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

(21) BR 112019016965-2 A2

(22) Data do Depósito: 20/02/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/04/2020

(54) Título: AGLOMERADOS LINFOIDES ASSOCIADOS À GORDURA COMO LOCAIS PARA TRANSPLANTE, REGENERAÇÃO DE TECIDO, ORGANOGÊNESE E FUNÇÃO PARA TECIDOS MÚLTIPLOS

(51) Int. Cl.: A61K 35/26; A61K 35/407; A61K 35/22.

(30) Prioridade Unionista: 17/02/2017 US 62/460,267; 18/10/2017 US 62/574,119.

(71) Depositante(es): UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION.

(72) Inventor(es): ERIC LAGASSE.

(86) Pedido PCT: PCT US2018018684 de 20/02/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/152488 de 23/08/2018

(85) Data da Fase Nacional: 15/08/2019

(57) Resumo: A presente divulgação refere-se ao enxerto e proliferação de células em aglomerados linfoides associados à gordura ("FALCs" ou "manchas lácteas"), que podem ser usados para gerar tecido ectópico funcional. A presente divulgação ainda fornece métodos e composições para enxerto e proliferação de células, em FALCs ativando-se a via de sinalização de receptor beta de linfotoxina (LTßR) e/ou cinase induzida por NF-kB (NIK). A presente divulgação também fornece métodos e composições para estabelecer tecido hepático ectópico em FALCs (manchas lácteas) e para usar tal tecido hepático ectópico para benefício terapêutico, e fornecer métodos e composições para gerar tecido renal ectópico em FALCs, que pode ser usado em um indivíduo para benefício terapêutico.

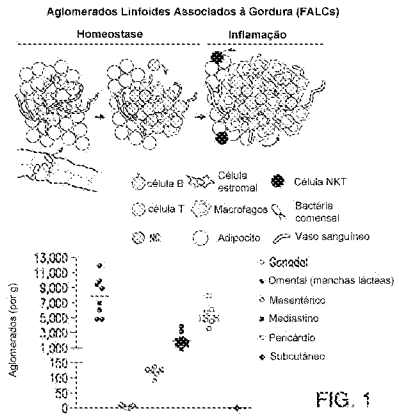


FIG. 1

"AGLOMERADOS LINFOIDES ASSOCIADOS À GORDURA COMO LOCAIS PARA TRANSPLANTE, REGENERAÇÃO DE TECIDO, ORGANOGÊNESE E FUNÇÃO PARA TECIDOS MÚLTIPLOS"

INFORMAÇÃO DE PRIORIDADE

[0001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 62/460,267, depositado em 17 de fevereiro de 2017, e Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 62/574,119, depositado em 18 de outubro de 2017, o conteúdo de cada um dos quais é incorporado por referência em sua totalidade aqui, e prioridade para cada um dos quais é reivindicado.

INFORMAÇÃO DE CONCESSÃO

Não aplicável.

1. INTRODUÇÃO

[0002] A presente divulgação refere-se ao enxerto e proliferação de células de órgãos em aglomerados linfoides associados à gordura ("FALCs", a.k.a. "manchas lácteas") para gerar tecido ectópico que pode ser usado para suplementar ou substituir função de órgão em um indivíduo.

2. FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0003] Existe uma escassez de tratamentos eficazes para pacientes com doença hepática. As doenças hepáticas são responsáveis por mais de 31.000 mortes anualmente nos Estados Unidos. O transplante ortotópico de fígado (OLT) é frequentemente o último recurso e atualmente apenas o tratamento curativo para doença grave (1, 2). Além disso, embora cerca de 100.000 pacientes precisem de um novo fígado, apenas pouco mais de 6.000 pacientes recebem

um transplante de fígado a cada ano. A falta de doadores disponíveis é um dos principais desafios enfrentados pelos pacientes afetados pelas doenças hepáticas em estágio terminal. Os pacientes com comorbidades e idade avançada não são considerados candidatos para OLT ou espera-se que tenham uma redução na sobrevida pós-transplante (3 - 5). Adicionalmente, os procedimentos para transplante são caros tanto financeiramente quanto em termos de recursos de cuidados de saúde. Por estas razões, o transplante com base em célula foi proposto como uma alternativa terapêutica para OLT, ou uma ponte, à medida que os pacientes aguardam por um órgão disponível (6).

[0004] Até o momento, o transplante de hepatócito demonstrou sua utilidade funcional em modelos animais. A partir da uroquinase transgênica (7 - 9) para o camundongo tirosinêmico induzido (10 - 15), o transplante de hepatócito estabeleceu com sucesso seu potencial terapêutico com regeneração completa do fígado. Apesar desses resultados encorajadores, o transplante de hepatócito humano está ainda na fase experimental de exploração clínica (6, 16) na esperança de que os resultados positivos de estudos animais possam ser traduzidos em utilidade terapêutica para doenças humanas.

[0005] Entretanto, para pacientes sofrendo de uma doença hepática terminal, existe um desafio adicional: a maioria das terapias celulares previstas são dirigidas ao enxerto celular no próprio fígado doente. As células hepáticas transplantadas são geralmente injetadas através do baço (por exemplo, através da artéria esplênica em pacientes humanos ou no parênquima esplênico em roedores)

ou através da veia porta. As células hepáticas rapidamente migram, ativa ou passivamente, para o fígado doente, onde espera-se ocorrer a regeneração hepática pelos hepatócitos transplantados. Essa abordagem limita, e possivelmente impossibilita, a eficácia de terapia celular em uma grande maioria de pacientes com doença hepática grave devido à presença de cirrose e fibrose (17), características patológicas comuns em fígados doentes. Em consequência, a regeneração de fígado nativo para estes pacientes - os pacientes que mais necessitam do tratamento - é um grande desafio.

[0006] Consequentemente, existe uma necessidade para novas terapias para pacientes com doença hepática avançada. Uma opção que tem sido explorada é a criação de um fígado auxiliar (18-20). Geralmente, isso consiste em implantar um enxerto de fígado saudável, colocado heterotópica ou ortotopicamente, deixando intacta a totalidade ou parte do fígado nativo. Essa abordagem não só tem o potencial de evitar a OLT para uma determinada categoria de pacientes, mas também abrange o potencial de regeneração espontânea do fígado nativo e a eventual retirada de fármacos imunossupressores (21-24). Embora tenham sido observados problemas nos estudos iniciais (18-20, 25-27), foram relatados desfechos favoráveis mais recentes e encorajadores em casos de insuficiência hepática aguda (25), distúrbio metabólico (28-31) e até mesmo cirrose hepática (26, 27). Até o momento, não há compreensão do mecanismo celular e molecular necessário para manter as células hepáticas e fígado auxiliar estáveis e viáveis a longo prazo.

[0007] Vários pesquisadores transplantaram hepatócitos em vários locais extra-hepáticos (37-40). O enxerto de hepatócitos na maioria dos locais extra-hepáticos tem sido associado a resultados variáveis. Foi anteriormente demonstrado que os hepatócitos, transplantados em gânglios linfáticos, geraram fígado auxiliar funcional (fígados auxiliares funcionais) capaz (capazes) de restaurar as funções hepáticas a longo prazo (mais de 6 meses) em camundongos (consultar, por exemplo, Patente dos Estados Unidos Nº 9.125.891). Esses resultados formaram a base para um novo paradigma de regeneração de tecido através do uso de locais linfáticos como biorreatores *in vivo* para o crescimento de tecidos ou substitutos de órgãos (32 - 36).

[0008] Além de doença hepática, a doença renal é prevalente na população e resulta em mais de 47.000 mortes anuais nos Estados Unidos. Os métodos terapêuticos conhecidos para o tratamento da doença renal incluem repouso, alterações na dieta, farmacoterapia, terapia de hemodiálise e transplante renal e dependem da gravidade da doença. Ao atingir a insuficiência renal, a terapia de diálise, como hemodiálise ou diálise peritoneal ou transplante renal é necessária. Embora a terapia de hemodiálise permita a eliminação de resíduos que se acumulam no corpo, a função renal danificada não se recupera. Nos casos de insuficiência renal, a menos que o paciente seja submetido a um transplante renal, o paciente terá que continuar a terapia de diálise durante sua vida. No entanto, existem muitas dificuldades associadas ao transplante renal, incluindo a falta de doadores,

dificuldades na compatibilidade dos tecidos e evitar a reação de rejeição. Por conseguinte, há necessidade de novas terapias para pacientes com função renal reduzida.

[0009] Gânglios linfáticos e Aglomerados linfoides associados à gordura ("FALCs", também denominados aqui como "manchas lácteas") são órgãos linfoides secundários do sistema linfático, e são bem vascularizados. FALCs ocorrem em vários locais anatômicos, incluindo o omento (consultar, Figura 1). Eles têm um papel importante no sistema imune, considerando expansão massiva dos glóbulos brancos durante várias condições tais como infecções bacterianas ou virais. Curiosamente, gânglios linfáticos e manchas lácteas também têm significância clínica em câncer, como eles são os locais de eventos metastáticos precoces, isto é, invasão tumoral e crescimento metastático inicial. A metástase tumoral em gânglios linfáticos é comumente usada para o estadiamento e prognóstico de câncer.

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0010] A presente divulgação refere-se ao enxerto e proliferação de células em aglomerados linfoides associados à gordura ("FALCs" ou "manchas lácteas"), que podem ser usados para gerar tecido ectópico funcional para transplante em um indivíduo hospedeiro. Baseia-se, pelo menos em parte, na descoberta que hepatócitos, intraperitonealmente transplantados em um camundongo com disfunção hepática, localizam e proliferam em FALCs (manchas lácteas) do omento, bem como em FALCs de gordura mesentérica, esplênica, portal e/ou gonadal para produzir tecido hepático ectópico capaz de aumentar beneficamente a

função hepática no camundongo. Também é com base, em parte, na descoberta que células renais fetais proliferam em FALCs do omento para produzir tecido renal ectópico. Baseia-se ainda, em parte, na descoberta que sinalização de LTβR em células estromais promove vascularização/angiogênese bem-sucedida das células enxertadas.

[0011] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece métodos e composições para estabelecer tecido hepático ectópico em FALCs (manchas lácteas) do omento, bem como em FALCs de gordura mesentérica, esplênica, portal e/ou gonadal e para usar tal tecido hepático ectópico para benefício terapêutico. Em certas modalidades, a presente divulgação ainda fornece métodos e composições para gerar tecido renal ectópico em FALCs, que podem ser usados em um indivíduo para benefício terapêutico.

[0012] Em certas modalidades, a presente divulgação ainda fornece métodos e composições para enxerto e proliferação de células, por exemplo, hepatócito ou células renais, em FALCs ou gânglios linfáticos ativando-se a via de sinalização de receptor beta de linfotoxina (LTβR) e/ou cinase induzida por NF-kB (NIK).

[0013] A presente divulgação fornece métodos para desenvolver tecido ectópico em um indivíduo. Em certas modalidades, o método inclui introduzir uma ou mais células em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo e fornecer um ou mais agentes que promovem a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para formar um tecido ectópico. Em certas modalidades, a uma ou mais células são hepatócitos e o

tecido ectópico é tecido hepático ectópico. Em certas modalidades, a uma ou mais células são células renais e/ou fragmentos do tecido renal e o tecido ectópico é tecido renal ectópico. Em certas modalidades, o aglomerado linfoide associado à gordura está localizado no tecido adiposo da cavidade pleural e/ou pericárdica e/ou peritoneal. Na cavidade peritoneal, o FALC pode ser localizado no omento e/ou gordura mesentérica e/ou esplênica e/ou portal e/ou gonadal do indivíduo.

[0014] Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido ectópico compreende uma ou mais das células derivadas da medula óssea e/ou células estromais. Em certa modalidade, a um ou mais agentes compreendem células estromais, por exemplo, células de fibroblasto. Em certas modalidades, as células estromais expressam uma ou mais de podoplanina, NIK e/ou LTβR. Em certas modalidades, as células estromais são tratadas com um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK.

[0015] Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido ectópico compreende um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK, por exemplo, um ativador de LTβR e/ou NIK. Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido ectópico compreende um ativador da via de sinalização NF-kB não canônica. Em certas modalidades, a ativação de LTβR e/ou NIK e/ou a ativação da via de sinalização NF-kB não canônica promove a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para formar o tecido ectópico.

[0016] Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido ectópico compreende um agente

que promove inflamação. Em certas modalidades, a inflamação é induzida antes de introduzir uma ou mais células em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo.

[0017] A presente divulgação ainda fornece métodos de tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada. Em certas modalidades, o método compreende administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de hepatócitos, e promover a proliferação de um hepatócito em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo para formar tecido hepático ectópico. Em certas modalidades, a formação de tecido hepático ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida pela administração dos hepatócitos localmente à região anatômica do aglomerado linfoide associado à gordura. Em certas modalidades, o aglomerado linfoide associado à gordura está localizado no omento e/ou gordura mesentérica e/ou esplênica e/ou portal e/ou gonadal.

[0018] Em certas modalidades, a formação de tecido hepático ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático é promovida pela coadministração de uma ou mais das células derivadas da medula óssea ou células estromais. Por exemplo, mas não por via de limitação, células estromais são coadministradas. Em certas modalidades, as células estromais são células de fibroblasto. Em certas modalidades, as células estromais expressam uma ou mais de podoplanina, NIK e/ou LTβR.

[0019] Em certas modalidades, a formação de tecido hepático ectópico no aglomerado linfoide associado à

gordura ou gânglio linfático é promovida pela coadministração de um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK. Em certas modalidades, a formação de tecido hepático ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático é promovida pela coadministração de um ativador da via de sinalização NF-kB não canônica.

[0020] Em certas modalidades, a formação de tecido hepático ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático é promovida induzindo-se inflamação no indivíduo. Em certas modalidades, inflamação é induzida pela administração de um agente que promove inflamação ao indivíduo. Em certas modalidades, a inflamação é induzida antes de introduzir uma ou mais células em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo.

[0021] A presente divulgação ainda fornece métodos para gerar um fígado ectópico, onde o método compreende introduzir, em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático, um ou mais hepatócitos, e fornecer pelo menos um agente que promove a formação de tecido hepático ectópico. Em certas modalidades, o método é praticado *in vivo* ou *in vitro*. Em certa modalidade, o agente que promove a formação de tecido hepático ectópico compreende uma ou mais das células derivadas da medula óssea e/ou células estromais. Em certas modalidades, as células estromais são células de fibroblasto. Em certas modalidades, as células estromais expressam uma ou mais de podoplanina, NIK e/ou LTβR. Em certas modalidades, as células estromais são tratadas com um ativador da via de

sinalização de LTβR e/ou NIK. Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido ectópico compreende um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK. Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido ectópico compreende um agente que promove inflamação.

[0022] Em certas modalidades, o método para gerar um tecido hepático ectópico em um indivíduo, compreende introduzir células compreendendo um ou mais hepatócitos e uma ou mais células estromais em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo e fornecer um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK, em que a ativação da via de sinalização de LTβR e/ou NIK na uma ou mais células estromais promove a proliferação e/ou vascularização do um ou mais hepatócitos para formar o tecido hepático ectópico.

[0023] Em certas modalidades, o método para gerar um tecido hepático ectópico em um indivíduo, compreende introduzir células compreendendo um ou mais hepatócitos e uma ou mais células estromais em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo e fornecendo um ativador de LTβR e/ou NIK, em que a ativação de LTβR e/ou NIK na uma ou mais células estromais promove a proliferação e/ou vascularização do um ou mais hepatócitos para formar o tecido hepático ectópico. Em certas modalidades, as células renais compreendem células isoladas a partir do rim embrionário, metanefro, células isoladas a partir de um organoide de rim formado *in vitro* ou qualquer combinação das mesmas.

[0024] A presente divulgação ainda fornece métodos de tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada. Em certas modalidades, o método compreende administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células renais (ou fragmentos do tecido renal), e promover a proliferação de uma célula renal em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo para formar tecido renal ectópico. Em certas modalidades, a formação de tecido renal ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida pela administração dos hepatócitos localmente à região anatômica do aglomerado linfoide associado à gordura. Em certas modalidades, o aglomerado linfoide associado à gordura está localizado no omento e/ou gordura mesentérica e/ou esplênica e/ou portal e/ou gonadal.

[0025] Em certas modalidades, a formação de tecido renal ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático é promovida pela coadministração de uma ou mais das células derivadas da medula óssea ou células estromais. Por exemplo, mas não por via de limitação, as células estromais são coadministradas. Em certas modalidades, as células estromais são células de fibroblasto. Em certas modalidades, as células estromais expressam uma ou mais de podoplanina, NIK e/ou LTβR.

[0026] Em certas modalidades, a formação de tecido renal ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático é promovida pela coadministração de um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK. Em certas modalidades, a formação de tecido renal ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura

ou gânglio linfático é promovida pela coadministração de um ativador da via de sinalização NF-kB não canônica.

[0027] Em certas modalidades, a formação de tecido renal ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático é promovida induzindo-se inflamação no indivíduo. Em certas modalidades, a inflamação é induzida pela administração de um agente que promove inflamação ao indivíduo. Em certas modalidades, a inflamação é induzida antes de introduzir a uma ou mais células renais em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo.

[0028] A presente divulgação ainda fornece métodos para gerar um rim ectópico, onde o método compreende introduzir, em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático, uma ou mais células renais (ou um ou mais fragmentos do tecido renal), e fornecer pelo menos um agente que promove a formação de tecido renal ectópico. Em certas modalidades, o método é praticado *in vivo* ou *in vitro*. Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido renal ectópico compreende uma ou mais das células derivadas da medula óssea e/ou células estromais. Em certas modalidades, as células estromais são células de fibroblasto. Em certas modalidades, as células estromais expressam uma ou mais de podoplanina, NIK e/ou LTβR. Em certas modalidades, as células estromais são tratadas com um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK. Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido renal ectópico compreende um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK. Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido renal ectópico

compreende um agente que promove inflamação.

[0029] Em certas modalidades, um método para gerar um tecido renal ectópico em um indivíduo, compreende introduzir células compreendendo uma ou mais células renais e uma ou mais células estromais em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo e fornecendo um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK, em que a ativação da via de sinalização de LTβR e/ou NIK na uma ou mais células estromais promove a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células renais para formar o tecido renal ectópico.

[0030] Em certas modalidades, um método para gerar um tecido renal ectópico em um indivíduo compreende introduzir células compreendendo uma ou mais células renais e uma ou mais células estromais em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo e fornecer um ativador de LTβR e/ou NIK, em que a ativação de LTβR e/ou NIK na uma ou mais células estromais promove a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células renais para formar o tecido renal ectópico.

[0031] A presente divulgação ainda fornece composições para gerar um tecido ectópico. Em certas modalidades, a composição compreende uma pluralidade de células e um ou mais dos agentes que promovem a formação de um tecido ectópico. Em certas modalidades, uma composição para gerar um tecido hepático ectópico compreende uma pluralidade de hepatócitos e um ou mais dos agentes que promovem a formação de um fígado ectópico. Em certas modalidades, uma composição para gerar um tecido renal ectópico compreende uma pluralidade de células renais e um

ou mais dos agentes que promovem a formação de um rim ectópico

[0032] Em certas modalidades, a um ou mais agentes que são incluídos em uma composição da matéria objeto presentemente divulgada compreende uma pluralidade de células derivadas da medula óssea e/ou uma pluralidade de células estromais. Em certas modalidades, as células estromais expressam uma ou mais de podoplanina, NIK e/ou LTβR. Em certas modalidades, a um ou mais agentes é um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK. Em certas modalidades, a um ou mais agentes é um agente que promove inflamação. Em certas modalidades, a um ou mais agentes compreende dois ou mais de: (a) pluralidade de células derivadas da medula óssea e/ou uma pluralidade de células estromais células estromais; (b) um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK; e (c) um agente que promove inflamação. Em certas modalidades, a composição compreendendo ainda um meio de cultura sintético.

[0033] Em certas modalidades, um método de tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada, compreende administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de hepatócitos, e fornecer um ou mais agentes que promovem a formação de um tecido hepático ectópico em um gânglio linfático do indivíduo, em que a um ou mais agentes compreendem dois ou mais de: (a) uma pluralidade de células derivadas da medula óssea, uma pluralidade de células estromais ou uma combinação das mesmas; (b) um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas; ou (c) um agente que

promove inflamação.

[0034] Em certas modalidades, a presente divulgação ainda fornece um método de tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada, onde o método compreende administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células renais, um fragmento de tecido renal, ou uma combinação das mesmas, e fornecer um ou mais agentes que promovem a formação de um tecido renal ectópico em um gânglio linfático do indivíduo, em que a um ou mais agentes compreendem dois ou mais de: (a) uma pluralidade de células derivadas da medula óssea, uma pluralidade de células estromais ou uma combinação das mesmas; (b) um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas; ou (c) um agente que promove inflamação.

[0035] A presente divulgação ainda fornece kits compreendendo uma ou mais composições divulgadas aqui.

4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0036] A Figura 1. Aglomerados linfoides associados à gordura; representação esquemática (painel superior), e distribuição (painel inferior).

[0037] As Figuras 2A a D: Geração de fígado ectópicos em tecidos linfoides secundários. (A) Imagem macroscópica de um camundongo $Fah^{-/-}$ de 12 semanas depois de transplante IP de hepatócitos. Círculos amarelos destacam os muitos nódulos hepáticos ectópicos gerados em tecidos linfoides (manchas lácteas e gânglios linfáticos (LN)). (B) Gânglio linfático mesentérico de porco de 2 meses depois de shunt porta cava, hepatectomia parcial e transplante de

hepatócito. Painéis esquerdos, bloco OTC e seção congelada deste bloco corado com CK18 para hepatócitos e PNAd para Vênula Endotelial Alta em LN. 51,5 % da massa LN foram identificados como hepatócitos CK18+. Painéis direitos, seções congeladas de fígado de controle e fígado ectópico corado com CK18 (hepatócitos) e ER-TR7 (Fibroblasto). H&E mostra microvascularização normal presente no fígado ectópico de porco (C) Painel superior, vista macroscópica de espaço peritoneal do camundongo mostrando o maior omento (O) cobrindo o estômago (S) e intestino (I), adjacente ao fígado (L) e acima dos pâncreas (não mostrado). Painel intermediário, omento de camundongo sob microscópio de dissecação mostrando vasculatura abundante. Painel inferior, representação de desenho do omento mostrando árvores vasculares alimentando as manchas lácteas. (D) Transplante IP de hepatócito GFP^{+}. Nódulos ectópicos foram gerados em manchas lácteas de camundongos $Fah^{-/-}$ de 12 semanas depois de hepatócitos enxertados.

[0038] A Figura 3. Camundongos $Fah^{-/-}$ de 3 a 4 semanas depois de transplante IP de hepatócitos; dilatação de espaço capilar e surgimento de vasos sanguíneos em manchas lácteas.

[0039] A Figura 4. Manchas lácteas omentais em um camundongo.

[0040] A Figura 5. Enxerto de hepatócitos transplantados em manchas lácteas omentais. Os hepatócitos são marcados com GFP e apresentam-se como áreas brilhantes de fluorescência verde. ER-TR7 é um antígeno encontrado na matriz extracelular de tecidos linfoides, azul fluorescente nesta imagem (indicado pelas setas).

[0041] A Figura 6. Manchas lácteas omentais estão ausentes em camundongos FRGN ($Fah^{-/-}Rag2/\gamma c^{-/-}Nod$). Coloração imunofluorescente de tipo selvagem (esquerda) e omento de FRGN, manchas lácteas ("MS") marcadas.

[0042] A Figura 7. Enxerto de hepatócitos em omento de camundongos FRGN.

[0043] A Figura 8. Hepatócitos enxertados no omento não são observados crescer em camundongos FRGN ao longo de um período de 12 semanas.

[0044] A Figura 9. Manchas lácteas são restauradas no omento de camundongos FRGN por transplante de medula óssea.

[0045] A Figura 10. Manchas lácteas são restauradas no omento de camundongos FRGN por transplante de medula óssea. Note a seta em painel direito mostrando hepatócitos enxertados em mancha láctea.

[0046] A Figura 11. Formação de fígado ectópico em camundongos FRGN depois de transplante de medula óssea.

[0047] A Figura 12. Formação de fígado ectópico em camundongos FRGN depois de transplante de medula óssea. Painel esquerdo mostra o resultado sem transplante de medula óssea - agregação de hepatócito mas nenhuma formação de fígado ectópico é observada. Painel direito mostra o resultado com transplante de medula óssea, geração de um fígado ectópico.

[0048] A Figura 13. Interação de células estromais/indutor de tecido linfoide (esquerda) e via de sinal de NIK (direita).

[0049] A Figura 14. Esquema de estudos para

testar o impacto de função de NIK no resgate de função hepática por injeção intraperitoneal (IP) versus esplênica (SP) em camundongos $Fah^{-/-}$ deficiente em NIK (aly/aly) e controle. Curvas de sobrevida de Kaplan Meier de camundongos Fah $^{-/-}$ e camundongos aly/aly $Fah^{-/-}$ transplantados com 106 hepatócitos por injeção esplênica (SP) (esquerda) ou injeção IP (direita).

[0050] A Figura 15. Função de NIK é necessária para resgatar o camundongo $Fah^{-/-}$ por injeção IP. 10^6 hepatócito GFP+s foram inoculados por injeção IP em camundongos $Fah^{-/-}$ e nos camundongos $Fah^{-/-}$ de alinfoplasia ($Fah^{-/-}$ aly/aly) respectivamente. Montagem total de imagens de manchas lácteas omentais em vários pontos no tempo. São mostradas as imagens de campo claro mescladas com a fluorescência dos hepatócitos doadores (verde). Painéis superiores, camundongo $Fah^{-/-}$; painéis inferiores, aly/aly camundongo $Fah^{-/-}$.

[0051] A Figura 16. Representação esquemática do desfecho observado depois de transplante de hepatócito de IP.

[0052] As Figuras 17A a D. (a) Distribuição de podoplanina (PDPLN) e CD31 em células reticulares fibroblásticas (“FRC”), células endoteliais linfáticas (LEC), e células endoteliais cerebrais (BEC), e análise citométrica de fluxo destes marcadores em gânglios linfáticos em comparação com manchas lácteas. (B) Hepatócitos se estabelecem por si só nas proximidades às células estromais ER-TR7 em manchas lácteas. (C) Células estromais isoladas, transplantadas IP, migrarão de volta para manchas lácteas omentais. (D) Mancha láctea com

hepatócitos transplantados.

[0053] A Figura 18. Estudos imunofluorescentes que demonstram que hepatócitos são linfotoxina alfa e beta positivas e células estromais são NIK e receptor beta de linfotoxina positivo.

[0054] A Figura 19. Hepatócitos do tipo selvagem GFP^{+} (Proteína Fluorescente Verde) transplantados intraperitonealmente em camundongos $Fah^{-/-}$ ou $Fah/LTbR^{-/-}$ após 2, 4 e 6 semanas. As imagens mostram o enxerto no omento desses animais.

[0055] As Figuras 20A a G. (a) Na parte superior, da esquerda para a direita, imagens de rim fetal humano, LNs jejunais após transplante de fragmento renal e LNs de 3 semanas após o transplante. Intermediária esquerda, seção corada com H & E do rim fetal de doador humano embebido em parafina. Intermediária direita, seção congelada de hematoxilina de LN de 3 semanas após o transplante renal. A região delimitada pela linha tracejada laranja indica a área do LN não enxertada. Na parte inferior, as inserções mostram um glomérulo não maduro (à esquerda) ou maduro (à direita). (B) Imunofluorescência representativa de seções de enxerto de 3 semanas para NCAM, WT-1, PDPLN, α-SMA, Megalina, AQ1, LTL, NKCC2, BRN1/DBA, LTL/DBA, K8/AQ2 ou EPO. (C) Reconstrução 3D representativa de um enxerto de 8 semanas. Esquerda, imagem de glomérulos e túbulos enxertados dentro do LN. Direita, imagem apenas com glomérulos e túbulos. (D) Acumulação de Texas Red Dextran de 10.000 kDa MW em enxertos de 11 semanas de camundongo. (E) Colorações de imunofluorescência representativas de seções de enxerto de 1, 3 e 8 semanas

para CD31 de camundongo e humano. (F) Colorações de imunofluorescência esquerda e representativa para NCAM, SIX2, WT-1 ou E-CADH em um organoide NP de camundongo antes do transplante. Cotas de imunofluorescência direita, representativas para PDPLN/CD31, PDPLN/CD105, ou PDPLN/Ly-76, mostrando estruturas semelhantes a glomérulos vascularizados em LN de 8 semanas após o transplante de organoides NP. (G) Colorações de imunofluorescência de montagem total esquerda e representativa de organoides renais derivados de iPSC para DBA/BRN1 e E-CADH/LTL. Parte inferior, seções em série mostrando duas estruturas semelhantes a néfrons distintas, cada uma compreendida por uma estrutura semelhante à glomerular contendo podócitos presuntivos (PDPLN, SYNPO, PODXL), células mesangiais (CIV) e células endoteliais (CD31), adjacentes à LTL/Megalina reativa túbulos semelhantes a proximal, 6 semanas após o transplante de organoide para o LN. Os núcleos foram contrastados usando Hoechst (azul).

[0056] A Figura 21. Representação esquemática das vias de sinalização de NF-kB canônicas e não canônicas.

[0057] As Figuras 22A a G. (a) Esquerda, Esquerda, visão esquemática do plano experimental. Camundongos foram injetados IP com 100 µg LTβR-Fc ou controle Ig dois dias antes de receber o transplante de fragmentos de rim embrionário GFP+ em seus LNs (Dia 1). Os camundongos foram tratados novamente no Dia 8 e 15. LNs foram coletados no Dia 22. Direita, LNs completos contendo rim de montagem isolados de camundongos tratados ou não tratados. (B) Colorações de imunofluorescência representativa de seções seriadas de enxertos renais como

em A para PDPLN, LTL, CD31, CD105, Ly-76. (C) Perfis de citometria de fluxo de células reticulares de fibroblastos (FRCs), células endoteliais linfáticas (LECs) e células endoteliais do sangue (BECs) em LN ou população de células estromais omentais (CD45-). (D) Coloração imunofluorescente representativa para PDPLN e LTβR de células estromais omentais. (E) Montagem total de omento contendo rim dos camundongos tipo selvagem ou $LT\beta R^{-/-}$ depois de transplante de rins embrionários GFP^{+}, 6 semanas após o transplante (fusão de fluorescência/imagens de campo claro à esquerda e dissecção de imagens de osciloscópio à direita). Neo-rins são mostrados em comparação com um rim de camundongo adulto. (F) Imunofluorescência representativa para CD31, CD105 e Ly-76 em seções seriadas de enxertos renais intraomental como em E. (G) Imunofluorescência representativa para ERTR-7, LTα, LTβ, LTβR, NIK, NIK/CD34 em seções de enxertos embrionários de enxertos de GFP^{+} (esquerda e média) ou de tipo selvagem (direita). Os núcleos foram contrastados usando Hoechst (azul).

[0058] A Figura 23. A inflamação peritoneal induz mudanças dramáticas no omento. Painel superior. Vista esquemática do experimento. O Zimosan é injetado intraperitonealmente (IP) no dia 0. Três dias depois, 1 milhão de hepatócitos são injetados IP. 7 dias após a injeção de hepatócitos, as amostras são recolhidas. Painel inferior esquerdo. Visão macroscópica do omento de um animal zimosan induzido e controle. Abaixe o painel direito. Aumento dramático no peso do omento após a inflamação induzida por Zimosan quando comparado ao controle.

[0059] A Figura 24. FALCs e crescimento hepático. Omento e gordura mesentérica de camundongos C57bl/6 após zimosan ou injeção de PBS uma semana após o transplante de hepatócitos GFP^+. A inflamação do zimosan induziu número e tamanho de FALCs que permitiram um aumento dramático no enxerto de hepatócitos GFP^+. Omento e gordura mesentérica foram comparados e os hepatócitos GFP^+ identificados sob o microscópio de fluorescência.

[0060] A Figura 25. A inflamação peritoneal aumenta a sobrevida de camundongos tirosinêmicos após o transplante de hepatócitos. Camundongos $Fah^{-/-}$ C57bl/6 com ou sem inflamação prévia induzida foram transplantados IP com hepatócitos do tipo selvagem, seguido por duas seleções (desligado NTBC). Os animais sem inflamação (painel da esquerda) continuaram a perder peso após a segunda seleção, o Animal H146 e o H148 morreram por volta das 8 semanas após o transplante. O animal com inflamação induzida prévia (painel direito) aumentou o peso durante a segunda seleção, indicando um resgate da doença hepática com restauração da massa funcional do fígado.

[0061] A Figura 26. A inflamação peritoneal aumenta a massa hepática presente em gordura contendo FALC. Uma visão macroscópica da gordura peritoneal contendo tecidos hepáticos de camundongos $Fah^{-/-}$ C57bl/6 sem (H146) e com (H150) inflamação prévia induzida. A inflamação é favorável ao crescimento hepático ectópico nas FALCs.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0062] Para clareza e não por via de limitação, a descrição detalhada da matéria objeto presentemente divulgada é dividida nas seguintes subseções:

(i) Definições;

(ii) Métodos de Tratamento;

a) Tratamento de Doenças e Transtornos Hepáticos;

b) Tratamento de Doenças e Transtornos Renais; e

(iii) Composições.

DEFINIÇÕES

[0063] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados neste pedido têm o significado como geralmente entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica.

[0064] Como usado aqui, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa dentro de um intervalo de erro aceitável para o valor particular como determinado por uma pessoa de habilidade comum na técnica, que dependerá em parte em como o valor é medido ou determinado, isto é, as limitações do sistema de medição. Por exemplo, "cerca de" pode significar dentro de 3 ou mais do que 3 desvios padrão, de acordo com a prática na técnica. Alternativamente, "cerca de" pode significar uma faixa de até 20 %, preferencialmente até 10 %, mais preferencialmente até 5 %, e mais preferencialmente ainda até 1 % de um dado valor. Alternativamente, particularmente em relação aos sistemas ou processos biológicos, o termo pode significar dentro de uma ordem de magnitude, preferencialmente dentro de 5 vezes, e mais preferencialmente dentro de 2 vezes, de um valor.

[0065] Os aglomerados linfoides associados à gordura ("FALCs", alternativamente denominados como "manchas lácteas" aqui), como usados aqui, são estruturas

do sistema linfoide que não são gânglios linfáticos. FALCs estão presentes em vários locais anatômicos, incluindo mas não limitados ao mesentério, o mediastino, o pericárdio e tecido subcutâneo (consultar, Figura 1). FALCs são localizados no tecido adiposo da cavidade pleural, pericardial e peritoneal. Na cavidade peritoneal, o FALC está localizado no omento e gordura mesentérica, esplênica, portal e gonadal do indivíduo. Em certas modalidades não limitantes, os FALCs usados para crescimento do tecido ectópico, por exemplo, crescimento do tecido hepático ou renal, está localizado no omento. Em certas modalidades não limitantes, os FALCs são localizados no mediastino ou pericárdio.

[0066] "Gânglio linfático" ou "LN", como usado aqui, refere-se a qualquer gânglio linfático por exemplo, mas não limitado a, gânglios linfáticos abdominais, gânglios linfáticos celíacos, gânglios linfáticos paraaórticos, gânglios linfáticos hilares esplênicos, gânglios linfáticos porta hepáticos, gânglios linfáticos gástricos (esquerda e direita), gastroomental (gastroepiplóico) gânglios linfáticos (esquerda e direita), gânglios linfáticos retroperitoneais, gânglios linfáticos pilóricos (suprapilóricos, subpilóricos, retropilóricos), gânglios linfáticos pancreáticos (gânglios linfáticos pancreáticos superiores, pancreáticos inferiores, lineais esplênicos), gânglios linfáticos hepáticos (forame cístico inclusivo de Winslow), gânglios linfáticos pancreaticoduodenais (pancreaticoduodenais superiores, pancreaticodoudenais inferiores), gânglios linfáticos mesentéricos superiores, gânglios linfáticos ileocólicos,

gânglios linfáticos pré-cecais, gânglios linfáticos retrocecais, linfa apendicular gânglios linfáticos mesocólicos (paracólico, cólica esquerda, cólica média, cólica direita, gânglios linfáticos mesentéricos inferiores, sigmoide, retal superior), gânglios linfáticos ilíacos comuns (ilíaco comum medial, ilíaco comum intermediário, ilíaco comum lateral, ilíaco comum subaórtico, comum Gânglios linfáticos ilíacos externos (ilíaco externo medial, ilíaco externo intermediário, ilíaco externo lateral, lacunar medial, lacunar intermediário-femoral intermediário, lacunar-femoral lateral, ilíaco externo intercilíaco, obturador-obturador ilíaco externo), gânglios linfáticos jejunais, poplíteos e axilares.

[0067] As células de um órgão podem ser constituídas por um ou vários tipos de células. Em certas modalidades, as células são compostas por uma pluralidade de tipos de células encontrados no órgão de origem, mas não necessariamente compreendem todos os tipos de células encontrados nesse órgão. Como um exemplo não limitativo, as "células hepáticas" para enxerto de acordo com a presente divulgação compreendem hepatócitos e podem ainda compreender uma ou mais células biliares, células endoteliais, células estaminais e células progenitoras do fígado. Como outro exemplo não limitativo, "células renais" para enxerto de acordo com a presente divulgação compreendem células parenquimatosas renais e podem ainda compreender uma ou mais células glomerulares, células endoteliais, células estaminais e progenitoras do rim. Em certas modalidades, as células são dissociadas antes da

introdução para o enxerto. Em certas modalidades, as células são compreendidas em um agregado antes de introdução. Em certas modalidades, as células são constituídas por organoides expandidos *in vitro*. Em certas modalidades, as células são constituídas por iPS ou outras células estaminais expandidas *in vitro*. Em certas modalidades, as células estão compreendidas em um fragmento de tecido obtido a partir de um órgão intacto, mas o referido fragmento não constitui mais do que cerca de 5% ou não mais do que cerca de 10% ou não mais do que cerca de 25% ou não mais do que cerca de 50 % do órgão.

[0068] "Ativador" como usado aqui, refere-se a um composto ou molécula (por exemplo, molécula pequena, peptídeo, peptidomimético, composto natural ou anticorpo) que ativa (por exemplo, aumenta, promove ou aumenta) a atividade, função, expressão e/ou geração de uma proteína ou via. Um ativador pode ser qualquer composto ou molécula que promova qualquer atividade de uma proteína denominada (molécula, qualquer molécula envolvida com a molécula nomeada ou uma molécula denominada associada), como LTβR ou NIK, ou promova a interação de uma proteína nomeada, por exemplo, LTβR ou NIK, com parceiros de sinalização ou parceiros de ligação. Os ativadores podem também incluir moléculas que regulam indiretamente a atividade biológica de uma proteína nomeada, por exemplo, LTβR ou NIK, interceptando moléculas de sinalização a montante. Em certas modalidades, o ativador pode incluir moléculas que promovem, aumentam e/ou melhoram a geração e/ou produção de uma proteína denominada como LTβR ou NIK, por exemplo, aumentando a atividade e/ou função das enzimas que geram

e/ou produzir LTβR ou NIK.

[0069] Como usado aqui, "tratamento" (e suas variações gramaticais como "tratar" ou "tratando") refere-se à intervenção clínica em uma tentativa de alterar o curso natural do indivíduo a ser tratado, e pode ser realizada tanto para profilaxia quanto durante o curso de tratamento de patologia clínica. Os efeitos desejáveis do tratamento incluem, mas não se limitam a prevenir a ocorrência ou recorrência da doença, alívio dos sintomas, diminuição de quaisquer consequências patológicas diretas ou indiretas da doença, diminuição da taxa de progressão da doença, melhoria ou paliação do estado da doença e remissão ou melhor prognóstico. Em certas modalidades, "tratamento" pode referir-se a uma diminuição na gravidade de complicações, sintomas e/ou deterioração. Por exemplo, mas não como limitação, a redução pode ser de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % diminuição na gravidade das complicações, sintomas e/ou deterioração, por exemplo em relação a um indivíduo de controle comparável que não recebe o tratamento. Em certas modalidades, "tratamento" pode também significar prolongar a sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada se o tratamento não for recebido.

[0070] Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "quantidade eficaz" como usado aqui, refere-se a uma quantidade que é capaz de alcançar um ou mais dos seguintes: alívio de sintomas, diminuição da taxa de progressão da doença, prolongamento de sobrevivência, melhoria ou paliação de estado da doença e/ou prognóstico melhorado.

[0071] Um “indivíduo” ou “individual”, como usado permutavelmente aqui, pode se referir a um indivíduo humano ou não humano. Exemplos não limitativos de indivíduos não humanos incluem primatas não humanos, cães, gatos, cavalos, ratinhos, ratos, hamsters, coelhos, suínos, etc.

[0072] O termo ou frase "transplante", "substituição de células" ou "enxerto", como aqui utilizado indistintamente, refere-se à introdução de células em um tecido alvo, por exemplo, FALC ou tecidos que contêm FALCs.

[0073] “Em combinação com”, como usado aqui, pode significar que uma ou mais células a serem enxertadas ou uma composição das mesmas, e um agente, por exemplo, um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK, são administrados a um indivíduo como parte de um regime ou plano de tratamento. Em certas modalidades, sendo usado em combinação não requer que a uma ou mais células e a um ou mais agentes sejam fisicamente combinados antes da administração ou que eles sejam administrados durante o mesmo período de tempo. Por exemplo, mas não por via de limitação, a uma ou mais células a serem enxertadas e a um ou mais agentes podem ser administrados simultaneamente ao indivíduo sendo tratado, ou pode ser administrado ao mesmo tempo ou sequencialmente em qualquer ordem ou em diferentes pontos no tempo. Em certas modalidades, os métodos da presente divulgação podem incluir a administração de um ou mais agentes antes da administração da uma ou mais células a serem enxertadas, por exemplo, hepatócitos ou células renais.

5.2 MÉTODOS DE TRATAMENTO

[0074] Em certas modalidades, a presente divulgação refere-se ao enxerto e proliferação de células em aglomerados linfoides associados à gordura ("FALCs" ou "manchas lácteas") para desenvolver tecido ectópico.

[0075] A presente divulgação fornece métodos de gerar tecido ectópico em ou em torno de um FALC. Em certas modalidades, o método para gerar tecido ectópico pode compreender introduzir uma célula, por exemplo, um hepatócito ou uma célula renal, em um FALC de um indivíduo para formar um tecido ectópico, por exemplo, um tecido hepático ectópico ou um tecido renal ectópico. Em certas modalidades, os métodos para gerar um tecido ectópico podem compreender introduzir uma célula em um gânglio linfático do indivíduo. Em certas modalidades, os métodos da presente divulgação podem ser usados para tratar uma condição médica e/ou transtorno (por exemplo, patologia, doença, síndrome) que pode beneficiar a partir da geração do tecido ectópico. Por exemplo, mas não por via de limitação, o indivíduo pode estar sofrendo a partir de uma doença ou transtorno tal como, mas não limitado a, doença hepática e/ou falha ou doença renal e/ou falha.

[0076] Em certas modalidades, o indivíduo pode ser humano ou não humano. Exemplos não limitantes de não humanos incluem primatas não humanos, cães, gatos, cavalos, camundongos, ratos, hamsters, coelhos, suínos, etc. Em certas modalidades, o indivíduo é humano.

[0077] Em certas modalidades, as células a serem enxertadas nos FALCs de um indivíduo podem ser células humanas, células não humanas ou ambas. Em certas

modalidades, as células são células humanas. Em certas modalidades, as células humanas podem ser enxertadas nos FALCs, ou uma região que contém FALCs, de um indivíduo não humano, por exemplo, camundongo.

[0078] As células para enxerto podem ser obtidas a partir do indivíduo que está submetido ao enxerto. Em certas modalidades, as células podem ser obtidas a partir de um fonte diferente ao indivíduo que é submetido ao enxerto. Em certas modalidades, as células podem ser obtidas a partir de populações de células frescas ou congeladas. Em certas modalidades, as células podem ser isoladas a parti de tecido e cultivado *in vitro* sob várias condições de cultura antes do transplante. Em certas modalidades, as células podem ser obtidas a partir de tecido embrionário, fetal, pediátrico ou adulto. Em certas modalidades, as células podem ser células progenitoras ou precursoras. Em certas modalidades, as células progenitoras ou precursoras podem ser diferenciadas no tipo de célula a ser transplantada.

[0079] As células para o uso de acordo com a presente divulgação podem ser preparadas por quaisquer meios conhecidos na técnica. Em certas modalidades, soluções da célula, por exemplo, composições divulgadas aqui, são usadas para injeção. Exemplos não limitantes de composições para o uso nos métodos divulgados são descritos em Seção 5,3 abaixo. Em certas modalidades, as células podem ser preparadas de acordo com o método de Li *et al*. J Tissue Culture Methods 14:139-146 (1992). Brevemente, o isolamento envolve perfusão de colagenase de uma amostra de tamanho limitado (<50 g) com apenas uma superfície de

corte. Em certas modalidades, populações de célula especificamente enriquecidas podem ser usadas tal como as divulgadas em Pat. U.S. Nº 7.211.404.

[0080] As células podem ser administradas ao indivíduo por qualquer método conhecido na técnica. Em certas modalidades, as células podem ser injetadas, incluindo mas não limitadas a, injeção intraperitoneal, intravenosa ou intra-arterial ou por instilação local. Em certas modalidades, as células podem ser cirurgicamente enxertadas, por exemplo, por técnicas cirúrgicas convencionais ou endoscópicas. Em certas modalidades, as células podem ser localmente administradas. Por exemplo, mas não por via de limitação, as células podem ser introduzidas na proximidade de um local anatômico que contém FALCs, tal como, mas não limitado a, as gônadas, o omento, o mesentério, o mediastino, o pericárdio e o tecido subcutâneo. Em certas modalidades, a região anatômica é o omento. Em certas modalidades, por exemplo, hepatócitos ou células renais (ou fragmentos de tecido renal), podem ser introduzidos em proximidade do omento (e FALCs residindo), por exemplo, por injeção intraperitoneal direcionada ou por técnicas cirúrgicas convencionais ou endoscópicas. Em certas modalidades, as células a serem enxertadas podem ser inicialmente expandidas em cultura antes da introdução em um FALC ou gânglio linfático *in vivo*.

[0081] Em certas modalidades, as células podem ser colocadas em suspensão em qualquer tampão apropriado por injeção. Exemplos não limitantes de tais tampões incluem solução salina, solução salina tamponada com fosfato, sal de Hank e solução de Ringer, entre outros.

[0082] Em certas modalidades, o método para gerar um tecido ectópico em ou em torno de um FALC ou gânglio linfático pode ainda compreender fornecer um agente que promove a formação do tecido ectópico. Por exemplo, mas não por via de limitação, os métodos podem incluir administrar uma ou mais células a serem enxertadas em combinação com um ou mais agentes que promovem a formação do tecido ectópico. Em certas modalidades, a um ou mais agentes podem ser incluídos na composição que inclui a uma ou mais células a serem enxertadas. Alternativa e/ou adicionalmente, a um ou mais agentes podem ser administrados antes, depois ou simultaneamente com o enxerto da uma ou mais células. Em certas modalidades, o agente promove a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para formar o tecido ectópico. Os métodos análogos podem ser usados para gerar um tecido ectópico em um gânglio linfático.

[0083] Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido ectópico pode ser um tipo de célula diferente daquele das células, por exemplo, células renais ou hepatócitos, que formam o tecido ectópico. Em certas modalidades, o agente inclui uma ou mais das células derivadas da medula óssea e/ou células estromais. Em certas modalidades, o agente inclui células estromais, por exemplo, fibroblastos, células reticulares fibroblásticas (FRCs), células dendríticas foliculares (FDCs), células endoteliais linfáticas (LECs), células endoteliais do sangue (BECs), pericitos alfa-7 integrinas (AIPs) e células duplamente negativas (DNCs). Em certas modalidades, os fibroblastos podem ser fibroblastos de prepúcio humano,

fibroblastos embrionários humanos, fibroblastos embrionários de ratinho, células de fibroblastos de pele, células de fibroblastos vasculares, miofibroblastos, células de músculo liso, células de fibroblastos derivados de células estaminais mesenquimais (MSCs) ou uma combinação dos mesmos. Por exemplo, mas não por via de limitação, um método para gerar tecido ectópico pode compreender (a) introduzir uma ou mais células, por exemplo, hepatócitos ou células renais, em um FALC (ou uma região anatômica contendo o FALC) ou gânglio linfático (ou uma região anatômica contendo o gânglio linfático) de um indivíduo para formar um tecido ectópico, por exemplo, um tecido hepático ectópico ou um tecido renal ectópico, e (b) introduzir uma ou mais células derivadas da medula óssea e/ou células estromais para promover a formação de tecido ectópico, por exemplo, promovendo-se a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para formar o tecido ectópico. Em certas modalidades, a uma ou mais células a serem enxertadas e a uma ou mais células derivadas da medula óssea e/ou células estromais podem ser incluídas na mesma composição.

[0084] Em certas modalidades não limitantes, as células estromais, por exemplo, células estromais endoteliais ou fibroblastos, que promovem a formação de tecido ectópico pode expressar níveis dectáveis de uma ou mais de podoplanina, receptor beta de linfotoxina ("LTβR"), NIK ou uma combinação das mesmas. Alternativa e/ou adicionalmente, as células estromais podem ser tratadas com um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK, por exemplo, um ativador de LTβR ou NIK ou alvos a jusante das

mesmas, antes, durante ou depois da administração ao indivíduo. Em certas modalidades, células estromais, por exemplo, células estromais endoteliais ou fibroblastos, podem ser tratadas com um ativador de NIK. Em certas modalidades, as células estromais podem ser geneticamente modificadas para expressar exogenicamente LTβR e/ou NIK e/ou sobre-expressar LTβR e/ou NIK.

[0085] Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido ectópico, por exemplo, promovendo-se a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para formar o tecido ectópico, pode ser um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK. Por exemplo, mas não por via de limitação, o método de gerar tecido ectópico em ou em torno de um FALC ou gânglio linfático pode compreender introduzir uma célula, por exemplo, um hepatócito ou uma célula renal em um FALC (ou uma região anatômica contendo o FALC) ou gânglio linfático de um indivíduo e fornecer pelo menos um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK, em que a ativação de LTβR e/ou NIK ou alvos a jusante do mesmo promove a formação do tecido ectópico, por exemplo, um tecido hepático ectópico ou um tecido renal ectópico. Em certas modalidades, o ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK é um ativador de LTβR e/ou NIK ou um ativador da via de sinalização NF-kB não canônica. Em certas modalidades, a uma ou mais células a serem enxertadas e o ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK pode ser incluído na mesma composição. Alternativamente, o ativador pode ser administrado antes, durante ou depois da introdução da uma ou mais células a serem enxertadas no indivíduo.

[0086] Em certas modalidades, o ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK pode aumentar a expressão de LTβR ou NIK em uma célula, por exemplo, uma célula estromal ou célula endotelial estromal, presente no indivíduo que é submetida ao enxerto. Por exemplo, mas não por via de limitação, o ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK ativa a via de sinalização em células estromais presentes no FALC do indivíduo.

[0087] Alternativa e/ou adicionalmente, as células a serem enxertadas pode ser uma população de célula heterogênea, por exemplo, uma composição compreendendo uma população de célula heterogênea, que inclui células estromais ou células estromais endoteliais, e o ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK pode aumentar a expressão de LTβR ou NIK nas células estromais ou células estromais endoteliais presentes na composição a ser enxertada. Por exemplo, mas não por via de limitação, um método para gerar tecido ectópico pode compreender (a) introduzir uma ou mais células, por exemplo, hepatócitos ou células renais, em um FALC ou gânglio linfático de um indivíduo para formar um tecido ectópico, por exemplo, um tecido hepático ectópico ou um tecido renal ectópico, (b) introduzir uma ou mais células derivadas da medula óssea e/ou células estromais para promover a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para formar o tecido ectópico e (c) administrar um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK. Em certas modalidades, o ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK está presente na composição que inclui a uma ou mais células a serem enxertadas e a uma ou mais células derivadas da

medula óssea e/ou células estromais ou o ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK está presente na composição que inclui a uma ou mais células derivadas da medula óssea e/ou células estromais.

[0088] Em certas modalidades, o ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK pode ser um ativador de LTβR ou um alvo a jusante de LTβR. Em certas modalidades, o ativador pode ser um ativador de NIK ou um alvo a jusante de NIK, por exemplo, um ativador da via de sinalização NF-kB não canônica. Em certas modalidades, o ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK pode ser um anticorpo agonista (ou fragmento de anticorpo do mesmo) ou anticorpo de cadeia única que especificamente se liga ao LTβR ou NIK. Exemplos não limitantes de anticorpos agonistas anti-LTβR incluem o anticorpo monoclonal produzido por Adipogen Life Sciences, catálogo número AG-20B-0008, o anticorpo agonista anti-LTβR CBE11 (consultar, por exemplo, Lukashev et al., Cancer Res. 66(19):9617-9624 (2006)), o anticorpo agonista anti-LTβR BS-1 (consultar, por exemplo, Hu et al., Carcinogenesis 34(5):1105-1114 (2013)) e o anticorpo agonista anti-LTβR 4H8 (consultar, por exemplo, Scarzello et al., Gut 65:1765-1775 (2016)). Exemplos não limitantes adicionais de anticorpos agonistas anti-LTβR são divulgados em Publicação de Patente U.S. N° 2002/0090366, o conteúdo do qual é divulgado aqui em sua totalidade. Em certas modalidades, o ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK pode ser uma molécula pequena que aumenta a função e/ou atividade de LTβR ou NIK ou um alvo a jusante do mesmo.

[0089] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece um método para gerar um tecido ectópico

em um indivíduo compreendendo introduzir uma ou mais células em um FALC ou gânglio linfático do indivíduo e fornecendo um ativador de LTβR e/ou NIK, em que a ativação de LTβR e/ou NIK promove a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para gerar o tecido ectópico. Em certas modalidades, a uma ou mais células compreendem um hepatócito e o tecido ectópico compreende um tecido hepático ectópico. Em certas modalidades, a uma ou mais células compreendem uma célula renal e o tecido ectópico compreende um tecido renal ectópico. Em certas modalidades, a uma ou mais células ainda compreende uma ou mais células estromais e o ativador de LTβR e/ou NIK resulta em ativação da via de sinalização de LTβR e/ou NIK nas células estromais.

[0090] Em certas modalidades, o agente que promove a formação de tecido ectópico pode ser um agente que promove inflamação no indivíduo. Por exemplo, mas não por via de limitação, o método para gerar um tecido ectópico em ou em torno de um FALC ou gânglio linfático ainda pode incluir induzir inflamação no indivíduo, por exemplo, pela administração de um agente que promove inflamação no indivíduo. Exemplos não limitantes de tais agentes incluem citocinas, vasodilatadores, histamina, serotonina, bradicinina e zimosan. Exemplos não limitantes de citocinas incluem IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24, IL-27, IFN-alfa, IFN-alfa, IFN-beta, ou IFN-gama, TNF-alfa e TNF-beta, TGF-alfa e TGF-beta, Linfotoxina-alfa e Linfotoxina-beta. Exemplos não limitantes de quimiocinas incluem CCL18, CCL19, CCL21,

CXCL8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 CCL7, CXCL12 e CXCL13. Em certas modalidades, o agente compreende um composto e/ou molécula que ativa o sistema de complemento. Em certas modalidades, o agente compreende zimosan. Em certas modalidades, o agente é administrado em e/ou em torno dos FALCs que foram ou devem ser enxertados com as células. Em certas modalidades, a inflamação é induzida localmente, por exemplo, em ou em torno da região anatômica que contém FALCs ou o gânglio linfático onde as células foram ou devem ser transplantadas. Alternativa e/ou adicionalmente, a inflamação é induzida sistemicamente.

[0091] Em certas modalidades, a inflamação é temporária. Por exemplo, mas não por via de limitação, a inflamação dura não mais do que cerca de 10 semanas, não mais do que cerca de 9 semanas, não mais do que cerca de 8 semanas, não mais do que cerca de 7 semanas, não mais do que cerca de 6 semanas, não mais do que cerca de 5 semanas, não mais do que cerca de 4 semanas, não mais do que cerca de 3 semanas, não mais do que cerca de 2 semanas, não mais do que cerca de 1 semana, não mais do que cerca de 6 dias, não mais do que cerca de 5 dias, não mais do que cerca de 4 dias ou não mais do que cerca de 3 dias.

[0092] Em certas modalidades, a inflamação é induzida antes da introdução da uma ou mais células a serem enxertadas. Por exemplo, mas não por via de limitação, a inflamação é induzida pelo menos 2 horas antes de, pelo menos 4 horas antes de, pelo menos 6 horas antes de, pelo menos 8 horas antes de, pelo menos 10 horas antes de, pelo menos 12 horas antes de, pelo menos 14 horas antes de, pelo menos 16 horas antes de, pelo menos 18 horas antes de, pelo

menos 20 horas antes de, pelo menos 22 horas antes de, 1 dia antes de, pelo menos 2 dias antes, pelo menos 3 dias antes, pelo menos 4 dias antes, pelo menos 5 dias antes, pelo menos 6 dias antes, pelo menos 7 dias antes, pelo menos 8 dias antes, pelo menos 9 dias antes de ou pelo menos 10 dias antes da introdução da uma ou mais células a serem enxertadas.

[0093] Alternativa e/ou adicionalmente, a inflamação é induzida depois da introdução da uma ou mais células a serem enxertadas. Por exemplo, mas não por via de limitação, a inflamação é induzida pelo menos 10 minutos depois, pelo menos 30 minutos depois, pelo menos 1 hora depois, pelo menos 2 horas depois, pelo menos 4 horas depois, pelo menos 6 horas depois, pelo menos 8 horas depois, pelo menos 10 horas depois, pelo menos 12 horas depois, pelo menos 14 horas depois, pelo menos 16 horas depois, pelo menos 18 horas depois, pelo menos 20 horas depois, pelo menos 22 horas depois, 1 dia depois, pelo menos 2 dias depois, pelo menos 3 dias depois, pelo menos 4 dias depois, pelo menos 5 dias depois, pelo menos 6 dias depois, pelo menos 7 dias depois, pelo menos 8 dias depois, pelo menos 9 dias depois de ou pelo menos 10 dias depois da introdução da uma ou mais células a serem enxertadas.

[0094] Em certas modalidades não limitantes, a célula, por exemplo, hepatócito ou células renais, recipientes de transplante podem ser adicionalmente administrados com agentes imunossupressores de modo a minimizar rejeição imune das células enxertadas, por exemplo, hepatócitos ou células renais. Agentes imunossupressores podem reduzir ou prevenir um resposta

imune adversa no mamífero receptor para o tecido estranho ou enxertado inibindo-se ou suprimindo qualquer atividade imune do sistema inato, incluindo, mas não limitado a, atividade de célula T e/ou célula B. A administração de agentes imunossupressores pode incluir, mas não é limitada a, a administração de terapia de radiação e/ou a administração de fármacos imunossupressores. Exemplos de fármacos imunossupressores adequados incluem, mas não são limitados a, esteroides (tal como corticosteroides, dexametasona, e prednisona), inibidores Cox-1 e Cox-2, antibióticos macrólidos (tal como rapamicina e tacrolimus), e outras substâncias que limitam, reduzem, ou suprimem célula B, célula T e/ou outro atividade imune inata. Em certas modalidades, os agentes imunossupressores particularmente adequados para o uso com a presente divulgação incluem aqueles agentes imunossupressores conhecidos para o uso com transplante de fígado e/ou rim, incluindo, mas não limitados a, esteroides, ciclosporina, rapamicina, azatioprina, prednisona, e OKT3. Em uma certa modalidade, os recipientes de enxerto de hepatócito são administrados com o agente imunossupressor tacrolimus, também chamado FK506, um inibidor de calcineurina que por sua vez pode inibir produção de IL-2 e ativação de linfócito B a jusante.

[0095] Em certas modalidades não limitantes, um indivíduo não é administrado um agente imunossupressor, por exemplo, um agente apresentado acima neste parágrafo (por exemplo, mas não por limitação, onde hepatócitos autólogos ou células renais são transplantados).

5.2.1 Tratamento de Doenças Hepáticas e

Transtornos

[0096] A presente divulgação fornece métodos de tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada. Em certas modalidades, a presente divulgação fornece métodos de propagar hepatócitos em FALCs ou gânglios linfáticos para o propósito de produzir tecido hepático ectópico, que pode ser usado em um indivíduo para benefício terapêutico, por exemplo, em um indivíduo com função hepática reduzida. Em certas modalidades, os FALCs são localizados no omento.

[0097] Um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada é um indivíduo sem fígado funcional suficiente para manter um estado saudável, incluindo mas não limitado a um indivíduo tendo um fígado fibrótico e/ou cirrótico, ou um fígado danificado pela doença, trauma ou efeito tóxico. Por exemplo, um estado saudável é evidenciado por um ou mais parâmetros da função hepática dentro de um intervalo normal para o indivíduo. Exemplos não limitantes de parâmetros da função hepática incluem o nível de albumina, alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), creatinina, bilirrubina total, bilirrubina direta, fenilalanina, alanina, glicina, nível de valina, nível de glutamato, tempo de protrombina, lactato desidrogenase e fosfatase alcalina; intervalos normais para estes níveis são conhecidos na técnica para vários indivíduos, incluindo indivíduos humanos. Em certas modalidades não limitantes, uma elevação de um ou mais, ou dois ou mais, ou três ou mais dos referidos parâmetros em pelo menos cerca de 25% ou pelo menos cerca de 50% em relação aos níveis normais indica uma necessidade de função

hepática aumentada. Alcançar a função hepática aumentada no indivíduo significa mover-se para o intervalo normal em pelo menos um parâmetro da função hepática, por exemplo, mas não por limitação, melhorando em pelo menos cerca de 10 por cento ou pelo menos cerca de 20 por cento ou pelo menos cerca de 30 por cento ou pelo menos cerca de 40 por cento ou pelo menos cerca de 50 por cento.

[0098] Em certas modalidades não limitantes, função hepática aumentada é indicada por um prolongamento de sobrevivência de um indivíduo, por exemplo, por pelo menos cerca de 20 % ou pelo menos cerca de 30 %.

[0099] Em certas modalidades, o indivíduo em necessidade de função hepática aumentada pode estar sofrendo a partir de uma doença hepática, um fígado transtorno, insuficiência hepática e/ou função hepática reduzida. Exemplos não limitantes de doenças hepáticas e/ou transtornos que pode ser tratada pelos métodos da presente divulgação incluem distúrbios metabólicos, síndrome de Crigler-Najjar tipo I, insuficiência hepática aguda, cirrose, hemocromatose, hiperoxalúria, oxalose, doença de Wilson, Alfa 1 deficiência de antitripsina, câncer de fígado, hepatite (alcoólica e autoimune), doença hepática gordurosa e doença hepática gordurosa não alcoólica. Exemplos não limitantes de doenças e/ou transtornos relacionados com o sistema biliar (e indiretamente com o fígado) que podes ser tratados pelos métodos da presente divulgação incluem cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária.

[00100] Em certas modalidades não limitantes, a presente divulgação fornece um método de tratar um

indivíduo em necessidade de função hepática aumentada, compreendendo administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de hepatócitos, em que pelo menos um dos hepatócitos administrados prolifera em ou em torno de um FALC ou gânglio linfático e gera um tecido hepático ectópico, pelo qual a função hepática do indivíduo é aumentada.

[00101] Em certas modalidades, os hepatócitos transplantados no indivíduo podem ser hepatócitos humanos, hepatócitos não humanos ou ambos. Um hepatócito pode ser singênico ou alogênico ao recipiente pretendido. Em modalidades não limitantes, o hepatócito é autólogo ao recipiente pretendido (por exemplo, foi colhido e expandido em cultura antes do transplante, ou foi gerado a partir de um célula precursora ou célula estaminal do recipiente pretendido). Em certas modalidades não limitantes, um hepatócito de uma espécie pode ser transplantada em uma outra espécie, por exemplo, mas não limitado a, um hepatócito humano transplantado em um hospedeiro não humano (por exemplo, camundongo). Por exemplo, mas não por via de limitação, os hepatócitos não humanos podem ser enxertados em FALCs de um recipiente humano.

[00102] Uma quantidade eficaz ou quantidade terapeuticamente eficaz de hepatócitos a ser enxertada pode compreender entre cerca de 10^4 e 10^{11} hepatócitos, ou entre cerca de 10^5 e 10^{10} hepatócitos ou uma quantidade encontrada para ser eficaz em resultar em pelo menos um local de tecido hepático ectópico em um FALC ou gânglio linfático. Em certas modalidades, uma quantidade eficaz de hepatócitos pode compreender um ou mais hepatócitos. Em certas

modalidades, uma quantidade de cerca de 10^5 a cerca de 10^{11}, de cerca de 10^5 a cerca de 10^9, de cerca de 10^5 a cerca de 10^8, de cerca de 10^5 a cerca de 10^7, de cerca de 10^5 a cerca de 10^6, de cerca de 10^6 a cerca de 10^{11}, de cerca de 10^6 a cerca de 10^{10}, de cerca de 10^6 a cerca de 10^9, de cerca de 10^6 a cerca de 10^8, de cerca de 10^6 a cerca de 10^7, de cerca de 10^7 a cerca de 10^{11}, de cerca de 10^7 a cerca de 10^{10}, de cerca de 10^7 a cerca de 10^9 ou de cerca de 10^7 a cerca de 10^8 hepatócitos podem ser administrados ao indivíduo.

[00103] Em certas modalidades, os hepatócitos podem ser administrados a um indivíduo mais do que uma vez para obter o tecido hepático ectópico desejado. Por exemplo, mas não por via de limitação, os hepatócitos podem ser administrados ao indivíduo pelo menos duas vezes, pelo menos três vezes ou pelo menos quatro vezes. Alternativa ou adicionalmente, os hepatócitos podem ser enxertados a duas ou mais regiões anatômicas diferentes que contêm FALCs ou gânglios linfáticos para obter dois ou mais tecido hepático ectópicos.

[00104] Em certas modalidades não limitantes, a presente divulgação fornece um método de tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada, compreendendo administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de hepatócitos, e promover a proliferação de pelo menos um dos hepatócitos em um FALC do indivíduo. Em certas modalidades, tal proliferação pode ser promovida, por exemplo, mas não por limitação, administrando-se os hepatócitos localmente à região anatômica contendo o FALC sendo alvo para formação de tecido hepático ectópico e/ou fornecendo-se pelo menos um

agente que promove a formação de um tecido hepático ectópico, como divulgado acima. Em certas modalidades, o agente pode ser, por exemplo, mas não limitado a, uma pluralidade de células derivadas da medula óssea e/ou uma pluralidade de células estromais. Em certas modalidades, o agente pode ser um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK, por exemplo, um ativador de LTβR ou NIK ou alvos a jusante do mesmo, como descrito acima. Em certas modalidades, o agente pode ser células derivadas da medula óssea, células estromais, um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK ou combinações do mesmo. Os métodos análogos podem ser usados para gerar um tecido ectópico em um gânglio linfático para aumentar a função hepática.

[00105] Em certas modalidades não limitantes, a presente divulgação fornece um método de gerar um tecido hepático ectópico compreendendo introduzir, em um FALC, um hepatócito, e fornecer pelo menos um agente que promove a formação de um tecido hepático ectópico, por exemplo, como apresentado acima. Por exemplo, mas não por via de limitação, um método para tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada, compreendendo (a) administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de hepatócitos em um FALC de um indivíduo para formar um tecido hepático ectópico, e (b) administrar, ao indivíduo, um ou mais células derivadas de medula óssea e/ou células estromais para promover a formação do fígado ectópico, por exemplo, promovendo-se a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para formar o tecido hepático ectópico. Os métodos análogos podem ser usados para gerar um tecido ectópico em um gânglio linfático.

[00106] Em certas modalidades não limitantes, um método para tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada, pode compreender (a) administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de hepatócitos em um FALC de um indivíduo para formar um tecido hepático ectópico, (b) administrar, ao indivíduo, um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK para promover a formação do tecido hepático ectópico. Os métodos análogos podem ser usados para gerar um tecido ectópico em um gânglio linfático para aumentar a função hepática.

[00107] Em certas modalidades não limitantes, um método para tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada, pode compreender (a) administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de hepatócitos em um FALC de um indivíduo para formar um tecido hepático ectópico, (b) administrar, ao indivíduo, uma ou mais células derivadas da medula óssea e/ou células estromais para promover a formação do fígado ectópico, por exemplo, promovendo-se a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para formar o tecido hepático ectópico, e (c) administrar um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK. Os métodos análogos podem ser usados para gerar um tecido ectópico em um gânglio linfático para aumentar a função hepática.

[00108] Em certas modalidades, o método para tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada, ainda pode incluir induzir inflamação no indivíduo. Por exemplo, mas não por via de limitação, a inflamação pode ser induzida pela administração de um agente que promove inflamação ao indivíduo, como divulgado

acima. Em certas modalidades, a inflamação é induzida antes da introdução do um ou mais hepatócitos a serem enxertados, como descrito acima.

[00109] Em certas modalidades, o método divulgado é realizado *in vivo*, como descrito acima. Em certas modalidades, é realizado *in vitro/ex vivo*, por exemplo como um explante de tecido cultivado. Em certas modalidades não limitantes, a matéria objeto presentemente divulgada fornece para tecido hepático produzido em um tal método *in vitro/ex vivo*, por exemplo, para posterior transplante em um indivíduo necessitando de função hepática aumentada.

5.2.2 Tratamento de Doenças Renais e Transtornos

[00110] A presente divulgação fornece métodos de tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada. Em certas modalidades, a presente divulgação fornece métodos de propagar células renais ou fragmentos de tecido renal em FALCs ou gânglios linfáticos para o propósito de produzir tecido renal ectópico, que pode ser usado em um indivíduo para benefício terapêutico, por exemplo, em um indivíduo com função renal reduzida. Em certas modalidades, os FALCs são localizados no omento.

[00111] Um indivíduo em necessidade de função renal aumentada é um indivíduo sem rim funcional suficiente para manter um estado saudável, incluindo mas não limitado a um indivíduo tendo falha renal, ou um rim danificado pela doença, trauma ou efeito tóxico. Por exemplo, mas não por via de limitação, um estado saudável é evidenciado por um ou mais parâmetros de função renal dentro de um intervalo normal para o indivíduo. Exemplos não limitantes de

parâmetros de função renal incluem nível de creatinina, nível de proteína e nível de albumina; intervalos normais para estes níveis são conhecidos na técnica para vários indivíduos, incluindo indivíduos humanos. Em certas modalidades não limitantes, uma elevação de um ou mais, ou dois ou mais, ou três dos referidos parâmetros em pelo menos cerca de 25% ou pelo menos cerca de 50% em relação aos níveis normais indica uma necessidade de função renal aumentada. Alcançar a função renal aumentada no sujeito significa mover para o intervalo normal em pelo menos um parâmetro da função renal, por exemplo, mas não por limitação, melhorando em pelo menos 10 por cento ou pelo menos 20 por cento ou pelo menos 30 por cento menos cerca de 40 por cento ou pelo menos cerca de 50 por cento. Em certas modalidades, uma redução na taxa de filtração glomerular (TFG) de um indivíduo é indicativa de função renal reduzida. Por exemplo, mas não como limitação, uma redução de cerca de 10 %, cerca de 20 %, cerca de 30 %, cerca de 40 % ou cerca de 50 % na TFG de um indivíduo é indicativa de função renal reduzida. Em certas formas de realização, as células enxertadas são capazes de produzir uma urina concentrada.

[00112] Em certas modalidades não limitantes, a função renal aumentada é indicada por um prolongamento de sobrevivência de um indivíduo, por exemplo, por pelo menos cerca de 20 % ou pelo menos cerca de 30 %.

[00113] Em certas modalidades, o indivíduo em necessidade de função renal aumentada pode estar sofrendo a partir de uma doença renal, um transtorno renal, falha renal e/ou função renal reduzida. Exemplos não limitantes

de doenças renais e/ou transtornos que podem ser tratados pelos métodos da presente divulgação incluem insuficiência renal aguda, doença renal crónica, glomerulonefrite, lúpus, doença renal policística, nefropatia, nefrose, malformações renais e cancro do rim. Outros exemplos não limitantes relacionados a doenças renais são eritropoiese diminuída, falta de vitamina D ativada e doenças não tireoidianas atípicas.

[00114] Em certas modalidades não limitantes, a presente divulgação fornece um método de tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada, compreendendo administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células renais, em que pelo menos uma das células renais administradas prolifera em ou em torno de um FALC ou gânglio linfático e gera um tecido renal ectópico, pelo qual a função renal do indivíduo é aumentada.

[00115] Em certas modalidades, as células renais ou fragmentos de tecido renal são enxertados em ou em torno de um FALC ou gânglio linfático para gerar tecido renal ectópico. Em certas modalidades, as células renais ou fragmentos de tecido renal transplantados no indivíduo podem ser células humanas ou não humanas. Exemplos não limitantes de células não humanas renais incluem células renais não humanas de primata e células renais de vários animais não humanos tal como cães, gatos, cavalos, camundongos, ratos, hamsters, coelhos, suínos, etc. Em certas modalidades, as células renais ou fragmentos de tecido renal podem ser singênicos ou alogênicos ao recipiente pretendido. Em modalidades não limitantes, a

célula renal e/ou fragmento de tecido renal é autólogo ao recipiente pretendido (por exemplo, foi colhido e expandido em cultura antes do transplante, ou foi gerado a partir de uma célula precursora ou célula estaminal do recipiente pretendido). Em certas modalidades, as células renais são células renais fetais ou tecido, por exemplo, metanefro. Em certas modalidades, as células renais não são metanefro, por exemplo, metanefro intacto. Em certas modalidades, as células renais podem ser células progenitoras renais. Em certas modalidades não limitantes, uma célula renal e/ou fragmento de tecido renal de uma espécie pode ser transplantada em uma outra espécie, por exemplo, mas não limitado a, uma célula renal humana transplantada em um hospedeiro de camundongo. Por exemplo, mas não por via de limitação, células não humanas renais e/ou fragmentos do tecido renal podem ser enxertadas em FALCs de um recipiente humano.

[00116] Em certas modalidades, uma quantidade eficaz de células renais pode compreender entre cerca de 10^4 e 10^{11} células renais, ou entre cerca de 10^5 e 10^{10} células renais ou uma quantidade encontrada para ser eficaz em resultar em pelo menos um local de tecido renal ectópico em um FALC. Em certas modalidades, uma quantidade eficaz de células renais pode compreender uma ou mais células renais. Em certas modalidades, uma quantidade de cerca de 10^5 a cerca de 10^{11}, de cerca de 10^5 a cerca de 10^9, de cerca de 10^5 a cerca de 10^8, de cerca de 10^5 a cerca de 10^7, de cerca de 10^5 a cerca de 10^6, de cerca de 10^6 a cerca de 10^{11}, de cerca de 10^6 a cerca de 10^{10}, de cerca de 10^6 a cerca de 10^9, de cerca de 10^6 a cerca de 10^8, de cerca de 10^6 a cerca

de 10^7, de cerca de 10^7 a cerca de 10^{11}, de cerca de 10^7 a cerca de 10^{10}, de cerca de 10^7 a cerca de 10^9 ou de cerca de 10^7 a cerca de 10^8 células renais podem ser administradas ao indivíduo.

[00117] Em certas modalidades, as células renais e/ou fragmentos do tecido renal podem ser administrados a um indivíduo mais do que uma vez para obter o tecido renal ectópico desejado. Por exemplo, mas não por via de limitação, as células renais e/ou fragmentos do tecido renal podem ser administrados ao indivíduo pelo menos duas vezes, pelo menos três vezes ou pelo menos quatro vezes. Alternativa ou adicionalmente, as células renais e/ou fragmentos do tecido renal podem ser enxertados a duas ou mais diferentes regiões anatômicas que contêm FALCs ou gânglios linfáticos para obter dos ou mais tecidos renais ectópicos.

[00118] Em certas modalidades, a presente divulgação ainda fornece um método de tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada, compreendendo administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células renais (ou um fragmento de tecido renal), e promover a proliferação de uma célula renal em um aglomerado linfoide associado à gordura ou gânglio linfático do indivíduo. Em certas modalidades, tal proliferação pode ser promovida, por exemplo e não por limitação, administrando-se as células renais localmente à região anatômica contendo o FALC ou gânglio linfático direcionado para formação de tecido renal ectópico e/ou fornecendo-se pelo menos um agente que promove a formação de um tecido renal ectópico.

[00119] Em certas modalidades, o agente pode ser, por exemplo, mas não limitado a, uma pluralidade de células derivadas da medula óssea e/ou uma pluralidade de células estromais ou células estromais endoteliais. Alternativa e/ou adicionalmente, o agente pode ser um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK, por exemplo, um ativador de LTβR ou NIK ou alvos a jusante do mesmo. Em certas modalidades, o agente pode ser um ativador da via de sinalização NF-kB não canônica. Em certas modalidades, o agente pode ser células derivadas da medula óssea, células estromais, um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK, um ativador da via de sinalização NF-kB não canônica ou combinações do mesmo.

[00120] Em certas modalidades não limitantes, a presente divulgação fornece um método de gerar um tecido renal ectópico compreendendo introduzir, em um FALC, uma composição compreendendo células renais, e fornecer pelo menos um agente que promove a formação de um tecido renal ectópico, por exemplo, como apresentado acima. Por exemplo, mas não por via de limitação, um método para tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada, compreendendo (a) administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células renais ou fragmentos do tecido renal em um FALC de um indivíduo para formar um tecido renal ectópico, e (b) administrar, ao indivíduo, uma ou mais células derivadas da medula óssea e/ou células estromais para promover a formação do rim ectópico, por exemplo, promovendo-se a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para formar o tecido renal ectópico. Os métodos análogos podem ser usados para gerar um tecido

ectópico em um gânglio linfático.

[00121] Em certas modalidades não limitantes, um método para tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada, compreendendo (a) administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células renais ou fragmentos do tecido renal em um FALC ou gânglio linfático de um indivíduo para formar um tecido renal ectópico, e (b) administrar, ao indivíduo, uma ou mais células derivadas da medula óssea e/ou células estromais para promover a formação do rim ectópico, por exemplo, promovendo-se a proliferação e/ou vascularização da uma ou mais células para formar o tecido renal ectópico. Os métodos análogos podem ser usados para gerar um tecido ectópico em um gânglio linfático para aumentar a função renal.

[00122] Em certas modalidades não limitantes, um método para tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada, pode compreender (a) administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células renais ou fragmentos do tecido renal em um FALC ou gânglio linfático de um indivíduo para formar um tecido renal ectópico, (b) administrar, ao indivíduo, um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK para promover a formação do tecido renal ectópico. Os métodos análogos podem ser usados para gerar um tecido ectópico em um gânglio linfático para aumentar a função renal.

[00123] Em certas modalidades, o método para tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada, ainda pode incluir induzir inflamação no indivíduo. Por exemplo, mas não por via de limitação, a

inflamação pode ser induzida pela administração de um agente que promove inflamação ao indivíduo, como divulgado acima. Em certas modalidades, a inflamação é induzida antes da introdução do um ou mais hepatócitos a serem enxertados, como descrito acima.

[00124] Em certas modalidades, o método divulgado é realizado *in vivo*, como descrito acima. Em certas modalidades, é realizado *in vitro/ex vivo*, por exemplo, como um explante de tecido cultivado. Em certas modalidades não limitantes, a matéria objeto presentemente divulgada fornece para tecido renal produzido em um tal método *in vitro/ex vivo*, por exemplo, para posterior transplante em um indivíduo necessitando de função renal aumentada.

5.3 COMPOSIÇÕES E KITS

[00125] A matéria objeto presentemente divulgada fornece composições para gerar tecido ectópico. A presente divulgação fornece composições para gerar tecido ectópico que incluem uma ou mais células e um ou mais agentes que podem ser usados para promover a formação de um tecido ectópico de a uma ou mais células.

[00126] Em certas modalidades, a uma ou mais células presente na composição compreendem hepatócitos. Em certas modalidades, a uma ou mais células presente na composição compreendem células renais. Em certas modalidades, hepatócitos ou células renais podem ser preparados para transplante e/ou procedimentos para transplante podem ser realizados usando metodologia descrita em, Patente dos Estados Unidos Nº 9.125.891, incorporada por referência aqui.

[00127] As células adequadas para o uso na presente divulgação podem ser derivadas de qualquer fonte adequada. Por exemplo, mas não por via de limitação, as células podem ser derivadas a partir de uma fonte autóloga. Em certas modalidades, as células podem ser derivadas a partir do indivíduo a ser implantado com as células. Em certas modalidades, as células podem ser derivadas a partir de um fonte heteróloga. Em certas modalidades, as células podem ser derivadas de um indivíduo diferente a partir do indivíduo a ser implantado com as células. Em certas modalidades, as células, por exemplo, hepatócitos ou células renais, podem também ser geradas a partir de células estaminais derivadas de várias fontes que são então diferenciadas no tipo relevante de célula. Em certas modalidades, as células podem ser cultivadas durante um período de tempo sob várias condições para induzir certos fenótipos antes do uso nas composições e/ou métodos presentemente divulgados.

[00128] Em certas modalidades, o número de células contidas dentro de uma composição divulgada aqui pode variar. Em certas modalidades, uma composição pode incluir pelo menos cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 10, cerca de 15, cerca de 20, cerca de 25, cerca de 30, cerca de 35, cerca de 50, cerca de 100, cerca de 150, cerca de 200, cerca de 300, cerca de 400, cerca de 500, cerca de 1000, cerca de 10,000, cerca de 100,000 ou cerca de 1.000.000 células, por exemplo, hepatócitos ou células renais. Em certas modalidades, uma composição pode incluir de cerca de 10^4 a cerca de 10^{11} células, por exemplo, hepatócitos ou células

renais.

[00129] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece uma composição para gerar um fígado ectópico ou tratar um indivíduo que necessita de função hepática aumentada. Em certas modalidades, a composição compreende uma pluralidade de hepatócitos e um ou mais dos seguintes agentes que promovem a formação de um fígado ectópico. Em certas modalidades, o agente pode ser uma ou mais células que não são hepatócitos. Por exemplo, mas não por via de limitação, a um ou mais agentes podem incluir uma pluralidade de células derivadas da medula óssea e/ou uma pluralidade de células estromais. Em certas modalidades, as células derivadas da medula óssea podem ser células estaminais hematopoiéticas. Em certas modalidades, as células estromais podem ser fibroblasto ou células tipo fibroblasto, tais como células reticulares fibroblásticas (FRCs), células dendríticas foliculares (FDCs), células endoteliais linfáticas (LECs), células endoteliais do sangue (BECs), pericitos da integrina alfa-7 (AIPs) e células duplamente negativas (DNCs).

[00130] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece uma composição para gerar um rim ectópico ou tratar um indivíduo que necessita de função renal aumentada. Em certas modalidades não limitantes, a presente divulgação fornece uma composição para gerar um rim ectópico compreendendo uma pluralidade de células renais (ou um fragmento de tecido renal) e um ou mais dos agentes que promovem a formação de um rim ectópico. Em certas modalidades, o agente pode ser uma ou mais células que não são células renais. Por exemplo, mas não por via de

limitação, a um ou mais agentes podem incluir uma pluralidade de células derivadas da medula óssea e uma pluralidade de células estromais. Em certas modalidades, as células derivadas da medula óssea podem ser células estaminais hematopoiéticas. Em certas modalidades, as células estromais podem ser fibroblasto ou células tipo fibroblasto, tais como células reticulares fibroblásticas (FRCs), células dendríticas foliculares (FDCs), células endoteliais linfáticas (LECs), células endoteliais do sangue (BECs), pericitos da integrina alfa-7 (AIPs) e células duplamente negativas (DNCs).

[00131] Em certas modalidades, a composição ainda pode incluir um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK. Exemplos não limitantes de ativadores da via de sinalização de LTβR e/ou NIK são discutidos acima. Em certas modalidades, a composição ainda pode incluir um ativador da via de sinalização NF-kB não canônica. Por exemplo, mas não por via de limitação, uma composição da presente divulgação pode incluir uma pluralidade de células, por exemplo, células renais (ou um fragmento de tecido renal) ou hepatócitos, e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ativador da via de sinalização de LTβR e/ou NIK.

[00132] Em certas modalidades, a presente divulgação fornece uma composição que pode incluir (a) uma pluralidade de células, por exemplo, células renais (ou um fragmento de tecido renal) ou hepatócitos, (b) uma pluralidade de células derivadas da medula óssea e uma pluralidade de células estromais e (c) uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ativador da via de

sinalização de LTβR e/ou NIK.

[00133] Em certas modalidades, a composição pode opcionalmente compreender um meio de cultura sintético e/ou um suporte. Em certas modalidades, o meio e/ou suporte podem incluir, mas não são limitados a, peptídeos, proteínas, carboidratos, matrigel, ácido hialurônico, colágeno, fibrina, fibrinogênio, fibronectina, poliortoéster, álcool polivinílico, poliamida, policarbonato, agarose, alginato, poli(etileno) glicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona, polivinilpirrolidona, um proteína adesiva marinha, cianoacrilato, hidrogel polimérico, análogos ou uma combinação dos mesmos.

[00134] Em certas modalidades, a composição pode opcionalmente compreender um antibiótico. Exemplos não limitantes de antibióticos incluem, mas não são limitados a, penicilina, por exemplo, penicilina e amoxicilina; cefalosporinas, por exemplo, cefalexina; sulfonamidas, por exemplo, co-trimoxazol e trimetoprima; macrolidas, por exemplo, eritromicina, claritromicina e azitromicina; fluoroquinolonas, por exemplo, ciprofloxacina, levofloxacina e ofloxacina; tetraciclinas, por exemplo, tetraciclina e doxiciclina; e aminoglicosídeos, por exemplo, gentamicina e tobramicina.

[00135] A presente divulgação ainda fornece composições que incluem tecido ectópico produzido pelos métodos divulgados acima. Por exemplo, mas não por via de limitação, uma composição da presente divulgação pode incluir um tecido hepático humano produzido em um hospedeiro não humano, como divulgado acima. Em certas

modalidades, as composições podem opcionalmente compreender um meio de cultura sintético e/ou suporte. Em certas modalidades, as composições podem opcionalmente compreender um antibiótico.

[00136] A presente divulgação ainda fornece kits que incluem uma ou mais das composições divulgadas aqui. Em certas modalidades, se o kit inclui uma ou mais composições, cada composição pode ser fornecida em seu próprio recipiente no kit. Em certas modalidades, um kit da presente divulgação ainda fornece instruções para usar o kit, por exemplo, instruções para administrar a composição presente no kit. Em certas modalidades, um kit desta divulgação ainda pode incluir um ou mais componentes tal como instruções para o uso, dispositivos e reagentes adicionais, e componentes, tais como tubos, recipientes e seringas para realizar os métodos divulgados acima.

[00137] Os exemplos seguintes são oferecidos para ilustrar mais completamente a divulgação, mas não devem ser interpretados como limitando o escopo da mesma.

6. EXEMPLO 1: BIOENGENGARIA DE UM FÍGADO EM TECIDO LINFOIDE SECUNDÁRIO

6.1. Geração de fígado auxiliar em gânglio linfático (LN) e manchas lácteas (FALCs)

[00138] Na tentativa de identificar novos locais para transplante de hepatócitos como uma alternativa ao transplante de órgão completo, foi observada uma observação incomum que os hepatócitos poderiam formar nódulos ectópicos de novo após injeção intraperitoneal (IP) no camundongo $Fah^{-/-}$ (um camundongo eficiente na enzima catabólica da tirosina fumarilacetoacetato hidrólase

(Fah)), um modelo de insuficiência hepática induzida, após a remoção de 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexanodiona (“NTBC”) a partir do consumo de água (32). Inicialmente, observou-se hepatócitos normais migrando para o sistema linfático para colonizar os gânglios linfáticos do camundongo $Fah^{-/-}$ (Figura 2A), e gerando mais de 70 % da massa hepática nativa ectopicamente. Este foi um resultado surpreendente, especialmente considerando como os gânglios linfáticos são locais comuns de metástase inicial para vários tipos de câncer. A Figura 3 representa camundongos $Fah^{-/-}$ de 3 a 4 semanas depois de transplante IP de hepatócitos; dilatação de espaço capilar e surgimento de vasos sanguíneos em manchas lácteas.

[00139] Isso levou a uma hipótese de que os gânglios linfáticos podem ser direcionados diretamente como um local para o transplante ectópico de vários tipos de células para restaurar a função dos tecidos e dos órgãos. Foi estabelecido que a injeção direta de hepatócitos em um único gânglio linfático de camundongo $Fah^{-/-}$ (axilar, poplíteo ou mesentérico) gerou massa hepática ectópica funcional suficiente para resgatar a sobrevivência desses camundongos mutantes afetados com doença metabólica letal (33).

[00140] Mais recentemente, demonstrou-se que este conceito de geração de um fígado ectópico poderia ser traduzido em grandes animais após a indução de uma doença do fígado (Figura 2B). Aqui, um modelo de porco de doença hepática foi gerado e crescimento do tecido hepático ectópico em linfonodos através da realização de um shunt porta cava seguido de transplante de hepatócitos nos

gânglios linfáticos mesentéricos. 6 porcos foram transplantados com aumento adicional de lesão hepática usando hepatectomia parcial. O resultado desta experiência foi a demonstração do enxerto de hepatócitos nos gânglios linfáticos e a geração de tecido hepático em todos os animais transplantados (Figura 2B) com aumento da massa hepática ectópica. A derivação porta cava é um procedimento cirúrgico importante para pacientes com doenças hepáticas graves, mas agora é menos comumente usado. Reduz 75% do fluxo sanguíneo para o fígado, criando uma nova conexão entre os vasos sanguíneos (veia porta para veia cava) para aliviar a hipertensão portal debilitante. Além disso, esta redução dramática do fluxo sanguíneo para o fígado é conhecida por induzir fatores hepatotróficos e proliferação de hepatócitos (41).

[00141] Hoje, um procedimento minimamente invasivo similar, mas preferencial, é o desvio portossistêmico intra-hepático transjugular (TIPS) para iniciar novas conexões entre a veia porta e a veia hepática em pacientes cirróticos com hipertensão portal crítica. Devido a esses resultados promissores no modelo de suínos e seus potenciais resultados de translação para os pacientes após o TIPS, foi necessário determinar como e por que o microambiente linfático é um bom hospedeiro para as células transplantadas.

[00142] Hepatócitos também enxertam em manchas lácteas. Quando o local de enxerto de hepatócitos no camundongo $Fah^{-/-}$ após a injeção IP foi cuidadosamente analisado, verificou-se que, além dos gânglios linfáticos, os hepatócitos também migravam para as manchas lácteas

omentais, gerando nódulos hepáticos (Figuras 2C a D, Figuras 3 a 5). Note, como mostrado na Figura 3, a dilatação do espaço capilar e surgimento de vasos sanguíneos (por exemplo, painel inferior direito) em manchas lácteas. As manchas lácteas são pequenas áreas coloridas "lácteas" de tecido linfoide (aglomerados linfoides associados à gordura ou "FALCs") encontradas principalmente no omento maior (Figura 2C). Esses agregados de células hematopoiéticas (células linfoides e macrófagos) e células estromais são conhecidos como órgãos linfoides secundários (42, 43), semelhantes aos gânglios linfáticos. Não surpreendentemente, manchas lácteas também foram identificadas como um alvo precoce na carcinomatose peritoneal, particularmente com câncer de ovário metastático.

[00143] Para confirmar que a formação hepática ectópica exigia um ambiente de tecido linfoide, o transplante IP foi realizado em camundongos $Fah^{-/-}$ NOD portadores de mutações no gene de ativação recombinase 2 (RAG2) e na cadeia gama do receptor citoquina (gama c) (camundongos "FRGN"); esses camundongos são completamente alifóide (44). Como mostrado na Figura 6, manchas lácteas omentais, e FALCs, estão ausentes em camundongos FRGN. Transplante IP de hepatócitos resultou em deficiente enxerto no omento de camundongos FRGN em relação ao controle tipo selvagem (Figura 7) e crescimento de células enxertadas não foi observado (Figura 8). Curiosamente, a capacidade para formar manchas lácteas e FALCs foi restaurada em camundongos FRGN por transplante de medula óssea (Figuras 9 e 10) e aquelas manchas lácteas e FALCs

poderiam suportar formação de fígado ectópico (Figuras 11 e 12).

6.2. Um mecanismo molecular para desenvolvimento de fígado ectópico

[00144] Foi então perguntado se os gânglios linfáticos são necessários para o enxerto de hepatócitos e sobrevivência e $Fah^{-/-}$. Foi raciocinado que os hepatócitos estão colonizando manchas lácteas e gânglios linfáticos, e queriam saber se os camundongos $Fah^{-/-}$ sem gânglios linfáticos funcionais poderiam gerar massa hepática ectópica suficiente em manchas lácteas para sobreviver. Para testar essa hipótese, camundongos linfoblásticos (aly/aly) foram cruzados com camundongos que sofreram insuficiência hepática indutível ($Fah^{-/-}$). Os camundongos Aly/aly não possuem gânglios linfáticos, placas de Peyer e têm um baço desorganizado devido a uma mutação pontual na cinase indutora de NF-κB (NIK) que interrompe a sinalização não canônica de NF-kB nas células (Figura 13). Sem a sinalização não canônica do NF-κB, a organogênese do, gânglio linfático não ocorre adequadamente durante o desenvolvimento (ausência de gânglios linfáticos), embora os vasos linfáticos e importantes manchas lácteas, estejam presentes e funcionais nesses camundongos (43).

[00145] Se os hepatócitos transplantados IP foram enxertados em camundongos aly/aly-$Fah^{-/-}$ foi primeiramente testado (Figura 14). Descobriu-se que a maioria dos hepatócitos migrou para as manchas lácteas no omento e confirmou que os hepatócitos enxertaram o omento de camundongos aly/aly-$Fah^{-/-}$ similarmente para camundongos $Fah^{-/-}$ (Figura 15), mas não conseguiram formar nódulos

grandes ao longo de 6 semanas, e nenhum (n = 28) dos ratos transplantados foram resgatados após 12 semanas (o tempo necessário para resgatar camundongos $Fah^{-/-}$ controle) apesar do enxerto inicial no omento (Figura 14, parcela de sobrevivência de Kaplan Meier mais à direita). Na necropsia, observou-se vascularização limitada em comparação com nódulos ectópicos gerados em camundongos $Fah^{-/-}$. Hepatócitos também foram transplantados no fígado (via injeção esplênica) de camundongos aly/aly-$Fah^{-/-}$, e descobriram que os camundongos foram resgatados da insuficiência hepática (Figura 14, parcela de sobrevivência mais à esquerda de Kaplan Meier). Este resultado é importante porque indica que a falta de crescimento peritoneal de hepatócitos em camundongos aly/aly- $Fah^{-/-}$ é única neste local e é uma consequência da interrupção da via NIK devido à mutação aly (NIK) (Figura 16). Hepatócitos injetados no fígado (injeção esplênica) presumivelmente substituem os hepatócitos que estão morrendo dentro da arquitetura normal do fígado, sem a necessidade da via NIK.

[00146] Em seguida, estudos foram feitos para caracterizar os ambientes linfoides que podem ser hospedeiros da formação de fígado ectópico. A Figura 17A mostra a distribuição do marcador linfoide podoplanina e o marcador endotelial CD31 nos gânglios linfáticos em comparação com manchas lácteas. Como mostrado na Figura 17B, os hepatócitos transplantados formam associações próximas com ER-TR7 contendo células estromais. Curiosamente, quando as células do estroma omental, e não os hepatócitos, são transplantadas via injeção intraperitoneal, elas também migram de volta para as

manchas lácteas no omento (Figura 17C). Como mostrado na Figura 18, as células estromais foram encontradas para expressar tanto NIK quanto o receptor beta de linfotoxina; hepatócitos, por sua vez, eram linfotoxinas alfa (também conhecidas como Fator Beta de Necrose Tumoral) e beta (também conhecido como Fator de Necrose Tumoral C) positivas.

[00147] Dada a observação que hepatócitos expressam linfotoxina beta ("LTb") e células estromais expressam receptor beta de linfotoxina ("LTbR") foi interessante observar se os hepatócitos seriam enxertados e cresceriam em locais em manchas lácteas de camundongos Fah/- sem LTbR. Os resultados são mostrado na Figura 19, onde crescimento de hepatócitos nos camundongos Fah/LTbR$^{-/-}$ foi observado ser menor do que que em camundongos Fah$^{-/-}$, LTbR^{+}.

[00148] Em conclusão, os hepatócitos injetados IP sofrem organogênese, completa com neovascularização para suportar a massa hepática ectópica em camundongos Fah-/-, e a via NIK é uma via única necessária para que esse processo seja completado.

[00149] Na hipótese clássica de sementes e solo de câncer pelo Dr. Stephen Paget (1889), a semente (câncer metastático) requer que o solo (um ambiente fértil) seja bem-sucedido. Os resultados aqui descritos demonstram que as sementes (hepatócitos) requerem que o solo (órgãos linfoides secundários) implante e gere tecido hepático num local ectópico. Sem estarem limitados por nenhuma teoria em particular, os dados apoiam um mecanismo no qual hepatócitos com células estromais ativam a via da

linfotoxina/NIK para gerar um fígado auxiliar em manchas lácteas. Os dados indicam ainda que a regeneração do tecido hepático, por transplante de hepatócitos no fígado (via esplênica) ou nas manchas lácteas (via IP), é mecanisticamente diferente. A mutação pontual aly/aly na cinase induzindo NF-κB (NIK) interrompeu o desenvolvimento hepático ectópico mas não reparo do fígado nativo. NIK tem uma função central na sinalização não canônica de NF-κB para linfoides secundários desenvolvimento de órgãos. A NIK é um membro das cinases da proteína ativadora de mitógeno 3 (MAP3), que após a ligação do receptor, acumula-se a níveis detectáveis. Isso permite que a NIK fosforilado e ative o inibidor de κB Cinase α (IKKα), iniciando assim a fosforilação mediada por IKK α de p100 (*consultar,* Figura 13).

6.3. REFERÊNCIAS

1. Starzl, T.E. et al. Orthotopic homotransplantation of the human liver. Ann Surg 168, 392-415 (1968).

2. Reuben, A. Alcohol and the liver. Curr Opin Gastroenterol 23, 283-291 (2007).

3. Perkins, J.D. et al. Should liver transplantation in patients with model for end-stage liver disease scores <or= 14 be avoided? A decision analysis approach. Liver Transpl 15, 242-254 (2009).

4. Volk, M.L., Hernandez, J.C., Lok, A.S. & Marrero, J.A. Modified Charlson comorbidity index for predicting survival after liver transplantation. Liver Transpl 13, 1515-1520 (2007).

5. Lipshutz, G.S. & Busuttil, R.W. Liver

transplantation in those of advancing age: the case for transplantation. Liver Transpl 13, 1355-1357 (2007).

6. Strom, S.C., Chowdhury, J.R. & Fox, I.J. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. Semin Liver Dis 19, 39-48 (1999).

7. Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. Science (Nova Iorque, N.Y.) 263, 1149-1152 (1994).

8. Weglarz, T.C., Degen, J.L. & Sandgren, E.P. Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes. Am J Pathol 157, 1963-1974 (2000).

9. Braun, K.M. & Sandgren, E.P. Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury. Am J Pathol 157, 561-569 (2000).

10. Grompe, M. et al. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. Nat Genet 10, 453-460 (1995).

11. Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M. & Grompe, M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. The American journal of pathology 151, 1273-1280 (1997).

12. Lagasse, E. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med 6, 1229-1234 (2000).

13. Grompe, M. Principles of therapeutic liver

repopulation. J Inherit Metab Dis 29, 421-425 (2006).

14. Grompe, M., Overturf, K., al-Dhalimy, M. & Finegold, M. Therapeutic trials in the murine model of hereditary tyrosinaemia type I: a progress report. J Inherit Metab Dis 21, 518-531 (1998).

15. Overturf, K. et al. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. Nat Genet 12, 266-273 (1996).

16. Fox, I.J. et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. N Engl J Med 338, 1422-1426 (1998).

17. Nishikawa, T. et al. Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. The Journal of clinical investigation 125, 1533-1544 (2015).

18. Tretbar, L.L., Beven, E.G. & Hermann, R.E. Homotransplantation of an auxiliary dog liver into the pelvis; effect of protacaval shunt in the prevention of liver atrophy. Surgical forum 16, 219-221 (1965).

19. Marchioro, T.L., Porter, K.A., Dickinson, T.C., Faris, T.D. & Starzi, T.E. Physiologic Requirements For Auxiliary Liver Homotransplantation. Surgery, gynecology & obstetrics 121, 17-31 (1965).

20. Van Thiel, D.H., Makowka, L. & Starzl, T.E. Liver transplantation: where it's been and where it's going. Gastroenterology clinics of North America 17, 1-18 (1988).

21. Moritz, M.J. et al. Heterotopic liver transplantation for fulminant hepatic failure--a bridge to

recovery. Transplantation 50, 524-526 (1990).

22. Boudjema, K. et al. Temporary auxiliary liver transplantation for subacute liver failure in a child. Lancet (Londres, Inglaterra) 342, 778-779 (1993).

23. Terpstra, O.T., Reuvers, C.B. & Schalm, S.W. Auxiliary heterotopic liver transplantation. Transplantation 45, 1003-1007 (1988).

24. Metselaar, H.J. et al. Recovery of failing liver after auxiliary heterotopic transplantation. Lancet (Londres, Inglaterra) 335, 1156-1157 (1990).

25. Faraj, W. et al. Auxiliary liver transplantation for acute liver failure in children. Annals of surgery 251, 351-356 (2010).

26. Dokmak, S., Elkrief, L. & Belghiti, J. Auxiliary liver transplantation with a small deceased liver graft for cirrhotic liver complicated by hepatocellular carcinoma. Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation 26, e102-104 (2013).

27. Ren, W., Zhang, A. & Dong, J. Integrating repopulation and regeneration of the auxiliarily transplanted small liver graft: the solution for organ shortage and immunosuppression. Medical hypotheses 79, 241-245 (2012).

28. McKiernan, P. Liver transplantation and cell therapies for inborn errors of metabolism. Journal of inherited metabolic disease 36, 675-680 (2013).

29. Shanmugam, N.P. et al. Auxiliary liver transplantation: a form of gene therapy in selective metabolic disorders. Journal of clinical and experimental

hepatology 1, 118-120 (2011).

30. Rela, M. et al. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I. Annals of surgery 229, 565-569 (1999).

31. Burdelski, M. & Rogiers, X. Liver transplantation in metabolic disorders. Acta gastro-enterologica Belgica 62, 300-305 (1999).

32. Hoppo, T., Komori, J., Manohar, R., Stolz, D.B. & Lagasse, E. Rescue of lethal hepatic failure by hepatized lymph nodes in mice. Gastroenterology 140, 656-666 e652 (2011).

33. Komori, J., Boone, L., DeWard, A., Hoppo, T. & Lagasse, E. The mouse lymph node as an ectopic transplantation site for multiple tissues. Nat Biotechnol 30, 976-983 (2012).

34. DeWard, A.D., Komori, J. & Lagasse, E. Ectopic transplantation sites for cell-based therapy. Current opinion in organ transplantation 19, 169-174 (2014).

35. Francipane, M.G. & Lagasse, E. Maturation of embryonic tissues in a lymph node: a new approach for bioengineering complex organs. Organogenesis, 1-9 (2014).

36. Francipane, M.G. & Lagasse, E. in Stem Cells Translational Medicine In press (2015).

37. Gupta, S. et al. Hepatocytes exhibit superior transgene expression after transplantation into liver and spleen compared with peritoneal cavity or dorsal fat pad: implications for hepatic gene therapy. Hum Gene Ther 5, 959-967 (1994).

38. Jirtle, R.L. & Michalopoulos, G. Effects of

partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. Cancer Res 42, 3000-3004 (1982).

39. Ohashi, K. et al. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. Nat Med 6, 327-331 (2000).

40. Ohashi, K. et al. Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. Hepatology (Baltimore, Md.) 41, 132-140 (2005).

41. Nordlinger, B. et al. Can hepatocytes proliferate when transplanted into the spleen? Demonstration by autohistoradiography in the rat. European surgical research. Europaische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes 19, 381-387 (1987).

42. Shah, S. et al. Cellular basis of tissue regeneration by omentum. PloS one 7, e38368 (2012).

43. Rangel-Moreno, J. et al. Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. Immunity 30, 731-743 (2009).

44. Mazurier F1, Fontanellas A, Salesse S, Taine L, Landriau S, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Peault B, Di Santo JP, de Verneuil H., A novel immunodeficient mouse model--RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants--requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. J Interferon Cytokine Res. Maio de 1999; 19(5):533-41.

45. Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, Ten Dijke P; IT-LIVER

Consortium., TGF-β signalling and liver disease. FEBS J. Junho de 2016; 283(12):2219-32.

46. Rogers S., Lowell J., Hammerman N., and Hammerman M., Transplantation of developing metanephroi into adult rats. Kidney International 1998; 54:27-37.

7. EXEMPLO 2: BIOENGENGARIA DE UM RIM EM TECIDO LINFOIDE SECUNDÁRIO

[00150] O gânglio linfático do camundongo (LN), um órgão linfoide secundário (SLO), pode suportar a maturação de metanefro do camundongo em néfrons com funções glomerulares e tubulares, e o LN também pode promover a maturação do rim fetal humano transplantado, bem como culturas organoides renais gerados a partir de progenitores nefrônicos de camundongo (NPs) ou células estaminais pluripotentes induzidas por humanos (hiPSCs) (Figura 20). Para testar se a sinalização de LTβR, um mediador de sinalização crítica na gênese de LN, sustentava a organogênese ectópica, camundongos portadores de enxertos renais de LN foram tratados com uma proteína de fusão LTβR-Fc. A proteína de fusão LTp-R-Fc antagoniza os efeitos mediados por LTpR por engatar os ligantes LTβR (LTα e LTβ) (consultar, Figura 21). Como mostrado nas Figuras 22A a B, o tratamento com LTβR-Fc reduziu significativamente o tamanho dos enxertos e sua vascularização.

[00151] Além de engatar os ligantes LTβR, LTβR-Fc também envolve o membro da família não-TNF LIGHT, que não apenas interage com LTβR, mas também pode interagir com os receptores HVEM e Dcr3 (consultar, Figura 21). Para descartar a possibilidade de que a vascularização/angiogênese do enxerto prejudicada pela

interferência de LTβR-Fc com vias de sinalização diferentes das mediadas por LTβR, o resultado do transplante renal em um ambiente defeituoso de LTβR foi investigado, como o oferecido pelo camundongo LTβR-/- (consultar, Figura 22). Esta abordagem também permitiu a exclusão da possibilidade de os efeitos observados serem devidos à inibição de LTβR/HVEM/Dcr3 nas células renais do doador ou outros tipos de células presentes no tecido do dador no momento do transplante, incluindo células estromais e hematopoiéticas.

[00152] Como camundongos $LT\beta R^{-/-}$ não possuem LNs, o omento maior foi usado como um SLO alternativo para transplante. O omento contém agregados linfoides, chamados manchas lácteas, que promovem imunidade aos antígenos peritoneais (consultar, Figura 1). Como no LN, uma rede reticular de células reticulares de fibroblastos (FRCs) suporta leucócitos em manchas lácteas. Ao explorar a composição estromal do estado estacionário de omenta em comparação com LNs, foram encontrados perfis citométricos de fluxo celular estromal semelhantes (Figura 22C). Além disso, os subconjuntos de células $PDPLN^{+}/LT\beta R^{+}$ e $PDPLN^{-}/LT\beta R^{+}$ foram identificados em suspensões de células omentais, indicando a existência de populações raras de FRCs responsivos a LT e células endoteliais cerebrais (BECs) no omento (Figura 22D). O crescimento de fragmentos embrionários de rim foi significativamente afetado no omento de $LT\beta R^{-/-}$; os enxertos não só ficaram menores, mas também menos vascularizados, e mostraram uma morfologia aberrante quando comparados aos seus equivalentes de controle, apontando a importância da sinalização de LTβR nas células estromais do hospedeiro para uma

vascularização/angiogênese bem-sucedida do enxerto renal ectópico (Figuras 22E a F). Nos enxertos renais de LN não tratados, NIK, um LTβR alvo a jusante e componente central da via de NF-kB não canônica, estava restringida a células endoteliais glomerulares (Figura 22G). Por outro lado, o tratamento com LTβR-Fc anulou a expressão de NIK nessas células. Da mesma forma, a expressão de NIK não pôde ser detectada em enxertos desenvolvidos na omelina $LT\beta R^{-/-}$. Sem estar vinculado a nenhuma teoria em particular, o LTβR pode usar a NIK para propagar a sinalização não-canônica do NF-κB e promover a vascularização/angiogênese do tecido transplantado. Além disso, sem estarem vinculados a nenhuma teoria em particular, as células estromais que residem nos órgãos linfoides secundários parecem usar a sinalização de LTβR para favorecer a organogênese, e a ativação da NIK restrita às células endoteliais do estroma pode promover a angiogênese do gráfico.

8. EXEMPLO 3: INFLAMAÇÃO AUMENTA O CRESCIMENTO DOS HEPTÓCITOS ENXERTADOS

[00153] A inflamação peritoneal induz um aumento no número e tamanho dos aglomerados linfoides associados à gordura (FALCs) número e tamanho (Benezech, C. et al. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. Nature immunology 16, 819-828 (2015)). Este efeito é dependente da expressão do TNF pelas células mieloides e da sinalização do TNFR nas células estromais (Benezech et al. (2015)). Para determinar se a inflamação conduz também ao aumento do enxerto de hepatócitos, iniciou-se uma inflamação peritoneal estéril conduzida por Zimosan (um ligante derivado de levedura do receptor Toll-

like 2) foi iniciado em C57bl/6 de tipo selvagem e animais controle (tipo selvagem C57bl/6 injetados com PBS) (Consultar, Figura 23). Os hepatócitos GFP^+ foram transplantados 3 dias depois em ambos os grupos de animais e sacrificados após 1 semana.

[00154] Como mostrado na Figura 24, a inflamação induzida por zimosan aumentou dramaticamente a presença de células GFP^+, como visualizado no tecido e por quantificação de hepatócitos GFP^+ em omento e gordura mesentérica. Importante, o enxerto de hepatócitos em FALCs após a injeção IP foi observado em camundongos do tipo selvagem, indicando que o enxerto em FALCs não é dependente de lesão hepática. Como a formação do FALC é cronometrada com a iniciação ou resolução da inflamação e se o enxerto de hepatócitos será sustentado na fase de resolução ainda deve ser investigado.

[00155] Em seguida, este regimento de pré-condicionamento foi testado em camundongos $Fah^{-/-}$ C57bl/6 para determinar se isso afetaria a sobrevivência de camundongos tirosinêmicos após a indução de uma doença hepática (fora de NTBC). Usando o mesmo método como descrito na Figura 23, camundongos $Fah^{-/-}$ C57bl/6 com ou sem uma inflamação induzida foram transplantados com hepatócitos de tipo selvagem, seguidos por indução de doença hepática (fora de NTBC). Como mostrado na Figura 25, os animais no painel esquerdo sem inflamação não foram resgatados após duas seleções (queda de peso = doença hepática) enquanto o animal com inflamação foi resgatado após 8 semanas.

[00156] A necropsia dos animais sem inflamação

induzida revelou um enxerto hepático baixo/limitado e massa hepática nos FALC presentes na gordura omental, esplênica, portal, gonadal e mesentérica (Figura 26). Ao contrário, o animal com inflamação induzida apresentava grandes massas de tecido hepático nestes locais.

[00157] Várias referências, patentes e pedido de patentes são citados aqui, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para gerar um tecido ectópico em um indivíduo, compreendendo introduzir uma ou mais células em um aglomerado linfoide associado à gordura do indivíduo e fornecer um ou mais agentes que promovem a formação do tecido ectópico.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a um ou mais agentes que promovem a formação de tecido ectópico compreendem células derivadas da medula óssea, células estromais ou ambas.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, onde a um ou mais agentes compreendem células estromais.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que as células estromais compreendem células de fibroblasto.

5. Método, de acordo com a reivindicação 2, 3 ou 4, em que as células estromais expressam podoplanina, NIK, LTβR ou uma combinação das mesmas.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, em que as células estromais são tratadas com um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, em que o ativador é um ativador de LTβR, NIK ou uma combinação dos mesmos.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6, em que o ativador é um ativador de uma via de sinalização NF-kB não canônica.

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, 7 ou

8, em que a ativação da via de sinalização de LTβR, da via de sinalização de NIK, da via de sinalização NF-kB não canônica ou uma combinação das mesmas promove proliferação da uma ou mais células, vascularização do tecido ectópico ou uma combinação das mesmas.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a um ou mais agentes que promovem a formação de tecido ectópico compreendem um agente que promove inflamação.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, compreendendo ainda induzir inflamação no indivíduo.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que a inflamação é induzida pela administração de um agente que promove inflamação ao indivíduo.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, em que a inflamação é induzida antes de introduzir a uma ou mais células no aglomerado linfoide associado à gordura do indivíduo.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que a uma ou mais células compreendem hepatócitos e o tecido ectópico compreende tecido hepático ectópico.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que a uma ou mais células compreendem células renais, um ou mais fragmentos do tecido renal ou uma combinação dos mesmos e o tecido ectópico compreende tecido renal ectópico.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, em que o aglomerado linfoide

associado à gordura está localizado em tecidos adiposos na cavidade pleural, pericárdica e/ou peritoneal tal como a gordura omental, mesentérica, esplênica, portal e/ou gonadal do indivíduo.

17. Método de tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada, compreendendo administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de hepatócitos, e promover a formação de tecido hepático ectópico em um aglomerado linfoide associado à gordura do indivíduo.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, em que a formação de tecido hepático ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida pela administração dos hepatócitos localmente à região anatômica do aglomerado linfoide associado à gordura.

19. Método, de acordo com a reivindicação 17 ou 18, em que o aglomerado linfoide associado à gordura está localizado na gordura omental, mesentérica, esplênica, portal e/ou gonadal do indivíduo.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, em que a formação de tecido hepático ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida pela coadministração de uma ou mais das células derivadas da medula óssea ou células estromais.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, em que células estromais são coadministradas.

22. Método, de acordo com a reivindicação 20 ou 21, em que as células estromais compreendem células de fibroblasto.

23. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 20 a 22, em que as células estromais expressam podoplanina, NIK, LTβR ou uma combinação das mesmas.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 23, em que a formação de tecido hepático ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida pela coadministração de um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 24, em que a formação de tecido hepático ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida pela coadministração de um ativador de uma via de sinalização NF-kB não canônica.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 24 compreendendo ainda induzir inflamação no indivíduo.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, em que a inflamação é induzida pela administração de um agente que promove inflamação ao indivíduo.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 27, em que a inflamação é induzida antes da administração dos hepatócitos.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 25, em que a formação de tecido hepático ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida administrando-se ao indivíduo um agente que promove inflamação.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, em que o agente que promove inflamação é administrado ao

indivíduo antes de administrar os hepatócitos.

31. Método de gerar um fígado ectópico compreendendo introduzir, em um aglomerado linfoide associado à gordura, um ou mais hepatócitos, e fornecer pelo menos um agente que promove a formação de tecido hepático ectópico.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, em que o método é praticado *in vivo*.

33. Método, de acordo com a reivindicação 31, em que o método é praticado *in vitro*.

34. Método, de acordo com a reivindicação 31, 32 ou 33, em que o agente que promove a formação de tecido hepático ectópico compreende células derivadas da medula óssea, células estromais, ou uma combinação das mesmas.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, em que o agente compreende células estromais.

36. Método, de acordo com a reivindicação 34 ou 35, em que as células estromais compreendem células de fibroblasto.

37. Método, de acordo com a reivindicação 34, 35 ou 36, em que as células estromais expressam uma podoplanina, NIK, LTβR ou uma combinação das mesmas.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 a 37, em que as células estromais são tratadas com um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas.

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 38, em que o agente que promove a formação de tecido ectópico compreende um ativador da via

de sinalização de LTβR, da via de sinalização de NIK, um agente que promove inflamação ou uma combinação dos mesmos.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 38, compreendendo ainda induzir inflamação.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, em que a inflamação é induzida pela administração de um agente que promove inflamação.

42. Método de tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada, compreendendo administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células renais, um fragmento de tecido renal ou uma combinação dos mesmos, e promover a formação de um tecido renal ectópico em um aglomerado linfoide associado à gordura do indivíduo.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, em que a formação de tecido renal ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida pela administração das células renais localmente à região anatômica do aglomerado linfoide associado à gordura.

44. Método, de acordo com a reivindicação 42 ou 43, em que o aglomerado linfoide associado à gordura está localizado na gordura omental, mesentérica, esplênica, portal e gonadal do indivíduo.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 42 a 44, em que a formação de tecido renal ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida pela coadministração de uma ou mais células derivadas da medula óssea, células estromais ou uma combinação das mesmas.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, em que as células estromais são coadministradas.

47. Método, de acordo com a reivindicação 45 ou 46, em que as células estromais compreendem células de fibroblasto.

48. Método, de acordo com qualquer uma de uma das reivindicações 45 a 47, em que as células estromais expressam podoplanina, NIK, LTβR ou uma combinação das mesmas.

49. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 42 a 48, em que a formação de tecido renal ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida pela coadministração de um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos.

50. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 42 a 49, em que a formação de tecido renal ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida pela coadministração de um ativador de uma via de sinalização NF-kB não canônica.

51. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 42 a 50, em que a formação de tecido renal ectópico no aglomerado linfoide associado à gordura é promovida administrando-se um agente que promove inflamação.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, em que o agente que promove inflamação é administrado antes de administrar as células renais, o fragmento de tecido renal ou a combinação dos mesmos.

53. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 42 a 50, compreendendo ainda induzir inflamação no indivíduo.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, em que a inflamação é induzida pela administração de um agente que promove inflamação ao indivíduo.

55. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 54, em que a inflamação é induzida antes de introduzir uma ou mais células em um aglomerado linfoide associado à gordura do indivíduo.

56. Método de gerar tecido renal ectópico compreendendo introduzir, a um aglomerado linfoide associado à gordura, uma ou mais células renais, um fragmento de tecido renal, ou uma combinação dos mesmos, e fornecer pelo menos um agente que promove a formação de tecido renal ectópico.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, em que o método é praticado *in vivo*.

58. Método, de acordo com a reivindicação 56, em que o método é praticado *in vitro*.

59. Método, de acordo com a reivindicação 56, 57 ou 58, em que o agente que promove a formação de tecido hepático ectópico compreende células derivadas da medula óssea, células estromais ou uma combinação das mesmas.

60. Método, de acordo com a reivindicação 59, em que o agente compreende as células estromais.

61. Método, de acordo com a reivindicação 59 ou 60, em que as células estromais compreendem células de fibroblasto.

62. Método, de acordo com a reivindicação 59, 60 ou 61, em que as células estromais expressam podoplanina,

NIK, LTβR ou uma combinação das mesmas.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 59 a 62, em que as células estromais são tratadas com um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos.

64. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 63, em que o agente que promove a formação de tecido ectópico compreende um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK, um agente que promove inflamação ou uma combinação dos mesmos.

65. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 63, compreendendo ainda induzir inflamação no indivíduo.

66. Método, de acordo com a reivindicação 65, em que a inflamação é induzida administrando-se um agente que promove inflamação ao indivíduo.

67. Método para gerar um tecido renal ectópico em um indivíduo, compreendendo introduzir células compreendendo uma ou mais células renais e uma ou mais células estromais a um aglomerado linfoide associado à gordura do indivíduo e fornecer um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos; em que a ativação da via de sinalização de LTβR, da via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas na uma ou mais células estromais promove a formação do tecido renal ectópico.

68. Método para gerar um tecido hepático ectópico em um indivíduo, compreendendo introduzir células

compreendendo um ou mais hepatócitos e uma ou mais células estromais a um aglomerado linfoide associado à gordura do indivíduo e fornecer um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos; em que a ativação da via de sinalização de LTβR, da via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas na uma ou mais células estromais promove a formação do tecido hepático ectópico.

69. Composição para gerar um tecido ectópico compreendendo uma pluralidade de células e um ou mais agentes que promovem a formação de um tecido ectópico.

70. Composição para gerar um tecido hepático ectópico compreendendo uma pluralidade de hepatócitos e um ou mais agentes que promovem a formação de um fígado ectópico.

71. Composição para gerar um tecido renal ectópico compreendendo uma pluralidade de células renais e um ou mais agentes que promovem a formação de um rim ectópico.

72. Composição, de acordo com as reivindicações 69, 70 ou 71, em que a um ou mais agentes compreendem uma pluralidade de células derivadas da medula óssea, uma pluralidade de células estromais ou uma combinação das mesmas.

73. Composição, de acordo com a reivindicação 72, em que as células estromais expressam podoplanina, NIK, LTβR, ou uma combinação das mesmas.

74. Composição, de acordo com as reivindicações 69, 70 ou 71, em que a um ou mais agentes compreendem um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de

uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos.

75. Composição, de acordo com as reivindicações 69, 70 ou 71, em que a um ou mais agentes compreendem um agente que promove inflamação.

76. Composição, de acordo com as reivindicações 69, 70 ou 71, em que a um ou mais agentes compreendem dois ou mais de: (a) uma pluralidade de células derivadas da medula óssea, uma pluralidade de células estromais ou uma combinação das mesmas; (b) um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas; ou (c) um agente que promove inflamação.

77. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 76, compreendendo ainda um meio de cultura sintético.

78. Kit compreendendo a composição de qualquer uma das reivindicações 69 a 77.

79. Método de gerar um tecido renal ectópico em um indivíduo, compreendendo: introduzir uma quantidade eficaz de células renais, um fragmento de tecido renal ou uma combinação dos mesmos a um aglomerado linfoide associado à gordura do indivíduo.

80. Método, de acordo com a reivindicação 79, em que as células renais compreendem células isoladas a partir de rim embrionário, metanefro, células isoladas a partir de um organoide de rim formado *in vitro* ou qualquer combinação das mesmas.

81. Método de tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada, compreendendo administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de

hepatócitos, e fornecer um ou mais agentes que promovem a formação de um tecido hepático ectópico em um gânglio linfático do indivíduo, em que a um ou mais agentes compreendem dois ou mais de: (a) uma pluralidade de células derivadas da medula óssea, uma pluralidade de células estromais, ou uma combinação das mesmas; (b) um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas; ou (c) um agente que promove inflamação.

82. Método de tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada, compreendendo administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células renais, um fragmento de tecido renal, ou uma combinação das mesmas, e fornecer um ou mais agentes que promovem a formação de um tecido renal ectópico em um gânglio linfático do indivíduo, em que a um ou mais agentes compreendem dois ou mais de: (a) uma pluralidade de células derivadas da medula óssea, uma pluralidade de células estromais, ou uma combinação das mesmas; (b) um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas; ou (c) um agente que promove inflamação.

83. Método para gerar um tecido ectópico em um indivíduo, compreendendo introduzir uma ou mais células em um gânglio linfático do indivíduo e fornecer um ou mais agentes que promovem a formação do tecido ectópico.

84. Método, de acordo com a reivindicação 83, em que a um ou mais agentes que promovem a formação de tecido ectópico compreendem células derivadas da medula óssea, células estromais ou ambas.

85. Método, de acordo com a reivindicação 83 ou 84, em que a um ou mais agentes compreendem células estromais.

86. Método, de acordo com a reivindicação 83, 84 ou 85, em que as células estromais compreendem células de fibroblasto.

87. Método, de acordo com a reivindicação 84, 85 ou 86, em que as células estromais expressam podoplanina, NIK, LTβR ou uma combinação das mesmas.

88. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 a 87, em que as células estromais são tratadas com um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos.

89. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83 a 88, em que a um ou mais agentes que promovem a formação de tecido ectópico é um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas

90. Método, de acordo com a reivindicação 88 ou 89, em que o ativador é um ativador de LTβR, NIK ou uma combinação dos mesmos.

91. Método, de acordo com a reivindicação 88 ou 89, em que o ativador é um ativador de uma via de sinalização NF-kB não canônica.

92. Método, de acordo com a reivindicação 88, 89, 90 ou 91, em que a ativação da via de sinalização de LTβR, ativação da via de sinalização de NIK, ativação da via de sinalização NF-kB não canônica ou uma combinação das mesmas promove proliferação da uma ou mais células, vascularização

do tecido ectópico ou uma combinação das mesmas.

93. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83 a 92, em que a um ou mais agentes que promovem a formação de tecido ectópico compreendem um agente que promove inflamação.

94. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83 a 92, compreendendo ainda induzir inflamação no indivíduo.

95. Método, de acordo com a reivindicação 94, em que a inflamação é induzida pela administração de um agente que promove inflamação ao indivíduo.

96. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 95, em que a inflamação é induzida antes de introduzir a uma ou mais células no gânglio linfático do indivíduo.

97. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83 a 96, em que a uma ou mais células compreendem hepatócitos e o tecido ectópico compreende tecido hepático ectópico.

98. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83 a 96, em que a uma ou mais células compreendem células renais, um ou mais fragmentos do tecido renal ou uma combinação dos mesmos, e o tecido ectópico compreende tecido renal ectópico.

99. Método de tratar um indivíduo em necessidade de função hepática aumentada, compreendendo administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de hepatócitos, e promover a formação de tecido hepático ectópico em um gânglio linfático do indivíduo.

100. Método, de acordo com a reivindicação 99, em

que a formação de tecido hepático ectópico no gânglio linfático é promovida pela administração dos hepatócitos localmente à região anatômica do gânglio linfático.

101. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 100, em que a formação de tecido hepático ectópico no gânglio linfático é promovida pela coadministração de uma ou mais das células derivadas da medula óssea ou células estromais.

102. Método, de acordo com a reivindicação 101, em que células estromais são coadministradas.

103. Método, de acordo com a reivindicação 101 ou 102, em que as células estromais compreendem células de fibroblasto.

104. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 a 103, em que as células estromais expressam podoplanina, NIK, LTβR ou uma combinação das mesmas.

105. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 104, em que a formação de tecido hepático ectópico no gânglio linfático é promovida pela coadministração de um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos.

106. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 105, em que a formação de tecido hepático ectópico no gânglio linfático é promovida pela coadministração de um ativador de uma via de sinalização NF-kB não canônica.

107. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 106 compreendendo ainda induzir

inflamação no indivíduo.

108. Método, de acordo com a reivindicação 107, em que a inflamação é induzida pela administração de um agente que promove inflamação ao indivíduo.

109. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 107 a 108, em que a inflamação é induzida antes da administração dos hepatócitos.

110. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99 a 106, em que a formação de tecido hepático ectópico no gânglio linfático é promovida administrando-se ao indivíduo um agente que promove inflamação.

111. Método, de acordo com a reivindicação 110, em que o agente que promove inflamação é administrado ao indivíduo antes de administrar os hepatócitos.

112. Método de gerar um fígado ectópico compreendendo introduzir, em um gânglio linfático, um ou mais hepatócitos, e fornecer pelo menos um agente que promove a formação de tecido hepático ectópico.

113. Método, de acordo com a reivindicação 112, em que o método é praticado *in vivo*.

114. Método, de acordo com a reivindicação 112, em que o método é praticado *in vitro*.

115. Método, de acordo com a reivindicação 112, 113 ou 114, em que o agente que promove a formação de tecido hepático ectópico compreende células derivadas da medula óssea, células estromais ou uma combinação das mesmas.

116. Método, de acordo com a reivindicação 115, em que o agente compreende células estromais.

117. Método, de acordo com a reivindicação 115 ou 116, em que as células estromais compreendem células de fibroblasto.

118. Método, de acordo com a reivindicação 115, 116 ou 117, em que as células estromais expressam uma podoplanina, NIK, LTβR ou uma combinação das mesmas.

119. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 115 a 118, em que as células estromais são tratadas com um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos.

120. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 112 a 119, em que o agente que promove a formação de tecido ectópico compreende um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK, um agente que promove inflamação ou uma combinação das mesmas

121. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 112 a 119, compreendendo ainda induzir inflamação.

122. Método, de acordo com a reivindicação 121, em que a inflamação é induzida pela administração de um agente que promove inflamação.

123. Método de tratar um indivíduo em necessidade de função renal aumentada, compreendendo administrar, ao indivíduo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de células renais, um fragmento de tecido renal ou uma combinação das mesmas; e promover a formação de um tecido renal ectópico em um gânglio linfático do indivíduo.

124. Método, de acordo com a reivindicação 123,

em que a formação de tecido renal ectópico no gânglio linfático é promovida pela administração das células renais localmente à região anatômica do gânglio linfático.

125. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 123 a 124, em que a formação de tecido renal ectópico no gânglio linfático é promovida pela coadministração de células derivadas da medula óssea, células estromais ou uma combinação das mesmas.

126. Método, de acordo com a reivindicação 125, em que as células estromais são coadministradas.

127. Método, de acordo com a reivindicação 125 ou 126, em que as células estromais compreendem células de fibroblasto.

128. Método, de acordo com qualquer uma de uma das reivindicações 125 a 127, em que as células estromais expressam podoplanina, NIK, LTβR ou uma combinação das mesmas.

129. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 123 a 128, em que a formação de tecido renal ectópico no gânglio linfático é promovida pela coadministração de um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos.

130. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 123 a 129, em que a formação de tecido renal ectópico no gânglio linfático é promovida pela coadministração de um ativador de uma via de sinalização NF-kB não canônica.

131. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 123 a 130, em que a formação de tecido renal

ectópico no gânglio linfático é promovida administrando-se um agente que promove inflamação.

132. Método, de acordo com a reivindicação 131, em que o agente que promove inflamação é administrado antes de administrar as células renais, o fragmento de tecido renal ou a combinação dos mesmos.

133. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 123 a 131, compreendendo ainda induzir inflamação no indivíduo.

134. Método, de acordo com a reivindicação 133, em que a inflamação é induzida pela administração de um agente que promove inflamação ao indivíduo.

135. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 131 a 134, em que a inflamação é induzida antes de introduzir uma ou mais células em um gânglio linfático do indivíduo.

136. Método de gerar tecido renal ectópico compreendendo introduzir, a um gânglio linfático, uma ou mais células renais, um fragmento de tecido renal ou uma combinação das mesmas, e fornecer pelo menos um agente que promove a formação de tecido renal ectópico.

137. Método, de acordo com a reivindicação 136, em que o método é praticado *in vivo*.

138. Método, de acordo com a reivindicação 136, em que o método é praticado *in vitro*.

139. Método, de acordo com a reivindicação 136, 137 ou 138, em que o agente que promove a formação de tecido hepático ectópico compreende células derivadas da medula óssea, células estromais, ou uma combinação das mesmas.

140. Método, de acordo com a reivindicação 139, em que o agente compreende as células estromais.

141. Método, de acordo com a reivindicação 139 ou 140, em que as células estromais compreendem células de fibroblasto.

142. Método, de acordo com a reivindicação 139, 140 ou 141, em que as células estromais expressam podoplanina, NIK, LTβR ou uma combinação das mesmas.

143. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 139 a 142, em que as células estromais são tratadas com um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas.

144. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 136 a 143, em que o agente que promove a formação de tecido ectópico compreende um ativador de uma via de sinalização de LTβR, uma via de sinalização de NIK, um agente que promove inflamação ou uma combinação dos mesmos.

145. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 136 a 142, compreendendo ainda induzir inflamação no indivíduo.

146. Método, de acordo com a reivindicação 145, em que a inflamação é induzida administrando-se um agente que promove inflamação ao indivíduo.

147. Método para gerar um tecido renal ectópico em um indivíduo, compreendendo introduzir células compreendendo uma ou mais células renais e uma ou mais células estromais a um gânglio linfático do indivíduo e fornecendo um ativador de uma via de sinalização de LTβR,

um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos; em que a ativação da via de sinalização de LTβR, ativação da via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas na uma ou mais células estromais promovem a formação do tecido renal ectópico.

148. Método para gerar um tecido hepático ectópico em um indivíduo, compreendendo introduzir células compreendendo um ou mais hepatócitos e uma ou mais células estromais a um gânglio linfático do indivíduo e fornecer um ativador de uma via de sinalização de LTβR, um ativador de uma via de sinalização de NIK ou uma combinação dos mesmos; em que a ativação da via de sinalização de LTβR, ativação da via de sinalização de NIK ou uma combinação das mesmas na uma ou mais células estromais promovem a formação do tecido hepático ectópico.

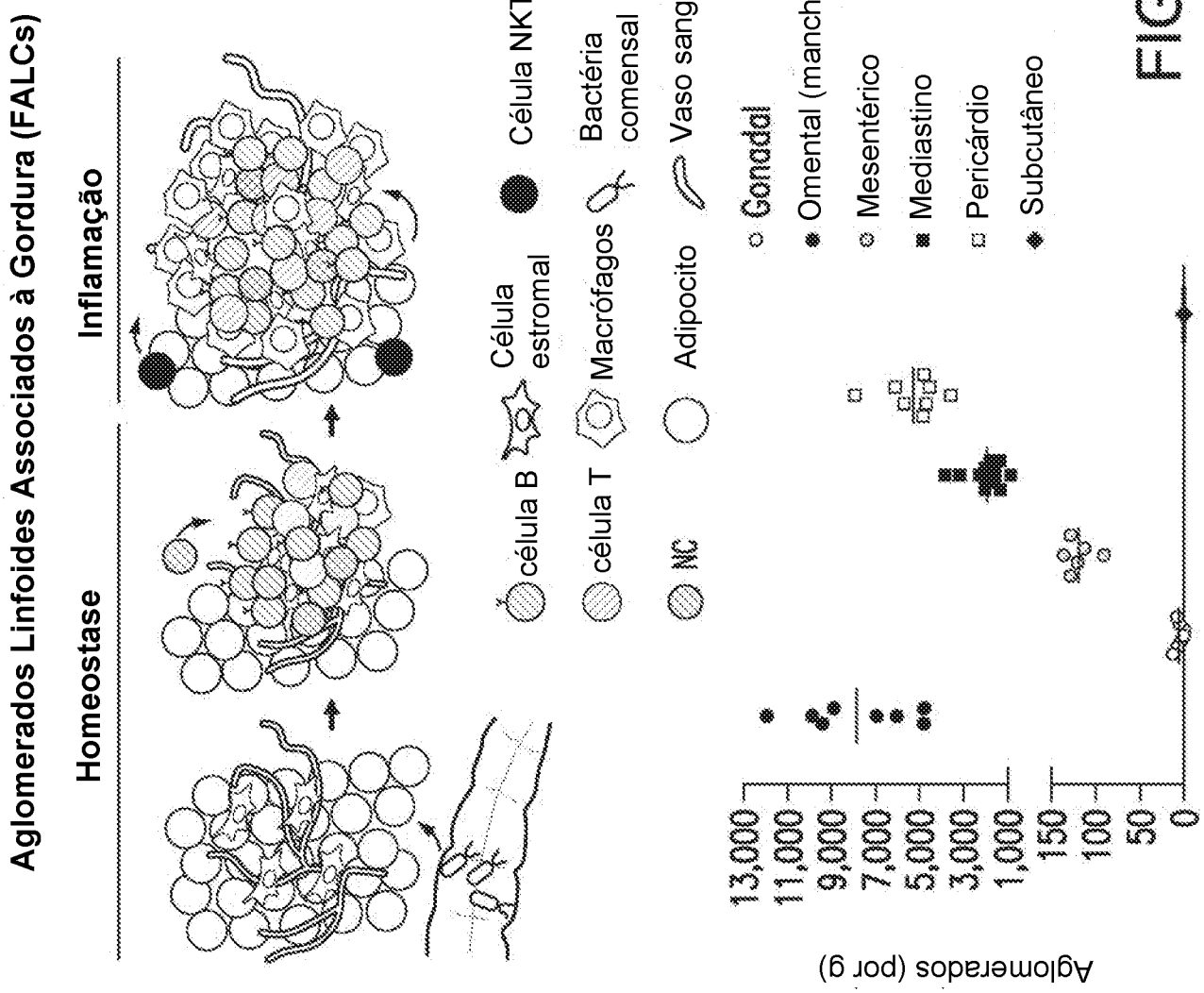
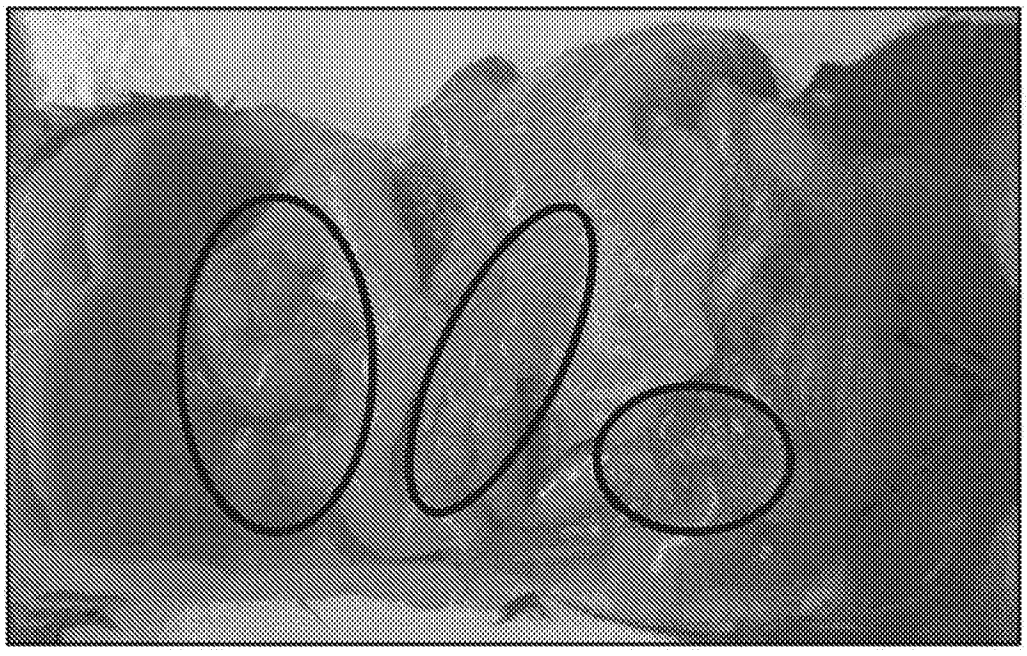

Aglomerados Linfoides Associados à Gordura (FALCs)
Homeostase
Inflamação
célula B
Célula estromal
Célula NKT
célula T
Macrófagos
Bactéria comensal
NC
Adipocito
Vaso sanguíneo
Aglomerados (por g)
13,000
11,000
9,000
7,000
5,000
3,000
1,000
150
100
50
0
Conodal
Omental (manchas lácteas)
Mesentérico
Mediastino
Pericárdio
Subcutâneo

FIG. 1



Camundongo

FIG. 2A

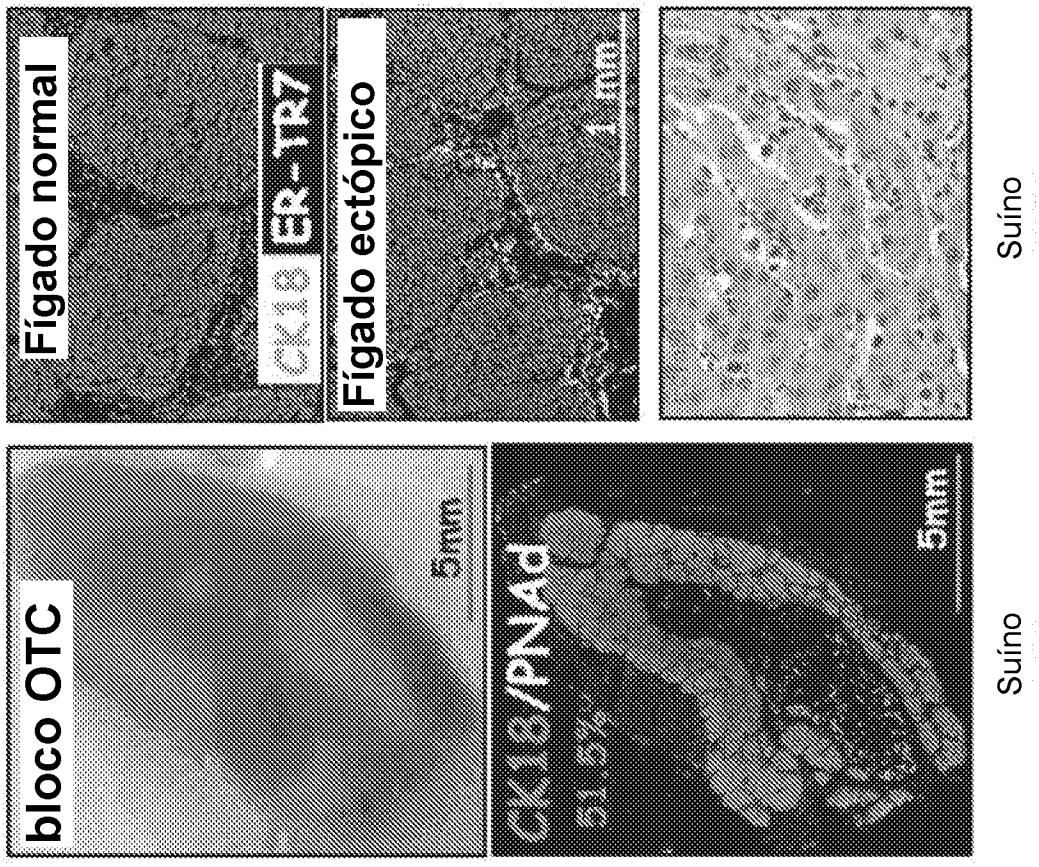
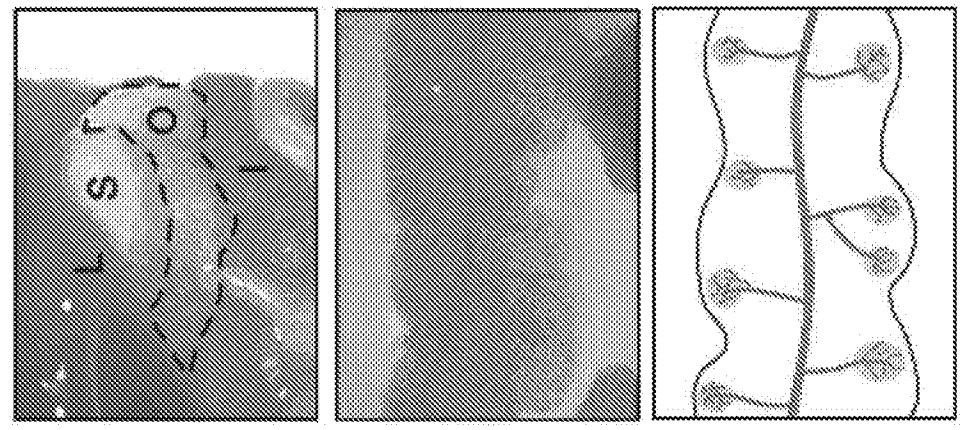
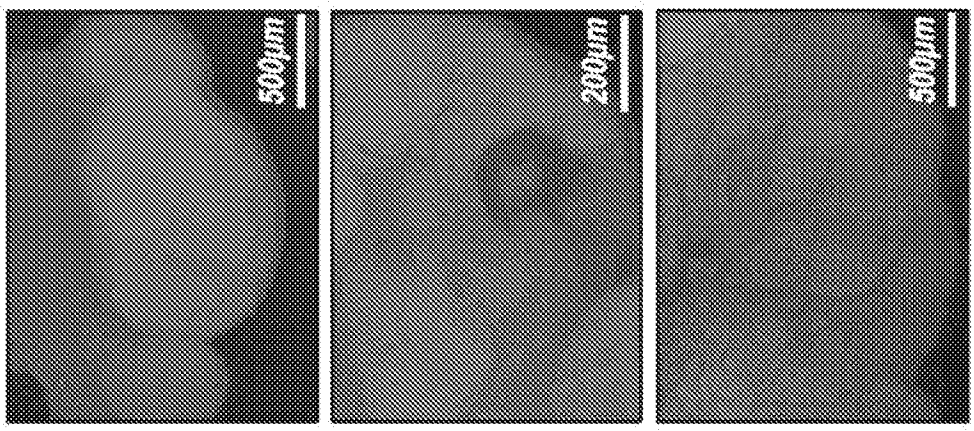


FIG. 2B



Camundongo

FIG. 2C



Camundongo

FIG. 2D

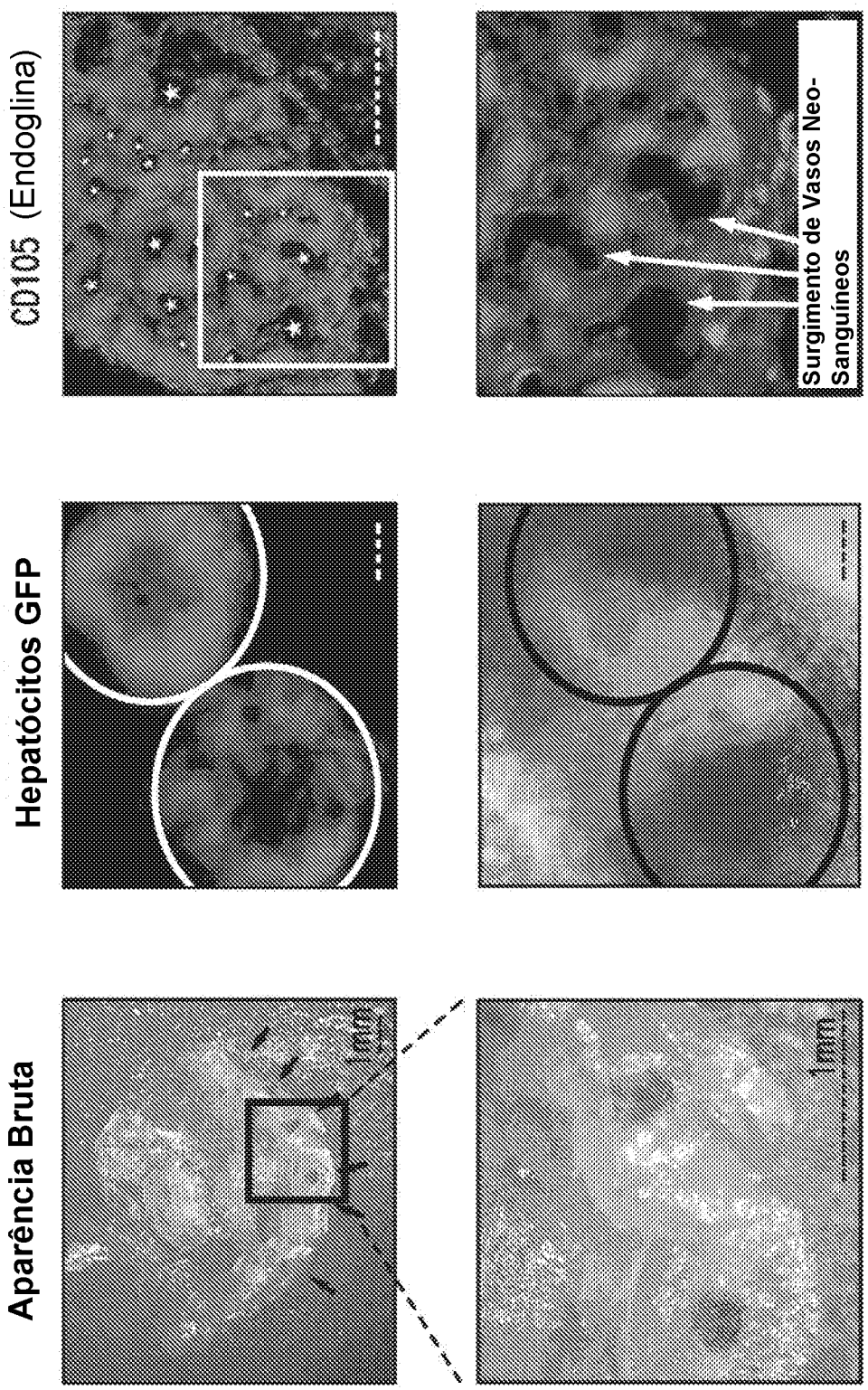

Aparência Bruta
Hepatócitos GFP
CD105 (Endoglina)
1mm
1mm
Surgimento de Vasos Neo-Sanguíneos

FIG. 3

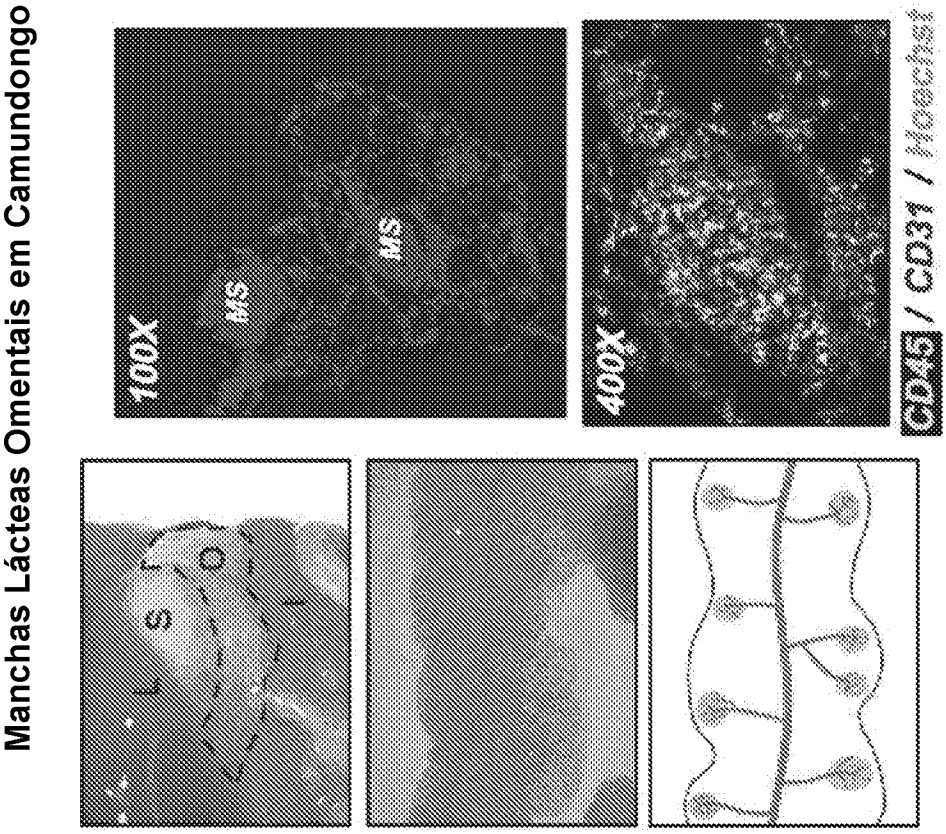

Manchas Lácteas Omentais em Camundongo
100X
MS
MS
400X
CD45 / CD31 / Hoechst

FIG. 4

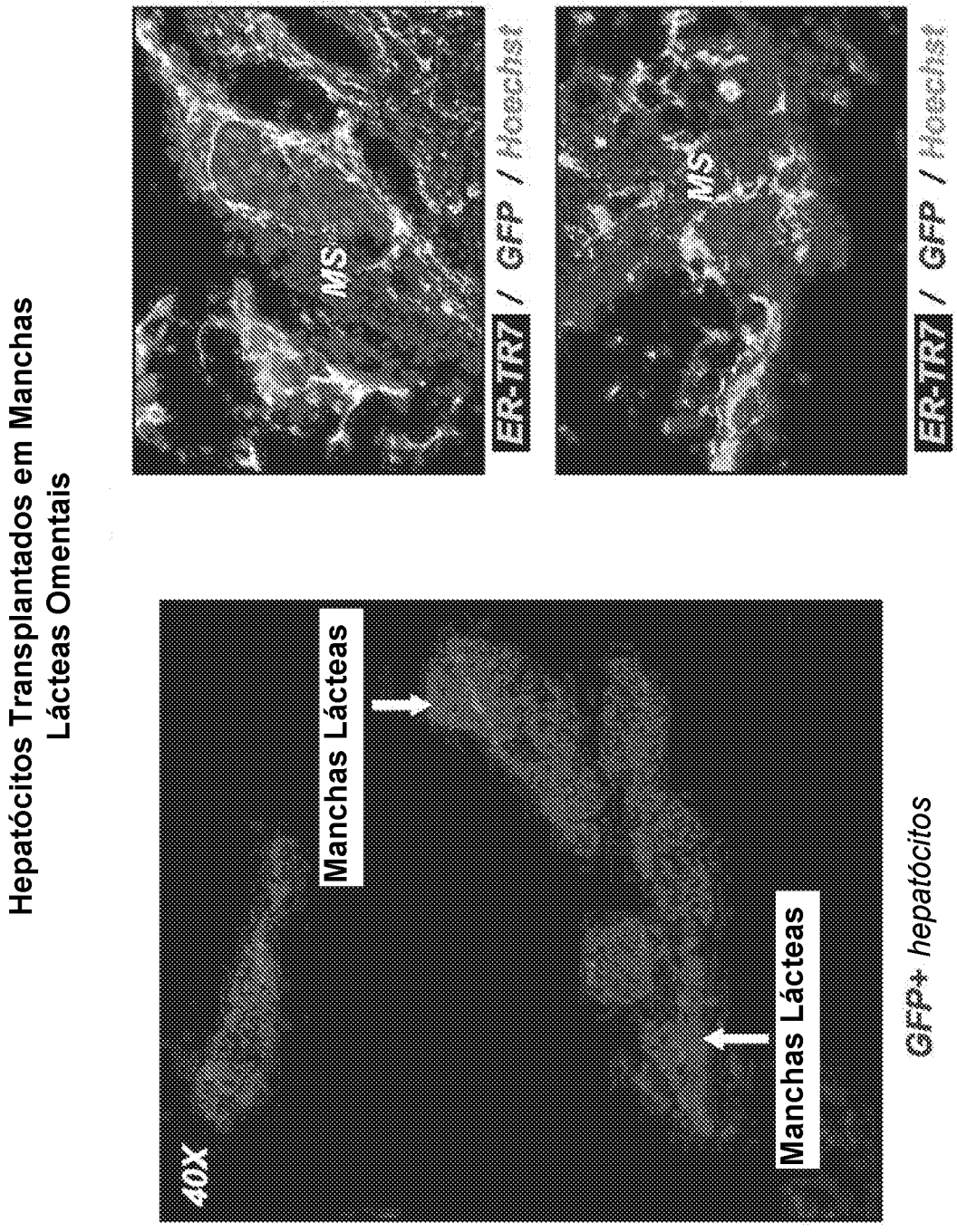

Hepatócitos Transplantados em Manchas Lácteas Omentais
40X
Manchas Lácteas
Manchas Lácteas
GFP+ hepatócitos
MS
ER-TR7 / GFP / Hoechst
MS
ER-TR7 / GFP / Hoechst

FIG. 5

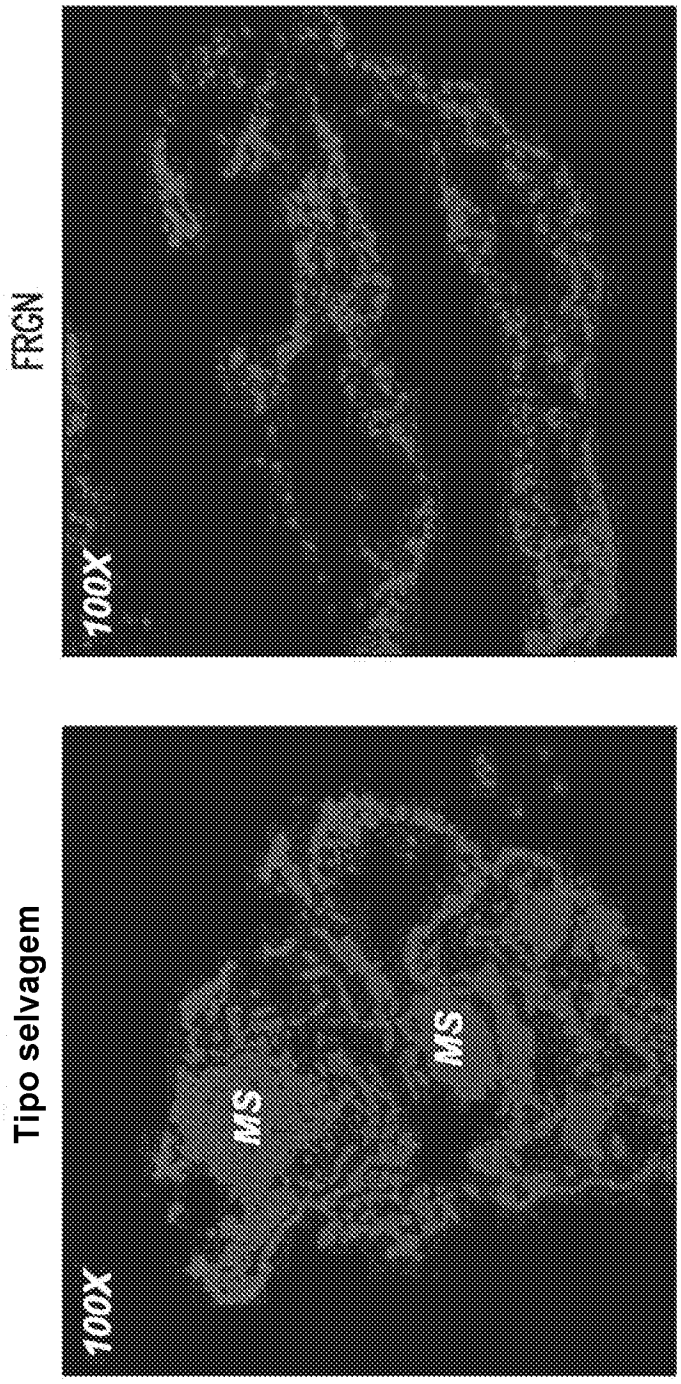


FIG. 6

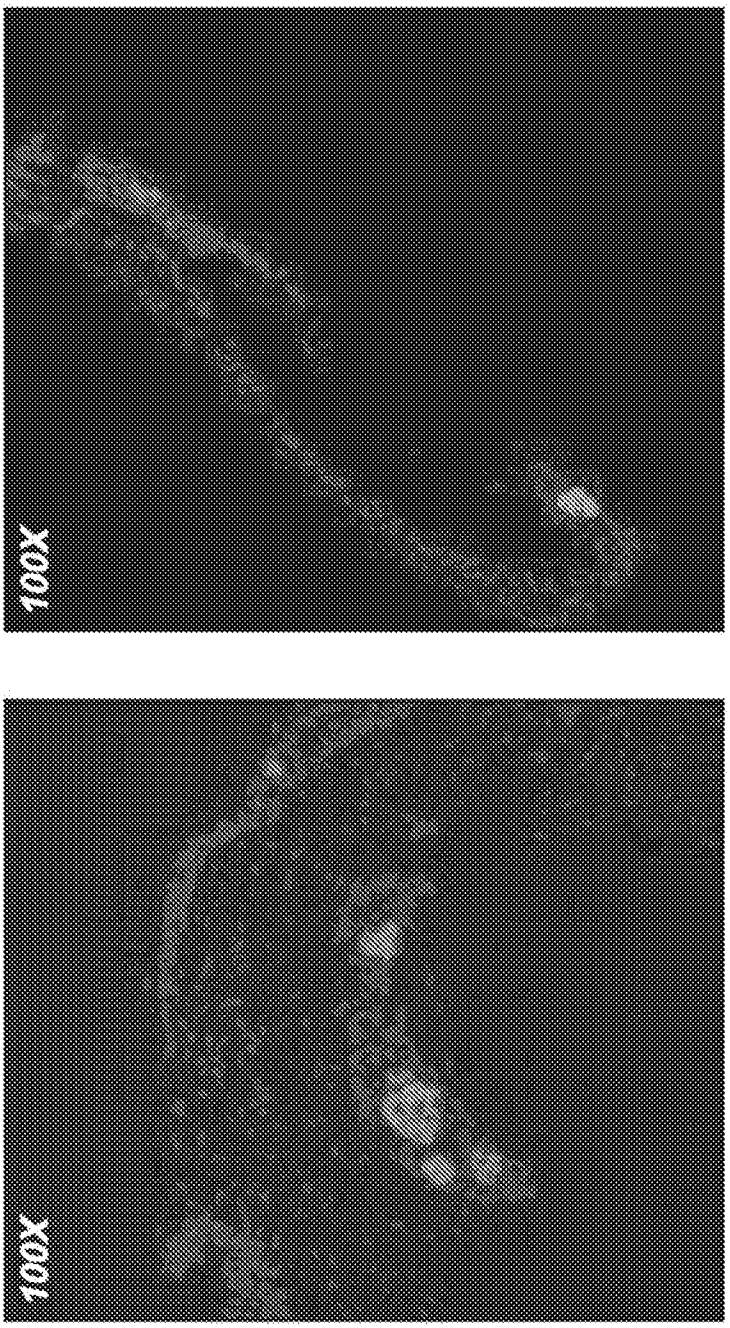


FIG. 7

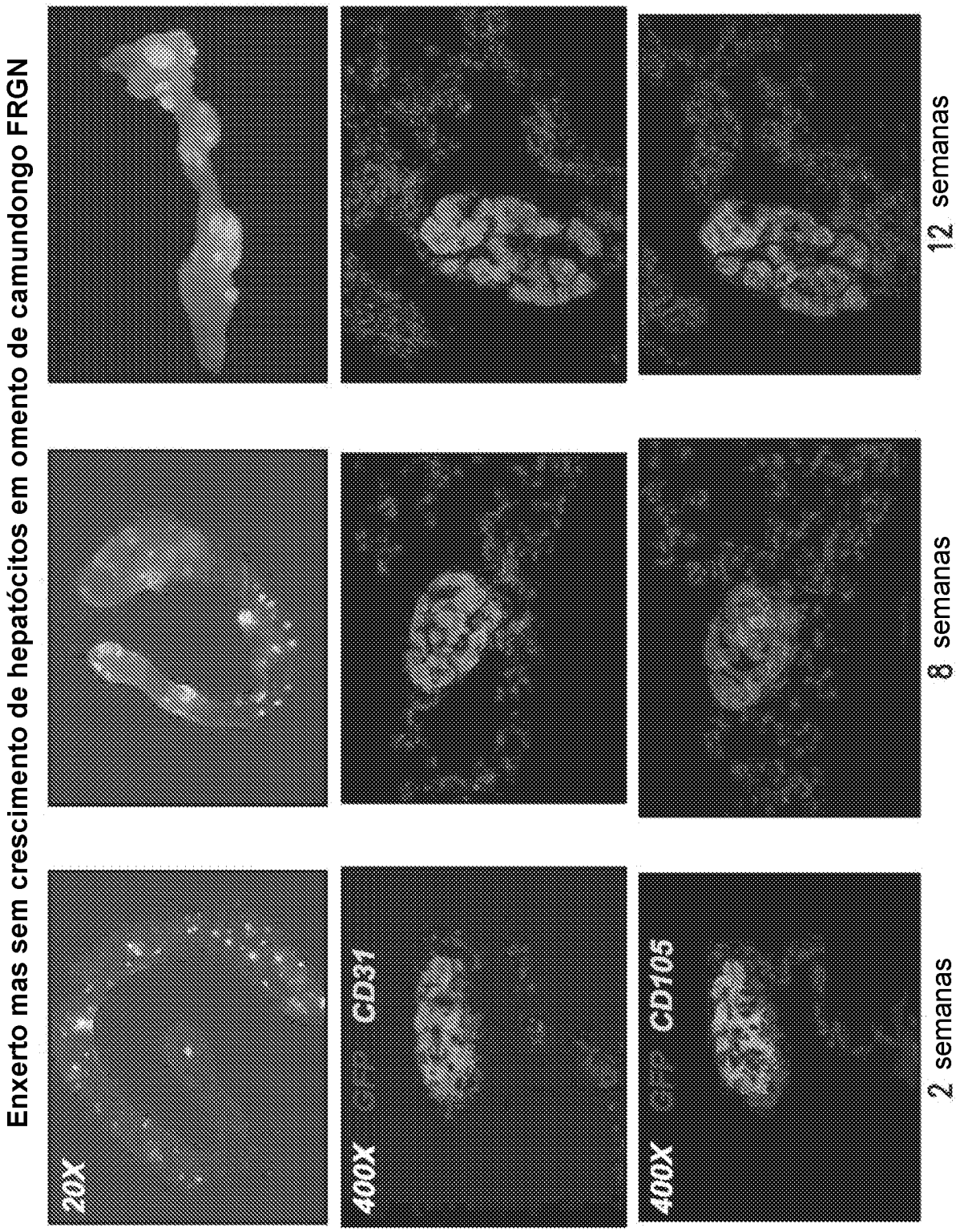

Enxerto mas sem crescimento de hepatócitos em omento de camundongo FRGN
20X
400X
CD31
400X
CD105
2 semanas
8 semanas
12 semanas

FIG. 8

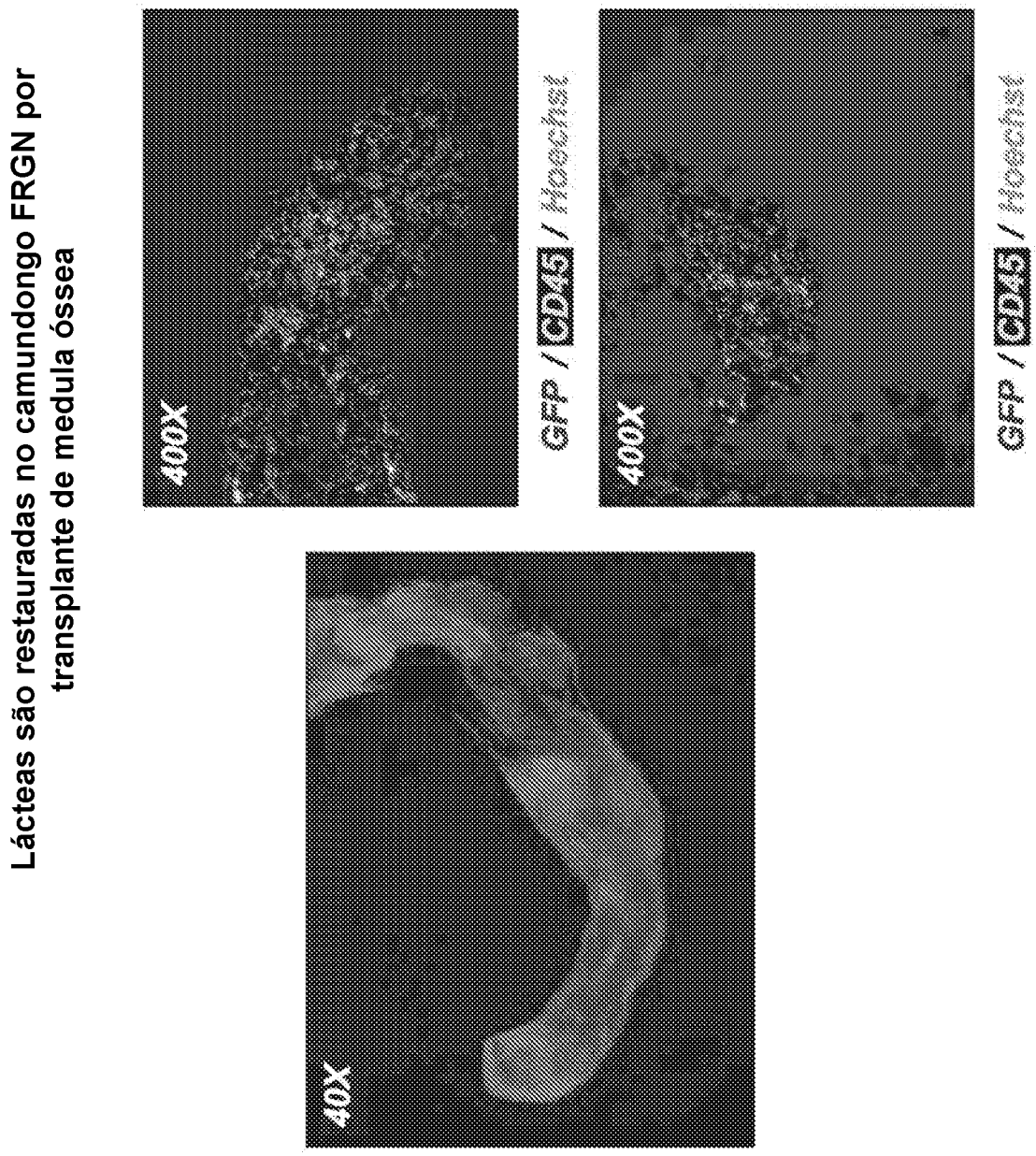

Lácteas são restauradas no camundongo FRGN por transplante de medula óssea
400X
GFP / CD45 / Hoechst
400X
GFP / CD45 / Hoechst
40X

FIG. 9

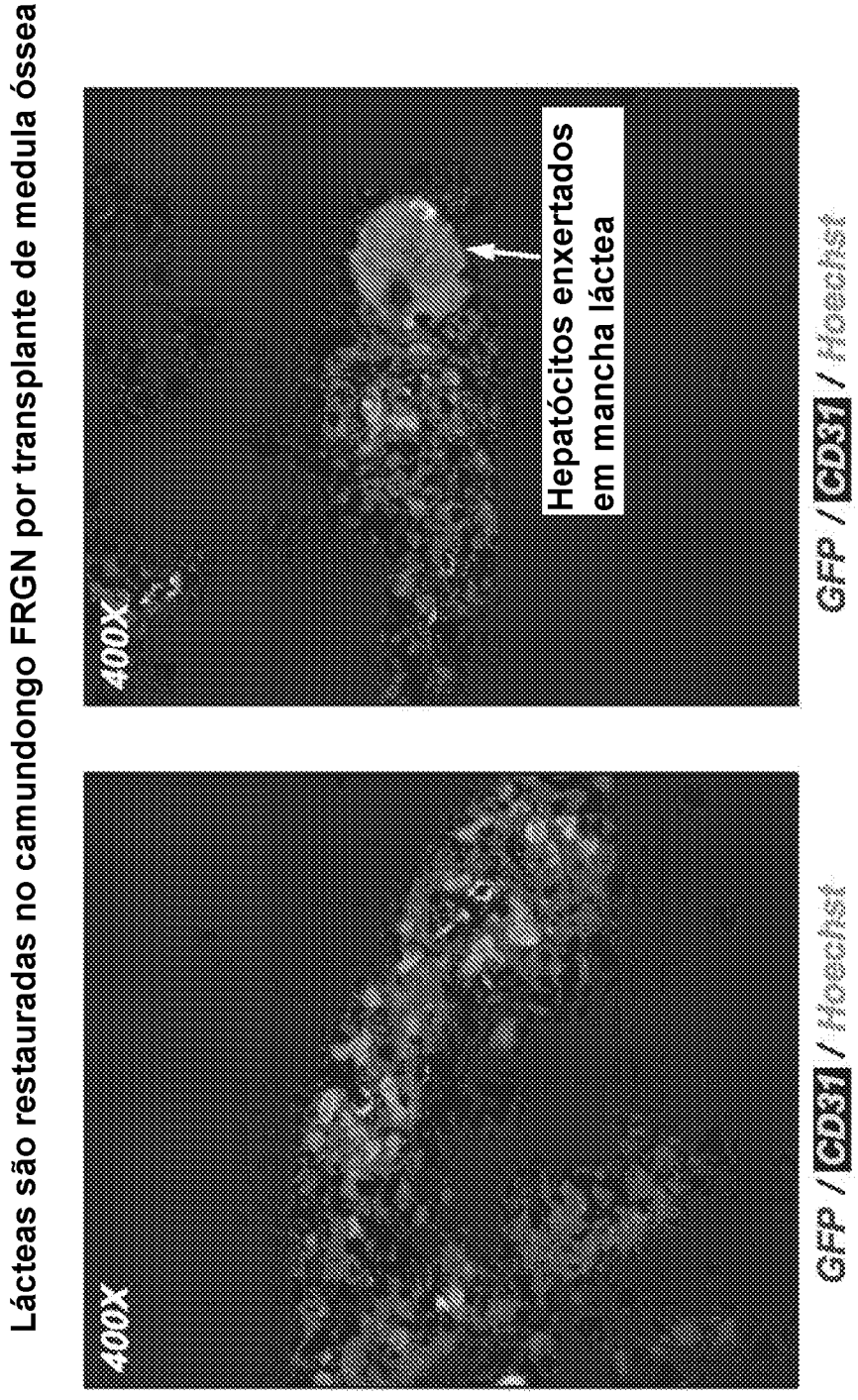

Lácteas são restauradas no camundongo FRGN por transplante de medula óssea
400X
GFP / CD31 / Hoechst
400X
Hepatócitos enxertados em mancha láctea
GFP / CD31 / Hoechst

FIG. 10

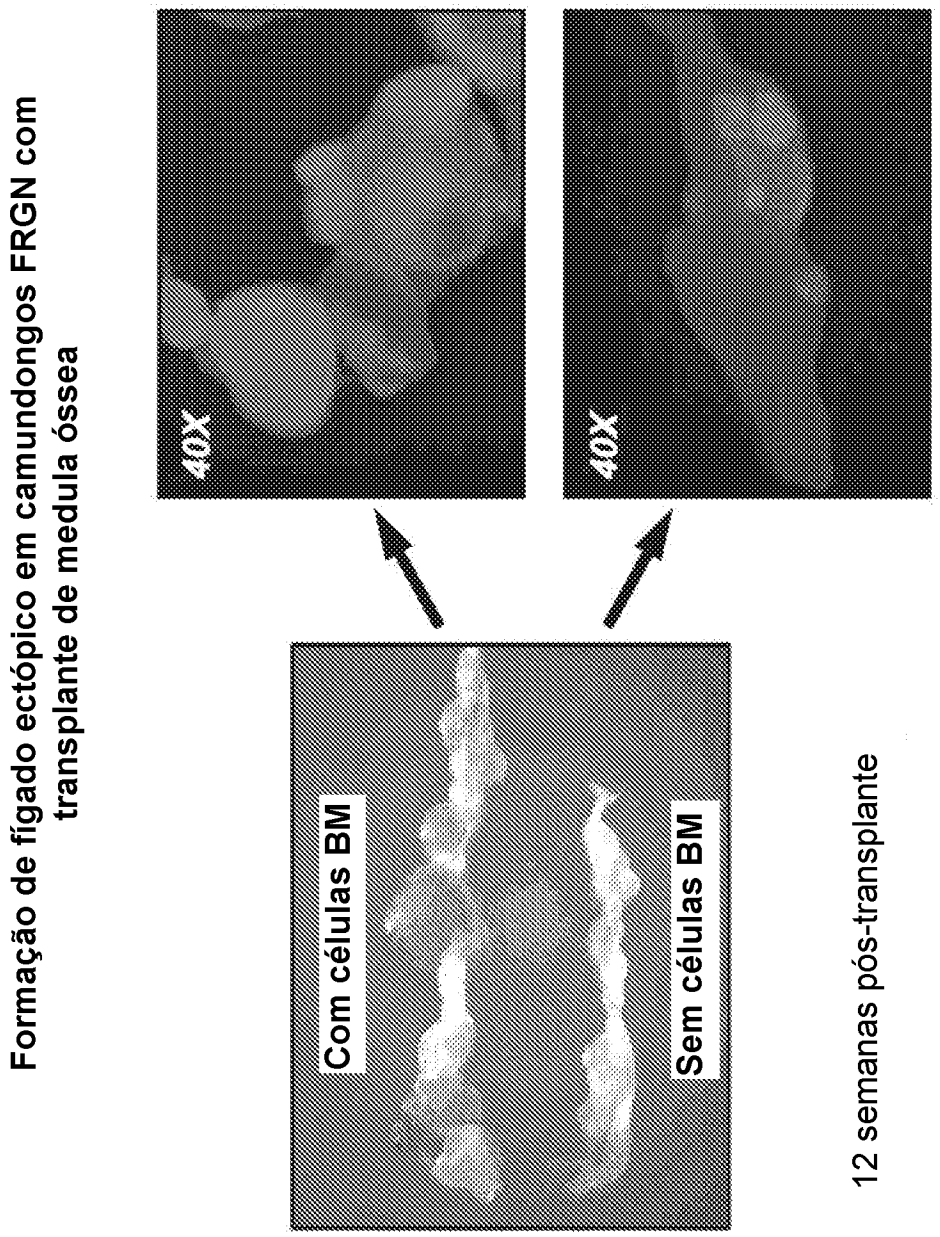

Formação de fígado ectópico em camundongos FRGN com transplante de medula óssea
40X
40X
Com células BM
Sem células BM
12 semanas pós-transplante

FIG. 11

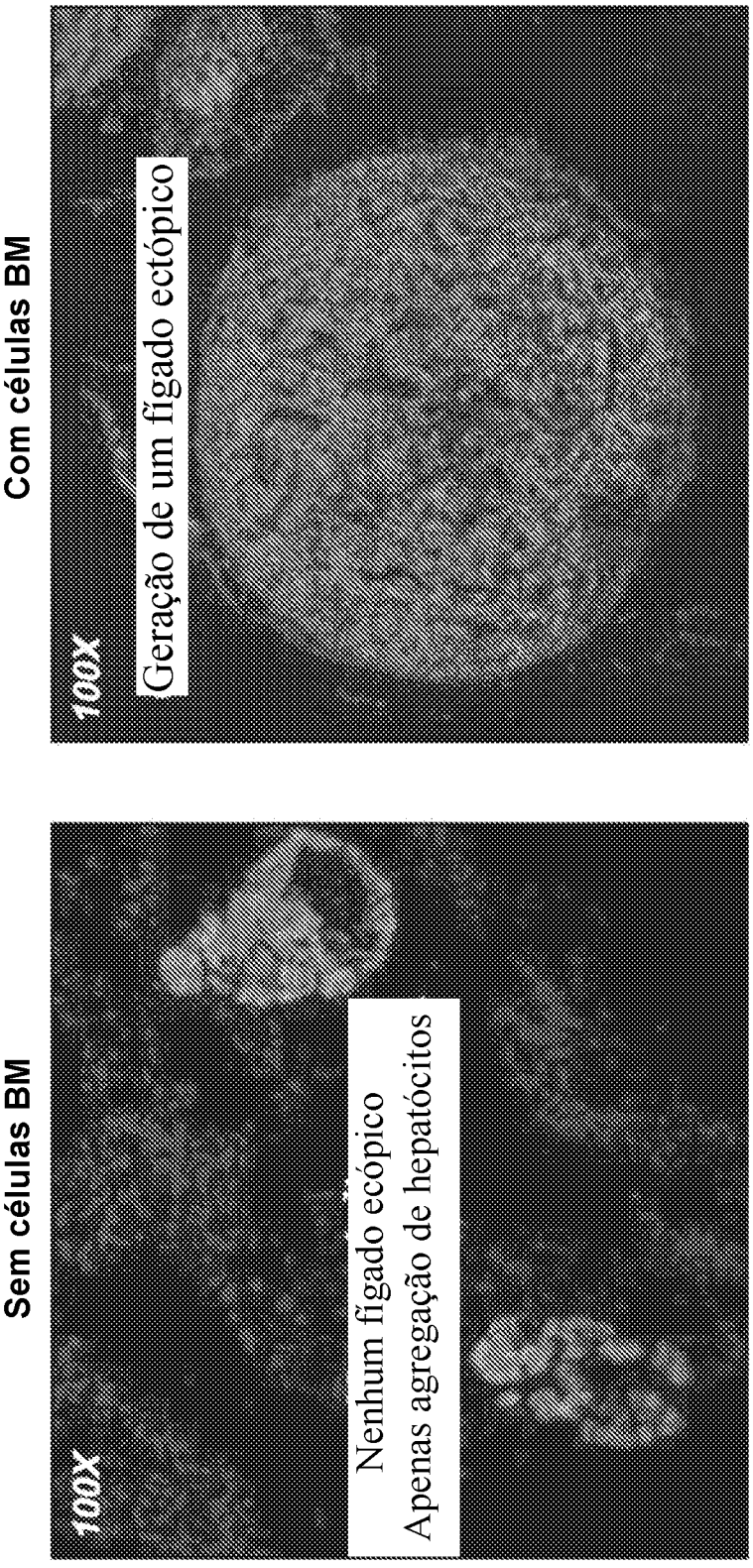

Sem células BM
100X
Nenhum fígado ecópico
Apenas agregação de hepatócitos
Com células BM
100X
Geração de um fígado ectópico

FIG. 12

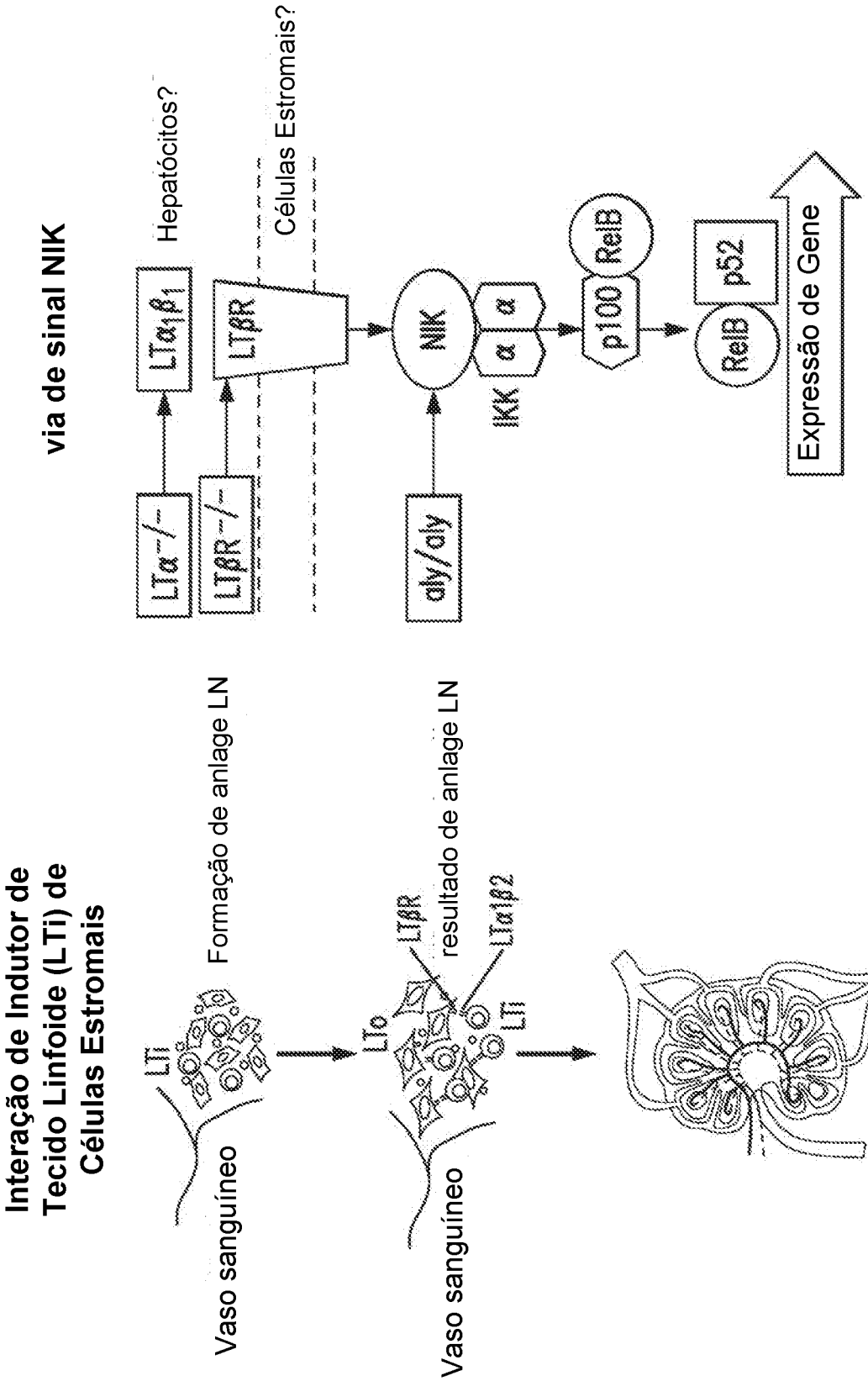

Interação de Indutor de Tecido Linfoide (LTi) de Células Estromais
via de sinal NIK
Vaso sanguíneo
LTi
Formação de anlage LN
LTo
LTβR
LTα1β2
LTi
resultado de anlage LN
Vaso sanguíneo
LTα1β1
LTα−/−
Hepatócitos?
LTβR
LTβR−/−
Células Estromais?
aly/aly
NIK
IKK
α
α
p100
RelB
RelB
p52
Expressão de Gene

FIG. 13

Petição 870190079121, de 15/08/2019, pág. 116/149

Deficiência estrutural do camundongo com Alinfosia de órgãos de linfóide secundários

Aly/Aly: Deficiente para um fator nuclear - cinase induzida por kappB envolvida na transdução de sinal do receptor beta de linfotoxina (LT-betaR) resultando em defeitos estruturais de gânglios linfáticos, mas não manchas lácteas e FALCs

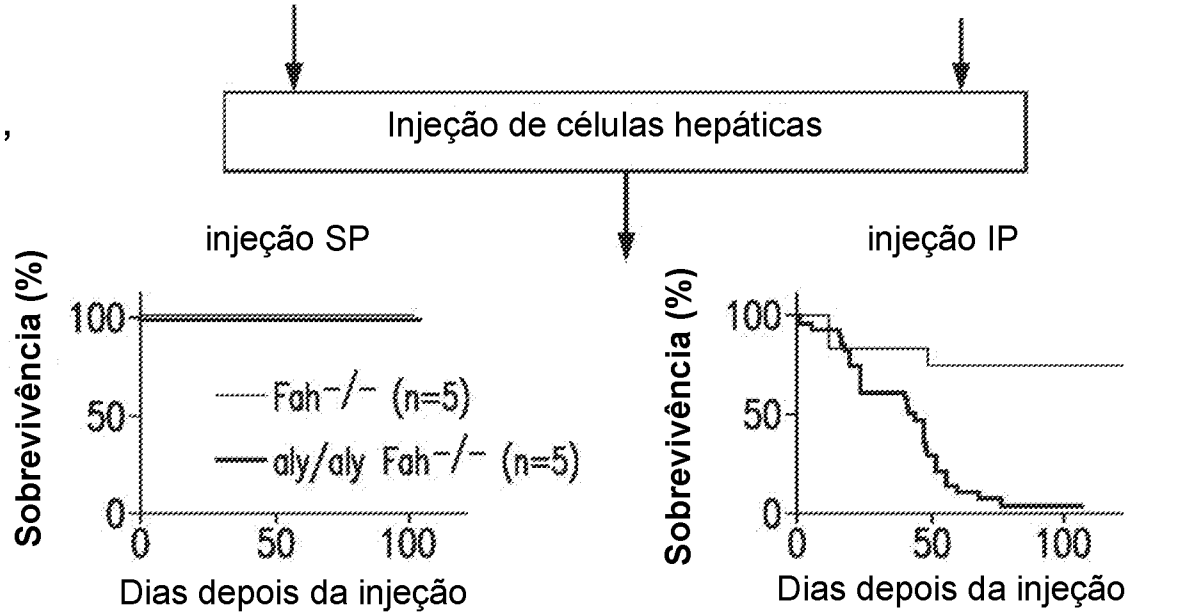
a função NIK é necessária para recuperar o camundongo Fah-/- por injeção IP



camundongo Fah-/- aly/aly



Controle de camundongo Fah-/-



Este resultado implica um mecanismo diferente para a capacitação de hepatócitos e o crescimento de manchas lácteas e FALCs

FIG. 14

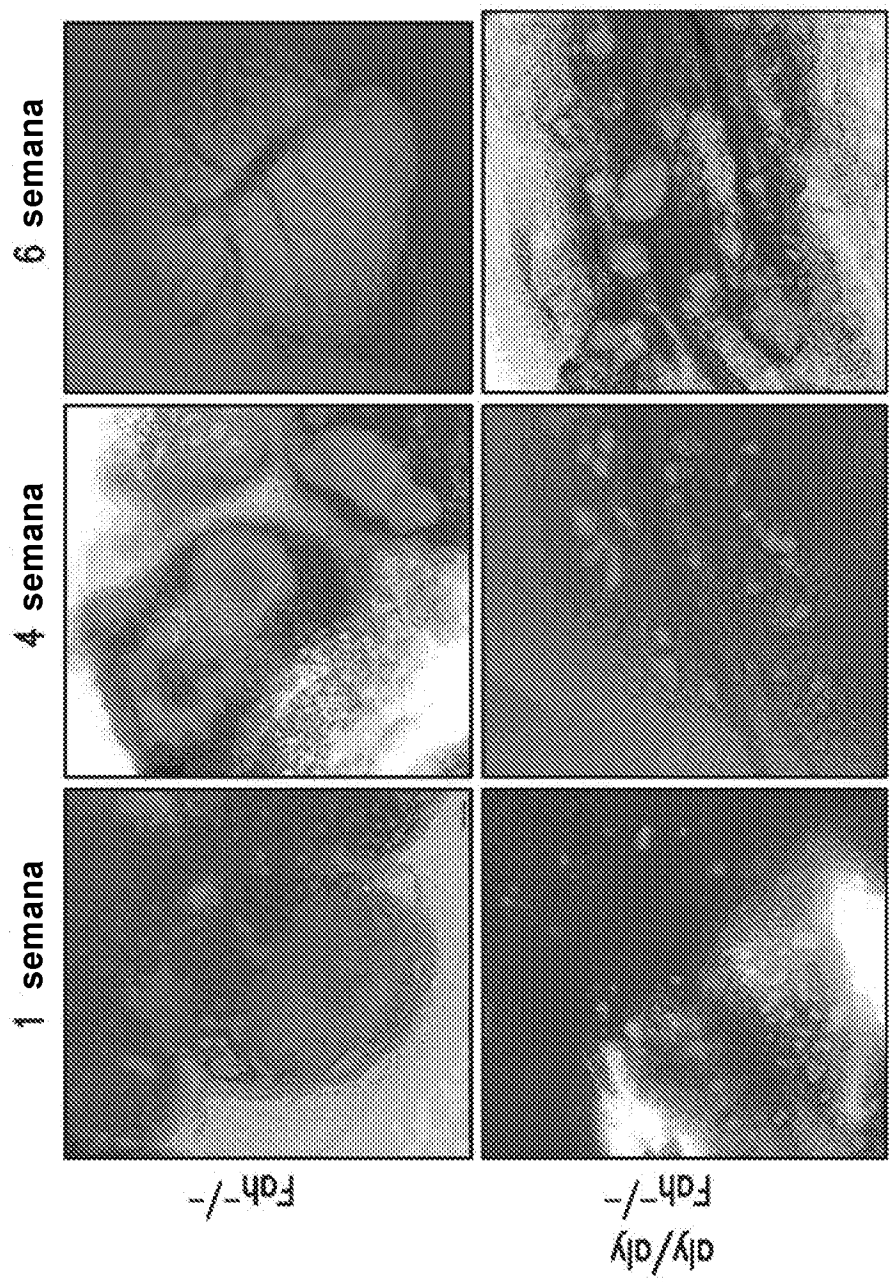


FIG. 15

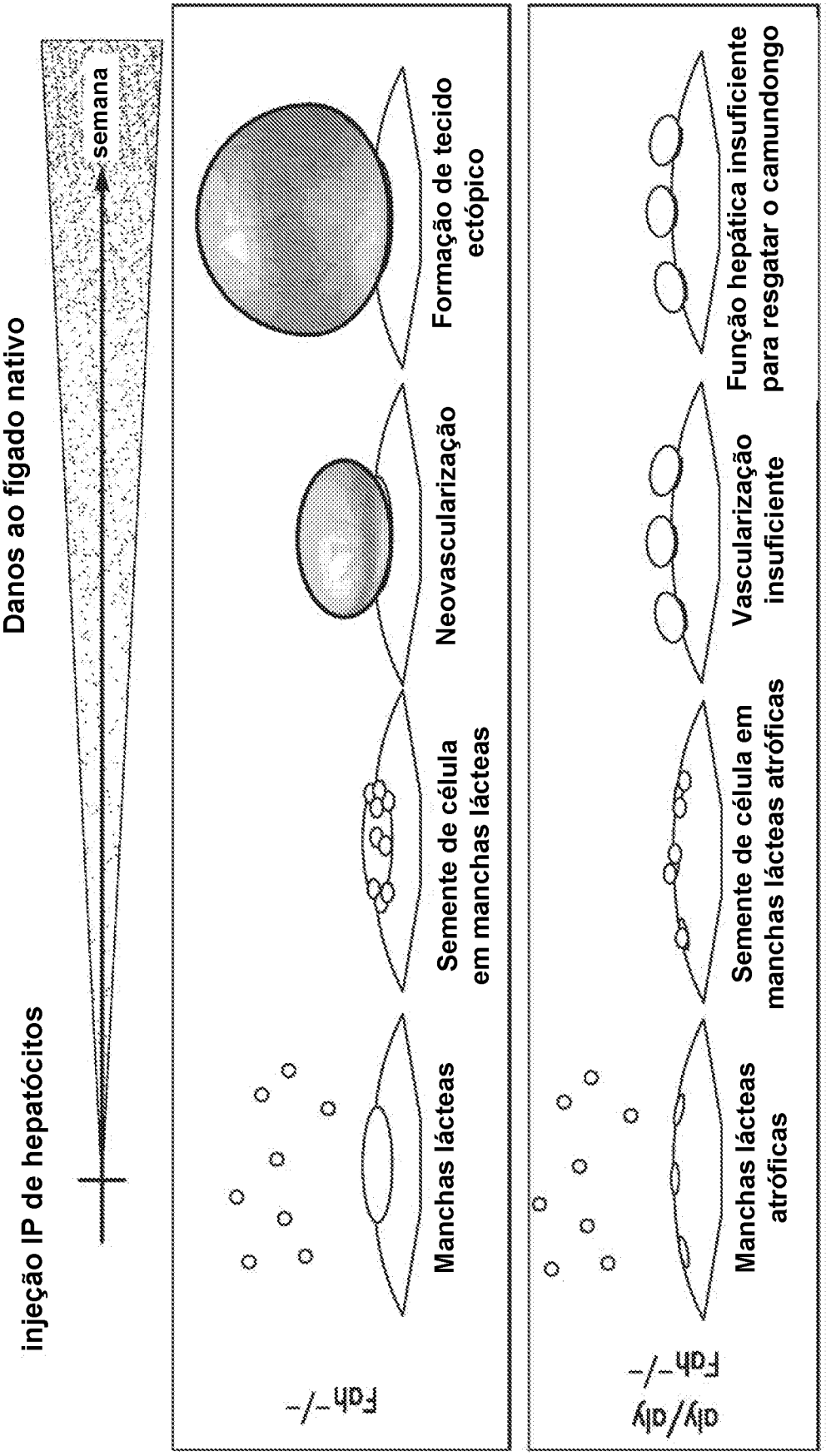

Danos ao fígado nativo
injeção IP de hepatócitos
semana
Fah-/-
Manchas lácteas
Semente de célula em manchas lácteas
Neovascularização
Formação de tecido ectópico
aly/aly Fah-/-
Manchas lácteas atróficas
Semente de célula em manchas lácteas atróficas
Vascularização insuficiente
Função hepática insuficiente para resgatar o camundongo

FIG. 16

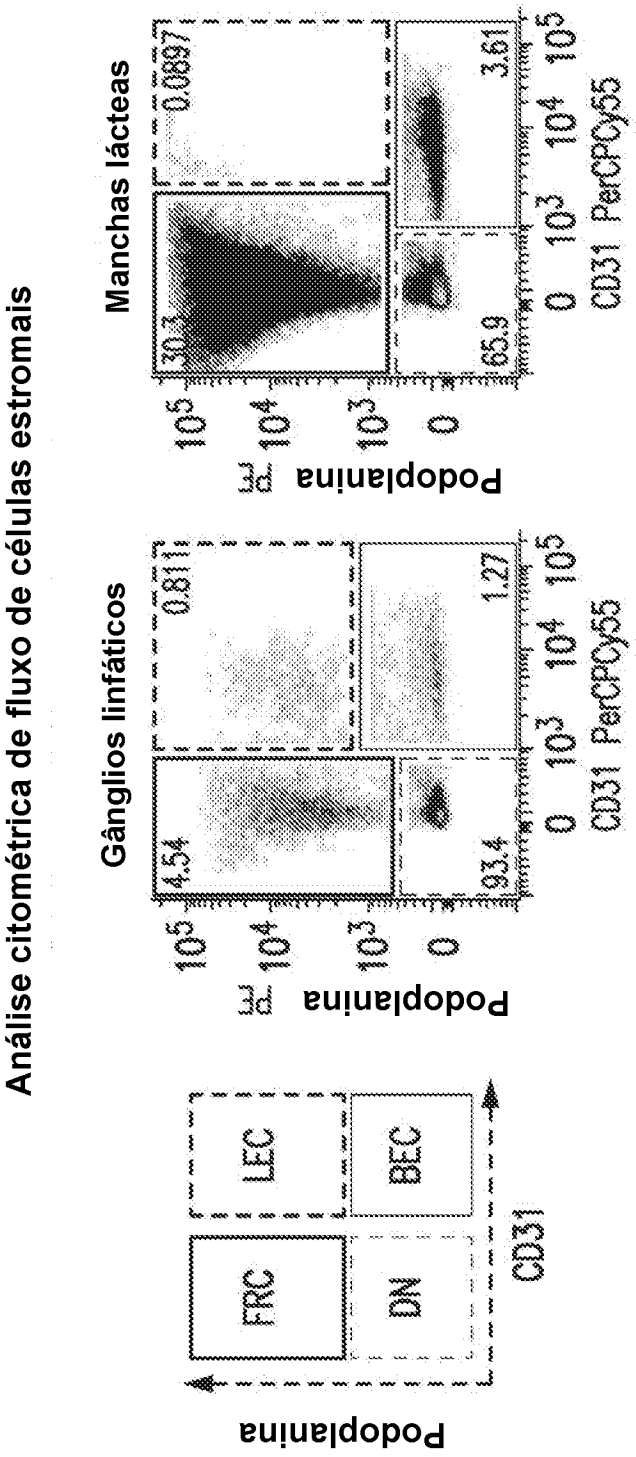

Análise citométrica de fluxo de células estromais
Manchas lácteas
Gânglios linfáticos
Podoplanina
CD31 PerCPCy55
FRC
LEC
DN
BEC
CD31
30.3
65.9
0.0897
3.61
4.54
93.4
0.811
1.27

FIG. 17A

Petição 870190079121, de 15/08/2019, pág. 120/149

Hepatócitos em proximidade com células estromais ER-TR7

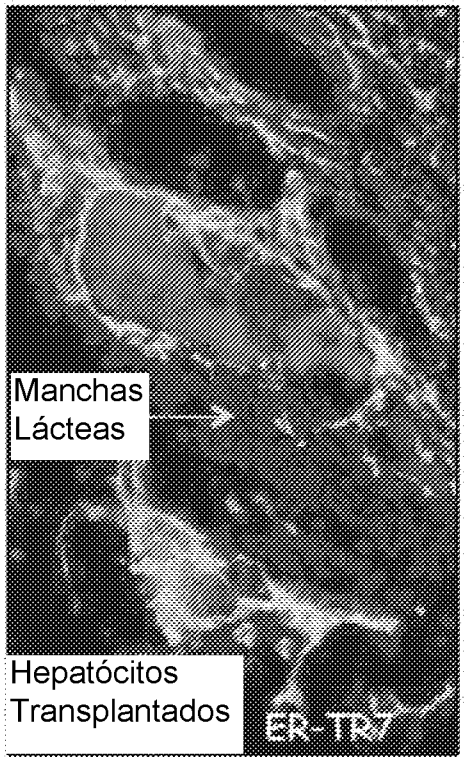


FIG. 17B

Células estromais isoladas pelo fluxo migrarão de voltar para o omento depois da injeção intraperitoneal

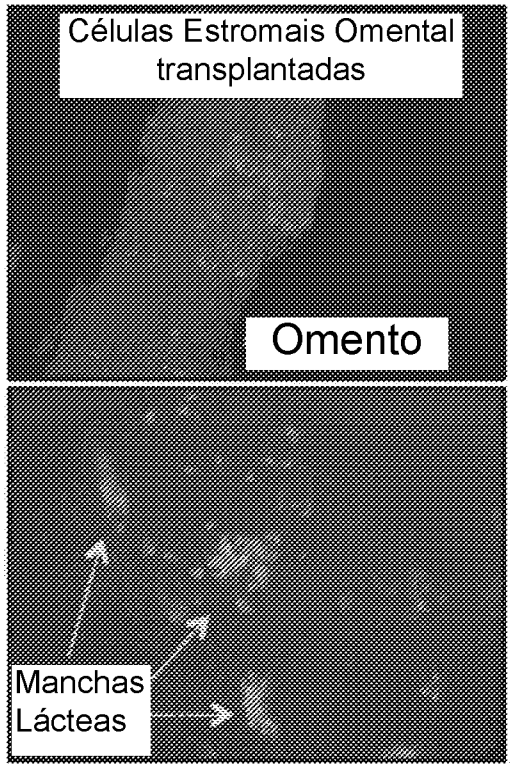


FIG. 17C

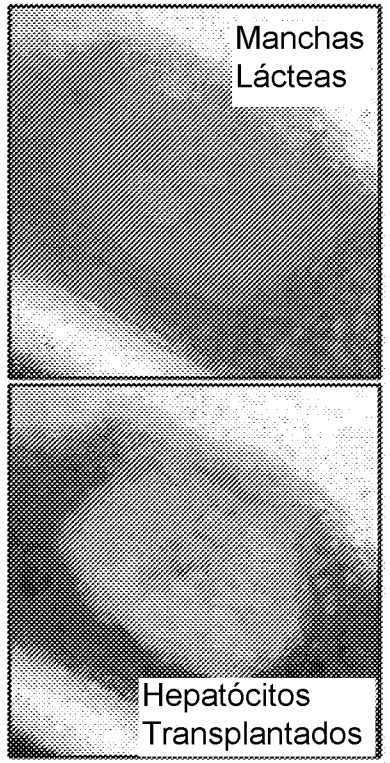


FIG. 17D

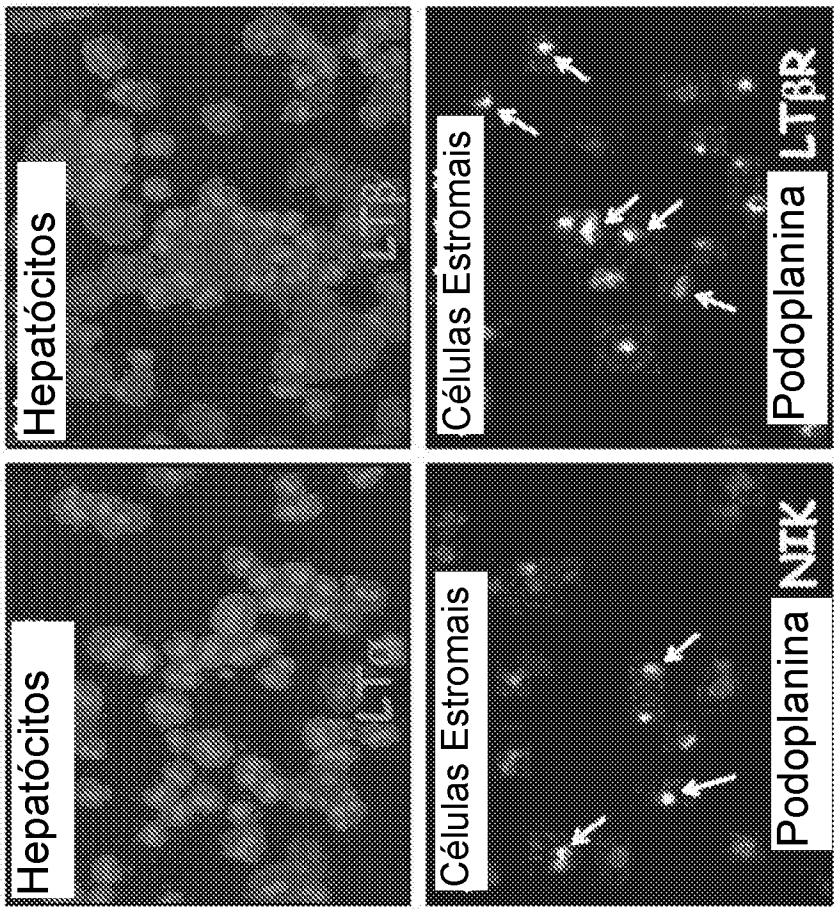

Hepatócitos
Hepatócitos
Células Estromais
Podoplanina NIK
Células Estromais
Podoplanina LTβR

FIG. 18

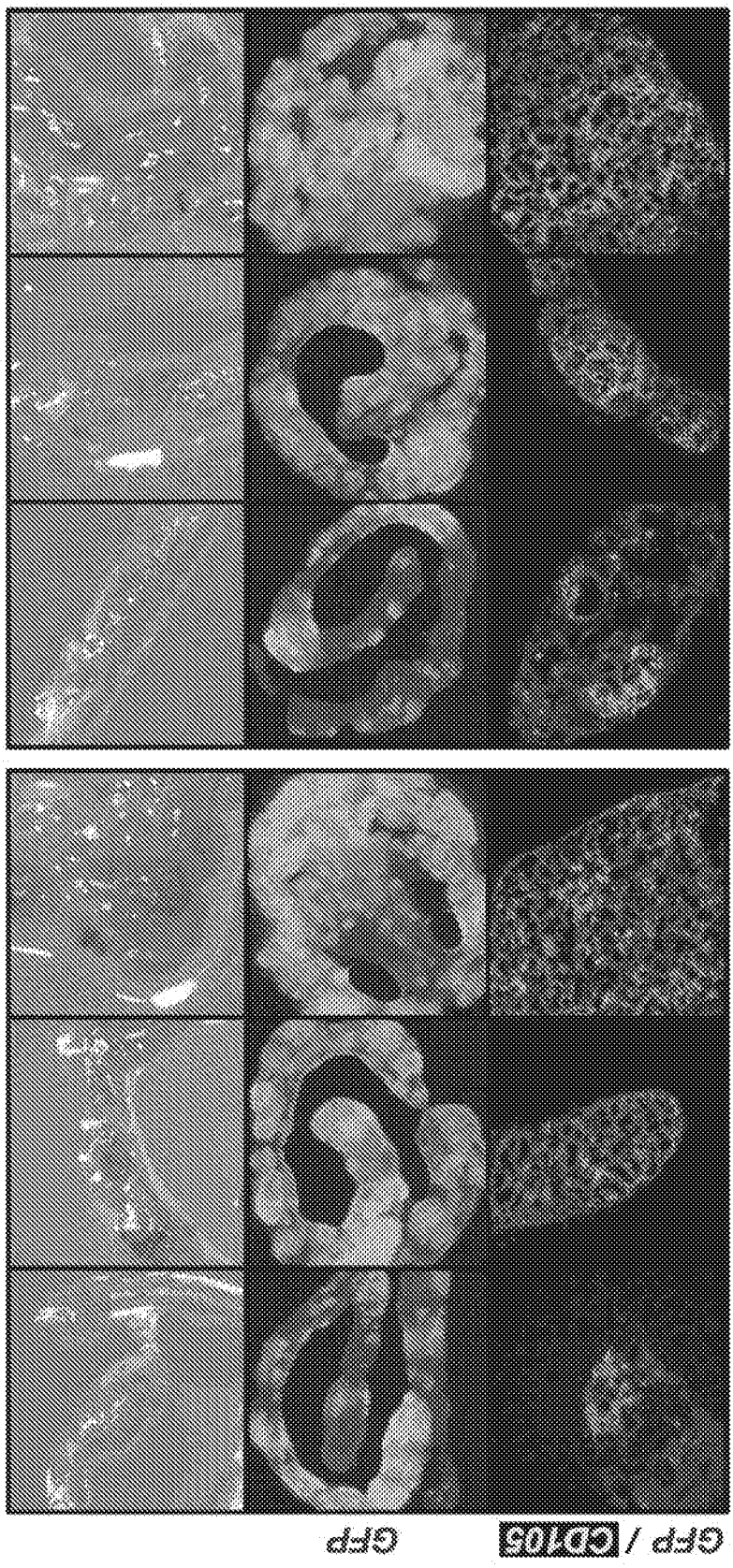

Hepatócitos tipo selvagem
transplantados em Fah-/- e Fah/LTbR-/-
FAH−
LTbR−/FAH−
GFP
GFP / CD105
2 semanas pós-Tx
4 semanas pós-Tx
6 semanas pós-Tx
2 semanas pós-Tx
4 semanas pós-Tx
6 semanas pós-Tx

FIG. 19

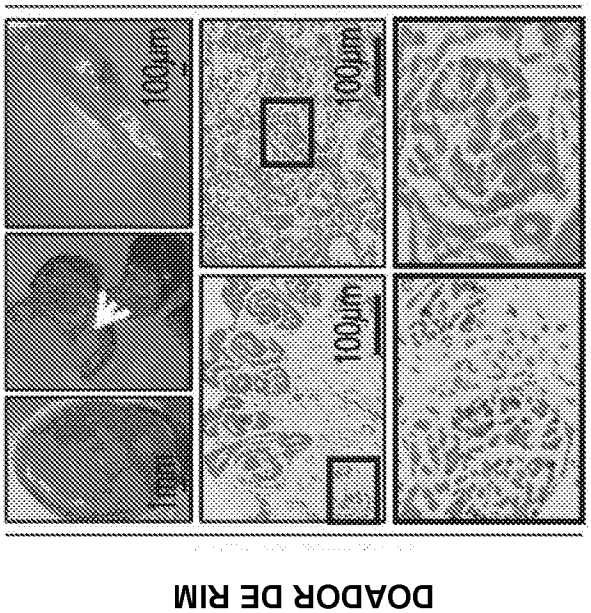


FIG. 20A

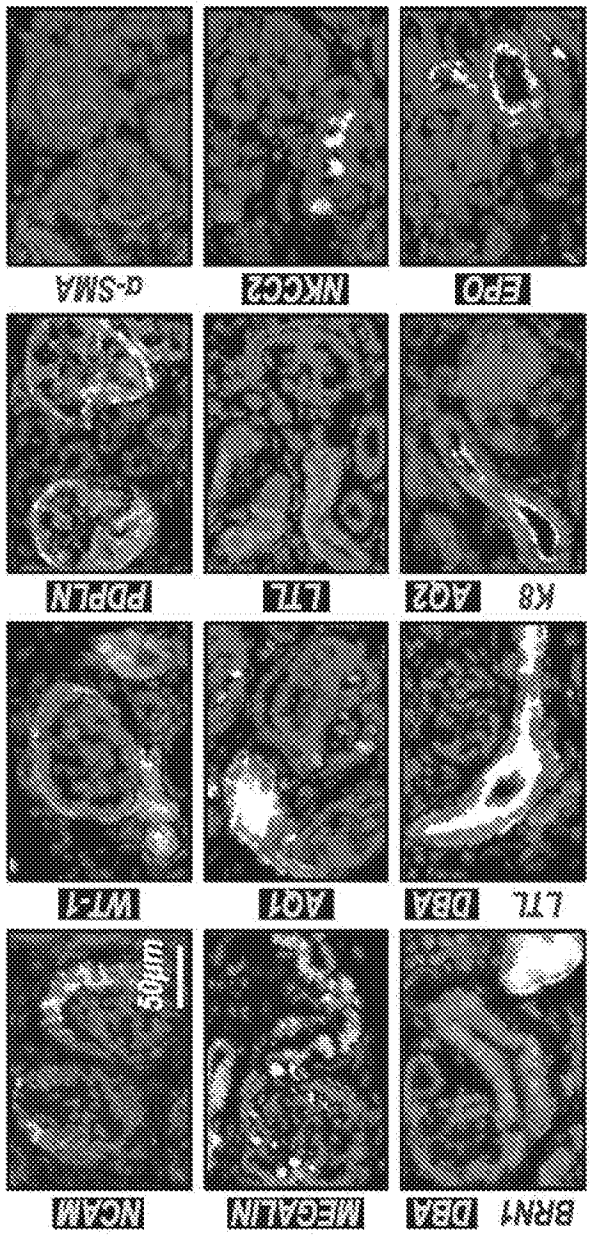


FIG. 20B

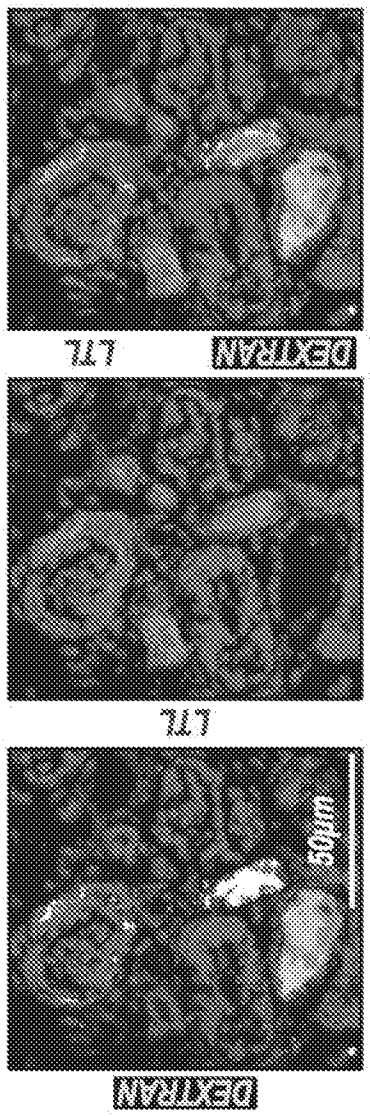


FIG. 20D

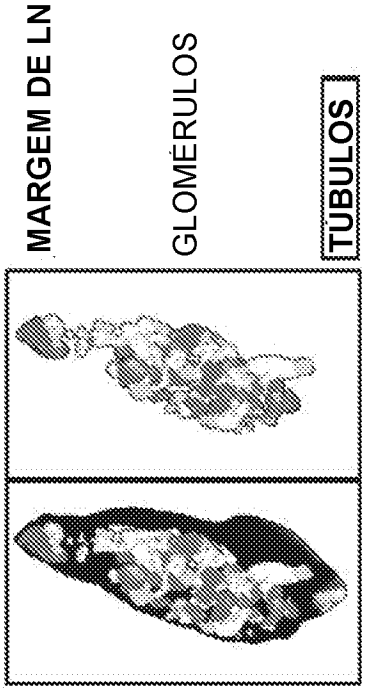


FIG. 20C

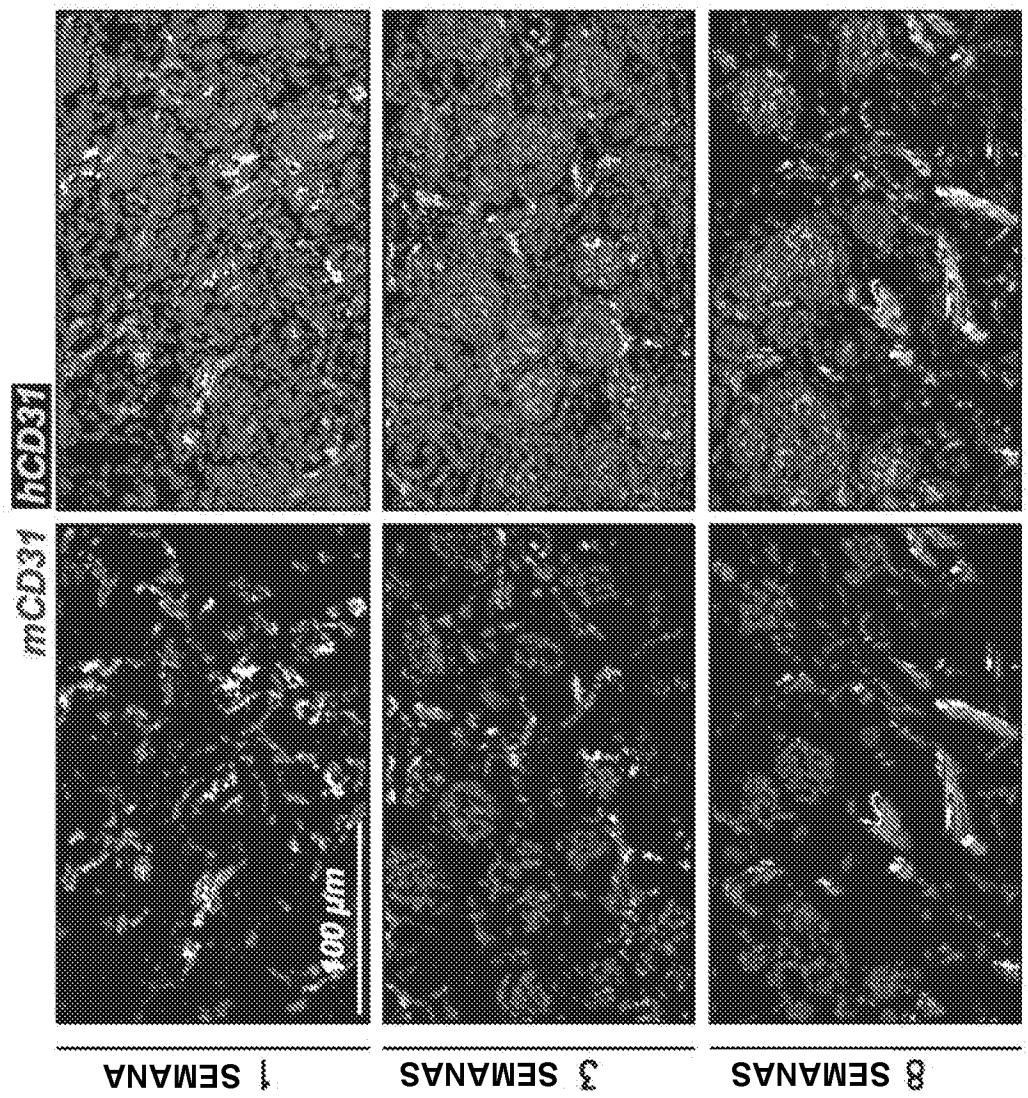


FIG. 20E

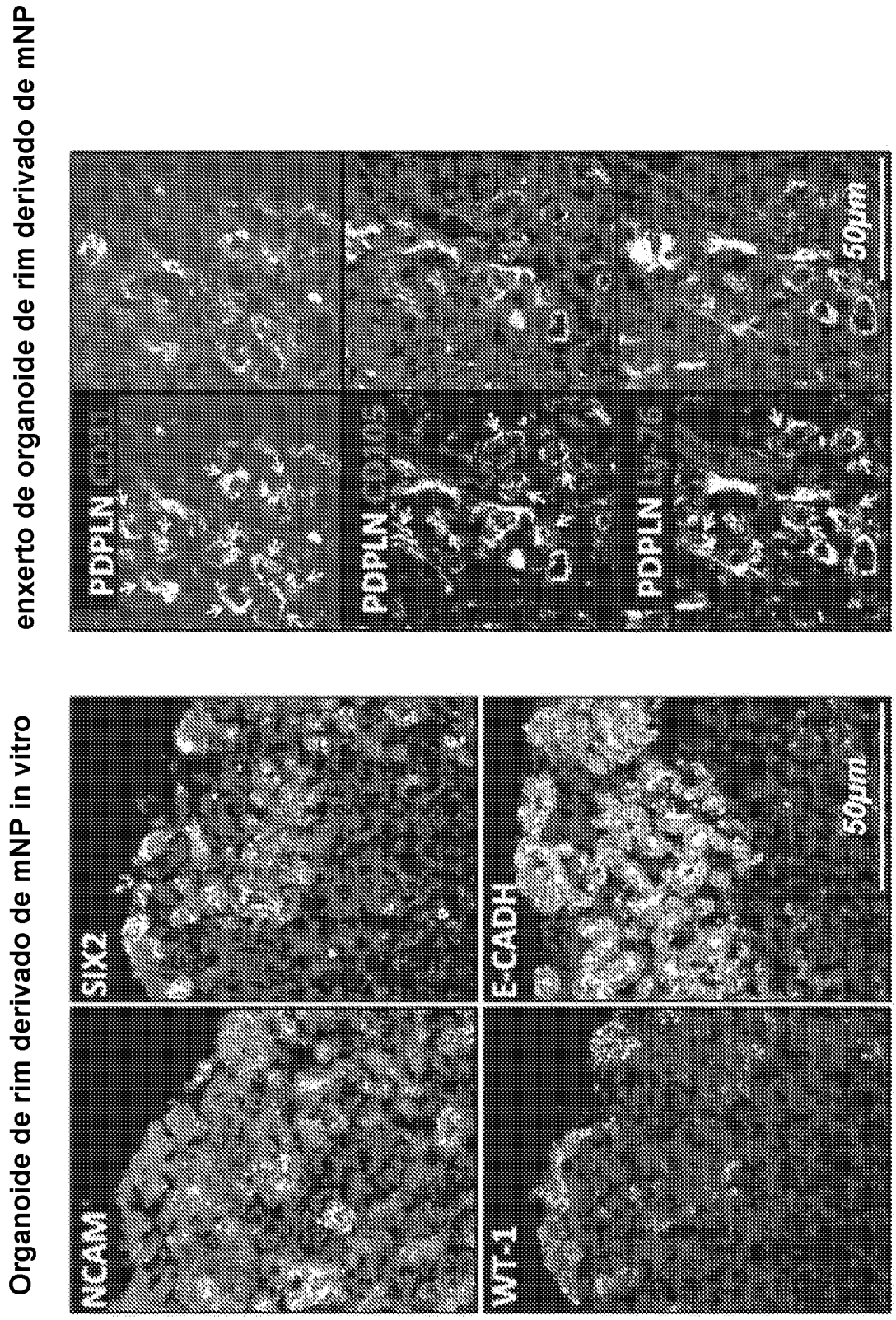

Organoide de rim derivado de mNP in vitro
NCAM
SIX2
WT-1
E-CADH
50μm
enxerto de organoide de rim derivado de mNP
PDPLN
PDPLN
PDPLN
50μm

FIG. 20F

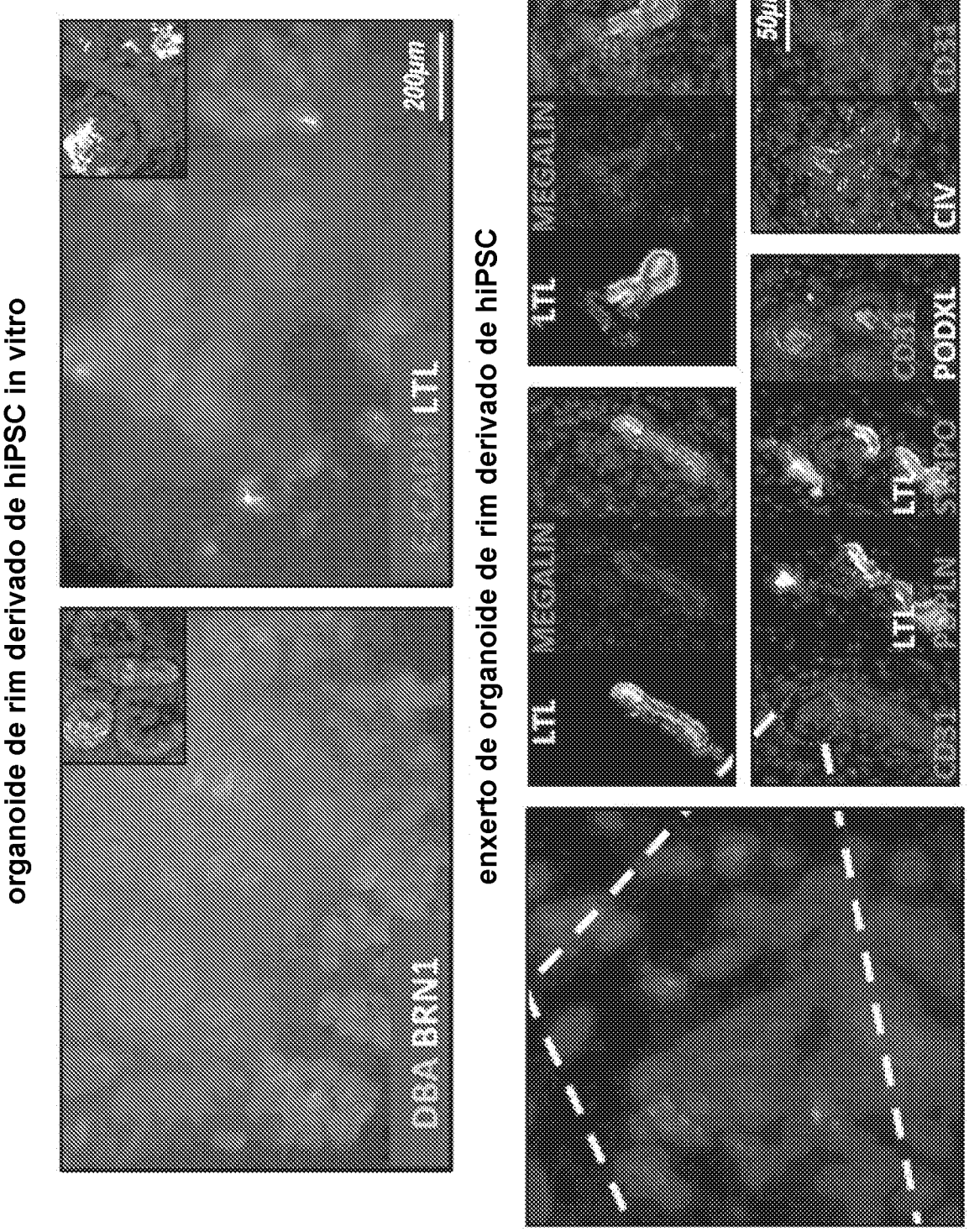

organoide de rim derivado de hiPSC in vitro
DBA BRN1
LTL
200µm
enxerto de organoide de rim derivado de hiPSC
LTL MEGALIN
LTL MEGALIN
LTL
PODXL
CDH1
CIV
50µm

FIG. 20G

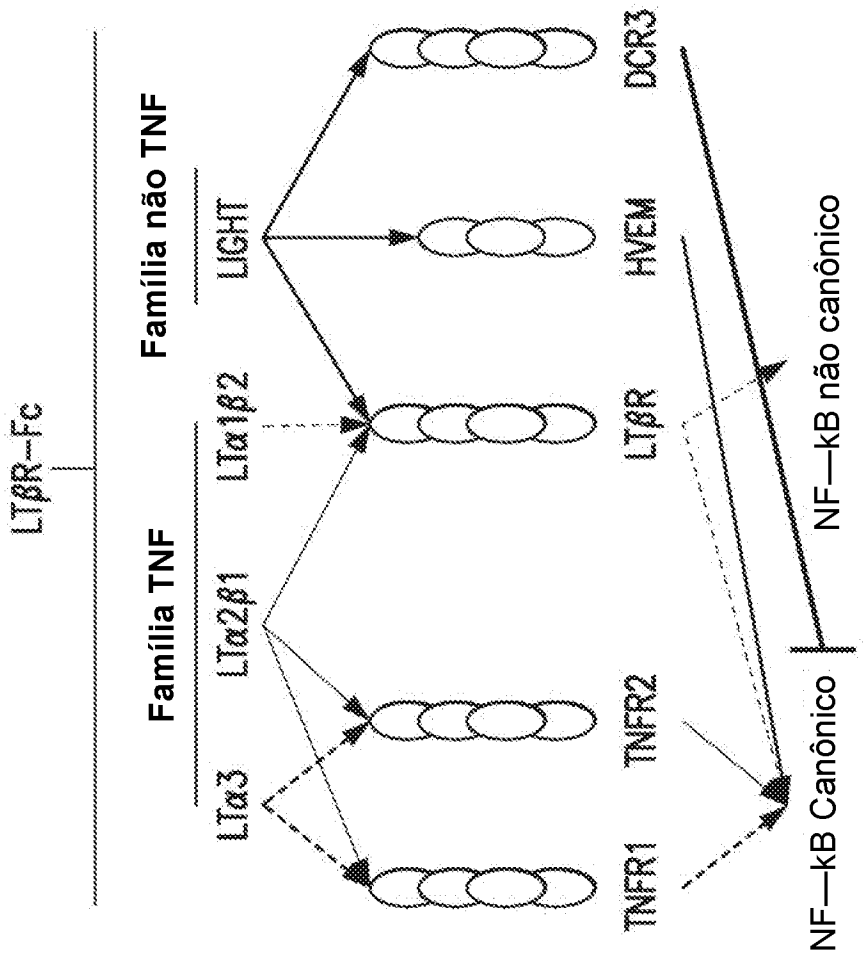

LTβR–Fc
Família TNF
Família não TNF
LTα3
LTα2β1
LTα1β2
LIGHT
TNFR1
TNFR2
LTβR
HVEM
DCR3
NF—kB Canônico
NF—kB não canônico

FIG. 21

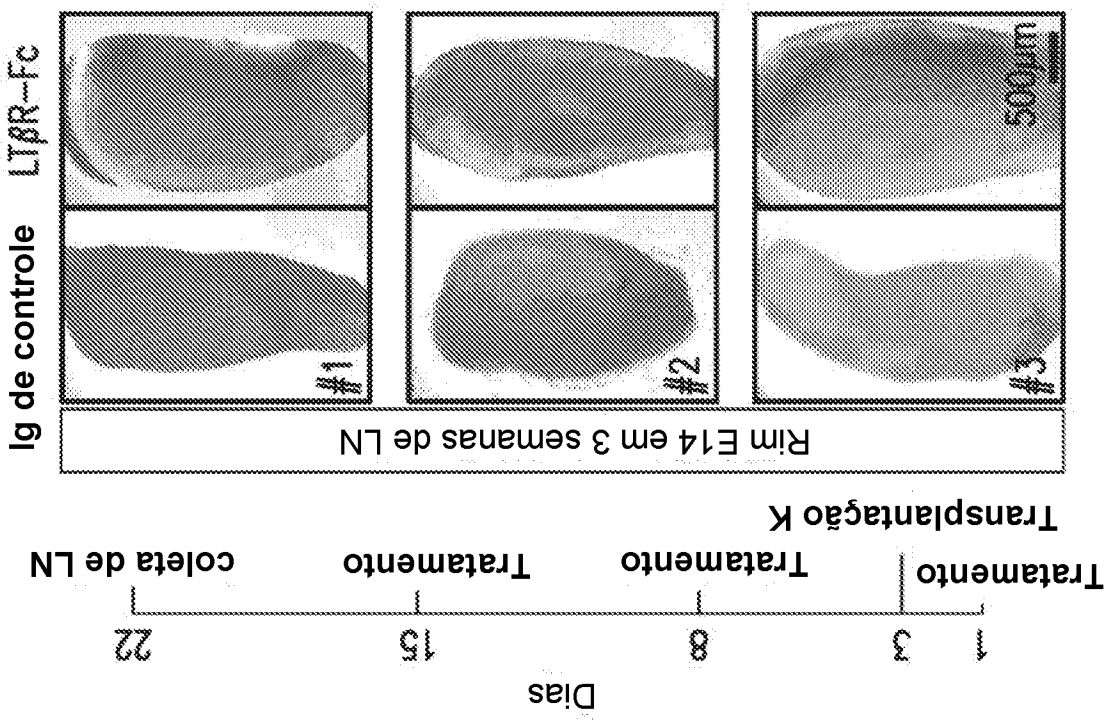

Dias
1
3
8
15
22
Tratamento
Tratamento
Tratamento
coleta de LN
Transplantação K
Rim E14 em 3 semanas de LN
Ig de controle
LTβR-Fc
#1
#2
#3
500μm

FIG. 22A

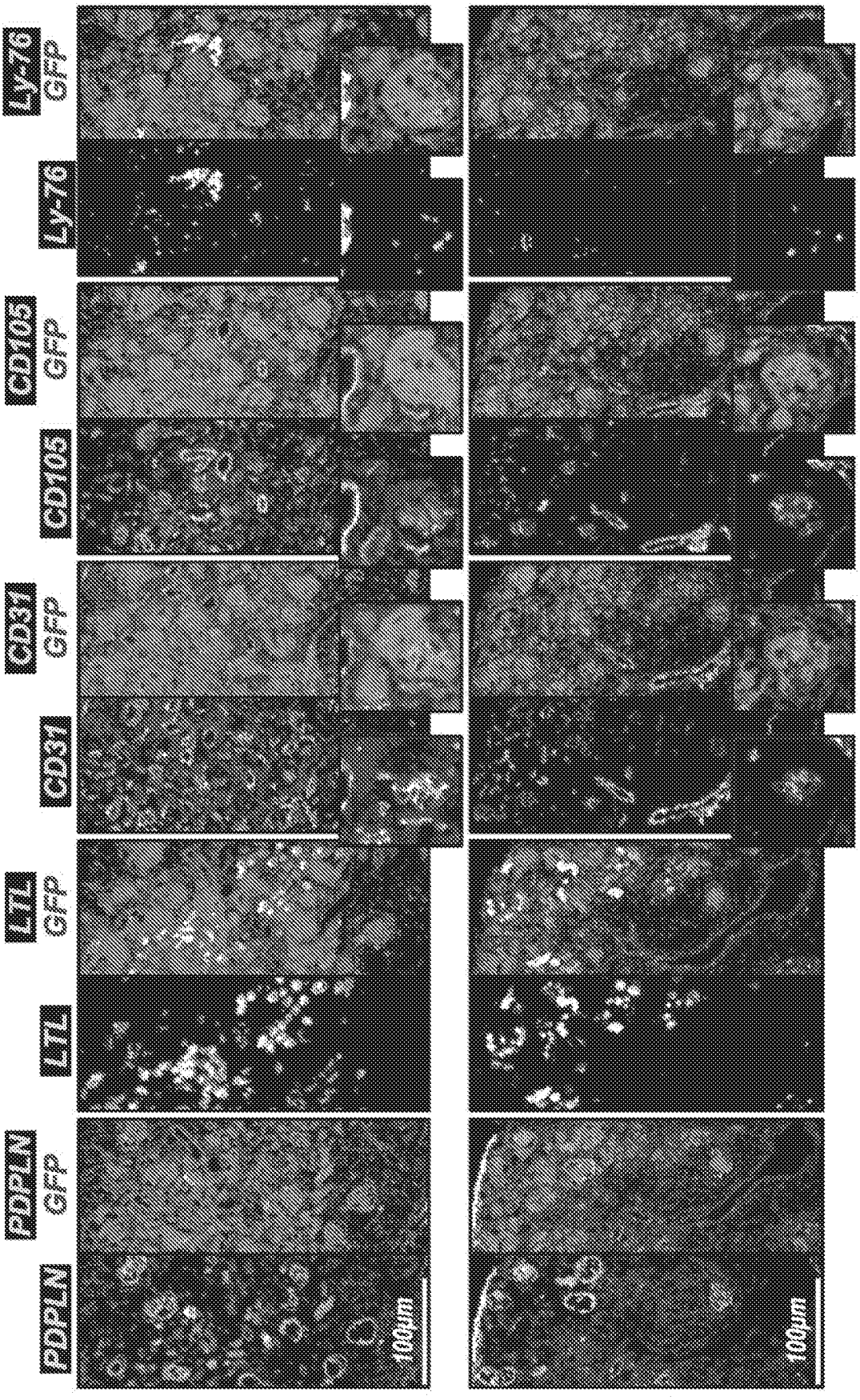

PDPLN
PDPLN GFP
LTL
LTL GFP
CD31
CD31 GFP
CD105
CD105 GFP
Ly-76
Ly-76 GFP
100μm
Ig de controle
LTβR-Fc

FIG. 22B

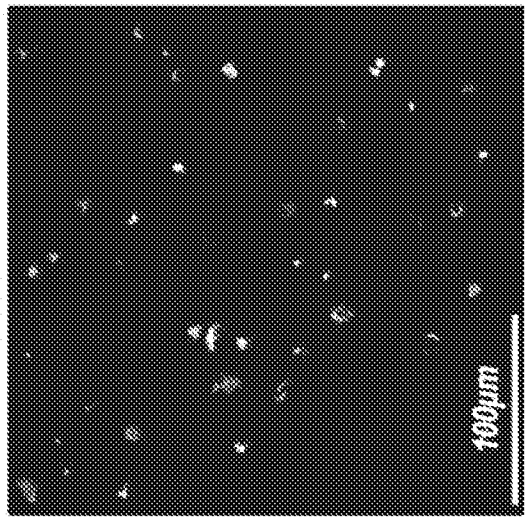


FIG. 22D

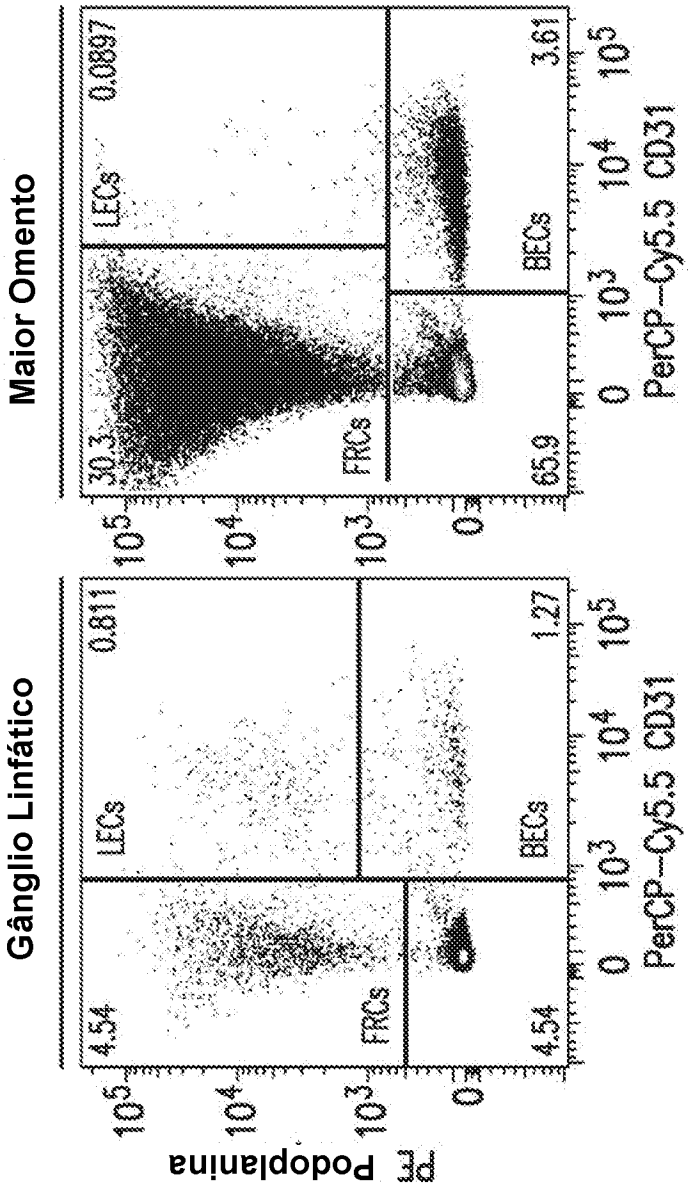


FIG. 22C

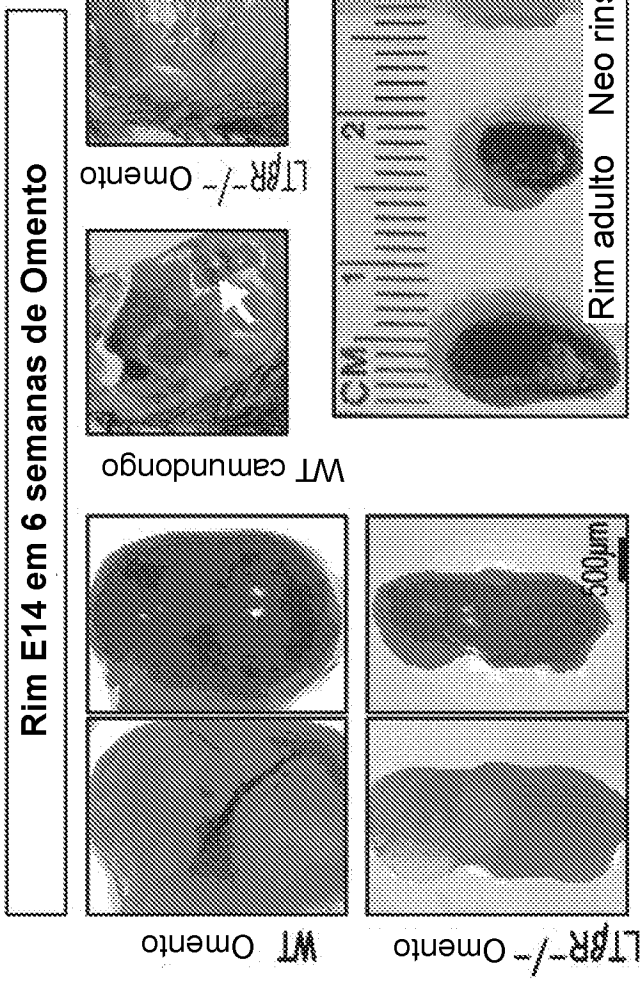


FIG. 22E

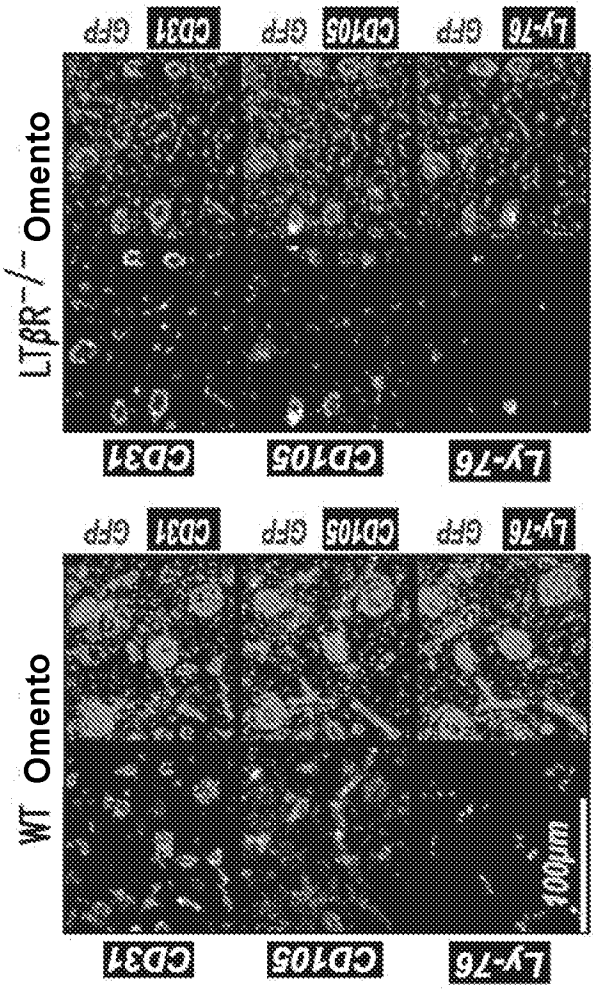


FIG. 22F

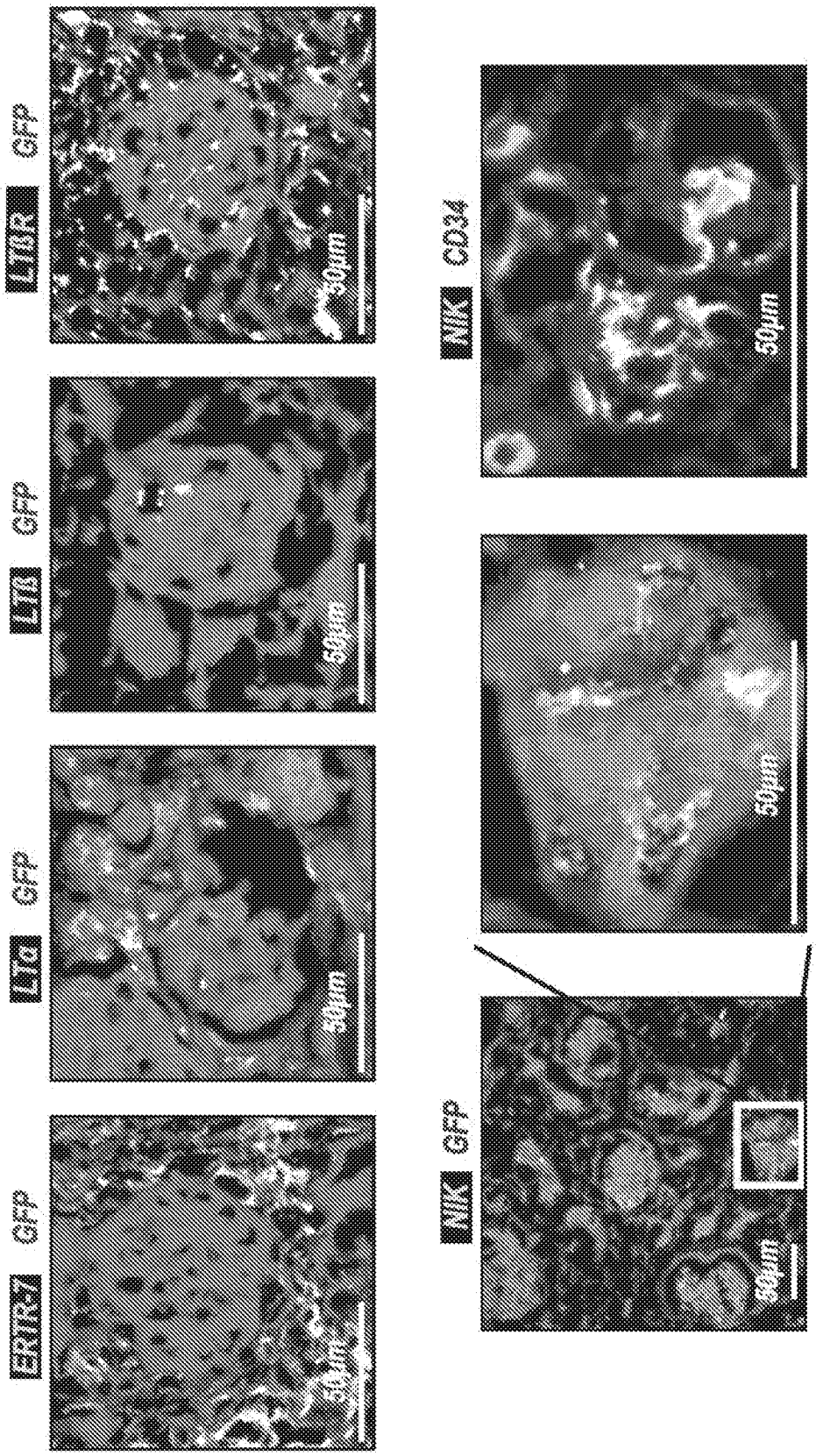


FIG. 22G

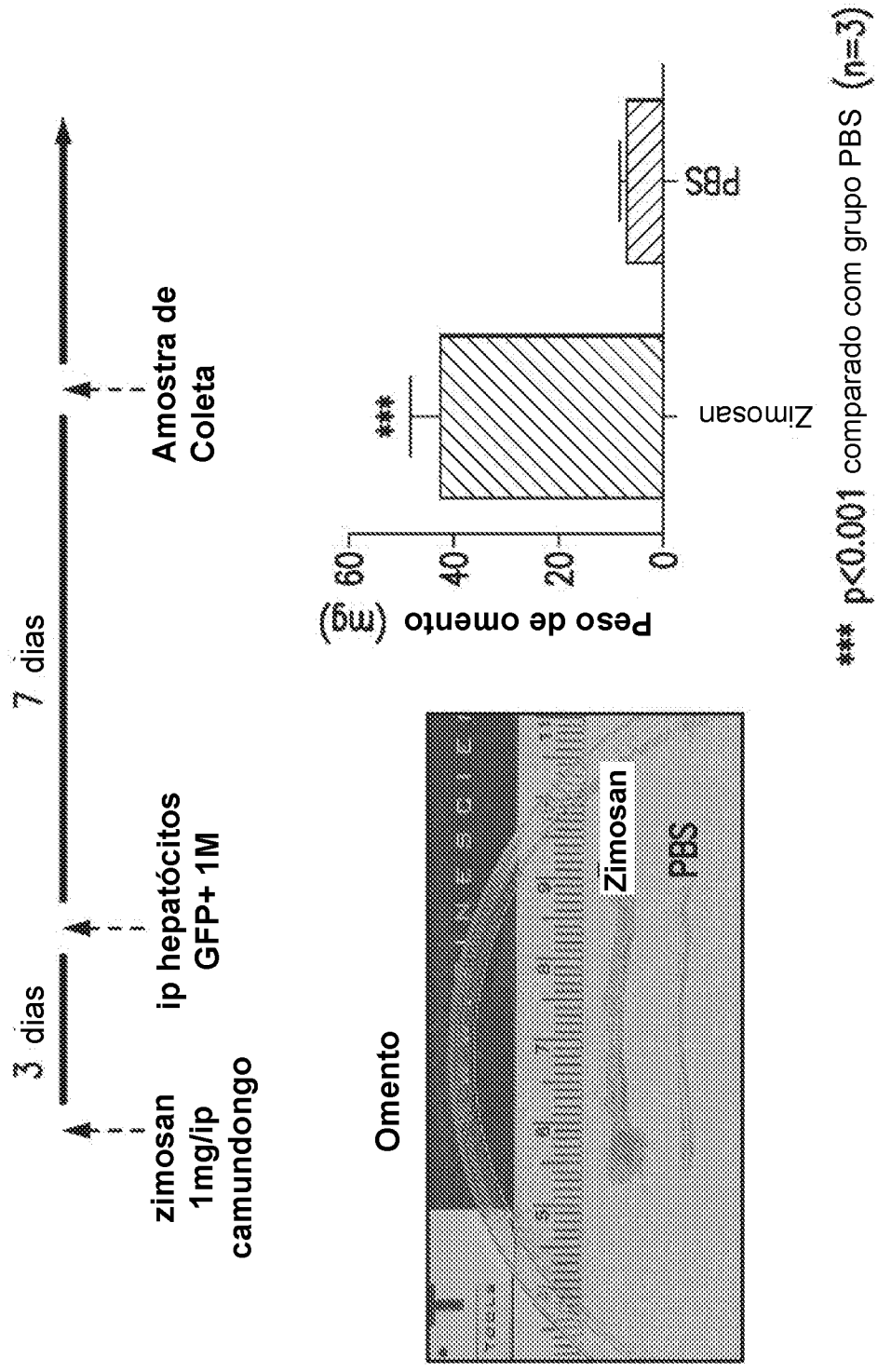

3 dias
7 dias
zimosan
1mg/ip
camundongo
ip hepatócitos
GFP+ 1M
Amostra de
Coleta
Omento
Zimosan
PBS
Peso de omento (mg)
60
40
20
0
***
Zimosan
PBS
*** p<0.001 comparado com grupo PBS (n=3)

FIG. 23

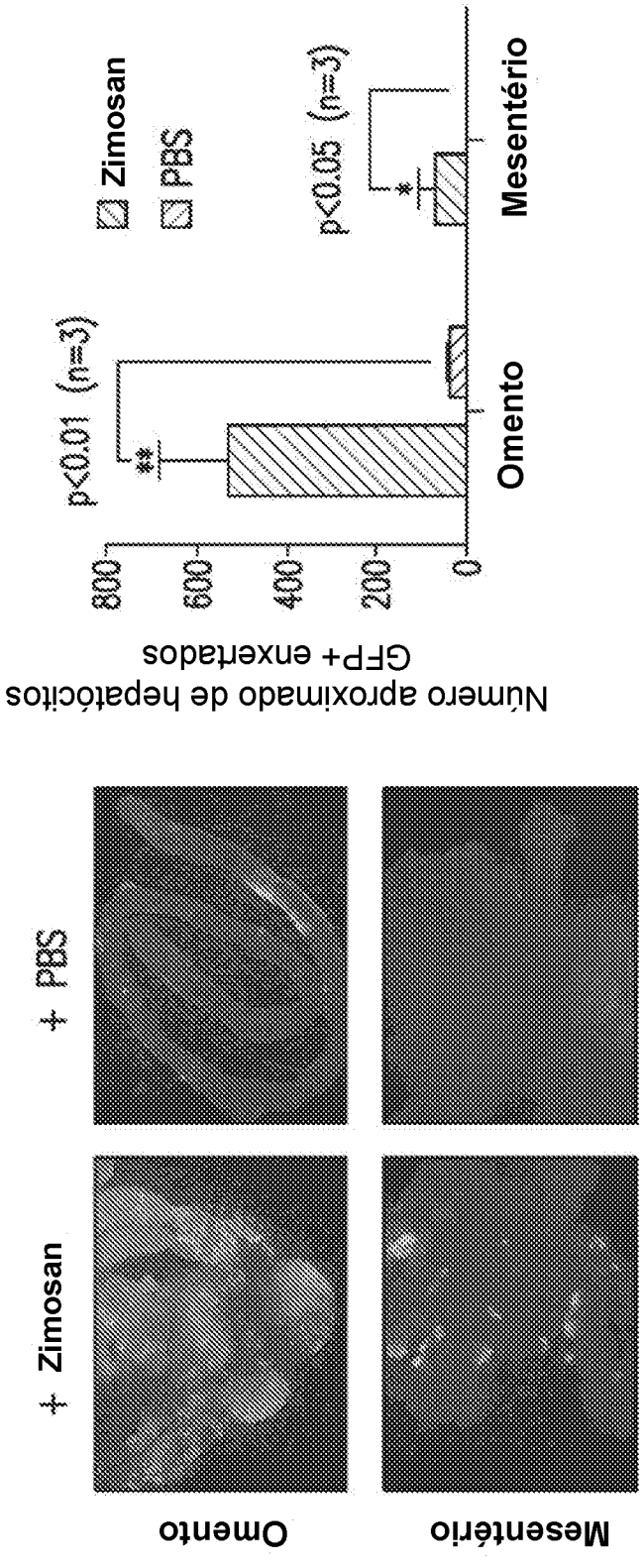

+ Zimosan
+ PBS
Omento
Mesentério
Número aproximado de hepatócitos GFP+ enxertados
800
600
400
200
0
p<0.01 (n=3)
**
p<0.05 (n=3)
*
Zimosan
PBS
Omento
Mesentério

FIG. 24

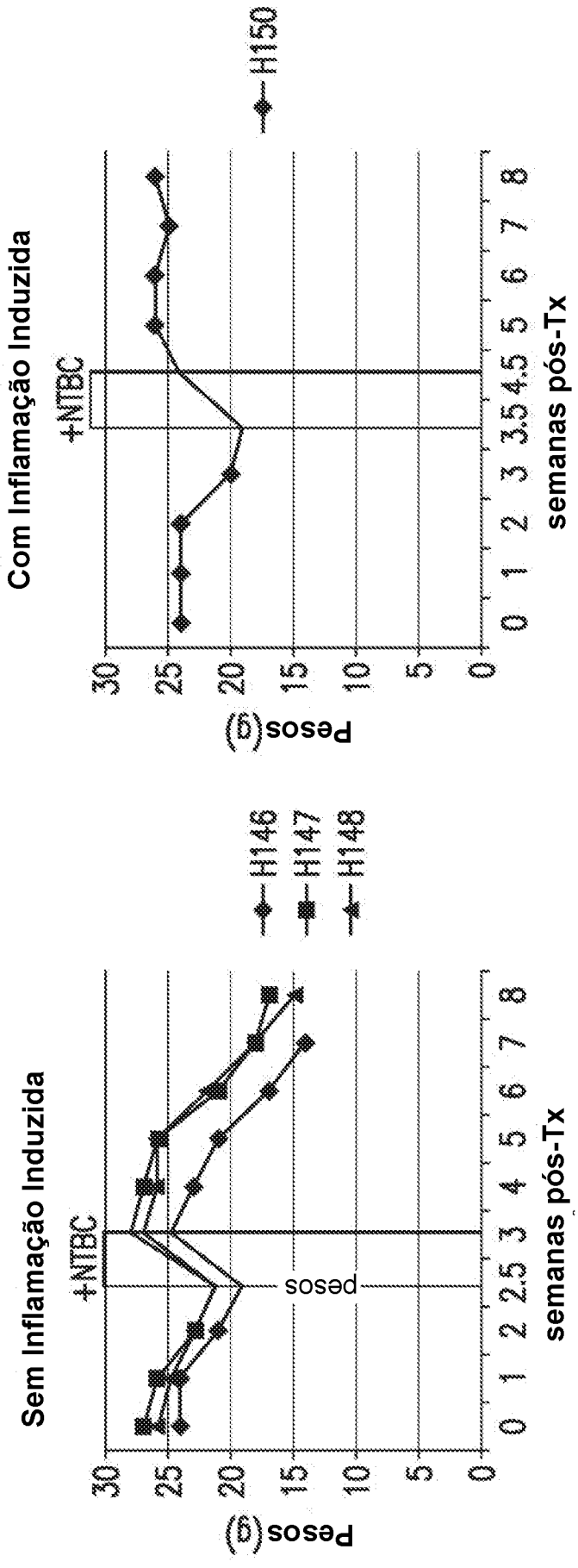

Com Inflamação Induzida
+NTBC
H150
Pesos (g)
semanas pós-Tx
Sem Inflamação Induzida
+NTBC
H146
H147
H148
pesos
Pesos (g)
semanas pós-Tx

FIG. 25

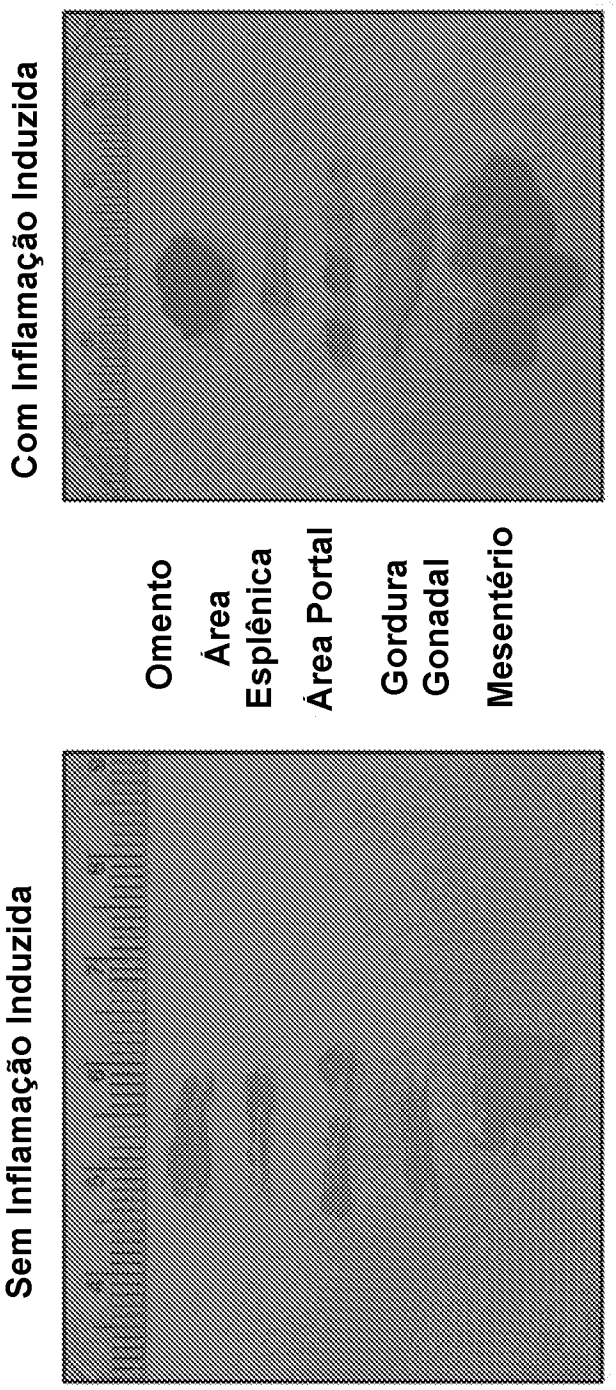

Sem Inflamação Induzida
Com Inflamação Induzida
Omento
Área Esplênica
Área Portal
Gordura Gonadal
Mesentério
H146
H150
8 semanas pós-tx

FIG. 26

RESUMO

"AGLOMERADOS LINFOIDES ASSOCIADOS À GORDURA COMO LOCAIS PARA TRANSPLANTE, REGENERAÇÃO DE TECIDO, ORGANOGÊNESE E FUNÇÃO PARA TECIDOS MÚLTIPLOS"

A presente divulgação refere-se ao enxerto e proliferação de células em aglomerados linfoides associados à gordura ("FALCs" ou "manchas lácteas"), que podem ser usados para gerar tecido ectópico funcional. A presente divulgação ainda fornece métodos e composições para enxerto e proliferação de células, em FALCs ativando-se a via de sinalização de receptor beta de linfotoxina (LTβR) e/ou cinase induzida por NF-kB (NIK). A presente divulgação também fornece métodos e composições para estabelecer tecido hepático ectópico em FALCs (manchas lácteas) e para usar tal tecido hepático ectópico para benefício terapêutico, e fornecer métodos e composições para gerar tecido renal ectópico em FALCs, que pode ser usado em um indivíduo para benefício terapêutico.