X-100, 10 µmol/L de fluoreto de fenilmetil sulfonila, 10 µmol/L de leupeptina e 100 U/mL de aprotinina) e centrifugado a 15000 g. Os teores de proteínas dos sobrenadantes foram medidos pelo método Bradford. Alíquotas contendo 200 µg de proteínas de lisados de fígados foram submetidas à eletroforese em gel de dodecilsulfato-poliacrilamida sob condições redutoras e eletro-manchados em filtros de membrana de nitrocelulose. As manchas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em 20 mmol/L de Tris-HCL, pH 7,5, 500 mmol/L de NaCl mais 0,1% de Tween (TBS-T). A membranas foram subseqüentemente imunomanchadas de um dia para o outro a 4°C com os relevantes anticorpos primários na concentração apropriada. Após lavagens extensivas com TBS-T, as manchas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos a isotipo conjugado com peroxidase, lavados com TBS-T, desenvolvidos com reagentes de detecção ECL por 1 minutos e expostos a filme X-Omat. Os seguintes anticorpos foram usados: anticorpo monoclonal anti-BAX e anticorpo policlonal BclXS/L de Santa Cruz Biotechnology.

Resultados

Os resultados obtidos são ilustrados nas figuras de 2 a 4.

A figura 2 mostra a taxa de sobrevivência (%) de camundongos SCID feridos com GalN/LPS tratados com CM-HLSC (n = 22; 73% de sobrevivência), CM-MS (n = 5; 0% de sobrevivência) ou com uma mistura de citocinas (citocinas: VEGF, IL6, IL8, HGF; n = 10; 40% de sobrevivência), e a mistura de citocinas mais MSP-1 (citocinas: VEGF, IL6, IL8, HGF + MSP-1; n = 5, 100% de sobrevivência).

A figura 3 mostra os níveis de aminotransferase aspartato (AST) e aminotransferase alanina (ALT) no soro de controle, camundongos tratados com GalN/LPS e camundongos tratados com GalN/LPS injetados com CM-HLSC após 6 dias de indução de FHF.

A figura 4 é uma imagem mostrando o manchamento H&E e PCNA de camundongos SCID tratados com GalN/LPS injetados com CM-HLSC após 3 e 6 dias de indução FHF.

Exemplo 3 - Experimentos *in vitro* usando meio condicionado (CM) HLSCs e MSCs e misturas de citocinas

Neste protocolo experimental, foi investigada a capacidade do CM-HLSCs de inibir diretamente a apoptose em hepatócitos primários humanos cultivados. Usando ensaios de apoptose *in vitro*, o meio condicionado derivado de HLSCs demonstrou exercer um efeito inibitório direto sobre a morte de hepatócitos. Esta atividade *in vitro* também foi comparada com a atividade *in vitro* de CM-MS. O efeito de 6 citocinas recombinantes humanas presentes no meio condicionado produzido pelas

células também foi estudado no ensaio de apoptose de hepatócitos humanos.

Materiais e métodos

Cultura de células. As células tronco mesenquimais humanas (MSCs) foram isoladas de aspirados de medula óssea, cresceram e foram caracterizadas como relatado anteriormente. As MSCs foram cultivadas em meio MesenPRO RS™ que é um meio de soro reduzido (2% de FCS) especificamente formulado para suportar o crescimento de MSC. As células foram usadas para experimentos durante as passagens de 3 a 5. As células progenitoras de fígado humano (HLSCs) foram isoladas como previamente descrito e cultivadas em alfa-MEM/EBM (3:1) contendo 10% de FCS (soro fetal bovino, GMP) suplementado com 4 ng/mL de ambos hEGF e hFGF.

Meio condicionado (CM) de MSCs. As MSCs humanas foram cultivadas e caracterizadas para expressão de marcador de superfície e capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica como previamente descrito. Para obter o CM-MSCs, as células foram deixadas a crescer até 90% de confluência (aproximadamente 2×10^6 MSCs por frasco de 75 cm²), lavadas cuidadosamente e cultivadas em 10 mL de MesenPRO RS™, um meio de cultura com 2% de FCS. O meio condicionado foi coletado 24 horas mais tarde e concentrado 25 vezes usando unidades de ultrafiltração (Millipore, Bedford, MA) com um corte de 3 kDa.

CM-HLSCs. As HLSCs foram obtidas a partir de hepatócitos humanos congelados. As HLSCs humanas foram cultivadas e caracterizadas para expressão de marcador de superfície e capacidade de diferenciação como previamente descrito. Para obter o CM-HLSCs, as células foram deixadas a crescer até de 60 a 70% de confluência (aproximadamente 2×10^6 MSCs por frasco de 75 cm²), lavadas cuidadosamente e cultivadas em 10 mL de meio alfa-MEM livre de soro suplementado com 0,05% de albumina de soro humano (produzida em grau GMP). O meio condicionado foi coletado 24 horas mais tarde e concentrado 25 vezes usando unidades de ultrafiltração (Millipore, Bedford, MA) com um corte de 3 kDa.

Apoptose de hepatócitos *in vitro* (TUNEL). Os hepatócitos foram cultivados por 1 dia em placas de 96 cavidades a 30000 células/cavidade em placas revestidas com fibronectina. A galactosamina-D foi adicionada a uma concentração de 5 mM por 24 horas, seguida de diferentes doses de meio condicionado derivados de HLSC e MSC obtidos como previamente descrito (de 0,5% a 16%), mistura de quatro citocinas (MIX 4 significa IL-8, IL-6, HGF, VEGF). Os resultados são expressos como média \pm dp de 8 experimentos diferentes.

Concentração de citocinas. A concentração das citocinas recombinantes humanas usadas no experimentos *in vitro* foi escolhida a partir das concentrações produzidas por HLSCs após 24 horas em condições de cultura em frasco, concentradas 25 vezes. No caso de MSP, foi usada a concentração obtida em condições de cultura BAL. A primeira

concentração é considerada a mesma do estoque de meio condicionado, as células foram então estimuladas com os 16% de cada concentração estoque que representa a mais alta concentração do meio condicionado usado *in vitro*.

IL-6=56,5 ng/mL, concentração final usada = 9 ng/mL

5 IL-8=210 ng/mL, concentração final usada= 33,6 ng/mL

HGF=259 ng/mL, concentração final usada = 41,4 ng/mL

VEGF= 44,8 ng/mL, concentração final usada= 7,2 ng/mL

MCP-1= 25,7 ng/mL, concentração final usada = 4,1 ng/mL

MSP= 60 ng/mL, concentração final usada= 9,6 ng/mL

10 Os resultados são ilustrados nas figuras de 5 a 10.

A figura 5 mostra a inibição *in vitro* de apoptose de hepatócito por CM-HLSCs em baixas concentrações. Os hepatócitos humanos primários foram cultivados em placas revestidas com fibronectina. A apoptose foi induzida com D-galactosamina (GalN). Durante a exposição à GalN, os hepatócitos foram cultivados em um meio de cultura celular suplementado com 0,5; 2; 8 ou 16% de CM-HLSCs concentrado 25 vezes (produzido em grau GMP). A morte das células foi quantificada usando análise de imagem digital de quatro imagens por cavidade. Os dados mostrados são média \pm dp de 8 experimentos. $P < 0,05$.

20 A figura 6 mostra micrografias representativas do ensaio TUNEL de hepatócitos humanos tratados com GalN. (A) hepatócitos tratados com 5 mM GalN após 24 horas e (B) hepatócitos tratados com 5 mM GalN estimulados com 2% CM-HLSCs após 24 horas.

25 A figura 7 mostra a inibição *in vitro* de apoptose de hepatócitos por CM-MSCs em baixas concentrações. Os hepatócitos humanos primários foram cultivados em placas revestidas com fibronectina. A apoptose foi induzida com D-galactosamina (GalN). Durante a exposição à GalN, os hepatócitos foram cultivados em um meio de cultura celular suplementado com 0,5; 2; 8 ou 16% de CM-MSCs concentrado 25 vezes (produzido em grau GMP). A morte das células foi quantificada usando análise de imagem digital de quatro imagens por cavidade. Os dados mostrados são média \pm dp de 8 experimentos. $P < 0,05$.

30 A figura 8 mostra a inibição *in vitro* de apoptose de hepatócitos por várias misturas de citocinas. Os hepatócitos humanos primários foram cultivados na presença de D-galactosamina (GalN; 5 mM) por 24 horas. O uso de MIX 4 + MSP em hepatócitos tratados com GalN resultou na inibição da apoptose após 24 horas. 35 Os hepatócitos tratados com GalN também foram cultivados com MIX 4 + MCP-1 ou com a combinação de MIX 4 + MSP + MCP-1. A morte das células foi quantificada usando análise de imagem digital de quatro imagens por cavidade. Os dados mostrados são média \pm dp de 8 experimentos. * $P < 0,05$.

Exemplo 4 - Análise da composição do CM por ensaio multiplex e imunosorvente ligado a enzima

As citocinas solúveis produzidas no meio de cultura pelas células tronco do fígado humano (HLSCs) mostraram intensificar a cura do fígado. A fim de elucidar ainda mais os mecanismos envolvidos, foram determinadas as citocinas liberadas pelas HLSCs e comparadas com as citocinas produzidas pelas células tronco mesenquimais (MSCs) da medula óssea humana. A análise do perfil das citocinas secretadas foi estendida pela produção de meio condicionado sob diferentes condições de cultura de células, tais como garrafa rolante, frasco T em condições normóxicas e frasco T sob condições hipóxicas. No caso de MSCs, as células foram cultivadas somente em frasco T em condições de cultura normóxicas. Foi obtido um total de 16 meios condicionados diferentes. Todas as análises feitas com o sistema Multiplex (de Bio-Rad) do meio condicionado produzidas em 24 horas de cultura por HLSCs e MSCs, indicaram a presença de citocinas e quimiocinas, tais como quantidades principais de, *inter alia*, HGF, IL6, IL8, VEGF, MCP1, com um total de 31 proteínas diferentes. Vários anticorpos usados para o ensaio multiplex humano Bio-Rad foram também avaliados pelo ensaio ELISA (IL-6, IL-8, HGF, VEGF, MCP1 e MSP1). O teste ELISA foi executado com kits RayBio® Human ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Os inventores também avaliaram comparativamente os ensaios multiplex e imunosorvente ligado a enzima (ELISA). A comparação foi baseada na medida de seis citocinas presentes nos 16 meios condicionados diferentes produzidos. As concentrações de citocinas, medidas pelos diferentes kits, mostraram tendências similares, embora as concentrações absolutas medidas fossem diferentes.

Materiais e métodos

Cultura de células

HLSCs. Células progenitoras de fígado humano (HLSC) foram isoladas como previamente descrito e cultivadas em alfa-MEM/EBM (3:1) contendo 10% de FCS (soro fetal bovino, GMP) suplementado com 4 ng/mL de ambos rhEGF e rhFGF.

A semente celular inicial e composições dos meios, para a coleção de meio condicionado (CM), em todos os experimentos executados com HLSCs cultivadas por 24 horas, foram como descrito abaixo:

- 2 experimentos com células na passagem 3 cultivadas numa garrafa rotatória: cultura de 20×10^6 HLSC em 100 mL de RPMI + 0,05% de albumina humana
- 2 experimentos com células na passagem 10 cultivadas numa garrafa rotatória: cultura de 20×10^6 HLSC em 100 mL de RPMI + 0,05% de albumina humana
- 3 experimentos com células na passagem 3 cultivadas em frasco T em condições normóxicas: cultura de 2×10^6 HLSC em 10 mL de RPMI + 0,05% de albumina humana

- 3 experimentos com células na passagem 10 cultivadas em frasco T em condições normóxicas: cultura de 2×10^6 HLSC em 10 mL de RPMI + 0,05% de albumina humana
- 2 experimentos com células na passagem 3 cultivadas em frasco T em condições hipóxicas: cultura de 2×10^6 HLSC em 10 mL de RPMI + 0,05% de albumina humana
- 2 experimentos com células na passagem 10 cultivadas em frasco T em condições hipóxicas: cultura de 2×10^6 HLSC em 10 mL de RPMI + 0,05% de albumina humana

hMSCs. As células tronco mesenquimais humanas (hMSCs) foram isoladas de aspirados de medula óssea humana e cresceram e foram caracterizadas como previamente relatado. As MSCs foram cultivadas em meio MesenPRO RS™ que é um meio de soro reduzido (2% FCS) especificamente formulado para suportar o crescimento de MSCs. As células foram usadas nos experimentos durante a passagem 3.

A semeadura celular inicial e composições dos meios, para a coleção de meio condicionado (CM), dos experimentos executados com hMSCs cultivadas por 24 horas, foram como descrito abaixo:

- 2 experimentos com células na passagem 3 cultivadas em frasco T em condições normóxicas: cultura de 2×10^6 HLSC em 10 mL de RPMI + 0,05% de albumina humana

Preparação do CM. Os CMs derivados de HLSCs foram obtidos pela semeadura das células numa concentração de 2×10^6 em frascos T e incubando-as de um dia para o outro na incubadora. No dia seguinte, as células foram cuidadosamente lavadas, e cultivadas em 10 mL de RPMI (sem o vermelho fenol) na presença de 0,05% de albumina humana. O meio CM foi coletado 24 horas mais tarde e todas as alíquotas de cada experimento foram congeladas a -20°C . O CM foi concentrado por centrifugação por 1, 30 horas a 4°C , a 2700 g usando as unidades de ultrafiltração de Millipore com um corte de 3 kDa de tamanhos de poros.

Os CMs derivados de hMSCs foram obtidos deixando crescer até 90% de confluência (aproximadamente 2×10^6 MSCs por frasco de 75 cm^2), lavando cuidadosamente, e cultivando em 10 mL de RPMI (sem o vermelho fenol) na presença de 0,05% de albumina humana. O meio condicionado foi coletado 24 horas mais tarde e todas as alíquotas de cada experimento foram congeladas a -20°C . O CM foi concentrado por centrifugação por 1, 30 horas a 4°C , a 2700 g usando as unidades de ultrafiltração de Millipore com um corte de 3 kDa de tamanhos de poros.

Após a coleta do CM, as células foram recuperadas, a viabilidade celular foi avaliada por exclusão pelo corante azul de tripano obtendo mais de 95% de viabilidade em todos os experimentos.

Quantização total de proteína. A concentração total de proteína no CM foi determinada de acordo com o método Bradford (Bio-Rad Laboratories) seguindo-se o protocolo do

fabricante. A albumina de soro bovino (BSA) foi usada para criar uma referência padrão. 5 μ L de cada amostra foram adicionados a 1 mL do corante do reagente de Bradford diluído 1 para 5 com água destilada e misturado. Após incubação por 5 min. à temperatura ambiente, a absorvância óptica a luz de 595 nm foi determinada com um fluorofotômetro. A concentração de proteína para cada amostra foi calculada de acordo com a curva BSA linearizada.

ELISA. Foi usado o ensaio RayBio® Human ELISA (ensaio imunossorvente ligado à enzima) para a medição quantitativa de IL-8, IL-6, VEGF, HGF, MCP1 e MSP1. Este ensaio emprega anticorpos específicos para as citocinas humanas mencionadas, revestido numa placa de 96 cavidades. Os padrões e amostras foram pipetados nas cavidades e as citocinas presentes na amostra são ligadas às cavidades pelos anticorpos imobilizados. As cavidades foram lavadas e anticorpos biotinizados anti- citocinas humanas foram adicionados. Após lavar os anticorpos biotinizados não ligados, estreptavidina conjugada com HRP foi pipetada nas cavidades. As cavidades foram novamente lavadas, uma solução substrato de TMB foi adicionada às cavidades e desenvolveu cor em proporção à quantidade de citocinas ligadas. A solução de parada muda a cor de azul para amarelo, e a intensidade da cor é medida em 450 nm.

Ensaio Bioclarma. Um imuno ensaio biométrico multiplex de Bio-Rad, contendo microesferas coradas fluorescentes conjugadas com um anticorpo monoclonal específico para as proteínas alvo, foi usado para medição de citocinas de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Plex Human Cytokine Assay; Bio-Rad). As seguintes citocinas foram ensaiadas: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8 (IL-8), IL-9, IL-10, HGF, M-CSF, MIF, SCF, PDGF, Rantes, VEGF, Eotaxina, bFGF, IP-10, IFN γ , IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, fator de estimulação de colônia de granulócito (G-CSF), fator de estimulação de colônia de granulócito-monócito (GM-CSF), proteína quimioatrativa de monócito (MCP-1), proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 β /CCL4), MIP-1 α e TNF- α .

Brevemente, 250 μ L de CM não diluídos foram incubados com contas acopladas a anticorpos. Os complexos foram lavados, então incubados com anticorpos biotinizados de detecção e, finalmente, com estreptavidina-ficoeritrina antes de avaliar a concentração de citocinas. Uma faixa de 1,95 a 40000 pg/mL de citocinas recombinantes foi usada para estabelecer curvas padrão e maximizar a sensibilidade e faixa dinâmica do ensaio. Os níveis de citocina foram determinados usando um leitor de matriz multiplex de Luminex™ Instrumentation System. A concentração foi calculada usando o software provido pelo fabricante. Os resultados obtidos são ilustrados abaixo nas Tabelas de 2 a 8.

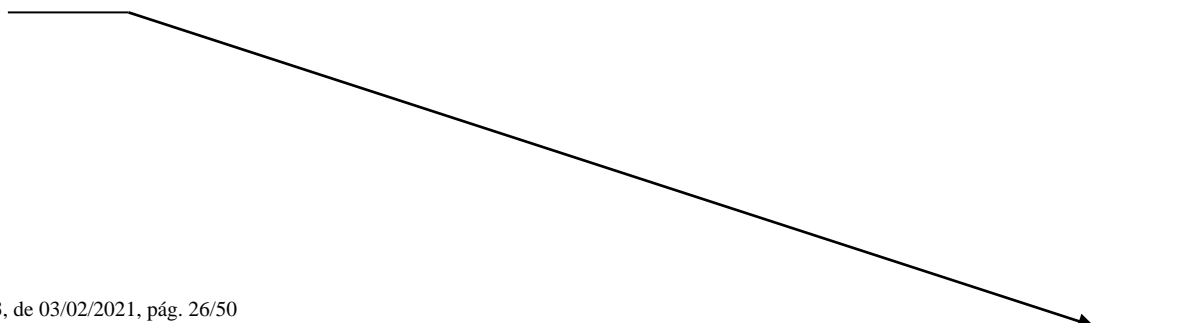


Tabela 2. Número de células recuperadas após 24 horas

Células	Quantidade de células após 24 h
HLSC Rotat 3p	$4,25 \pm 0,49 \times 10^6$
HLSC Rotat 10p	$2,3 \pm 2,1 \times 10^6$
HLSC Hipo 10p	$1,82 \pm 0,74 \times 10^6$
HLSC Hipo 3p	$1,04 \pm 0,88 \times 10^6$
HLSC Norm 10p	$2,56 \pm 0,79 \times 10^6$
HLSC Norm 3p	$1,70 \pm 0,18 \times 10^6$
MSC Norm 3p	$2,35 \pm 0,78 \times 10^6$

Tabela 3. Concentração de proteína de CM após 24 horas em cultura e após concentração com filtros Amicon

CM derivado de:	Concentração de proteína de CM (mg/mL) \pm dp	Concentração de proteína de CM após concentração Amicon (mg/mL) \pm dp
HLSC Rotat 3p	$0,36 \pm 0,004$	$7,405 \pm 0,106$
HLSC Rotat 10p	$0,335 \pm 0,021$	$7,37 \pm 0,141$
HLSC Hipo 10p	$0,315 \pm 0,021$	$7,68 \pm 0,396$
HLSC Hipo 3p	$0,31 \pm 0,013$	$7,55 \pm 0,707$
HLSC Norm 10p	$0,29 \pm 0,012$	$7,18 \pm 0,490$
HLSC Norm 3p	$0,28 \pm 0,078$	$7,72 \pm 0,132$
MSC Norm 3p	$0,23 \pm 0,042$	$7,75 \pm 0,276$

5

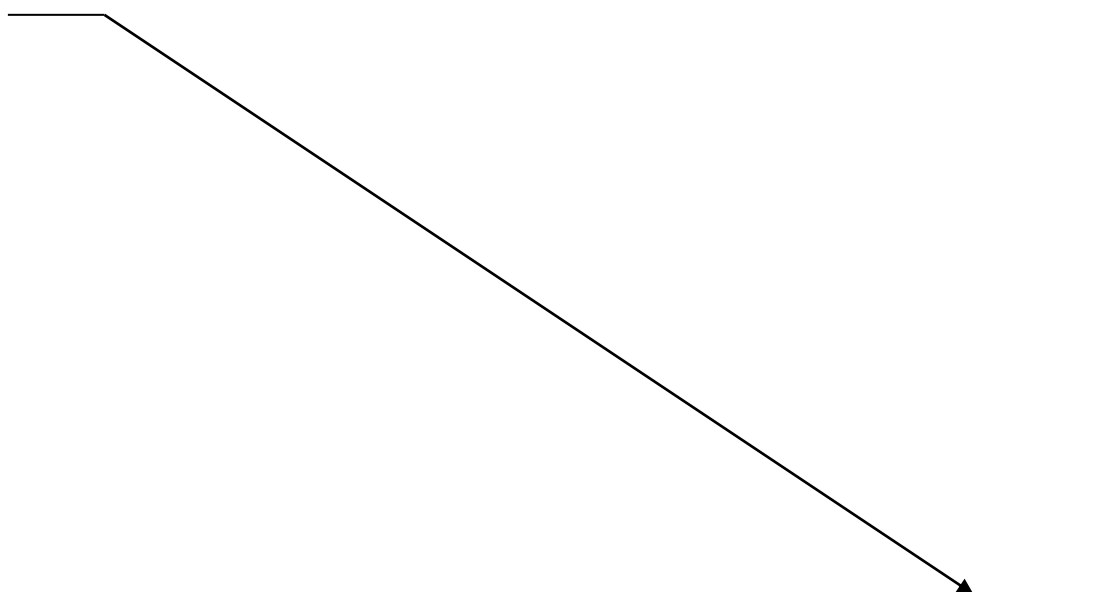


Tabela 4. Concentração de citocinas (pg/mL) determinada por Multiplex (Bioclarma) (pg/mL ± dp)

Citocina	Rotat 3p HLSC	Rotat 10p HLSC	Hipo 10p HLSC	Hipo 3p HLSC	Norm 10p HLSC	Norm 3p HLSC	Norm 3p MSC
IL1 β	22 ± 0,14	34 ± 13	30,8 ± 19,8	83,4 ± 32,5	17,1 ± 9,9	51,8± 35,9	7,5± 2,6
ILra	96 ± 0,32	87 ± 5	99,8 ± 26,5	163,4 ± 31,9	86,1 ± 7,9	91,7±32,6	596±404
IL-2	0	0	0	0	0	0	0
IL-4	2,6±0,02	2,8 ± 0,05	2,9 ± 1,1	4,8 ± 0,9	2,4 ± 0,3	2,4±1,3	2 ± 1,4
IL-5	0	0	0	0	0	0	0
IL-6	>40000	>40000	>40000	>40000	>40000	>40000	>40000
IL-7	0	4,4 ± 2,5	8,4 ± 2,4	24,1 ± 7,9	7,4 ± 3,7	18,5± 9	7,6±1,6
IL-8	>35000	>35000	>35000	>35000	>35000	>35000	>35000
IL-9	52 ± 0,8	42 ± 3,6	32,7 ± 12,4	41,9 ± 15,2	24,6 ± 7,7	26,1±4,8	27,9±3,0
IL-10	32 ± 3,9	33 ± 5,5	32,9 ± 0,1	36 ± 4,2	28,5 ± 3,7	31,3±1,3	35,8±7,9
IL-12	59,1± 11	52,8 ± 11,6	56,7 ± 8,7	74 ± 6,6	56 ± 8,1	41,1±17	36,6±13
IL-13	9,2 ± 2,2	7,7 ± 0,8	5,6 ± 2,1	7,8 ± 3,4	4,4 ± 2,0	2,2±1	4,9±1,3
IL-15	93,3± 9,8	87,1 ± 8,3	94,6 ± 5,6	95,9 ± 13,4	93,9± 10,7	81,8±9,7	64,5±22
IL-17	0	0	0	0	0	0	0
Eotaxina	81,3± 19	359 ± 227	2350 ± 532	2748 ± 76	1932 ± 133	2417±453	21±17
bFGF	49,8±3,9	79 ± 14	30,1 ± 5,6	23,5 ± 2,8	44 ± 59	22,1±26	6,7±9,2
G-CSF	1150±149	1714± 183	1371 ±1670	16275 ± 8389	490 ± 468	2188±921	359,3±212
GM-CSF	47 ± 0,8	37,4 ± 5,6	49,5 ± 2,4	59 ± 51	38,8 ± 3,8	60,4±21	65±65
IFN γ	156 ± 1,6	168 ± 10,1	171 ± 49,8	236 ± 27	147 ± 14,5	176,1±44	174,5±38

IP-10	0	54 ± 77	30 ± 42	61 ± 86	14,5 ± 25	283,5±132	28043,3±13513
MCP-1	?	?	5622 ± 2131	2999± 494	4614 ± 872	5647,9±2821	1410,5±767
MIP-1α	3,6 ± 1,4	2,1 ± 0,4	2,6 ± 0,2	2,8 ± 2,3	2,1 ± 0,5	5,8±0,5	12,5±1,1
MIP-1β	0	0	0	0	0	0	0
bbPDGF	0	0	0	0	0	0	0
Rantes	109 ± 28	328 ± 227	279 ± 210	909 ± 566	576 ± 522	118±24	11353±9310
TNFα	22 ± 2	24 ± 4	29 ± 4	40,5 ± 7,7	22 ± 2,5	24,6±6,7	30,2±5,3
VEGF	33817±6318	24814±1567	22591±7330	32286±4297	14830±3860	16664±10951	16485±3722
HGF	12238±1109	6674±2872	20901±1033	15508±1159	20642±3543	15853±4380	340±145
M-CSF	555 ± 39	256 ± 26	496 ± 177	538 ± 299	649 ± 628	548±33	173±65
MIF	35047±4014	45045±1835	30773±9632	24216±11108	24719±14645	17956±4115	10512±1367
SCF	119 ± 10	119 ± 64	209 ± 32	144 ± 31	265 ± 216	211±79	15,4±3,6

Tabela 5. Faixa de concentração em pg/mL (ou ng/mL onde indicado) determinada por multiplex de todos os CM produzidos por HLSCs e MSCs na passagem 3 (Bioclarma)

	HLSC	MSC
IL1 β	15,9-87,7	4,9-10,1
ILra	59,1-124,3	192-1000
IL-2	0	0
IL-4	0-3,7	0-3,4
IL-5	0	0
IL-6	>40000	>40000
IL-7	6,7-27,9	6-9,2
IL-8	>35000	>35000
IL-9	21,3-30,9	19,8-30,9
IL-10	12,9-32,6	15-43,7
IL-12	20,9-58,1	21,9-49,6
IL-13	0-3,2	0-6,2
IL-15	57-91,4	25-109
IL-17	0	0
Eotaxina	505-2870	10-38
bFGF	22-6055	0
G-CSF	1267-3109	11-571
GM-CSF	19,8-81,4	0-130
IFN γ	97-220	107-213
IP-10	152-416	0,9-41,6 (ng/mL)
MCP-1	1658-8500	600-2296
MIP-1 α	5,3-13	11,4-90
MIP-1 β	4,4-6,2	0-1000
bbPDGF	0	0
Rantes	94-142	124-20700
TNF α	17,9-31,3	24,9-35,5
VEGF	34,9-91 (ng/mL)	25,9-65,9 (ng/mL)
HGF	11,5-20,2 (ng/mL)	195-485
M-CSF	515-1072	91-238
MIF	9114-22100	8280-11900
SCF	128-290	9,9-19

Tabela 6. Concentração de citocinas (pg/mL) determinada por RayBio® Human ELISA

Citocina	Rotat 3p HLSC	Rotat 10p HLSC	Hipo 10p HLSC	Hipo 3p HLSC	Norm 10p HLSC	Norm 3p HLSC	Norm 3p MSC
VEGF	154572 ± 3903	121884 ± 50131	153456 ± 3479	132132 ± 297	118708 ± 16848	118936 ± 56365	157896 ± 4811
HGF	33822 ± 823	24312 ± 3971	90540 ± 23215	49050 ± 9631	88488 ± 9267	51716 ± 12211	0
MCP1	6383 ± 98	6397 ± 126	5966 ± 9	5635 ± 38	5823 ± 319	5680 ± 189	5497 ± 465
MSP1	20,4 ± 14,4	6,4 ± 4,5	5,4 ± 4,2	0	39,4 ± 1,4	34,4 ± 28	0
IL6	20604 ± 453	27694 ± 3493	28744 ± 2008	33319 ± 1732	27264 ± 10578	37971 ± 4381	30389 ± 3444
IL8	180432 ± 7682	183909 ± 10799	191568 ± 3311	189114 ± 803	203349 ± 13125	206652 ± 14639	227796 ± 12760

Tabela 7. Faixa de concentração determinada pelo ensaio ELISA

Citocina	HLSC	MSC
VEGF	63-175(ng/mL)	153-163(ng/mL)
HGF	39,5-64(ng/mL)	0
IL-6	33,6-42,3(ng/mL)	26,9-33,8(ng/mL)
IL-8	192-221(ng/mL)	215-240(ng/mL)
MCP1	5491-5869 (pg/mL)	5032-5962 (pg/mL)
MSP1	6,4-62,4 (pg/mL)	0

5 Tabela 8. Faixa de concentração das citocinas escolhidas determinada por multiplex e ELISA (ND: não determinado)

Cytokine	HLSC	MSC	HLSC	MSC
VEGF	34,9-91 (ng/ml)	25,9-65,9 (ng/ml)	63-175 (ng/ml)	153-163 (ng/ml)
HGF	11,5-20,2 (ng/ml)	195-485 (pg/ml)	39,5-64 (ng/ml)	0
IL-6	>40 ng/ml	>40 ng/ml	33,6-42,3 (ng/ml)	26,9-33,8 (ng/ml)
IL-8	>35 ng/ml	>35ng/ml	192-221 (ng/ml)	215-240 (ng/ml)
MCP1	1658-8500 (pg/ml)	600-2296 (pg/ml)	5491-5869 (pg/ml)	5032-5962 (pg/ml)
MSP1	ND	ND	6,4-62,4 (pg/ml)	0

Imunoprecipitação de MSP-1 a partir de meio condicionado HLSC e *Western Blot*

Os sobrenadantes MSP-1 em cultura de HLSC foram determinados por imunoprecipitação e *Western Blot*. 15 mL de sobrenadante de cultura após 24 horas de cultura foram centrifugados por 70 minutos a 4000 g a 4°C, concentrados em um Amicon 3KD ultrafiltro em 250 µL. Para precipitação de proteína, 1 mL de etanol puro frio (-20°) foi adicionado aos 250 µL de sobrenadante concentrado e incubado a -80°C de um dia para o outro. As proteínas precipitadas foram coletadas após centrifugação a 1200 g e lisada com 500 µL de tampão RIPA. A imunoprecipitação foi executada por 18 horas usando um anticorpo anti-MSP (R&D System) reticulado à proteína α-sefarose. Para SDS-PAGE, péletes foram suspensos em 40 µL de 2-beta-mercaptoetanol e aquecidos a 100°C. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE em gel acrilamida 8%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após 1 horas de bloqueio com 5% leite desnatado seco em tampão salino Tris contendo 0,05% de Tween 20, a membrana foi incubada de um dia para o outro com 2 µg/mL de anticorpo anti-MSP humano a 4°C e, após lavada três vezes, incubada 1 hora à temperatura ambiente com *goat anti-mouse* IgG conjugada com peroxidase de raiz-forte (Bio-Rad). A membrana foi revelada com reagente quimioluminescente e analisada com quimiodoc.

Os resultados são ilustrados na figura 9, mostrando a imunoprecipitação de MSP a partir do meio condicionado de HLSCs em três passagens diferentes (1, 2, 5). As bandas de 85 kDa representam MSP monomérico (pro-MSP) e as bandas de 55 kDa a cadeia alfa de MSP dimérico (ativo).

Exemplo 5 - Análise da composição CM por matriz de anticorpos *RayBio® Biotin Label-based*

Os níveis de expressão de 507 proteínas humanas alvo derivadas de CM HLSC e MSC foram simultaneamente detectados. Os CMs foram coletados após 48 horas de cultura de 1×10^6 células na presença de αMEM suplementado com 0,2% de FCS como descrito no protocolo de matriz de proteína. O painel de moléculas incluía citocinas, quimiocinas, adipocina, fatores de crescimento, proteases, receptores solúveis, moléculas de adesão solúveis e outras proteínas no sobrenadante de cultura de células.

Materiais e métodos

Preparação do CM. Para preparar CM HLSCs e MSC, as células foram depositadas em pratos de cultura de tecido de 100 mm a uma densidade de 1×10^6 células por prato. As células foram então cultivadas com meio de cultura completo por de 24 a 48 horas. Após o que, o meio foi substituído por baixo teor de soro (0,2% FCS) e então as células foram cultivadas por 48 horas mais uma vez. Os CMs foram coletados e centrifugados a 1000 g. Os CMs de ambos tipos de células sofreram diálise antes da etapa de marcação com biotina. Através de um processo simples, a

amina primária das proteínas nas amostras foi biotinizada, seguido por diálise para remover a biotina livre. A partir daqui, as amostras recém biotinizadas foram adicionadas sobre a membrana da matriz e incubadas à temperatura ambiente. Após a incubação com HRP-estreptavidina, os sinais foram visualizados por quimioluminescência. Nesta matriz, foi usado um controle interno para monitorar todo o processo incluindo o rótulo-biotina e a matriz de anticorpos. Os resultados foram analisados com RayBio Analysis Tool, que é um programa especificamente projetado para análise de matriz de anticorpos RayBio baseada em rótulo biotina. Detalhes adicionais deste ensaio podem ser encontrados em RayBio® Biotin Label-based Human Antibody Array I User Manual.

5

10

A figura 10 mostra o mapa da matriz humana do RayBio Biotin Label-based a partir dos sobrenadantes derivados de HLSCs (A) e MSC (B).

O resultado completo do ensaio de matriz de anticorpos RayBio® Biotin Label-based é resumido abaixo na Tabela 9.

Tabela 9

Proteínas	HLSC (análise densitométrica)	razão HLSC/MSC
6Ckina	6,11	2,06
Activina A	6,54	2,16
Activina B	5,42	2,18
Activina C	7,27	2,56
Activina RIA / ALK-2	5,63	2,18
Activina RIB / ALK-4	5,27	1,95
Activina RII A/B	5,18	1,76
Activina RIIA	5,28	1,71
Adiponectina / Acrp30	5,57	1,48
AgRP	5,67	1,59
ALCAM	10,30	2,62
Angiogenina	9,40	2,38
Angiopoietina-1	6,45	1,45
Angiopoietina-2	5,92	1,48
Angiopoietina-4	5,62	1,40
Angiopoietina-like 1	5,76	1,36
Angiopoietina-like 2	6,51	1,51
Fator Angiopoietin-like	6,26	1,53
Angiostatina	6,90	1,66
APJ	6,00	1,40
AR (Amfiregulina)	6,34	1,47
APRIL	7,03	1,47
Artemina	7,30	1,52
Axl	8,83	1,70
B7-1 /CD80	9,33	1,66
BAFF R / TNFRSF13C	9,12	1,48
BCMA / TNFRSF17	4,68	1,79
BD-1	4,64	1,77
BDNF	4,71	1,68
beta-Catenina	4,23	1,61
beta-Defensina 2	4,31	1,63

beta-NGF	4,38	1,66
BIK	4,56	1,73
BLC / BCA-1 / CXCL13	4,36	1,56
BMP-2	4,25	1,50
BMP-3	4,43	1,43
BMP-3b / GDF-10	4,34	1,43
BMP-4	4,60	1,41
BMP-5	4,46	1,40
BMP-6	4,47	1,34
BMP-7	4,44	1,31
BMP-8	4,87	1,31
BMP-15	4,74	1,33
BMPR-IA / ALK-3	5,30	1,49
BMPR-IB / ALK-6	6,35	1,69
BMPR-II	5,76	1,59
BTC	5,71	1,61
Cardiotrofina-1 / CT-1	5,89	1,61
CCL14 / HCC-1 / HCC-3	5,92	1,50
CCL28 / VIC	6,67	1,57
CCR1	7,76	1,42
CCR2	9,00	1,63
CCR3	8,21	1,49
CCR4	8,04	3,02
CCR5	5,02	1,97
CCR6	5,59	2,08
CCR7	5,52	1,89
CCR8	4,43	1,51
CCR9	4,10	1,48
CD14	4,21	1,55
CD27 / TNFRSF7	3,94	1,50
CD30 / TNFRSF8	3,70	1,38
CD30 Ligante / TNFSF8	4,28	1,40
CD40 / TNFRSF5	4,40	1,56
CD40 Ligante / TNFSF5 /CD154	4,14	1,38
CD 163	3,69	1,33
Cerberus 1	3,86	1,29
Chem R23	3,59	1,22
Cordina-Like 1	3,62	1,14
Cordina-Like 2	3,74	1,16
Csk	5,97	1,51
CLC	4,23	1,20
CNTF	4,73	1,35
CNTF R alfa	4,51	1,29
Fator de coagulação III / Fator de tecido	4,70	1,38
CRIM 1	8,98	2,55
Cripto-1	5,26	1,50
CRTH-2	5,11	1,44
Criptico	5,65	1,59
CTACK / CCL27	6,33	1,66
CTGF / CCN2	6,97	1,77
CTLA-4 /CD152	10,38	2,31
CV-2 / Crossveinless-2	7,80	1,61

CXCL14 / BRAK	6,49	2,03
CXCL16	4,64	1,67
CXCR1 / IL-8 RA	4,56	1,61
CXCR2 / IL-8 RB	4,41	1,55
CXCR3	4,01	1,56
CXCR4 (fusina)	3,85	1,44
CXCR5 /BLR-1	3,84	1,41
CXCR6	3,92	1,40
D6	3,77	1,38
DAN	4,02	1,36
DANCE	3,78	1,38
DcR3 / TNFRSF6B	3,62	1,28
Decorina	9,12	2,86
Dkk-1	4,35	1,36
Dkk-3	3,41	1,12
Dkk-4	3,50	1,09
DR3 / TNFRSF25	3,53	1,11
DR6 / TNFRSF21	4,20	1,25
Dtk	9,06	2,17
EDA-A2	237,46	2,94
EDAR	6,79	1,88
EDG-1	4,43	1,25
EGF	4,63	1,30
EGF R / ErbB1	4,69	1,31
EG-VEGF / PK1	5,03	1,34
EMAP-II	6,15	1,75
ENA-78	6,28	1,74
Endocano	8,34	2,14
Endoglina / CD105	8,97	2,02
Endostatina	8,59	1,53
EN-RAGE	5,09	2,04
Eotaxina / CCL11	4,52	1,77
Eotaxin-2 / MPIF-2	4,27	1,47
Eotaxin-3 / CCL26	4,24	1,52
Epiregulina	3,87	1,43
ErbB2	3,90	1,43
ErbB3	4,17	1,56
ErbB4	3,82	1,34
Eritropoietina	4,16	1,26
E-Selectina	3,79	1,33
Endotelina	14,95	3,86
FADD	3,77	1,29
FAM3B	6,05	1,76
Fas / TNFRSF6	3,73	1,21
Fas Ligante	3,61	1,11
FGF Básico	3,67	1,08
FGF-BP	3,78	1,16
FGF R3	4,05	1,19
FGF R4	4,72	1,29
FGF R5	17,21	2,92
FGF-4	4,68	1,30
FGF-5	4,05	1,13

FGF-6	4,27	1,16
FGF-7 / KGF	4,93	1,22
FGF-8	4,89	1,37
FGF-9	5,40	1,49
FGF-10 / KGF-2	5,74	1,56
FGF-11	6,19	1,66
FGF-12	8,68	1,98
FGF-13 1B	7,74	1,60
FGF-16	5,31	1,77
FGF-17	3,91	1,37
FGF-18	4,00	1,44
FGF-19	3,88	1,37
FGF-20	3,67	1,33
FGF-21	3,88	1,42
FGF-23	3,90	1,22
FLRG	3,84	1,34
FIt-3 Ligante	3,69	1,32
Folistatina	5,33	1,58
Folistatina-like 1	5,81	1,15
Fractalcina	3,94	1,28
Frizzled-1	3,88	1,23
Frizzled-3	3,80	1,18
Frizzled-4	3,78	1,21
Frizzled-5	4,52	1,36
Frizzled-6	5,46	1,62
Frizzled-7	4,17	1,23
Galectina-3	5,86	1,56
GASP-1 / WFIKKNRP	5,03	1,44
GASP-2 / WFIKKN	4,39	1,20
GCP-2 / CXCL6	4,69	1,26
GCSF	5,57	1,52
G-CSF R / CD 114	4,68	1,26
GDF1	5,00	1,28
GDF3	6,38	1,77
GDF5	6,55	1,74
GDF8	6,08	1,58
GDF9	10,31	2,25
GDF11	8,84	1,70
GDF-15	4,64	1,34
GDNF	3,87	1,27
GFR alfa-1	3,67	1,25
GFR alfa-2	3,92	1,21
GFR alfa-3	4,09	1,39
GFR alfa-4	4,01	1,45
GITR / TNFRF18	3,80	1,33
GITR Ligante / TNFSF18	4,04	1,44
Glucagon	3,89	1,31
Glut1	3,61	1,23
Glut2	3,73	1,22
Glut3	3,87	1,25
Glut5	4,00	1,29
Glypican 3	34,34	2,73

Glipicano 5	5,27	1,48
GM-CSF	4,20	1,24
GM-CSF R alfa	4,37	1,28
Granzima A	4,92	1,41
GREMLIN	8,49	2,19
GRO	21,75	3,69
GRO-a	4,90	1,32
Hormônio de Crescimento (GH)	5,17	1,34
Hormônio de Crescimento R (GHR)	5,42	1,36
HB-EGF	5,37	1,46
HCC-4 / CCL16	4,91	1,33
HCR / CRAM-A/B	5,09	1,39
Hepassocina	6,08	1,61
Heregulina / NDF / GGF / Neuregulina	6,08	1,45
HGF	15,29	3,38
HGFR	6,53	1,31
HRG-alfa	4,47	1,40
HRG-beta 1	4,09	1,25
HVEM / TNFRSF14	4,06	1,24
I-309	3,67	1,25
ICAM-1	3,49	1,25
ICAM-2	3,28	1,16
ICAM-3 (CD50)	3,77	1,15
ICAM-5	3,49	1,24
IFN-alfa / beta R1	3,50	1,19
IFN-alfa / beta R2	3,52	1,18
IFN-beta	3,66	1,19
IFN-gama	3,67	1,17
IFN-gama R1	3,89	1,22
IGFBP-1	4,95	1,39
IGFBP-2	13,69	2,11
IGFBP-3	6,11	1,66
IGFBP-4	5,90	1,64
IGFBP-6	27,78	4,59
IGFBP-rp1 / IGFBP-7	333,01	2,75
IGF-I	13,74	3,15
IGF-I SR	5,23	1,35
IGF-II	4,76	1,26
IGF-II R	6,57	1,69
IL-1 alfa	9,12	2,26
IL-1 beta	4,87	1,30
IL-1 F5 / FIL1delta	5,25	1,42
IL-1 F6 / FIL1 epsilon	7,50	1,79
IL-1 F7 / FIL1 zeta	5,73	1,37
IL-1 F8 / FIL1 eta	5,91	1,25
IL-1 F9 / IL-1 H1	6,37	1,24
IL-1 F10 / IL-1HY2	4,26	1,19
IL-1 R3 / IL-1 R AcP	4,11	1,25
IL-1 R4 /ST2	4,29	1,33
IL-1 R6 / IL-1 Rrp2	3,69	1,21
IL-1 R8	3,32	1,13
IL-1 R9	3,32	1,07

IL-1 ra	3,36	1,11
IL-1 sRI	3,29	1,09
IL-1 sRII	3,25	1,03
IL-2	3,53	1,12
IL-2 R alfa	4,82	1,43
IL-2 R beta /CD122	3,88	1,15
IL-2 R gama	4,07	1,17
IL-3	4,34	1,26
IL-3 R alfa	4,64	1,24
IL-4	4,72	1,25
IL-4 R	5,53	1,11
IL-5	6,31	1,60
IL-5 R alfa	16,15	2,21
IL-6	35,23	1,46
IL-6 R	6,41	1,51
IL-7	6,01	1,51
IL-7 R alfa	6,10	1,30
IL-8	38,69	1,37
IL-9	6,41	1,47
IL-10	5,27	1,39
IL-10 R alfa	5,42	1,36
IL-10 R beta	5,54	1,38
IL-11	5,71	1,20
IL-12 p40	6,30	1,17
IL-12 p70	4,14	1,22
IL-12 R beta 1	3,44	1,08
IL-12 R beta 2	8,52	1,70
IL-13	3,81	1,11
IL-13 R alfa 1	4,12	1,14
IL-13 R alfa 2	3,59	1,03
IL-15	4,07	1,19
IL-15 R alfa	4,37	1,19
IL-16	4,16	1,17
IL-17	4,13	1,18
IL-17B	4,59	1,17
IL-17B R	4,89	1,16
IL-17C	5,24	1,23
IL-17D	5,18	1,24
IL-17E	5,74	1,41
IL-17F	5,96	1,40
IL-17R	5,29	1,35
IL-17RC	9,68	2,10
IL-17RD	6,54	1,60
IL-18 BPa	7,23	1,50
IL-18 R alfa /IL-1 R5	5,76	1,44
IL-18 R beta /AcPL	5,84	1,44
IL-19	6,69	1,61
IL-20	6,79	1,58
IL-20 R alfa	15,60	3,16
IL-20 R beta	7,48	1,34
IL-21	3,14	0,98
IL-21 R	3,18	0,95

IL-22	3,34	0,91
IL-22 BP	3,22	0,93
IL-22 R	3,51	0,97
IL-23	4,14	1,07
IL-23 R	3,75	1,06
IL-24	4,14	1,07
IL-26	4,28	1,17
IL-27	5,71	1,42
IL-28A	9,23	2,20
IL-29	5,31	1,18
IL-31	4,89	1,23
IL-31 RA	5,80	1,26
Inibina A	5,19	1,31
Inibina B	5,93	1,37
Insulina	5,29	1,25
Insulina R	5,13	1,22
Insulisina / IDE	7,60	1,78
IP-10	5,86	1,36
I-TAC / CXCL11	5,83	1,40
Kininostatina / kininogeno	7,18	1,75
Kremen-1	6,35	1,54
Kremen-2	13,18	3,01
Lck	7,05	1,42
Latente TGF-beta bp1	28,04	4,90
LBP	4,34	1,23
LECT2	3,38	1,00
Lefty - A	3,38	1,01
Leptina R	3,66	0,98
Leptina (OB)	3,52	1,03
LFA-1 alfa	3,75	1,05
LIF	4,12	1,09
LIF R alfa	4,43	1,02
LIGHT / TNFSF14	4,34	1,09
Lipocalina-1	4,58	1,14
LRP-1	9,89	1,81
LRP-6	29,80	2,28
L-Selectina (CD62L)	5,94	1,51
Luciferase	5,29	1,25
Linfotactina / XCL1	8,21	1,50
Linfotoxina beta / TNFSF3	5,97	1,39
Linfotoxina beta R / TNFRSF3	5,61	1,30
MAC-1	5,54	1,20
MCP-1	22,87	1,84
MCP-2	5,83	1,37
MCP-3	6,96	1,65
MCP-4 / CCL13	6,09	1,48
M-CSF	6,90	1,65
M-CSF R	7,02	1,62
MDC	8,30	1,64
MFG-E8	8,93	1,62
MFRP	3,43	0,98
MIF	3,73	1,02

MIG	3,67	1,03
MIP-1a	5,17	1,42
MIP-1b	3,49	0,98
MIP-1d	3,45	0,93
MIP 2	11,45	2,56
MIP-3 alfa	4,64	1,33
MIP-3 beta	3,68	1,03
MMP-1	5,06	1,20
MMP-2	4,30	1,14
MMP-3	4,08	0,75
MMP-7	4,49	0,93
MMP-8	4,80	1,15
MMP-9	4,25	0,98
MMP-10	6,05	1,44
MMP-11 /estromelisina-3	5,23	1,22
MMP-12	5,12	1,33
MMP-13	5,75	1,40
MMP-14	7,60	1,79
MMP-15	5,71	1,39
MMP-16 / MT3-MMP	7,86	1,80
MMP-19	9,10	1,70
MMP-20	8,06	1,68
MMP-24 / MT5-MMP	6,44	1,48
MMP-25 / MT6-MMP	6,20	1,36
Musk	6,62	1,41
MSP alfa cadeia	6,85	1,40
MSP beta-cadeia	16,76	2,65
NAP-2	9,61	1,71
NCAM-1 / CD56	5,11	1,24
Neuritina	4,04	1,06
NeuroD1	3,86	1,07
Neuropilina-2	3,58	1,01
Neurturina	3,58	0,94
NGF R	3,63	1,03
NOV / CCN3	3,58	1,13
NRG1 Isoforma GGF2	3,60	1,10
NRG1-alfa / HRG1-alfa	3,58	1,03
NRG1-beta1 / HRG1-beta1	4,12	1,20
NRG2	4,09	1,02
NRG3	4,45	1,11
NT-3	3,73	0,96
NT-4	4,10	0,85
Orexina A	4,34	0,65
Orexina B	4,60	0,55
OSM	4,89	0,69
Osteoactivina / GPNMB	5,20	0,98
Osteocrina	8,16	1,73
Osteoprotegerina / TNFRSF11B	265,56	5,65
OX40 Ligante / TNFSF4	11,27	2,49
PARC / CCL18	5,35	1,26
PD-ECGF	5,31	1,20
PDGF R alfa	5,73	1,32

PDGF R beta	6,80	1,49
PDGF-AA	7,08	1,54
PDGF-AB	6,91	1,52
PDGF-BB	7,03	1,51
PDGF-C	7,12	1,43
PDGF-D	7,08	1,31
PECAM-1 /CD31	4,21	1,18
Pentraxina 3 / TSG-14	11,67	2,24
Perlefina	4,49	1,20
PF4 / CXCL4	3,88	1,10
PIGF	3,69	1,10
PLUNC	3,72	1,17
Pref-1	3,88	1,20
Progranulina	4,96	1,52
Prolactina	4,16	1,26
P-selectina	3,86	1,10
RAGE	3,93	1,06
RANK / TNFRSF11A	4,43	1,17
RANTES	3,86	1,05
RELM beta	3,74	0,98
RELT / TNFRSF19L	4,28	0,93
ROBO4	4,21	1,08
S100 A8/A9	4,84	1,18
S100A10	4,89	1,19
SAA	5,14	1,23
SCF	7,37	1,53
SCF R /CD117	5,51	1,32
SDF-1 / CXCL12	5,32	1,18
sFRP-1	6,65	1,47
sFRP-3	6,42	1,35
sFRP-4	69,46	5,43
sgp130	15,48	2,93
SIGIRR	7,82	1,55
Siglec-5/CD170	7,13	1,47
Siglec-9	7,91	1,63
SLPI	7,96	1,29
Smad 1	4,78	1,23
Smad 4	10,65	2,26
Smad 5	4,59	1,15
Smad 7	4,59	1,22
Smad 8	3,92	1,09
SMDF / NRG1Isoforma	4,11	1,05
Soggy-1	3,92	1,14
Sonic Hedgehog (Shh N-terminal)	3,77	1,10
SPARC	56,56	3,63
Spinesina	6,40	1,68
TACI / TNFRSF13B	4,40	1,10
Tarc	3,85	1,07
TCCR / WSX-1	3,80	1,00
TECK / CCL25	3,79	0,98
TFPI	5,18	1,22
TGF-alfa	4,28	1,09

TGF-beta 1	4,64	1,19
TGF-beta 2	4,85	1,22
TGF-beta 3	5,26	1,32
TGF-beta 5	5,28	1,29
TGF-beta RI / ALK-5	6,94	1,51
TGF-beta RII	5,43	1,30
TGF-beta RIIb	5,72	1,34
TGF-beta RIII	6,70	1,53
Trombopoietina (TPO)	7,40	0,94
Trombospondina (TSP)	325,53	3,99
Trombospondina-1	281,16	3,76
Trombospondina-2	10,81	1,94
Trombospondina-4	7,96	1,57
Timopoietina	7,60	1,44
Tie-1	4,03	0,88
Tie-2	3,92	0,86
TIMP-1	137,73	1,08
TIMP-2	54,09	7,91
TIMP-3	7,21	1,73
TIMP-4	4,31	1,05
TL1A / TNFSF15	4,70	1,14
TLR1	4,81	1,21
TLR2	5,77	1,36
TLR3	4,47	1,06
TLR4	4,16	1,01
TMEFF1 / Tomoregulina-1	4,91	1,10
TMEFF2	4,66	1,16
TNF-alfa	5,07	1,26
TNF-beta	5,36	1,26
TNF RI / TNFRSF1A	8,08	1,77
TNF RII / TNFRSF1B	5,79	1,19
TRADD	5,70	1,26
TRAIL / TNFSF10	5,83	1,26
TRAIL R1 / DR4 / TNFRSF10A	6,28	1,40
TRAIL R2 / DR5 / TNFRSF10B	6,57	1,36
TRAIL R3 / TNFRSF10C	6,98	1,44
TRAIL R4 / TNFRSF10D	8,02	1,38
TRANCE	9,17	1,53
TREM-1	4,77	0,95
TROY / TNFRSF19	5,21	1,04
TSG-6	5,72	1,10
TSLP	4,90	1,03
TWEAK / TNFSF12	5,00	1,03
TWEAK R / TNFRSF12	5,14	1,07
Ubiquitina +1	4,92	1,03
uPA	4,94	0,90
uPAR	5,41	1,11
Vasorina	6,12	1,27
VCAM-1 (CD106)	5,02	1,11
VE-Caderina	5,20	1,18
VEGF	10,00	1,61
VEGF R2 (KDR)	5,73	1,25

VEGF R3	5,48	1,19
VEGF-B	5,24	1,15
VEGF-C	7,98	1,60
VEGF-D	6,11	1,18
VEGI / TNFSF15	6,03	1,20
WIF-1	6,07	1,21
WISP-1 / CCN4	6,68	1,30
XEDAR	7,81	1,46

Com base numa razão HLSC/MSC igual ou maior que 2,5, foi identificado um total de 25 proteínas como aquelas mais prováveis de dar uma contribuição para a atividade do CM. Tais proteínas são destacadas na Tabela 9.

Exemplo 6 - comparação dos efeitos dos tratamentos de HLSCs e CM-HLSCs no modelo

5

FHF *in vivo*

Modelo *in vivo* D-galactosamina/endotoxina de hepatite letal tóxica aguda

Os mecanismos subjacentes à ação hepatotóxica de galactosamina ocorrem devido a uma elevada acumulação de derivados UDP-galactosamina no fígado, levando a uma exaustão de UTP hepático. Como resultado, pára a biossíntese de macromoléculas (RNA, proteínas, glicoproteínas, glicogênio, etc.). Estas alterações levam a um eventual dano celular e morte celular, que em estágios avançados da reação podem ser identificados pelo aumento das enzimas do fígado no sangue e por histologia. Ao mesmo tempo, a endotoxina induziu a produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) que desenvolveu uma apoptose massiva de hepatócitos. Este modelo *in vivo* foi desenvolvido em camundongos SCID para estudar a ação de HLSC neste sistema letal *in vivo*.

Métodos

Animais e protocolos experimentais. Camundongos SCID de seis a sete semanas de idade foram alojados em instalações animais com acesso livre a comida e água. Estes animais receberam uma injeção intraperitoneal de 500 μ L de tampão salino contendo 0,125 μ g de LPS e 18 mg de GalN. Os camundongos foram injetados intraperitonealmente com 30×10^6 de HLSC após 2 horas da injeção D-GalN/LPS. Um segundo grupo de camundongos SCID foi inoculado intraperitonealmente com 1 mL de sobrenadante de HLSC em tampão salino ao mesmo tempo, 30 minutos e 2 horas após a injeção de LPS e GalN. Os camundongos de controle receberam uma injeção de uma mistura de LPS e GalN.

Produção de sobrenadante a partir de HLSC no frasco T. Para a geração de CM a partir de HLSC (CM-HLSC), as células foram deixadas a crescer até de 60 a 70% de confluência (aproximadamente 2×10^6 HLSC por frasco de 75 cm²), lavadas cuidadosamente e cultivadas em 10 mL de meio α -MEM livre de soro suplementado com 0,05% de albumina de soro humano (produzida em grau GMP). O meio condicionado foi coletado 24 horas mais tarde e concentrado 25 vezes usando unidades

de ultrafiltração (Millipore, Bedford, MA) com um corte de 3 kDa.

Análise histológica. A necrose do fígado foi analisada através de manchamento H&E, proliferação (manchamento PCNA) e TUNEL (células apoptóticas).

Western Blot. O ensaio *Western Blot* foi realizado para a detecção de BAX e BclXS/L.

5 Os fígados foram homogeneizados e lisados a 4°C por 1 hora em tampão de lise (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3, 1% de Triton X-100, 10 µmol/L de fluoreto de fenilmetil sulfonila, 10 µmol/L de leupeptina e 100 U/mL de aprotinina) e centrifugado a 15000 g. Os teores de proteínas dos sobrenadantes foram medidos pelo método Bradford. Alíquotas contendo 200 µg de proteínas de lisados de fígados foram submetidas à eletroforese em
10 gel de dodecilsulfato-poliacrilamida sob condições redutoras e eletro-manchados em filtros de membrana de nitrocelulose. As manchas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em 20 mmol/L de Tris-HCL, pH 7,5, 500 mmol/L de NaCl mais 0,1% de Tween (TBS-T). As membranas foram subseqüentemente imunomanchadas de um dia para o outro a 4°C com os relevantes anticorpos primários na concentração apropriada. Após
15 lavagens extensivas com TBS-T, as manchas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos a isotipo conjugado com peroxidase, lavados com TBS-T, desenvolvidos com reagentes de detecção ECL por 1 minutos e expostos a filme X-Omat. Os seguintes anticorpos foram usados: anticorpo monoclonal anti-BAX e anticorpo policlonal BclXS/L de Santa Cruz Biotechnology.

20

Resultados

Para avaliar efeitos benéficos possíveis de HLSC sobre a letalidade de camundongos que receberam endotoxina (LPS) e GalN, foram realizados estudos de sobrevivência usando 6 camundongos. A % de sobrevivência animal injetada com 0,125 µg de LPS e 18 mg de GalN e 30 x 10⁶ HLSC foi de 75%. A % de
25 sobrevivência animal injetada com 1 mL de sobrenadante concentrado em tampão salino ao mesmo tempo, 30 minutos e 2 horas após a injeção de LPS e 18 mg de GalN foi de 70% (n = 17). Os níveis de transaminase alanina (ALT) no soro diminuíram de 273 U/L para 57 U/L e de transaminase aspartato (AST) no soro diminuíram de 1693 U/L para 291 U/L, ambos após 7 dias da injeção de HLSC. Os níveis de AST diminuíram de 1693 U/L
30 para 1000 U/L ambos após 6 dias de injeção de CM-HLSC.

A análise histológica de seções de fígado após 3 e 6 dias do tratamento com sobrenadante mostraram um índice diminuído de apoptose (TUNEL) e necrose. Uma regeneração massiva de tecido foi observada. Esta descoberta se correlaciona com um aumento do índice de proliferação de tecido (manchamento PCNA).
35 Pelo *Western Blot*, foi mostrado que houve uma regulação para cima da proteína pró-apoptótica BAX nos animais tratados com GalN/LPS e uma regulação para baixo no ponto diferente no tempo em ambos sobrenadantes concentrados. No caso da expressão da proteína pró-apoptótica BclX/L, foi observada uma regulação para cima desta

proteína nos animais tratados com o sobrenadante concentrado e uma regulação para baixo da expressão nos animais tratados somente com GalN/LPS.

Os resultados mencionados acima são ilustrados nas figuras de 11 a 13.

5 A figura 11a mostra a sobrevivência de camundongos no modelo letal LPS/GalN injetados com HLSC (n = 6).

A figura 11b mostra a sobrevivência de camundongos no modelo letal LPS/GalN injetados com HLSC concentrado (n = 17).

10 A figura 12 mostra o manchamento H&E e PCNA de camundongos SCID tratados com GalN/LPS injetados com CM concentrado a partir de HLSC purificado a partir do frasco T após 3 e 6 dias de indução de falha hepática (GalN/LPS).

15 A figura 13 mostra os resultados do ensaio TUNEL para avaliar os hepatócitos apoptóticos. A presença da proteína pró-apoptótica BAX e da proteína anti-apoptótica BclX foi avaliada por análise *Western Blot*.

Reivindicações

1. Meio condicionado, **caracterizado** pelo fato de ser obtido pela cultura de uma linhagem de células progenitoras pluripotentes de fígado humano,

em que compreende uma mistura de fator de crescimento de hepatócito (HGF) em uma concentração variando de 1 a 100 ng/mL, interleucina 6 (IL-6) em uma concentração variando de 10 a 200ng/mL, interleucina 8 (IL-8) em uma concentração maior do que ou igual a 35ng/mL, um fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em uma concentração variando de 10 a 400ng/mL, e proteína estimulante de macrófagos (MSP) em uma concentração variando de 1 a 100 pg/mL, e

em que é livre de células.

2. Método de produção de um meio condicionado livre de células como definido na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido método compreende as etapas de:

(i) cultivar hepatócitos humanos maduros derivados de uma amostra de tecido do fígado adulto num meio de cultura celular até a morte dos hepatócitos maduros e seleção de uma população de células sobreviventes tendo morfologia epitelióide, as referidas células tendo morfologia epitelióide sendo células progenitoras pluripotentes de fígado humano;

(ii) expandir a população de células sobreviventes tendo morfologia epitelióide por cultura num meio de cultura contendo soro e glicose suplementado com hEGF (fator de crescimento epitelial humano) e bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico) e compreendendo os usuais sais inorgânicos, aminoácidos e vitaminas necessários para o crescimento de células de mamíferos; e

(iii) separar as células do meio de cultura das células.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato que os hepatócitos maduros são congelados em um meio de cultura contendo soro na presença de um agente crio-protetor e então descongelados antes da cultura de acordo com a etapa (i).

4. Método, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, **caracterizado** pelo fato que o meio de cultura compreende alfa-MEM (meio mínimo essencial alfa) suplementado com albumina humana em grau GMP (boas práticas de fabricação).

5. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de compreender o meio condicionado como definido na reivindicação 1.

6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de ser concentrada 5 vezes.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de ser concentrada 10 vezes.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada**

pelo fato de ser concentrada 20 vezes.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de ser concentrada 25 vezes.

5 10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de ser diluída 5 vezes.

11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de ser diluída 10 vezes.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de ser diluída 20 vezes.

10 13. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de ser diluída 25 vezes.

Fig. 1

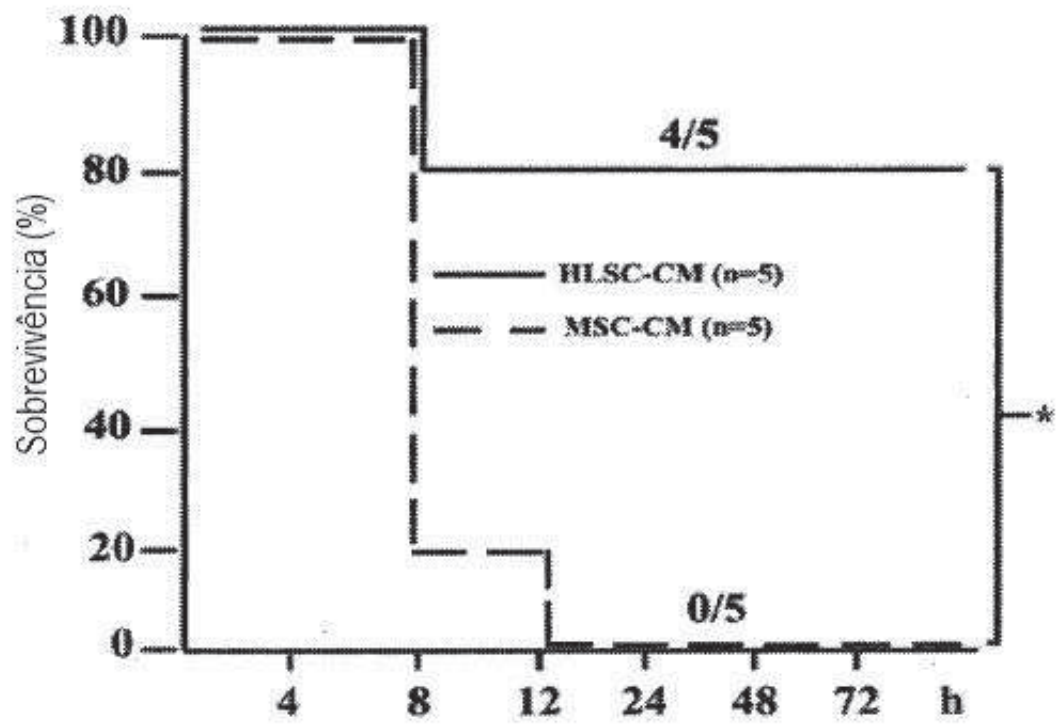


Fig. 2

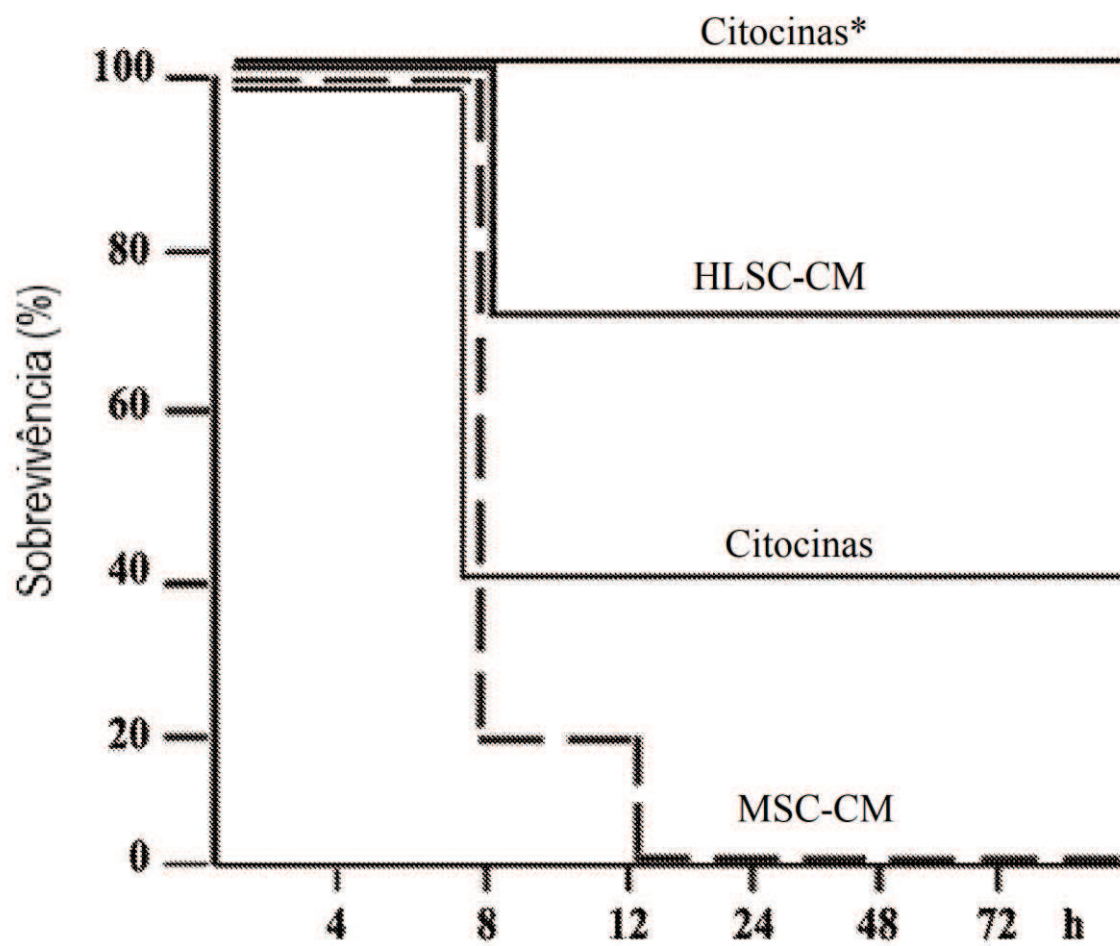


Fig. 3

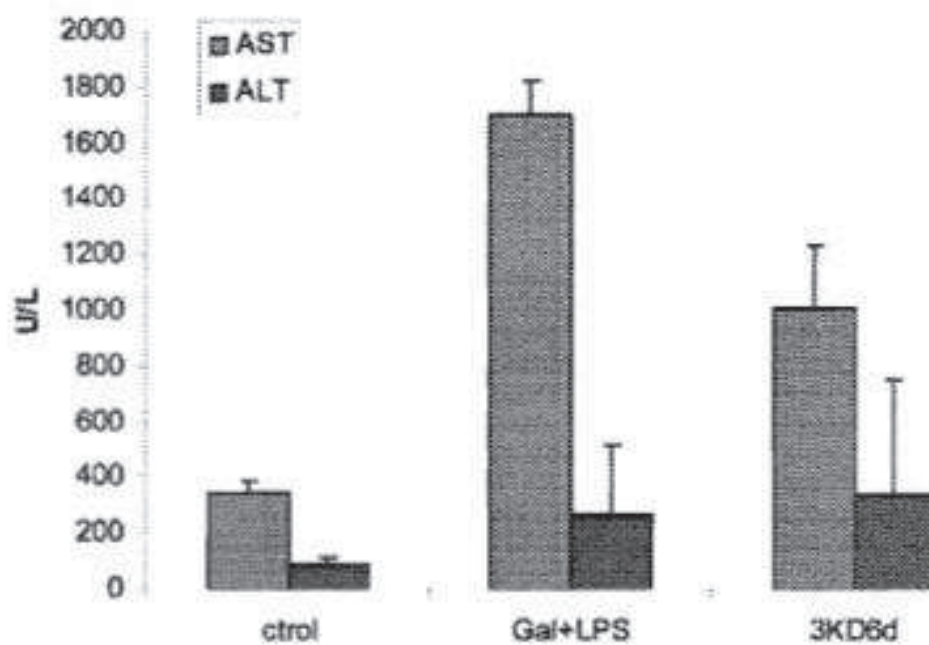


Fig. 4

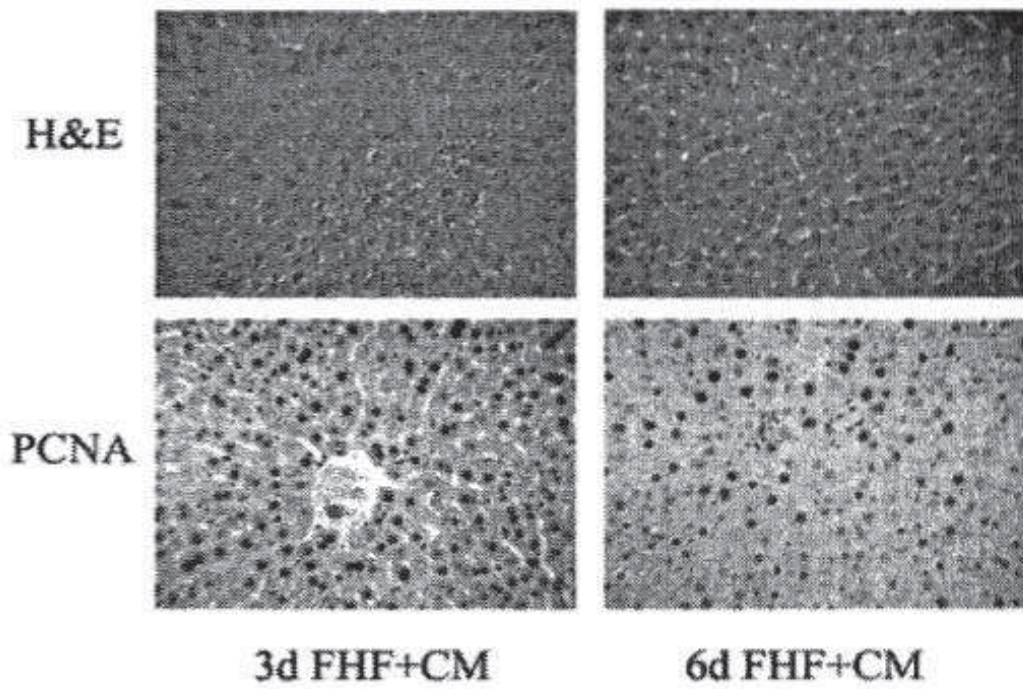


Fig. 5

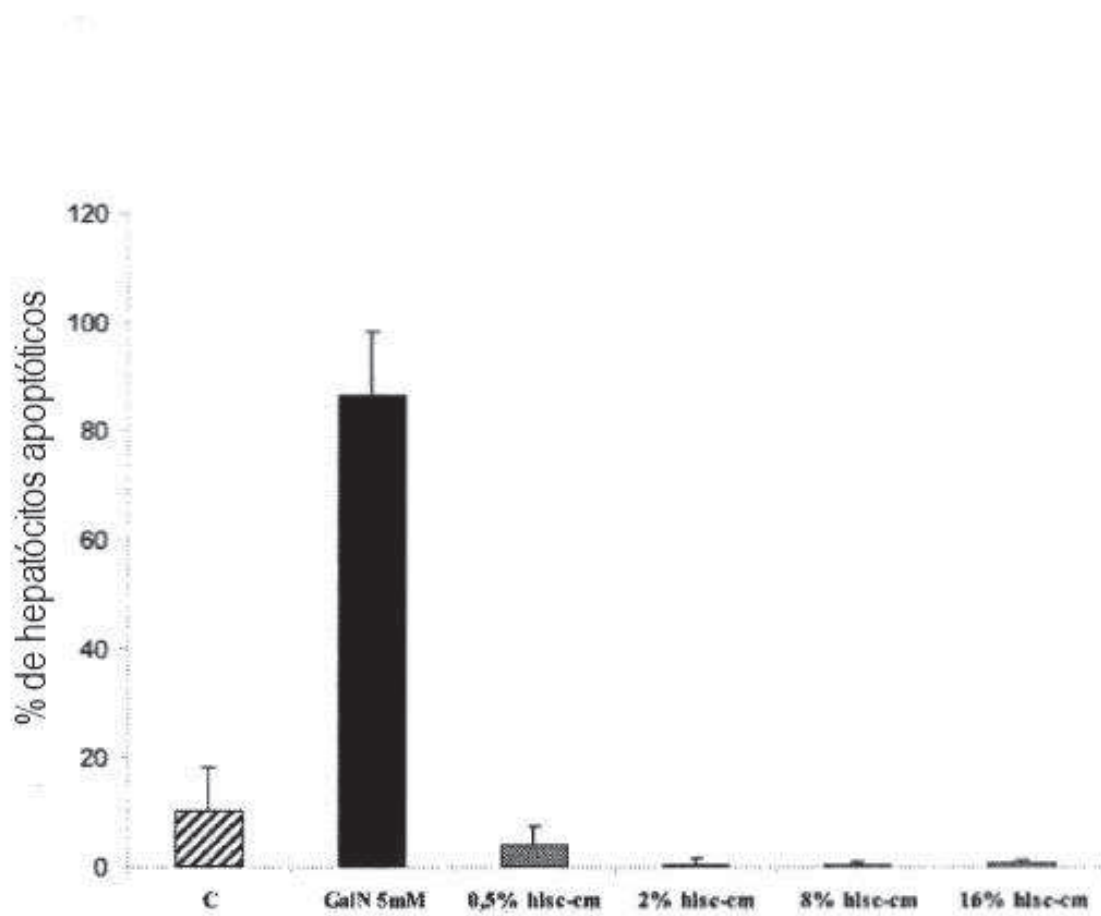


Fig. 6

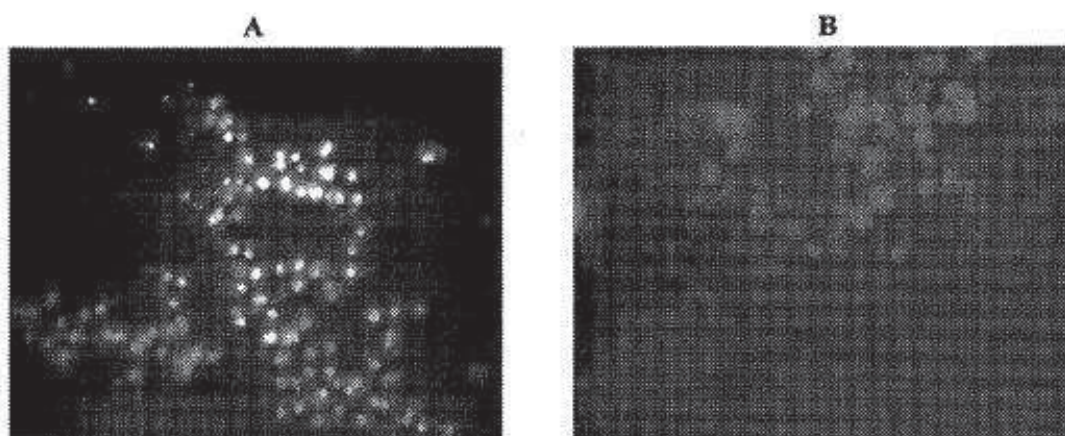


Fig. 7

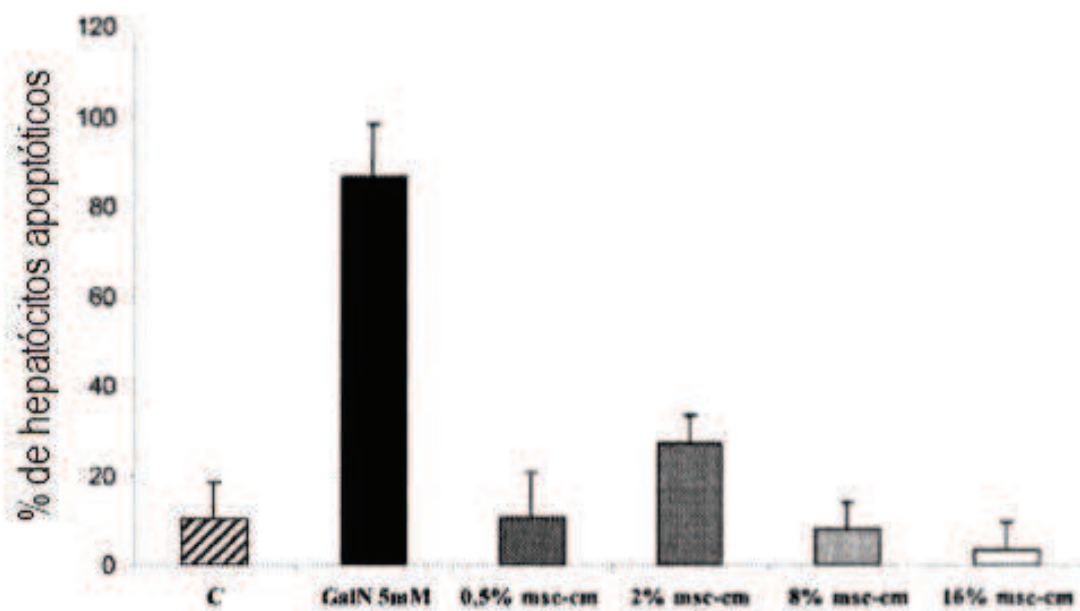


Fig. 8

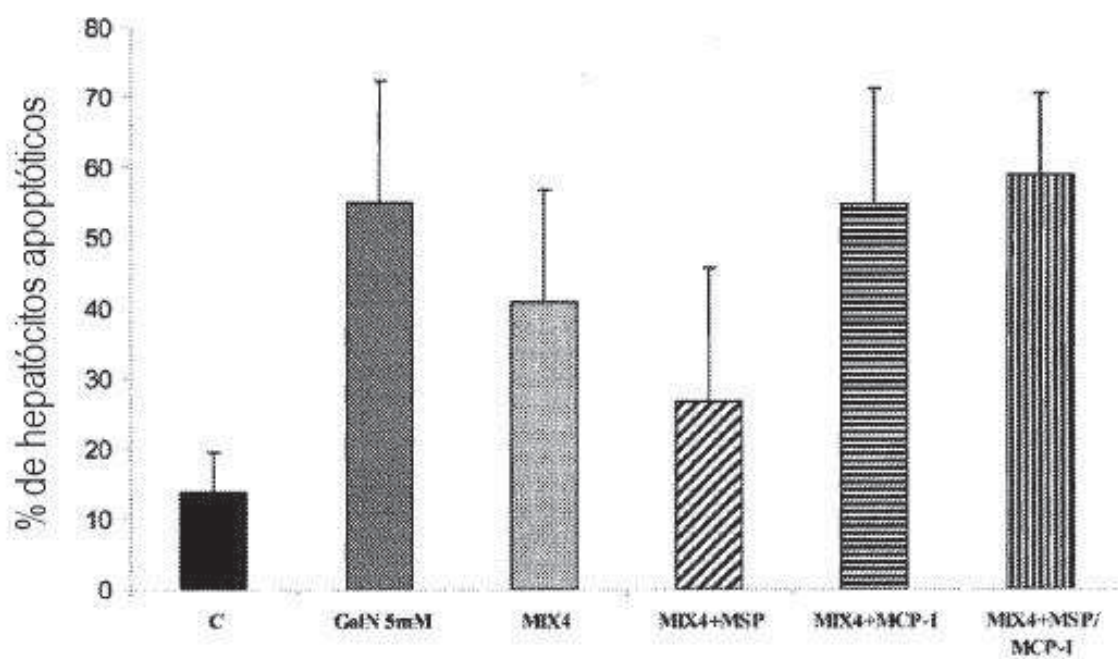


Fig. 9

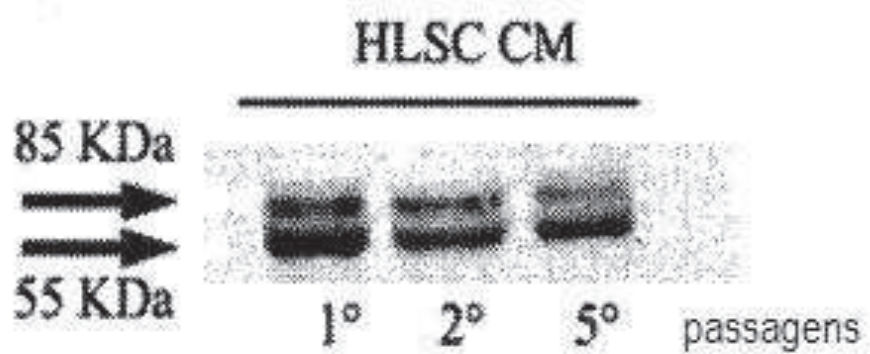


Fig. 10

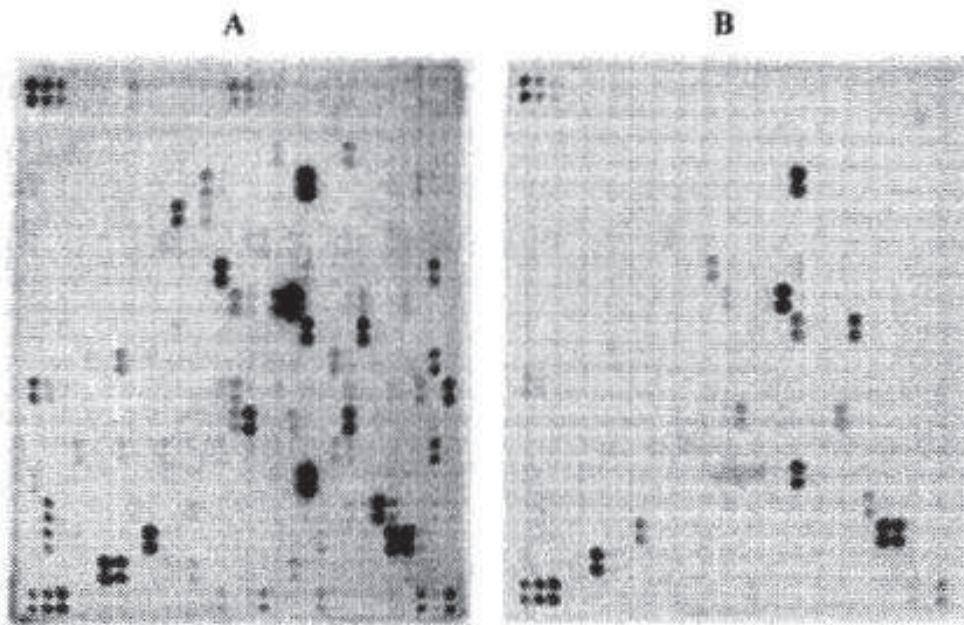


Fig. 11a

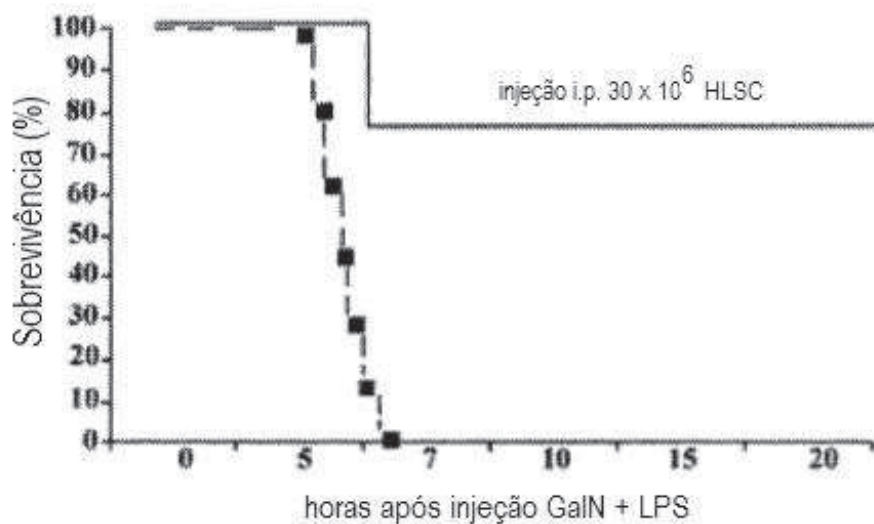


Fig. 11b

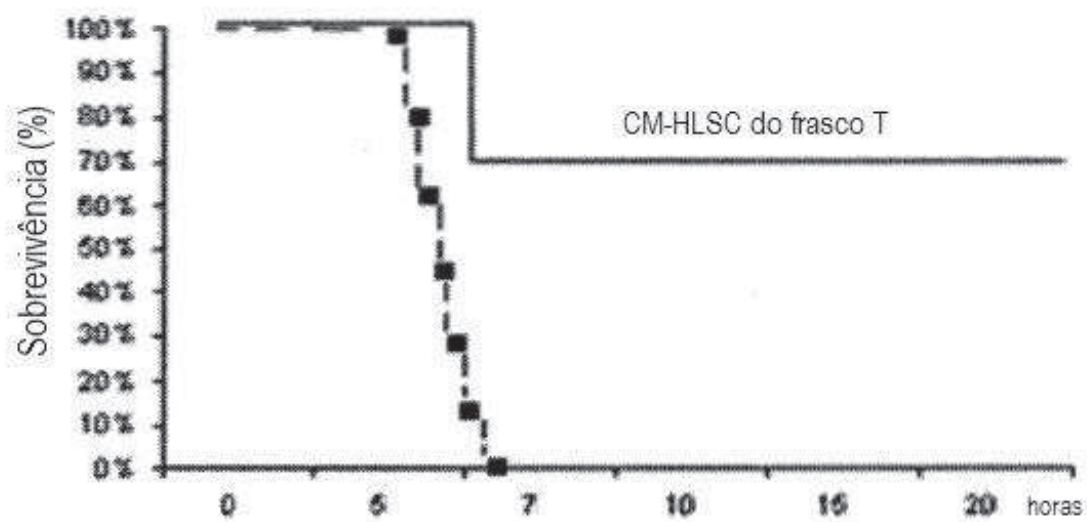


Fig. 12

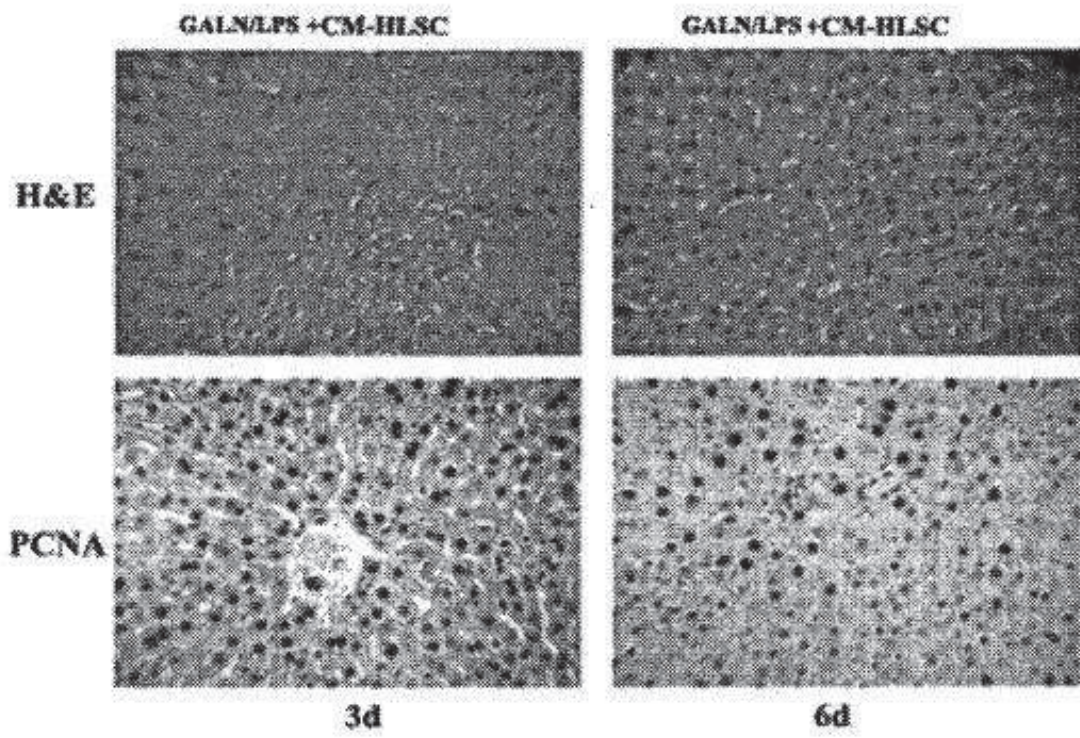


Fig. 13

