



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e Comércio Exterior  
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI0615730-0 A2**

(22) Data de Depósito: 22/09/2006  
(43) Data da Publicação: 24/05/2011  
(RPI 2107)



(51) *Int.Cl.:*  
A01N 1/02 2006.01  
C12N 1/00 2006.01  
C12N 5/06 2006.01  
C12N 5/08 2006.01

(54) Título: **EXTRATO DE PLANTA E USO DO MESMO COMO AGENTE CRIOPROTETOR**

(30) Prioridade Unionista: 22/09/2005 US 60/719,188

(73) Titular(es): TRANSFERT PLUS SOCIETE EN COMMANDITE

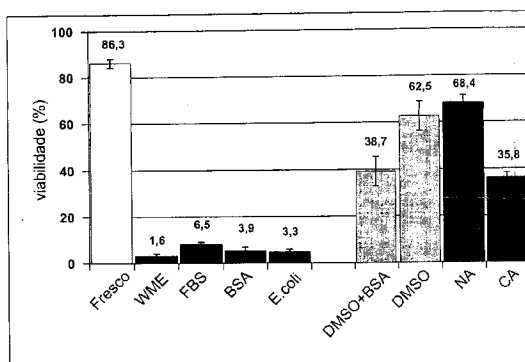
(72) Inventor(es): DIANA AVERILL-BATES, FATHEY SARHAN, FRANCINE DENIZEAU (FALECIDA), FRANCINE HAMEL, MÉLANIE GRONDIN

(74) Procurador(es): Di Blasi, Parente, S. G. & Associados S/C

(86) Pedido Internacional: PCT CA2006001565 de 22/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/033488 de 29/03/2007

(57) Resumo: EXTRATO DE PLANTA E USO DO MESMO COMO UM AGENTE CRIOPROTETOR. Um meio de criopreservação compreendendo um extrato de planta contendo proteína é revelado. Métodos, composições, usos e kits para criopreservação de material biológico, tal como uma molécula, organela, célula, embrião, tecido ou órgão também são revelados.



Pt - 0615430-0  
Pt - 0200800 437 42  
Data - 16/05/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção Para "EXTRATO DE PLANTA E USO DO MESMO COMO UM AGENTE CRIOPROTETOR".

Referência Remissiva a Pedidos Relacionados.

O presente pedido reivindica o benefício do Pedido de  
5 Patente Provisório dos Estados Unidos Nº 60/719.188,  
depositado em 22 de setembro de 2005, o qual é incorporado  
neste documento por referência em sua totalidade.

Campo da Invenção.

A presente invenção se refere à criopreservação de  
10 células ou tecidos. Mais especificamente, a presente  
invenção se relaciona ao uso de um extrato derivado de  
planta como um agente crioprotetor para tal  
criopreservação.

Antecedentes da Invenção.

15 O congelamento tem sido utilizado há vários anos como  
uma abordagem para preservar células vivas. Entretanto, a  
crioconservação e recuperação de células vivas provou ser  
difícil, uma vez que condições relativamente adversas de  
ambos congelamento e descongelamento de células durante sua  
20 crioconservação resulta em baixa viabilidade de células  
descongeladas. Várias estratégias foram buscadas a fim de  
melhorar a viabilidade de células descongeladas, referente  
principalmente ao desenvolvimento de agentes crioprotetores  
e métodos aperfeiçoados de crioproteção (por exemplo, taxas

aperfeiçoadas de resfriamento). O agente crioprotetor padrão na indústria para uma variedade de tipos de células é dimetil sulfóxido (DMSO). Contudo, a despeito de seu uso difundido, DMSO pode ser tóxico para as células e ter  
5 efeitos adversos sobre a função celular os quais podem, por exemplo, comprometer o uso de tais células descongeladas para uma variedade de aplicações.

Um exemplo de um tipo de célula o qual exhibe uma variedade de funções fisiologicamente relevantes é o  
10 hepatócito. Dentre os tipos de células hepáticas, hepatócitos são os mais importantes para a função do órgão, representando cerca de 70% da população celular total e 80% do volume de tecido hepático (1). Eles são responsáveis pela maioria das funções hepato-específicas (2), tais como  
15 síntese e secreção de proteínas essenciais (por exemplo, ceruloplasmina, fatores de coagulação, albumina). Hepatócitos também estão envolvidos na biotransformação de compostos hidrofóbicos endógenos e exógenos (xenobióticos, produtos tóxicos) em produtos solúveis em água que podem  
20 ser facilmente excretados no meio extracelular (por exemplo, urina e bile) (3).

Hepatócitos, assim, representam um modelo fisiologicamente relevante do fígado, especialmente como um sistema experimental "in vitro" para a avaliação do destino

metabólico e efeitos biológicos dos xenobióticos. Para xenobióticos que são metabolizados principalmente pelo fígado, o uso de hepatócitos mais provavelmente proporciona resultados os quais são representativos daqueles obtidos  
5 "in vivo", ambos em termos de perfis metabólicos e taxas de eliminação metabólica (4-6).

Tradicionalmente, hepatócitos recentemente isolados são requeridos para a maioria dos estudos sobre o metabolismo e toxicidade de xenobióticos, como por exemplo,  
10 as principais enzimas de metabolização de xenobióticos, tais como, as isoformas induzíveis de citocromo P450 (CYP) declinam rapidamente em cultura. Entretanto, isso requer o uso de fígados recentemente obtidos para o preparo de hepatócitos para experimento. Então, a crioconservação de  
15 hepatócitos recentemente isolados, mantendo alta viabilidade e funções hepáticas adequadas após descongelamento, diminuiria significativamente a necessidade de tal tecido fresco. Como tal, hepatócitos crioconservados de alta qualidade seriam de valor  
20 considerável para investigações nos campos de hepatologia, farmacologia e toxicologia (7-9).

Os principais problemas com os métodos clássicos de crioconservação de hepatócitos são a baixa taxa de sobrevivência em cultura, pobre atividade metabólica e

integridade funcional. Além disso, hepatócitos não replicam em cultura, conforme é o caso para linhagens de células. Assim, um método eficiente de crioconservação é necessário para reduzir o dano celular e funcional causado em hepatócitos durante congelamento. Vários agentes crioprotetores, tal como DMSO mencionado acima, são atualmente usados para proteger células da desidratação causada pela formação de gelo intracelular durante congelamento. Entretanto, eles são ou tóxicos para as células e precisam ser eliminados rapidamente após descongelamento (10) ou causam estresse osmótico que afeta a competência metabólica da célula (11). Conseqüentemente, a célula crioconservada não representa o estado metabólico nativo das células ou tecidos e torna a interpretação de resultados obtidos, durante o estudo de tais células, errôneos.

Portanto, existe uma necessidade contínua por abordagens aperfeiçoadas para a crioproteção de células.

A presente descrição se refere a uma série de documentos, o conteúdo dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

#### Sumário da Invenção.

A invenção se refere a reagentes e métodos para crioconservação baseado no uso de um extrato de planta.

Mais especificamente, de acordo com a presente invenção, é proporcionado um meio de criopreservação compreendendo um extrato de planta compreendendo proteína.

A invenção ainda proporciona uma composição  
5 compreendendo o meio acima mencionado e um material biológico. Em uma modalidade, a composição é congelada.

A invenção ainda proporciona um método para criopreservação de um material biológico, o método compreendendo congelamento de uma suspensão do material  
10 biológico no meio acima mencionado.

A invenção ainda proporciona um método para criopreservação de um material biológico, o método compreendendo introdução do material biológico no meio acima mencionado e congelamento do meio compreendendo o  
15 material biológico.

A invenção ainda proporciona um kit ou embalagem compreendendo o meio acima mencionado.

A invenção ainda proporciona o uso do meio acima mencionado para criopreservação de um material biológico.

20 A invenção ainda proporciona um extrato de planta compreendendo proteína para uso em criopreservação.

A invenção ainda proporciona uma composição compreendendo o extrato acima mencionado e um material biológico. Em uma modalidade, a composição é congelada.

A invenção ainda proporciona uma embalagem de kit compreendendo o extrato de planta compreendendo proteína acima mencionado juntamente com instruções para a crioconservação de um material biológico.

5 A invenção ainda proporciona o uso do extrato acima mencionado para crioconservação de um material biológico.

A invenção ainda proporciona um método para crioconservação de um material biológico, o método compreendendo introdução do extrato acima mencionado em um  
10 meio de crioconservação antes de congelamento.

Em uma modalidade, o extrato acima mencionado é derivado de uma planta não aclimatada.

Em uma modalidade, o extrato acima mencionado é derivado de uma planta aclimatada ao frio.

15 Em uma modalidade, o extrato acima mencionado é derivado das partes aéreas ou tecido de folha de uma planta.

Em uma modalidade, a planta acima mencionada é uma planta da família selecionada de Poaceae (Gramineae),  
20 Leguminoseae e Amaranthaceae.

Em uma modalidade, a planta acima mencionada é selecionada de trigo, centeio, cevada, alfafa e espinafre.

Em uma modalidade, o extrato acima mencionado é substancialmente solúvel.

Em uma modalidade, o extrato acima mencionado é enriquecido em proteína.

Em uma modalidade, o extrato enriquecido em proteína acima mencionado é preparado através de precipitação de  
5 sal. Em uma outra modalidade, a precipitação de sal acima mencionada é precipitação com sulfato de amônio.

Em uma modalidade, o meio ou extrato acima mencionado é substancialmente isento de DMSO.

Em uma modalidade, o meio ou extrato acima mencionado  
10 é substancialmente isento de soro animal exógeno (por exemplo, soro bovino fetal). Em uma outra modalidade, o meio acima mencionado é substancialmente isento de ambos DMSO e soro animal exógeno.

Em uma modalidade, o meio ou extrato acima mencionado  
15 é substancialmente isento de glúten.

Em modalidades, o meio ou extrato acima mencionado é substancialmente isento de:

- a) DMSO;
- b) soro animal exógeno (por exemplo, soro bovino fetal);
- 20 c) glúten;
- d) (a) e (b);
- e) (a) e (c);
- f) (b) e (c); ou
- g) (a), (b) e (c).

Em uma modalidade, a viabilidade após congelamento do material biológico acima mencionado crioconservado no meio acima mencionado é maior do que ou igual a 40%, em uma outra modalidade, maior do que ou igual a 50%, em ainda uma  
5 outra modalidade, maior do que ou igual a 60%.

Em uma modalidade, o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento do material biológico acima mencionado crioconservado no meio acima mencionado é maior do que ou igual a 40%, em uma outra  
10 modalidade, maior do que ou igual a 50%, em ainda uma outra modalidade, maior do que ou igual a 60%. Em modalidades, o parâmetro funcional é selecionado da eficiência de plaqueamento, aderência, morfologia celular, secreção celular, síntese de proteína, desintoxicação de amônio e  
15 atividade enzimática.

Em uma modalidade, o meio ou extrato acima mencionado é para crioconservação de um material biológico selecionado de uma molécula, organela, célula, embrião, tecido e órgão. Em uma modalidade, a célula é uma célula eucariótica. Em  
20 uma modalidade, a célula é uma célula primária, uma linhagem de célula ou uma célula imortalizada. Em uma modalidade, a célula, embrião, tecido ou órgão é uma célula, embrião, tecido ou órgão de mamífero. Em uma modalidade, a célula, embrião, tecido ou órgão é uma

célula, embrião, tecido ou órgão humano. Em uma modalidade, a célula ou tecido é um hepatócito ou tecido hepático.

Outras vantagens e características da presente invenção se tornarão mais evidente na leitura da descrição não restritiva a seguir de modalidades específicas da mesma, fornecida a título de exemplo apenas com referência aos desenhos em anexo.

#### Breve Descrição dos Desenhos.

Figura 1: Potencial de crioconservação de extratos de proteína de trigo (WPEs) sobre hepatócitos isolados de rato. Análise da viabilidade de suspensões de hepatócitos de rato após congelamento foi avaliada com o teste com calceína/PI através de citometria de fluxo. A viabilidade de hepatócitos de rato ( $1,5 \times 10^6$  células/ml) foi avaliada após 7 dias de congelamento em WME, FBS a 10% suplementado com FBS a 50% (FBS), 20 mg de BSA (BSA) ou 20 mg de proteínas de *E. coli* (*E. coli*), DMSO a 15% e 20 mg de BSA (DMSO + BSA) ou DMSO a 15% e FBS a 50% (DMSO). O efeito de WPEs sobre a viabilidade da suspensão de hepatócitos de rato também foi avaliada após 7 dias de congelamento em WME suplementado com 20 mg de WPEs CA (aclimatado a frio) ou NA (não aclimatado). Hepatócitos recentemente isolados (fresco) serviram como referência. Dados (média  $\pm$  SEM) representam medições em triplicata de pelo menos seis

experimentos independentes com diferentes preparados de célula (n = 18).

Figura 2: Viabilidade de hepatócitos frescos e crioconservados após semeadura: efeito de WPes.

5 Determinação da viabilidade usando ensaio de LDH durante um período de 4 dias após semeadura de hepatócitos descongelados de rato que tinham sido crioconservados por 7 dias em WME suplementado com DMSO a 15% e FBS a 50% (DMSO), WPes NA e CA. A viabilidade (%) foi obtida pela subtração  
10 do LDH liberado por hepatócitos mortos ou danificados do LDH total nas células. LDH total foi avaliado através de lise de células com Triton X-100 a 10%. A liberação de LDH no meio mensurou a perda da viabilidade de hepatócitos em cultura, proporcionando uma medição indireta da integridade  
15 da membrana de células. Hepatócitos recentemente isolados serviram como uma referência. Controles foram feitos para subtrair a atividade intrínseca da planta. Dados (SEM média) representam medições em triplicata de quatro experimentos com diferentes preparados de células (n = 12).  
20 Significância estatística: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Figura 3: Análise de aderência e morfologia celular de hepatócitos crioconservados de rato através de microscopia confocal. A aderência foi visualizada 24 h após semeadura

de hepatócitos descongelados de rato, os quais tinham sido crioconservados por 7 dias em WME, FBS a 10% suplementado com DMSO a 15% e FBS a 50% (B), WPES NA (C) ou CA (D). Hepatócitos recentemente isolados (A) serviram como uma  
5 referência. As setas indicam contatos célula com célula. Hepatócitos de rato,  $175 \times 10^3$  células, foram visualizados através de microscopia confocal sob 40X Hoffman (A-D). Fotografias de células são mostradas a partir de um experimento representativo, o qual foi repetido pelo menos  
10 em triplicata.

Figura 4: Secreção de albumina e desintoxicação de amônio para uréia através de hepatócitos frescos e crioconservados: efeito benéfico de WPES. (A) Secreção de albumina ( $\mu\text{g}/10^6$  células/24 h) no meio de cultura de  
15 células durante um período de 4 dias após semeadura de hepatócitos descongelados de rato e (B) produção de uréia ( $\mu\text{g}/10^6$  células) durante intervalos de tempo de 24h após 1, 2 e 3 dias em cultura, para hepatócitos descongelados de rato que tinham sido crioconservados durante 7 dias em WME  
20 suplementado com DMSO a 15% e FBS a 50% (DMSO), WPES NA e CA. Hepatócitos recentemente isolados serviram como uma referência. Controles foram feitos para subtrair a atividade intrínseca da planta. Dados (média  $\pm$  SEM) representam medições em triplicata de quatro experimentos

com diferentes preparados de célula (n = 12). Significância estatística: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Figura 5: Atividade e expressão das isoenzimas de citocroma P450 em hepatócitos frescos e crioconservados: efeito de WPES. (A) Atividade das isoformas CYP1A1 e CYP2B de citocromo P450 e (B) expressão da isoforma CYP1A1, 48 h após semeadura de hepatócitos descongelados de rato que tinham sido crioconservados durante 7 dias em WME suplementado com DMSO a 15% e FBS a 50% (DMSO), WPES NA e CA. Hepatócitos recentemente isolados (frescos) serviram como uma referência. (A) A taxa de indução das isoformas de citocroma P450 foi medida através de ensaios EROD (CYP1A1) e PROD (CYP2B) após uma indução de 24 h com benzo-a-pireno (+). (B) Expressão da isoforma CYP1A1 do citocroma P450 após uma indução de 24 h com benzo-a-pireno (+). Imunodeteção com anticorpo CYP1A1 sobre 30 µg de extratos de proteína de mamífero após uma indução de 24 h com benzo-a-pireno (+) e quantificação através de densitometria. A taxa de indução é a taxa entre a densidade da rota não-induzida sobre a densidade da rota induzida. Hepatócitos recentemente isolados (frescos) e frescos + NA também foram testados. Coloração de membrana foi usada como um controle de carga de proteína. Hepatócitos recentemente isolados

(frescos) serviram como uma referência. Dados (média  $\pm$  SEM) representam medições em triplicata de quatro experimentos com preparados diferentes de célula (n = 12). Imunodeteção (B) de proteínas é mostrada a partir de um experimento representativo, o qual foi repetido pelo menos em triplicata. Significância estatística: \*  $p < 0,05$ .

Figura 6: Potencial de crioconservação dos PEs sobre hepatócitos isolados de rato. Análise da viabilidade de suspensões de hepatócitos de rato após congelamento foi avaliada com o teste de calceína/PI por citometria de fluxo. A viabilidade de hepatócitos de rato ( $1,5 \times 10^6$  células/ml) foi avaliada após 7 dias de congelamento em WME, FBS a 10% suplementado com DMSO a 15% e FBS a 50% (DMSO). O efeito de PEs de trigo (*Triticum aestivum*) cv Clair, trigo cv Glenlae, cevada (*Hordeum vulgare*), centeio (*Secale cereale*), alfafa (*Medicago sativa*) ou espinafre (*Spinacia oleracea*) sobre a viabilidade da suspensão de hepatócitos de rato também foi avaliada após 7 dias de congelamento em WME suplementado com 20 mg ou 40 mg (+) de PEs de planta NA. Hepatócitos recentemente isolados (frescos) serviram como uma referência. Dados (média  $\pm$  SEM) representam medições em duplicata de pelo menos três

experimentos independentes com diferentes preparados de célula (n = 6).

Figura 7: Crioconservação de células eucarióticas com DMSO e WPEs. Análise da viabilidade de suspensões de células eucarióticas após congelamento foi avaliada com o teste de calceína/PI através da citometria de fluxo. A viabilidade de células de hepatócitos primários de rato, linhagens de células A549 (carcinoma de pulmão humano), Caco-2 (adenocarcinoma cólon-retal humano), CHO-B1 (ovário de hamster chinês transfectado com cDNA TGF- $\beta$ 1), HeLa (células de câncer cervical tiradas de Henrietta Lacks), HIEC (células de epitélio intestinal humano) e Jurkat (leucemia de células T humanas) ( $1,5 \times 10^6$  células/ml) foi avaliada após 7 dias de congelamento em seus respectivos meios de crescimento suplementados com DMSO a 15% e FBS a 50% (DMSO) ou WPEs NA Clair (NA). Hepatócitos recentemente isolados (frescos) serviram como uma referência. Dados (média  $\pm$  SEM) representam medições em triplicata de pelo menos três experimentos independentes com diferentes preparados de célula (n = 9).

Figura 8: Potencial de criopreservação de proteínas WPEs a partir de frações de precipitação com sulfato de amônio sobre hepatócitos isolados de rato. A viabilidade de suspensões de hepatócitos ( $1,5 \times 10^6$  células/ml) após 7

dias de congelamento foi avaliada com calceína/PI por citometria de fluxo. Hepatócitos foram congelados em WME, FBS a 10% (WME), suplementado com DMSO a 15% e FBS a 50% (DMSO) ou 20 mg de WPE (WPE) NA (não-aclimatado) ou CA (aclimatado a frio) ou 20 mg de fração de proteína NA ou CA a 41-60% (41-60) ou 20 mg de fração de proteína NA ou CA a 61-80% (61-80) ou 20 mg da fração de proteína NA ou CA a 81-100% (81-100). Hepatócitos recentemente isolados (frescos) serviram como referência. Dados (média  $\pm$  SEM) representam medições em triplicata de três preparados diferentes de WPEs em três experimentos independentes com diferentes preparados de célula (n = 27).

Figura 9: Influência do soro bovino fetal (FBS) sobre o potencial de crioconservação do WPE NA (não aclimatado) sobre hepatócitos isolados de rato. A viabilidade de suspensões de hepatócitos ( $1,5 \times 10^6$  células/ml) após 7 dias de congelamento foi avaliada com calceína/PI através de citometria de fluxo. Hepatócitos foram congelados em WME, suplementado com DMSO a 15% e FBS a 50% (DMSO) ou DMSO a 15% (DMSO-FBS) ou 20 mg de WPE NA e FBS a 10% (NA) ou 20 mg de WPE NA (NA-FBS). Hepatócitos recentemente isolados (frescos) serviram como referência. Dados (média  $\pm$  SEM) representam medições em triplicata de dois preparados

diferentes de WPEs em três experimentos independentes com diferentes preparados de célula ( $n = 18$ ).

Figura 10: Quantificação de glúten dos WPEs NA (não aclimatados) e CA (aclimatados a frio). Análise quantitativa do conteúdo de glúten foi avaliada através de um imunoensaio enzimático indireto (ELISA). Dados (média  $\pm$  SEM) representam medições em duplicata de dois preparados diferentes de WPEs ( $n = 4$ ).

Descrição de Modalidades Ilustrativas.

Nos estudos descritos neste documento, os requerentes desenvolveram um método aperfeiçoado de crioconservação para células, tais como hepatócitos isolados, condutivos ao armazenamento a longo prazo através de congelamento, tal como armazenamento em nitrogênio líquido. Os requerentes descobriram, surpreendentemente, que quando células, incluindo hepatócitos, bem como várias linhagens de células, foram crioconservadas com extratos de planta (por exemplo, trigo), a viabilidade celular após descongelamento era equivalente ou melhor do que aquela de células que foram crioconservadas com DMSO. Quando hepatócitos que tinham sido crioconservados com extratos de planta foram descongelados e semeados em placas de cultura, sua morfologia era similar àquela de células frescas. Além disso, funções hepato-específicas, tais como secreção de

albumina e biotransformação de amônio em uréia, foram bem mantidas durante 4 dias em cultura. As funções hepato-específicas eram comparáveis àquelas de células frescas, a qual estava em contraste com hepatócitos que tinham sido  
5 crioconservados com dimetil sulfóxido. Os níveis de indução de isoenzimas CYP1A1 e CYP2B de citocroma P450 em hepatócitos que tinham sido crioconservados com extratos de trigo eram similares àqueles em hepatócitos frescos.

Essas descobertas mostram claramente que extratos de  
10 planta, tais como extratos de trigo, são crioconservadores muito melhor para células (por exemplo, células primárias, tais como hepatócitos primários) do que dimetil sulfóxido. Tais extratos proporcionam as vantagens adicionais de serem um produto natural e representam um crioconservante  
15 eficiente, não tóxico, econômico e útil para o usuário com amplas aplicações para diferentes sistemas biológicos. Esse método de crioconservação permite armazenamento por longo prazo e recuperação de grandes quantidades de células saudáveis, as quais mantêm suas funções diferenciadas, tal  
20 como no caso de hepatócitos.

Conseqüentemente, em um primeiro aspecto, a invenção proporciona um extrato de planta compreendendo proteína para uso em crioconservação. "Extrato de planta compreendendo proteína" , conforme usado neste documento,

se refere a um extrato ou preparado obtido de material de planta de uma forma tal que ele compreende proteína do material de planta. Em uma modalidade, tal extrato pode ser um extrato bruto obtido, por exemplo, a partir de 5 trituração (por exemplo, em um misturador ou dispositivo similar) do material de planta em um solvente adequado (por exemplo, um solvente aquoso (por exemplo, água)), o qual pode ser seguido por meios adequados para remover matéria em partículas (por exemplo, filtração, centrifugação).

10 Em um outro aspecto, a invenção proporciona um meio de crioconservação compreendendo um extrato de planta compreendendo proteína.

O meio ou extrato da invenção pode, em modalidades, ser proporcionado em uma forma pronta para uso, uma forma 15 concentrada (ou seja, requerendo diluição) ou em uma forma desidratada (ou seja, requerendo reconstituição com um solvente aquoso adequado (por exemplo, água)). Tais formas do meio da invenção podem, em modalidades, ser proporcionadas em kits ou embalagens adequadas, em outras 20 modalidades junto com instruções (por exemplo, material escrito e/ou gráfico e/ou em uma forma legível em computador) para seu uso, preparo e/ou reconstituição. A invenção ainda proporciona kits ou embalagens contendo tais formas de meios ou extrato, em outras modalidades junto com

instruções para sua reconstituição/reidratação, diluição ou seu preparo em geral.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona uma composição compreendendo o extrato acima mencionado e um  
5 veículo ou carreador biologicamente compatível ou aceitável.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona uma composição compreendendo o meio acima mencionado e um material biológico.

10 Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de preparo do meio acima mencionado, compreendendo introdução de um extrato de planta compreendendo proteína em uma solução adequada para armazenamento ou cultura de um material biológico.

15 Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de preparo da composição acima mencionada, compreendendo introdução de um material biológico no meio acima mencionado.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método  
20 para crioconservação de um material biológico compreendendo congelamento de uma suspensão ou mistura do material biológico no meio acima mencionado.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método para crioconservação de um material biológico

compreendendo, introdução ou suspensão do material biológico no meio acima mencionado e congelamento da suspensão ou mistura do material biológico no meio acima mencionado.

5           Em um outro aspecto, a invenção proporciona o uso do meio ou extrato acima mencionado para a criopreservação de material biológico.

          Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método para criopreservação de um material biológico, o referido  
10 método compreendendo introdução do extrato acima mencionado em um meio de criopreservação antes de congelamento.

          Em um outro aspecto, a invenção proporciona um kit ou embalagem compreendendo o meio ou extrato acima mencionado. Em uma modalidade, o kit ou embalagem pode ainda  
15 compreender instruções (por exemplo, material escrito e/ou gráfico) para a criopreservação de material biológico.

          Em um outro aspecto, a invenção proporciona uma embalagem compreendendo a composição acima mencionada. Em uma modalidade, a composição é congelada, caso no qual a  
20 embalagem pode ainda compreender instruções (por exemplo, material escrito e/ou gráfico) para descongelamento da composição.

          O meio, extrato e métodos da invenção são vantajosos pelo fato de que a criopreservação pode ser realizada na

ausência de crioprotetores químicos tradicionais, tal como DMSO.

O meio, extrato e métodos da invenção também são vantajosos pelo fato de que crioconservação pode ser  
5 realizada na ausência de componentes obtidos de fontes animais, tal como soro animal exogenamente adicionado (por exemplo, soro bovino fetal, soro fetal de bezerro), assim, reduzindo o risco de contaminação por patógenos transmitidos de tais fontes animais durante o preparo de  
10 tais componentes. Em uma modalidade, o meio e extrato da invenção são substancialmente isentos de crioconservantes químicos (por exemplo, DMSO) e soro animal exógeno (por exemplo, soro bovino fetal, soro fetal de bezerro).

Em uma outra modalidade, o meio e o extrato da  
15 invenção são substancialmente isentos de glúten (ou substancialmente isentos de glúten). "Substancialmente isentos de glúten", conforme usado neste documento, se refere a um nível de glúten de 200 ppm ou menos no meio ou extrato.

20 Em outras modalidades, o meio e extrato da invenção são substancialmente isentos de DMSO, soro animal exógeno (por exemplo, soro bovino fetal), glúten ou quaisquer combinações dos mesmos.

"Meio" ou "meios", conforme usado neste documento, se refere a uma solução a qual é condutiva ao material biológico de apoio, tal como células, em um estado viável. Tais meios contêm, tipicamente, por exemplo, meios adequados para manter a isotonicidade e meios de tamponamento para manter o pH de acordo com o material biológico de interesse. Tais meios também podem conter outros aditivos os quais são conhecidos na técnica, tais como agentes para manter ou promover o crescimento celular, agentes para inibir crescimento microbiano (por exemplo, um antibiótico) e/ou um agente indicador de pH.

Em uma modalidade, o extrato de planta acima mencionado é derivado de uma planta não aclimatada ou tecido da mesma. "Não aclimatada", conforme usado neste documento, se refere a uma planta a qual não expressa proteínas anti-congelamento ou tolerantes ao congelamento. Esse termo, assim, abrange (a) plantas as quais não compreendem genes que codificam proteínas anti-congelamento ou tolerantes ao congelamento, (b) plantas as quais não podem sofrer indução de expressão de proteínas anti-congelamento ou tolerantes ao congelamento e (c) plantas as quais são capazes de indução de expressão de proteínas anti-congelamento ou tolerantes ao congelamento, mas não estão sujeitas a tal indução quando o material da planta é

obtido para preparar o extrato. No último caso, tal ausência de indução significa, tipicamente, que a planta não foi exposta às condições de aclimação ao frio (temperatura menor do que 15 °C) para que tal indução  
5 ocorra. Em contraste, uma planta "aclimatada ao frio", conforme usado neste documento, se refere a uma planta a qual não é somente capaz de sofrer indução de expressão de proteína anti-congelamento ou associadas à tolerância ao congelamento ou reguladas pelo frio, mas foi assim induzida  
10 através de tratamento adequado (por exemplo, tratamento pelo frio) e, portanto, expressa tais proteínas. Assim, uma planta capaz de aclimação (por exemplo, trigo do inverno) seria uma planta "não aclimatada" na ausência de tal indução e seria considerada uma planta "aclimatada ao frio"  
15 se ela não foi assim induzida.

Em uma modalidade, o extrato de planta acima mencionado é derivado de uma planta aclimatada ao frio ou tecido da mesma. "Aclimatada ao frio", conforme usado neste documento, é definido acima.

20 Em uma modalidade, o extrato de planta acima mencionado é obtido de um outro tecido da planta que não tecido da semente. Em uma modalidade, o extrato de planta acima mencionado é obtido das partes aéreas ou tecido de folha de uma planta.

Em modalidades, a planta é de uma família de planta selecionada de Poaceae (Gramineae), Leguminoseae e Amaranthaceae. Em uma outra modalidade, a planta é selecionada de trigo (por exemplo, trigo (*Triticum* 5 *aestivum*) cv Clair, trigo cv Glenlae), cevada (por exemplo, *Hordeum vulgare*), centeio (por exemplo, *Secale cereale*), alfafa (por exemplo, *Medicago sativa*) ou espinafre (por exemplo, *Spinacia oleracea*).

Em uma modalidade, o extrato de planta acima 10 mencionado é substancialmente solúvel. "Substancialmente solúvel", conforme usado neste documento, se refere a uma solução na qual virtualmente todo o soluto é dissolvido no solvente e parece ser límpida a olho nu. Soluções substancialmente solúveis podem ser preparadas através de 15 uma série de métodos conhecidos na técnica, incluindo métodos mecânicos de remoção de partículas, matéria não dissolvida (por exemplo, filtração, centrifugação) ou através de adição ou remoção de componentes ou tratamento da solução para intensificar a solubilidade.

20 Em uma modalidade, o extrato de planta acima mencionado é enriquecido em proteína. "Enriquecido em proteína", conforme usado neste documento, se refere a um preparado o qual sofreu um tratamento que resulta em uma maior concentração de proteína no preparado após tal

tratamento ou resulta em uma maior quantidade de proteína com relação aos outros componentes do preparado, após tal tratamento. Assim, o termo também abrange um preparado o qual sofreu um tratamento para reter, separar, isolar ou  
5 purificar proteínas em uma parte maior do que uma ou mais dos outros componentes presentes no preparado antes de tal tratamento. Tratamentos adequados são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, ultrafiltração/microfiltração, centrifugação, cromatografia, eletroforese e precipitação  
10 (por exemplo, precipitação com sulfato de amônio). Em uma modalidade, o extrato de planta enriquecido em proteína é obtido através de precipitação com sulfato de amônio. Em uma modalidade, o extrato de planta enriquecido em proteína é a fração de precipitado obtida em mais de 40% de sulfato  
15 de amônio (por exemplo, a fração de 41-100%), em outra modalidade, a fração de 41-80% de sulfato de amônio, em uma outra modalidade, a fração de 41-60% de sulfato de amônio. Em uma outra modalidade, o extrato de planta enriquecido em proteína é a fração de precipitado obtida em mais do que  
20 60% de sulfato de amônio (por exemplo, a fração de 61-100%), em uma outra modalidade, a fração de 61-80% de sulfato de amônio. Em uma outra modalidade, o extrato de planta enriquecido de proteína é a fração de precipitado

obtida em mais do que 80% de sulfato de amônio, por exemplo, a fração de 81-100% de sulfato de amônio.

Conforme mencionado acima, uma vantagem do meio da invenção é que a possibilidade de permitir a  
5 crioconservação na ausência de DMSO. Conseqüentemente, em uma modalidade, o meio acima mencionado é "substancialmente isento de DMSO", o qual, conforme usado neste documento, se refere a um meio ao qual DMSO não foi diretamente adicionado como um crioprotetor.

10 Conforme observado acima, outra vantagem do meio da presente invenção é que a possibilidade de permitir a crioconservação na ausência de componente de fontes animais, tal como soro animal. Conseqüentemente, em uma modalidade, o meio acima mencionado é substancialmente  
15 isento de soro animal exógeno (ou seja, em casos onde material biológico de uma fonte animal está sendo crioconservada, soro exógeno representa soro derivado de um animal diferente do que a fonte do material biológico). Em uma outra modalidade, o meio acima mencionado é  
20 substancialmente isento de soro bovino fetal. Conforme usado neste documento, "substancialmente isento de soro animal" ou "substancialmente isento de soro bovino fetal" se refere a um meio ao qual soro animal ou soro bovino fetal não foi diretamente adicionado. Em uma modalidade, o

meio acima mencionado é substancialmente isento de ambos DMSO e soro animal exógeno (por exemplo, soro bovino fetal).

"Material biológico", conforme usado neste documento, se refere a qualquer material derivado de um sistema biológico incluindo, mas não limitado a, material contendo informação genética e o qual é capaz de auto-reprodução ou reprodução em um sistema biológico adequado. Em modalidades, o material biológico é selecionado de uma molécula, organela, célula, embrião, tecido ou órgão. Em modalidades, o material biológico é eucariótico ou procariótico. Em uma modalidade, a célula é uma célula primária. "Célula primária", conforme usado nesse documento, se refere a uma célula obtida diretamente de um organismo vivo, o qual não é imortalizado. Em modalidades, a célula é eucariótica. Em uma modalidade, a célula, embrião, tecido ou órgão é uma célula, embrião, tecido ou órgão de animal, em uma outra modalidade, uma célula, embrião, tecido ou órgão de mamífero, em ainda uma outra modalidade, uma célula, embrião, tecido ou órgão humano. Em uma outra modalidade, a célula é um hepatócito, tal como um hepatócito humano primário. Em outras modalidades, o material é uma linhagem de célula ou célula imortalizada.

Em uma modalidade, a viabilidade do material biológico (por exemplo, célula, tecido ou órgão) após criopreservação com o meio acima mencionado, ou seja, determinada após descongelamento, será pelo menos 40% da viabilidade inicial (ou seja, a viabilidade do material biológico antes da criopreservação). Em outras modalidades, a viabilidade será pelo menos 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75% da viabilidade inicial. Métodos para determinar a viabilidade são conhecidos na técnica. Por exemplo, determinados métodos adequados para determinar a viabilidade são descritos nos exemplos abaixo.

Em uma modalidade, o nível ou atividade de um parâmetro funcional (por exemplo, o qual reflete a atividade metabólica) do material biológico (por exemplo, molécula, organela, célula, embrião, tecido ou órgão) após criopreservação com o meio acima mencionado, ou seja, determinado após descongelamento, será pelo menos 40% do nível ou atividade do parâmetro funcional (ou seja, o nível ou atividade anterior à criopreservação). Em outras modalidades, o nível ou atividade de um parâmetro funcional será pelo menos 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75% do nível ou atividade inicial do parâmetro funcional. Em modalidades, o parâmetro funcional é selecionado de eficiência de plaqueamento, aderência, morfologia celular,

secreção (por exemplo, de albumina), síntese de proteína, desintoxicação de amônio e atividade enzimática (por exemplo, LDH, diferentes isoformas de citocromo P450). Métodos para determinar um nível ou atividade de vários  
5 parâmetros funcionais são conhecidos na técnica. Por exemplo, determinados métodos adequados são descritos nos exemplos abaixo.

Uma composição (compreendendo o meio acima mencionado e material biológico) da invenção pode ser preparado para  
10 congelamento em uma série de maneiras, pelo fato de que os vários componentes podem ser combinados em diferentes seqüências. Por exemplo, em uma modalidade, o material biológico pode ser introduzido em meio já compreendendo o extrato de planta. Outra possibilidade pode ser, por  
15 exemplo, introduzir o material biológico em uma solução de meio e, então, subsequente, introduzir o extrato de planta na mistura.

Em modalidades, congelamento controlado da composição acima mencionada pode ser realizado usando um dispositivo  
20 de congelamento programável, o qual facilita taxas de resfriamento ótimas e reproduzíveis. Tais dispositivos são conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis.

Recipientes preferidos para congelamento da composição acima mencionada são aqueles que são estáveis em

temperaturas criogênicas e permitem transferência de calor apropriada para ambos congelamento e descongelamento. Tais recipientes incluem, por exemplo, frascos plásticos vedados para pequenos volumes (por exemplo, 1-2 ml) e sacos de poliolefina (tipicamente mantidos entre placas de metal para congelamento) para volumes maiores, ambos os quais são conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis.

Congelamento é, geralmente, realizado usando meios adequados (tais como um congelador, o dispositivo acima mencionado ou contato do material biológico com um substrato/banho abaixo de 0 °C apropriado) para diminuir a temperatura da amostra para uma temperatura adequada (por exemplo, -20 °C, -80 °C) em uma taxa apropriada. Em modalidades, as amostras congeladas podem ser transferidas para um recipiente adequado para armazenamento criogênico a longo prazo, tal como aqueles empregando armazenamento em nitrogênio líquido (cerca de -196 °C) ou em vapor de nitrogênio líquido (cerca de -105 °C). Tais dispositivos são conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis.

A presente invenção é ilustrada em maiores detalhes por meio dos exemplos não limitativos a seguir.

#### Exemplos.

Exemplo 1: Materiais e Métodos.

Produtos químicos: Colagenase, insulina, meio de Williams E (WME), sulfóxido de dimetila (DMSO), resofurina e todos os outros produtos químicos foram obtidos da Sigma Chemical Company (St-Louis, MO). Meio de Leibovitz (L-15),  
5 gentamicina e vitaminas MEM foram obtidos da Gibco/Life Technologies (Burlington, ONT). Calceína, 7-etóxi-resorufin-O-deetilase (EROD) e 7-pentóxi-resorufin-O-depentilase (PROD) foram obtidos da Molecular Probes (Eugene, OR). Iodeto de propídio (PI) foi obtido da  
10 Calbiochem (San Diego, CA). Anticorpos para 1A1 de citocroma P-450 (IgG policlonal de cabra CYP1A1 (G-18)) e para IgG anti-cabra (IgG anti-cabra de camundongo conjugada a peroxidase de *Armoracia rusticana* (HRP)) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Soro bovino  
15 fetal (FBS) foi obtido da Medicorp (Montreal, QC).

Materiais de planta e condições de crescimento: O genótipo de trigo do inverno (*Triticum aestivum* L. cv Clair, LT<sub>50</sub> (temperatura letal que mata 50% das mudas) - 19 °C foi usado nesse estudo. As plantas de trigo foram  
20 crescidas e tratadas conforme previamente descrito (12). Resumidamente, plantas de controle foram crescidas durante 10 dias a 20 °C e aclimação ao frio (CA) foi realizada a 4 °C por um período de 7 dias.

Extração de proteína total: As partes aéreas das mudas foram coletadas e misturadas até que uma solução homogênea fosse obtida com água nanopura gelada. O homogeneizado foi filtrado através de 3 camadas de "Miracloth" e centrifugado a 30.000 g durante 45 min a 4 °C. O pH do sobrenadante foi ajustado para 7,4 e esterilizado usando um filtro de 0,22 µm. O extrato foi concentrado através de liofilização e armazenado a -20 °C.

Isolamento e cultura de hepatócitos: Hepatócitos foram isolados de ratos machos "Sprague-Dawley" (120-180 g), obtidos de Charles River Canada (Saint-Constant, QC), em uma técnica de digestão com collagenase em duas etapas (13; 14). Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com as diretrizes do Canadian Council on Animal Care ("conselho canadense de cuidado ao animal") para o cuidado e uso de animais experimentais (15). A viabilidade celular foi avaliada através de citometria de fluxo (FACScan™, Becton Dickinson, Oakville, ON) com PI a 2 µM (16). Células isoladas foram diluídas a  $3,5 \times 10^5$ /ml e cultivadas em lâminas de cultura tecidual (Corning, Acton, MA) em meio WME suplementado com FBS a 10%, insulina (0,2 µg/ml) e gentamicina (50 µg/ml) em uma atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar a 37 °C. Após 3 h, o meio foi trocado e

as células foram incubadas durante a noite em meio L-15 (16) suplementado com insulina e gentamicina.

Crioconservação de hepatócitos isolados: Imediatamente após isolamento, a suspensão de hepatócito foi adicionada a  
5 uma mistura de meio WME gelado suplementado com FBS a 10% e extratos de proteína de trigo (WPEs) não-aclimatados (NA) ou CA em criofrascos gelados. Controles positivos (DMSO a 15% + FBS a 50%) e negativos (WME) foram também preparados. Os tubos contendo células foram, então, congelados em uma  
10 taxa de resfriamento de 1 °C/min em um recipiente de congelamento controlado (Nalgene, Rochester, NY) para -80 °C durante um dia e, então, transferidos para nitrogênio líquido.

Descongelamento de hepatócitos crioconservados: Os  
15 hepatócitos congelados foram descongelados rapidamente através de leve agitação em um banho de água a 37 °C. Análises de viabilidade foram realizadas sobre a suspensão de hepatócito. Para análises metabólicas e de aderência, a suspensão de hepatócito foi diluída 10 vezes através da  
20 adição de meio WME gelado, imediatamente após descongelamento. Uma etapa de centrifugação em "Percoll" isotônico a 30% foi realizada para remover as células mortas quando a viabilidade foi menor do que 80%. Após centrifugação (4 °C, 50 g, 2 min), hepatócitos foram

suspendidos em 10 ml de meio WME. Os hepatócitos foram lavados duas vezes conforme acima, então, suspendidos a  $3,5 \times 10^5/\text{ml}$  em WME e cultivados em lâminas de cultura de tecido em meio WME suplementado com insulina e gentamicina em uma atmosfera umidificada de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar a 37 °C. Após 3 h, o meio foi trocado e as células foram incubadas durante a noite em meio L-15 suplementado com insulina e gentamicina.

Ensaio de viabilidade: Após ciclos de congelamento/descongelamento, suspensões de hepatócitos foram coradas com as sondas fluorescentes calceína a 4  $\mu\text{M}$  e PI a 2  $\mu\text{M}$  em meio WME durante 5 minutos. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (excitação a 488 nm) usando um Becton Dickinson FACScan™. O número de células vivas expressando a fluorescência verde da calceína e o número de células mortas expressando a fluorescência vermelha de PI foram determinados com o software Cell Quest™ (Becton Dickinson, Oakville, ON).

Atividade de lactato desidrogenase (LDH) foi determinada no meio de hepatócitos cultivados como uma medida de deterioração de hepatócitos, conforme descrito por Moldeus e colaboradores (17). O meio de cultura de

hepatócito foi removido diariamente e a atividade do LDH liberado no meio foi quantificada (18).

Eficiência de plaqueamento: A eficiência de plaqueamento foi determinada através de medição da  
5 atividade de LDH em células antes da semeadura e em culturas de 3 e 24 h de idade. A eficiência de plaqueamento foi definida como a atividade de LDH em culturas de 24 h de idade dividido pela atividade de LDH em células em pré-cultura.

10 Aderência e morfologia celular: Aderência e morfologia celular foram avaliadas através de microscopia confocal. Para as observações por microscopia confocal, lâminas de cultura tecidual revestidas com colágeno foram usadas. Todas as análises foram realizadas usando o microscópio  
15 confocal MRC1024 da BioRad (Microscience, Cambridge, MA) equipado com um laser de argônio (excitação a 488 nm) combinado com um microscópio invertido Eclipse modelo TE 3000 (Nikon, Montreal, QC) com lentes objetivas de 40X Hoffman.

20 Determinação de secreção de albumina: A secreção de albumina de hepatócitos foi quantificada a cada 24 h, até 96 h, em diferentes meios de cultura de hepatócito através do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) de acordo com Uotila e colaboradores (19), com modificações mínimas (20).

Resumidamente, lâminas com 96 poços (Nunc, Napierville, IL) foram cobertas com anti-soro de coelho anti-albumina de rato (1  $\mu\text{g/ml}$ ). As lâminas foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente (RT), então, a 4 °C durante a noite, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), bloqueadas durante 30 min em RT com FBS a 5% em PBS e, então, lavadas novamente com PBS. Diluições seriais da amostra e padrão de albumina foram adicionadas (200  $\mu\text{l/poço}$ ). As lâminas foram incubadas para III em "RT" e lavadas com PBS suplementado com Tween-20 a 0,05% (PBS-T). Desde então, o anticorpo secundário (anti-albumina de rato peroxidase-conjugado; 2  $\mu\text{g/ml}$ ) foi adicionado e as lâminas foram incubadas durante 1 h em RT. Após 3 lavagens com PBS-T, as lâminas foram incubadas com substrato o-fenilenodiamina (OPND) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,1 M, 1 mg/ml de OPND, 0,4  $\mu\text{l/ml}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 30 min em RT no escuro. A reação foi cessada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 4 M. As concentrações de albumina foram determinadas a 550 nm usando uma curva padrão oscilando de 0 a 250 ng/dl de albumina de rato usando um leitor ELISA (SPECTRAFLUOR Plus™, Tecan, CA).

Determinação de uréia: Para avaliar a biotransformação mediada por hepatócito de amônia em uréia, hepatócitos cultivados foram expostos ao meio de cultura L-15 contendo

NH<sub>4</sub>Cl a 10 mM. Amostras de meio foram coletadas no início e após intervalos de exposição à amônia de 24 h, durante 3 dias. A concentração de uréia nas amostras foi medida colorimetricamente usando o conjunto reagente de nitrogênio uréia (BioTron Diagnostics, Hemet, CA) e um leitor ELISA a 540 nm. As concentrações de uréia foram determinadas usando uma curva padrão oscilando de 0 a 45 mg/gl de uréia. Os resultados são apresentados como µg de uréia/10<sup>6</sup> células.

Atividade enzimática e expressão de proteína de isoformas de citocromo P450: As atividades enzimáticas de CYP1A1 e 2B foram medidas em culturas de hepatócitos induzidas com benzo-a-pireno (10 µM). Células foram lavadas 2 vezes com PBS e os substratos EROD (8 µM) ou PROD (17 µM) ( $\lambda_{exc}$ : 530 nm;  $\lambda_{em}$ : 585 nm) foram adicionados às placas de cultura e incubados por 1 h. O sobrenadante (300 µl) foi misturado com 200 µl de ETOH e a atividade em 200 µl da mistura foi medida usando um leitor ELISA a 585 nm. A atividade enzimática foi determinada usando uma curva padrão oscilando de 0 a 200 µM de resorufina.

A expressão da proteína CYP1A1 foi determinada após uma indução de 24 h com benzo-a-pireno (10 µM). As células foram lavadas com PBS e raspadas das lâminas, suspendidas em 100 µl de tampão de lise (Tris-HCl a 20 mM, EGTA a 2 mM,

EDTA a 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol a 6 mM) e homogeneizadas através de ultra-som. Amostras de proteína (30  $\mu$ g) foram misturadas com tampão de amostra de Laemmli e separadas sobre um gel de SDS poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) (21).

5 Eletroforese foi realizada a 140 volts por 50 min. A transferência de proteínas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) foi realizada a 80 mA/membrana por 1,5 h. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó em tampão TBS-T (Tris-HCl a 2 mM, NaCl a 13,7 mM, Tween a

10 0,1%) por 1 h em RT. As membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T, incubadas com um anticorpo primário (CYP1A1 (G-18), diluídas 1/1000) durante a noite a 4 °C, lavadas 3 vezes com TBS-T e, então, incubadas por 1 h com o anticorpo

15 secundário HRP conjugado (IgG anti-cabra, diluição a 1/1000). As bandas de proteína que reagiram com o anticorpo foram reveladas usando o reagente Western Lightning Chemiluminescence Plus™ (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) e o filme BioMax MS™ (Eastman-Kodak, Rochester, NY). As

20 proteínas sobre o filme foram quantificadas através de densitometria usando um teste Molecular Dynamics (Amersham, Baie d'Urfe, Qc) e o software IP Lab Gel (Scanalytics Inc., Fairfax, VA).

Análise estatística: Resultados quantitativos foram expressos como a média  $\pm$  SD de pelo menos 3 placas repetidas para cada condição com um mínimo de 3 repetições experimentais, com cada repetição experimental usando 5 células de um procedimento de isolamento de hepatócito diferente. Os dados foram normalizados para os controles experimentais não criopreservados em cada intervalo de tempo no mesmo experimento. A comparação entre os grupos e a análise para as diferenças entre as médias dos controles e grupos tratados foram realizadas usando ANOVA seguido pelo teste "post-hoc" de Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ). O limiar para significância estatística foi considerado  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*).

Exemplo 2: Criopreservação de hepatócitos de rato usando 15 técnicas clássicas.

Experimentos iniciais foram projetados para determinar o protocolo ótimo de criopreservação para hepatócitos recentemente isolados de rato usando DMSO. Concentrações de hepatócito oscilando de 1,5 a  $5 \times 10^6$  células/ml foram 20 congeladas para  $-80^\circ\text{C}$  em meio de Williams suplementado com FBS a 10% e DMSO de 5 a 25%. Os melhores resultados foram obtidos quando células foram criopreservadas com DMSO a 15%. A taxa de congelamento também foi avaliada usando três diferentes aparelhos de congelamento: Styrofoam (4 h a  $-20$

°C, 18 h a -80 °C), um congelador programável (-6°C/h até -20 °C, então, 18 h a -80 °C) ou um aparelho Nalgene™ (-1°C/min até -80 °C por 18 h). Os resultados indicaram que uma concentração de hepatócito de  $5 \times 10^6$  células/ml e congelamento no aparelho Nalgene™ constituíam as condições ótimas para a crioconservação de hepatócitos de rato usando DMSO. Essas condições foram usadas como uma referência para crioconservação clássica nos experimentos subseqüentes.

Exemplo 3: Potencial de crioconservação de WPEs sobre hepatócitos de rato.

A capacidade de diferentes WPEs de melhorar a viabilidade de hepatócitos de rato crioconservados, comparado com DMSO, foi avaliada. Os resultados na figura 1 apresentam a viabilidade de hepatócitos de rato após 7 dias de congelamento na presença de WPEs, outras proteínas e DMSO comparado com hepatócitos frescos. A viabilidade de hepatócitos com DMSO a 15% + FBS a 50% (controle positivo) foi de 62,5%, comparado com 86,3% para hepatócitos recentemente isolados. Quando DMSO a 15% + 20 mg de BSA foram usados, a viabilidade de hepatócitos crioconservados foi de 38,7%. Por outro lado, baixa viabilidade foi obtida na presença de 20 mg de BSA, meio WME, 20 mg de FBS ou proteínas de *E. coli* (3,9; 1,6; 6,5 e 3,3%; respectivamente). Entretanto, resultados significativos

foram obtidos com a adição de 20 mg de WPE NA, proporcionando uma viabilidade de 68,4%. Esses níveis de viabilidade eram comparáveis com aqueles obtidos com o crioprotetor clássico, DMSO. Em comparação, uma quantidade  
5 igual de WPE CA proporcionou uma viabilidade de 35,8% (fig. 1). Essas descobertas demonstram que os WPEs contêm compostos específicos com atividade crioprotetora pelo menos equivalente ao crioprotetor comumente usado, DMSO.

Nossos resultados também demonstram que extratos de  
10 outras plantas, tais como cevada, centeio, alfafa e espinafre, possuíam atividade crioprotetora para hepatócitos (veja figura 6). Uma quantidade igual de outras proteínas, tais como BSA ou proteínas de *E. coli*, não mostraram qualquer atividade de crioconservação, indicando  
15 que a atividade crioprotetora é específica aos extratos de planta.

A viabilidade de hepatócitos também foi avaliada usando a liberação de LDH. A liberação de LDH celular mede a perda de viabilidade do hepatócito em cultura  
20 proporcionando uma medição indireta da integridade da membrana das células. Os resultados na fig. 2 mostram que os níveis de viabilidade para hepatócitos crioconservados com WPEs foram melhores do que aqueles obtidos com DMSO. Após 24 h em cultura, altas viabilidades de 76,4 e 89,3%

foram obtidas para hepatócitos crioconservadas com os WPEs NA e CA, respectivamente, comparado com 60,2% para o DMSO clássico. Viabilidade aperfeiçoada na presença de WPEs, comparado com DMSO, foi mantida durante o período de  
5 cultura de 96 h. WPEs melhoraram a viabilidade em níveis similares àqueles obtidos em hepatócitos frescos durante 96 h. O teste com LDH realizado sobre hepatócito pós descongelamento após semeadura demonstra, adicionalmente, que hepatócitos crioconservados com WPEs mantiveram melhor  
10 viabilidade celular em cultura do que aqueles que foram crioconservados com DMSO. Foi ainda demonstrado que a viabilidade celular dos hepatócitos crioconservados com WPE foi similar àquela de hepatócitos frescos, indicando que WPEs são menos tóxicos e mais eficientes como agentes de  
15 crioconservação do que DMSO.

Exemplo 4: Eficiência de plaqueamento, aderência e morfologia celular dos hepatócitos de rato crioconservados.

A capacidade de células descongeladas de sobreviver em cultura é uma indicação da crioconservação com sucesso de  
20 hepatócitos. A eficiência do plaqueamento de células foi avaliada 3 h e 24 h após semeadura e cultura. Após 3 h em cultura, as eficiências de plaqueamento dos hepatócitos de rato descongelados crioconservados com DMSO, WPEs NA e CA, foram ligeiramente menores do que para os hepatócitos de

rato recentemente isolados (62,5 a 64,9%, comparado com 77,3%, tabela 1). Após 24 h em cultura, a eficiência de plaqueamento foi maior do que 50% para os hepatócitos de rato descongelados crioconservados com DMSO, WPEs CA e NA, com relação aos hepatócitos não crioconservados (100%) (tabela 1). Essas descobertas demonstram que a eficiência de plaqueamento de hepatócitos era comparável na presença de WPEs e do crioprotetor clássico DMSO.

Tabela 1: Eficiência de plaqueamento de hepatócitos de rato descongelados após crioconservação com WPEs comparado com hepatócitos recentemente isolados.

| Período de cultura (horas) | Fresco      | Crioconservados |            |            |
|----------------------------|-------------|-----------------|------------|------------|
|                            |             | DMSO            | NA         | CA         |
| 3                          | 77,3 ± 0,5  | 64,9 ± 1,7      | 63,7 ± 1,5 | 62,5 ± 0,4 |
| 24                         | 100,0 ± 2,4 | 50,3 ± 4,1      | 50,9 ± 2,9 | 52,5 ± 3,4 |

\*Eficiência de plaqueamento foi avaliado pela atividade de LDH em hepatócitos recentemente isolados e crioconservados, conforme descrito em materiais e métodos. Os dados são expressos como a média ± SEM a partir de três experimentos diferentes.

Análise morfológica dos hepatócitos, crioconservados descongelados, através da microscopia confocal é mostrada

24 h após semeadura de hepatócitos que foram  
crioconservados com WPEs (Fig. 3C e D), assim como com DMSO  
(fig. 3B), comparado com hepatócitos recentemente isolados  
(fig. 3A). Na mesma concentração de célula, os hepatócitos  
5 frescos e crioconservados com WPE mostravam morfologia  
celular similar. Hepatócitos crioconservados com WPE (fig.  
3C e D) pareciam como a célula fresca (fig. 3A) com uma  
morfologia celular redonda. Eles também pareciam ser mais  
dispersos do que aqueles crioconservados com DMSO (fig.  
10 3B). Além disso, nós podemos observar a presença de  
contatos célula a célula para ambos hepatócitos frescos,  
crioconservados com WPEs NA e CA, enquanto que nenhum  
contato célula a célula foi detectado para os hepatócitos  
crioconservados com DMSO (fig. 3B).

15 Os estudos de eficiência de plaqueamento, assim,  
indicam que ambos hepatócitos crioconservados com DMSO e  
WPEs tiveram um bom desempenho, com eficiências de fixação  
na faixa de 50% com relação às células frescas. Esses  
resultados eram similares àqueles obtidos para hepatócitos  
20 crioconservados com DMSO em outros estudos (22,23). Além  
disso, análise microscópica de hepatócitos pós  
descongelados semeados sobre placas revestidas com colágeno  
demonstrou sua capacidade de se fixar e restaurar a  
morfologia próxima do normal com contatos célula a célula,

após criopreservação com WPE. As propriedades de fixação e morfologia celular foram melhores conservadas em hepatócitos que tinham sido criopreservados com WPE, em vez de DMSO, demonstrando novamente a maior eficiência de WPEs em criopreservar hepatócitos de rato. Os contatos célula a célula estavam presentes em hepatócitos de rato criopreservados com WPE, sugerindo uma melhor conservação de integridade da membrana.

Exemplo 5: Secreção de albumina por hepatócitos de rato criopreservados.

Secreção de albumina é um marcador específico para síntese de proteína em hepatócitos, porque requer expressão de gene fígado específico e vias traducionais e secretórias intactas. Os efeitos de WPEs sobre a produção de albumina por hepatócitos de rato criopreservados foram monitorados através de um período de 4 dias após plaqueamento em placas de cultura (fig. 4A). Secreção de albumina por hepatócitos recentemente isolados diminuiu progressivamente com o tempo dos dias 1 a 4, embora a diminuição fosse muito mais rápida em células que tinham sido criopreservadas com DMSO. Em hepatócitos frescos, 85% da atividade secretora de albumina foram mantidos após 4 dias em cultura enquanto que, em células criopreservadas com DMSO, restaram apenas 48% de atividade. Contudo, 83% da atividade secretora de albumina

foram mantidos em hepatócitos que foram crioconservados com os WPES CA após 4 dias. Esse valor é comparável com aquele de hepatócitos recentemente isolados. Quando hepatócitos foram crioconservados com WPES NA, os níveis de secreção de albumina foram aproximadamente 30% menos do que aqueles de hepatócitos crioconservados com WPES CA. Esses resultados demonstram que a função hepato-específica da secreção de albumina foi bem mantida no decorrer do período de cultura de 4 dias em hepatócitos crioconservados com WPE e que essa função foi consideravelmente aperfeiçoada com WPES CA comparado com DMSO (fig. 4A).

Exemplo 6: Desintoxicação de amônio por hepatócitos de rato crioconservados.

Os efeitos de WPES sobre a desintoxicação de amônio por hepatócitos de rato crioconservados foram medidos nos dias 2, 3 e 4 após plaqueamento em placas de cultura, comparado com células frescas (fig. 4B). A produção de uréia por hepatócitos recentemente isolados e crioconservados com DMSO diminuiu progressivamente com o tempo. Uma diminuição importante na produção de uréia pelos hepatócitos crioconservados com DMSO foi observada no quarto dia após plaqueamento, comparado com os hepatócitos frescos. Os hepatócitos frescos mantiveram 55% da atividade de desintoxicação inicial, enquanto que as células tratadas

com DMSO mantiveram apenas 16% da atividade inicial após 4 dias em cultura. Por outro lado, após subtração da atividade de arginase da planta, a desintoxicação de amônio em hepatócitos crioconservados com WPEs foi similar àquela dos frescos durante intervalos de tempo de 48-72 e 72-96 h. Essas descobertas indicam que a função hepato-específica de desintoxicação de amônio foi bem mantida no decorrer do período de cultura de 4 dias com WPE com relação ao padrão DMSO (fig. 4B).

Exemplo 7: Atividades da enzima de citocromo P450 através hepatócitos de rato crioconservados.

A atividade das enzimas de citocromo P450 que metabolizam xenobióticos também foi avaliada como um terceiro marcador de funções hepato-específicas. A atividade metabólica das isoformas CYP1A1 e CYP2B de citocromo P450 foi medida através das análises EROD (CYP1A1) e PROD (CYP2B) após uma indução de 24 h com benzo-a-pireno (fig. 5A). Comparado com hepatócitos frescos, a atividade relativa das enzimas CYP1A1 e CYP2B de P450 diminuiu ligeiramente em hepatócitos crioconservados com DMSO, enquanto que foi mantida em hepatócitos crioconservados com WPEs NA e CA. Análises de "Western Blot" da isoforma CYP1A1 demonstrou que o aumento na atividade benzo-a-pireno induzível estava associado à

expressão elevada da proteína (fig. 5B). Isso indica que a atividade metabólica das isoformas CYP1A1 e CYP2B de citocromo P450 também foi aperfeiçoada em hepatócitos crioconservados com WPE, comparado com DMSO (fig. 5A, B).

5 Esses resultados indicam que os hepatócitos crioconservados com WPE retiveram sua atividade metabólica e sua capacidade de responder a indutores de CYP mais eficientemente do que as células de rato crioconservadas com DMSO.

Exemplo 8: Potencial de crioconservação dos PES de uma  
10 variedade de tipos de planta sobre hepatócitos isolados de rato.

Análise da viabilidade de suspensões de hepatócitos de rato após congelamento foi avaliada com o teste de calceína/PI através de citometria de fluxo, com resultados  
15 mostrados na figura 6. A viabilidade de hepatócitos de rato ( $1,5 \times 10^6$  células/ml) foi avaliada após 7 dias de congelamento em WME, FBS a 10% suplementado com DMSO a 15% e FBS a 50% (DMSO). O efeito de PES de trigo (*Triticum aestivum*) cv Clair, trigo cv Glenlae, cevada (*Hordeum*  
20 *vulgare*), centeio (*Secale cereale*), alfafa (*Medicago sativa*) ou espinafre (*Spinacia oleracea*) sobre a viabilidade da suspensão de hepatócitos de rato também foi avaliada após 7 dias de congelamento em WME suplementado com 20 mg ou 40 mg (+) de PES de planta NA. Hepatócitos

recentemente isolados (frescos) serviram como uma referência.

Exemplo 9: Crioconservação de vários tipos de células eucarióticas com DMSO e WPES.

5       Análise da viabilidade de suspensões de células eucarióticas após congelamento foi avaliada com um teste com calceína/PI através de citometria de fluxo, com resultados apresentados na figura 7. A viabilidade de hepatócitos primários de rato, linhagens de células A549  
10       (carcinoma de pulmão humano), Caco-2 (adenocarcinoma cólon-retal humano), CHO-B1 (ovário de hamster chinês transfectado com cDNA de TGF- $\beta$ 1), HeLa (células de câncer cervical tiradas de Henrietta Lacks), HIEC (células de epitélio intestinal humano) e Jurkat (leucemia de células T  
15       humanas) ( $1,5 \times 10^6$  células/ml) foi avaliada após 7 dias de congelamento em seus respectivos meios de crescimento suplementados com DMSO a 15% e FBS a 50% (DMSO) ou WPES NA Clair (NA). Hepatócitos recentemente isolados (frescos) serviram como uma referência. Esses dados demonstram que o  
20       WPE é um melhor agente crioprotetor do que o DMSO.

Exemplo 10: Potencial de crioconservação dos WPES de frações de precipitado de sulfato de amônio sobre hepatócitos isolados de rato.

O efeito de precipitação com sulfato de amônio do extrato de CA sobre a viabilidade celular foi testado. Precipitação com sulfato de amônio é obtida através da adição de sais de amônio aos WPEs para compor a  
5 concentração de sal. As proteínas começam a se precipitar à medida que a concentração de sal é aumentada. A coleta de produto separado é denominada fracionamento; a fração das proteínas precipitadas coletadas entre 41 e 60% de saturação de sal é referida como a fração de 41-60%.  
10 Resultados significativos foram obtidos com a fração 41-60 do WPE CA, proporcionando uma viabilidade de 50,1% comparado com 25,8% para o WPE CA total (figura 8). As frações de 61-80 e 81-100% foram mais eficientes, proporcionando viabilidades de 76,56% e 74,75%,  
15 respectivamente, com extrato NA. Para o WPE CA, as viabilidades foram 67,09 e 76,04%. Isso demonstra que a precipitação com sulfato de amônio tem um efeito positivo sobre a viabilidade celular. Nós também observamos que as frações de proteína 41-60, 61-80 e 81-100 eram isentas de  
20 sua coloração verde viscosa.

Exemplo 11: Influência do soro bovino fetal sobre o potencial de crioconservação de WPE NA sobre hepatócitos isolados de rato.

Em protocolos de crioconservação, soro bovino fetal (FBS) é usualmente adicionado em concentrações oscilando de 10 a 50%. Uma vez que o FBS é de origem animal, ele representa um risco potencial de contaminação e cria grandes preocupações de segurança na indústria. Assim, há um interesse crescente no desenvolvimento de novas soluções de crioconservação isentas de produtos de origem animal. WPE foi testado como um crioconservante sem suplementação de FBS. Diferenças não significativas na viabilidade de hepatócitos foram obtidas quando FBS foi adicionado ou não às soluções de crioconservação (figura 9). Isso demonstra que a adição de soro bovino não é essencial para a crioconservação de células de hepatócitos primárias.

Exemplo 12: Teor de glúten de WPEs.

Glúten é uma mistura de proteínas prolamina e glutelina presentes no trigo. Doença celíaca é uma intolerância permanente ao glúten que resulta em dano ao intestino delgado e é reversível quando glúten é evitado pela dieta. No Codex Alimentarius, alimento "sem glúten" é definido como um alimento tendo menos do que 200 ppm de glúten. O novo Codex Standard proposto para alimentos sem glúten define um teor máximo de 20 ppm de glúten em produtos naturalmente sem glúten e 200 ppm de glúten em produtos tornados sem glúten. Análises quantitativas do

15  
teor de glúten foram obtidas para os WPES NA e CA, proporcionando 0,044 e 0,00 ppm, respectivamente (figura 10). Isso demonstra que os WPES NA e CA são produtos sem glúten.

5 Abreviações usadas neste documento: tolerância ao congelamento, "FT"; proteínas anti-congelamento, "AFPs"; inibição de recristalização do gelo, "IRI"; extratos de proteína de trigo, "WPE"; meio E de Williams, "WME"; sulfóxido dimetil, "DMSO"; meio de Leibovitz, L-15; 7-  
10 etóxioresorufin-O-deetilase, "EROD"; 7-pentóxioresorufin-O-depentilase, "PROD"; iodeto de propídio, "PI"; citocromo P450, "CYP"; peroxidase de *Armoracia rusticana*, "HRP"; soro bovino fetal, "FBS"; aclimatado ao frio, "CA"; não aclimatado, "NA"; lactato desidrogenase, "LDH"; ensaio  
15 enzimático indireto "ELISA"; temperatura ambiente, "RT"; solução salina tamponada com fosfato, "PBS"; PBS suplementado com Tween-20 a 0,05%, "PBS-T"; o-fenileno diamina, "OPND"; solução salina tris-tamponada suplementada com Tween-20 a 0,1%, "TBS-T".

20 Embora a presente invenção tenha sido descrita conforme acima por meio de modalidades específicas da mesma, ela pode ser modificada, sem divergir do espírito e natureza da invenção em questão, conforme definido nas reivindicações em anexo.

## Referências.

1. Meeks RG, Harrison SD, Bull RJ. Hepatotoxicology. CRC Press ed. FL: Boca Raton, 1991.
2. Clément B, Guillouzo A. Cellular and molecular aspects  
5 of cirrhosis. John Libbey Eurotext, INSERM ed. Paris: 1992.
3. Glicklis R, Shapiro L, Agbaria R, Merchuk JC, Cohen S. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2000; 67: 344-353.
4. Billings RE, McMahon RE, Ashmore J, Wag I e SR. The  
10 metabolism of drugs in isolated rat hepatocytes. A comparison with *in vivo* drug metabolism and drug metabolism in subcellular liver fractions. *Drug Metab Dispos* 1977; 5: 518-526.
5. Houston JB. Utility of *in vitro* drug metabolism data in  
15 predicting *in vivo* metabolic clearance. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 1469-1479.
6. Kedderis GL. Extrapolation of *in vitro* enzyme induction data to humans *in vivo*. *Chem Biol Interact* 1997; 107: 109-121.
- 20 7. Zaleski J, Richburg J, Kauffman FC. Preservation of the rate and profile of xenobiotic metabolism in rat hepatocytes stored in liquid nitrogen. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 111-116.

8. Powis G, Santone KS, Melder DC, Thomas L, Moore DJ, Wilke TJ. Cryopreservation of rat and dog hepatocytes for studies of xenobiotic metabolism and activation. *Drug Metab Dispos* 1987; 15: 826-832.
- 5 9. Santone KS, Melder DC, Powis G. Studies of chemical toxicity to fresh and cryopreserved rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 97: 370-376.
10. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 1986; 23: 1-13.
- 10 11. Schneider U, Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1984; 21: 68-79.
12. Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N e colaboradores. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 1998; 10: 623-638.
- 15 13. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13: 29-83.
- 20 14. Guillemette J, Marion M, Denizeau F, Fournier. M, Brousseau P. Characterization of the *in vitro* hepatocyte model for toxicological evaluation: repeated growth stimulation and glutathione response. *Biochem Cell Biol* 1993; 71: 7-13.

15. Canadian council on animal care. Guide to the care and use of experimental animals. 2<sup>a</sup> ed. Canadian council on animal care, 1993.
16. Reader S, Marion M, Denizeau F. Flow cytometric  
5 analysis of the effects of tri-n-butyltin chloride on cytosolic free calcium and thiol levels in isolated rainbow trout hepatocytes. *Toxicology* 1993; 80: 117-129.
17. Moldeus P, Hogberg J, Orrenius S. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol* 1978; 52: 60-71.
- 10 18. Moffatt P, Plaa GL, Denizeau F. Rat hepatocytes with elevated metallothionein expression are resistant to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 136: 200-207.
- 15 19. Uotila M, Ruoslahti E, Engvall E. Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *J Immunol Methods* 1981; 42: 11-15.
- 20 20. Wan X, Lachapelle M, Marion M, Fournier M, Denizeau F. Recovery potential of hepatocytes from inhibition of albumin secretion by cadmium. *J Toxicol Environ Health* 1993; 38: 381-392.
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

22. Silva JM, Day SH, Nicoll-Griffith DA. Induction of cytochrome-P450 in cryopreserved rat and human hepatocytes. *Chem Biol Interact* 1999; 121: 49-63.

23. Sosef MN, Baust JM, Sugimachi K, Fowler A, Tompkins RG,  
5 Toner M. Cryopreservation of isolated primary rat hepatocytes: enhanced survival and long-term hepatospecific function. *Ann Surg* 2005; 241: 125-133.

## REIVINDICAÇÕES

1. Meio de crioconservação **caracterizado pelo fato de** compreender um extrato de planta compreendendo proteína.
2. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**  
5 **pelo fato de que o referido extrato é derivado de uma** planta não-aclimatada.
3. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**  
**pelo fato de que o referido extrato é derivado das partes** aéreas ou tecido de folha de uma planta.
- 10 4. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**  
**pelo fato de que a referida planta é de uma família de** planta selecionada de Poaceae (Gramineae), Leguminosae e  
Amaranthaceae.
5. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**  
15 **pelo fato de que a referida planta é selecionada de trigo,** centeio, cevada, alfafa e espinafre.
6. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**  
**pelo fato de que o referido extrato é substancialmente** solúvel.
- 20 7. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**  
**pelo fato de que o referido extrato é enriquecido de** proteínas.
8. Meio, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado**  
**pelo fato de que o referido extrato enriquecido de**

proteínas foi preparado através de precipitação de sal.

9. Meio, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que o referido extrato enriquecido de proteína foi preparado através de precipitação com sulfato de amônio.

10. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o referido meio é substancialmente isento de DMSO.

11. Meio, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, **caracterizado pelo** fato de que o referido meio é substancialmente isento de soro de animal exógeno.

12. Meio, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo** fato de que o referido soro de animal é soro de bovino fetal.

13. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o referido extrato é substancialmente isento de glúten.

14. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a viabilidade após descongelamento de um material biológico crioconservado a respeito é maior do que ou igual a 40%.

15. Meio, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de que a viabilidade após descongelamento de um material biológico crioconservado a respeito é maior do que

ou igual a 50%.

16. Meio, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de que a viabilidade após descongelamento de um material biológico crioconservado a respeito é maior do que

5 ou igual a 60%.

17. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento de um material biológico crioconservado a respeito é maior do que ou igual a 40%.

10 18. Meio, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo** fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento de um material biológico crioconservado a respeito é maior do que ou igual a 50%.

15 19. Meio, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado pelo** fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento de um material biológico crioconservado a respeito é maior do que ou igual a 60%.

20 20. Meio, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo** fato de que o referido parâmetro funcional é selecionado da eficiência do plaqueamento, aderência, morfologia celular, secreção celular, síntese de proteína, desintoxicação de amônio e atividade enzimática.

21. Meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o referido meio é para crioconservação de

um material biológico selecionado de uma molécula, organela, célula, embrião, tecido e órgão.

22. Meio, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** fato de que a referida célula é uma célula eucariota.

5 23. Meio, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** fato de que a referida célula é uma célula primária, uma linhagem de célula ou uma célula imortalizada.

24. Meio, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** fato de que a referida célula, embrião, tecido ou  
10 órgão é uma célula, embrião, tecido ou órgão mamífero.

25. Meio, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado pelo** fato de que a referida célula, embrião, tecido ou órgão é uma célula, embrião, tecido ou órgão humano.

26. Meio, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado**  
15 **pelo** fato de que a referida célula ou tecido é um hepatócito ou tecido hepático.

27. Composição **caracterizada pelo** fato de compreender o meio, conforme definido pela reivindicação 1, e um material biológico.

20 28. Composição, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizada pelo** fato de que o referido extrato é derivado de uma planta não-aclimatada.

29. Composição, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizada pelo** fato de que o referido extrato é

derivado das partes aéreas ou tecido de folha de uma planta.

30. Composição, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizada pelo** fato de que a referida planta é de uma família de planta selecionada de Poaceae (Gramineae), Leguminoseae e Amaranthaceae.

31. Composição, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizada pelo** fato de que a referida planta é selecionada de trigo, centeio, cevada, alfafa e espinafre.

10 32. Composição, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizada pelo** fato de que o referido extrato é substancialmente solúvel.

33. Composição, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizada pelo** fato de que o referido extrato é enriquecido de proteínas.

34. Composição, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizada pelo** fato de que o referido extrato enriquecido de proteínas foi preparado através de precipitação de sal.

20 35. Composição, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizada pelo** fato de que o referido extrato enriquecido de proteína foi preparado através de precipitação de sulfato de amônio.

36. Composição, de acordo com a reivindicação 27,

caracterizada pelo fato de que o referido meio é substancialmente isento de DMSO.

37. Composição, de acordo com a reivindicação 27 ou 36, caracterizada pelo fato de que o referido meio é substancialmente isento de soro de animal exógeno.

38. Composição, de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que o referido soro de animal é soro de bovino fetal.

39. Composição, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que o referido extrato é substancialmente isento de glúten.

40. Composição, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que a viabilidade após descongelamento de um material biológico criopreservado a respeito é maior do que ou igual a 40%.

41. Composição, de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que a viabilidade após descongelamento de um material biológico criopreservado a respeito é maior do que ou igual a 50%.

42. Composição, de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que a viabilidade, após descongelamento, do material biológico criopreservado a respeito é maior do que ou igual a 60%.

43. Composição, de acordo com a reivindicação 27,

**caracterizada pelo** fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento de um material biológico crioconservado a respeito é maior do que ou igual a 40%.

5 44. Composição, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizada pelo** fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento de um material biológico crioconservado a respeito é maior do que ou igual a 50%.

10 45. Composição, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizada pelo** fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento do material biológico crioconservado a respeito é maior do que ou igual a 60%.

15 46. Composição, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizada pelo** fato de que o referido parâmetro funcional é selecionado da eficiência de plaqueamento, aderência, morfologia celular, secreção celular, síntese de proteína, desintoxicação de amônio e atividade enzimática.

20 47. Composição, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizada pelo** fato de que o referido material biológico é selecionado de uma molécula, organela, célula, embrião, tecido e órgão.

48. Composição, de acordo com a reivindicação 47,

caracterizada pelo fato de que a referida célula é uma célula eucariota.

49. Composição, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizada pelo** fato de que a referida célula é uma  
5 célula primária, uma linhagem de célula ou uma célula imortalizada.

50. Composição, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizada pelo** fato de que a referida célula, embrião, tecido ou órgão é uma célula, embrião, tecido ou órgão  
10 mamífero.

51. Composição, de acordo com a reivindicação 50, **caracterizada pelo** fato de que a referida célula, embrião, tecido ou órgão é uma célula, embrião, tecido ou órgão humano.

15 52. Composição, de acordo com a reivindicação 50, **caracterizada pelo** fato de que a referida célula ou tecido é um hepatócito ou tecido hepático.

53. Composição, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizada pelo** fato de que a referida composição é  
20 congelada.

54. Método para crioconservação de um material biológico **caracterizado pelo** fato de que o referido método compreende congelamento de uma suspensão do material biológico no meio, conforme definido pela reivindicação 1.

55. Método para crioconservação de um material biológico **caracterizado pelo** fato de que o referido método compreende introdução do material biológico no meio, conforme definido pela reivindicação 1, e congelamento do meio compreendendo  
5 o material biológico.

56. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado pelo** fato de que o referido extrato é derivado de uma planta não-aclimatada.

57. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado**  
10 **pelo** fato de que o referido extrato é derivado das partes aéreas ou tecido de folha de uma planta.

58. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado pelo** fato de que a referida planta é de uma família de planta selecionada de Poaceae (Gramineae), Leguminoseae e  
15 Amaranthaceae.

59. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado pelo** fato de que a referida planta é selecionada de trigo, centeio, cevada, alfafa e espinafre.

60. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado**  
20 **pelo** fato de que o referido extrato é substancialmente solúvel.

61. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado pelo** fato de que o referido extrato é enriquecido de proteína.

62. Método, de acordo com a reivindicação 61, **caracterizado pelo** fato de que o referido extrato enriquecido de proteína foi preparado através de precipitação de sal.

63. Método, de acordo com a reivindicação 62, **caracterizado**  
5 **pelo** fato de que o referido extrato enriquecido de proteína foi preparado através da precipitação de sulfato de amônio.

64. Método, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado pelo** fato de que o referido meio é substancialmente isento de DMSO.

10 65. Método, de acordo com a reivindicação 54 ou 64, **caracterizado pelo** fato de que o referido meio é substancialmente isento de soro de animal exógeno.

66. Método, de acordo com a reivindicação 65, **caracterizado pelo** fato de que o referido soro de animal é soro de bovino  
15 fetal.

67. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado pelo** fato de que o referido meio é substancialmente isento de glúten.

68. Método, de acordo com a reivindicação 54 ou 55,  
20 **caracterizado pelo** fato de que a viabilidade, após descongelamento, do material biológico crioconservado no referido meio é maior do que ou igual a 40%.

69. Método, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado pelo** fato de que a viabilidade, após descongelamento, do

material biológico crioconservado no referido meio é maior do que ou igual a 50%.

70. Método, de acordo com a reivindicação 69, **caracterizado pelo** fato de que a viabilidade, após descongelamento, do material biológico crioconservado no referido meio é maior do que ou igual a 60%.

71. Método, de acordo com a reivindicação 54 ou 55, **caracterizado pelo** fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento do material biológico crioconservado a respeito é maior do que ou igual a 40%.

72. Método, de acordo com a reivindicação 71, **caracterizado pelo** fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento do material biológico crioconservado a respeito é maior do que ou igual a 50%.

73. Método, de acordo com a reivindicação 72, **caracterizado pelo** fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento do material biológico crioconservado a respeito é maior do que ou igual a 60%.

74. Método, de acordo com a reivindicação 71, **caracterizado pelo** fato de que o referido parâmetro funcional é selecionado da eficiência de plaqueamento, aderência, morfologia celular, secreção celular, síntese de proteína, desintoxicação de amônio e atividade enzimática.

75. Método, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado pelo fato de que o referido material biológico é selecionado de uma molécula, organela, célula, embrião, tecido e órgão.**

5 76. Método, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizado pelo fato de que a referida célula é uma célula eucariota.**

77. Método, de acordo com a reivindicação 76, **caracterizado pelo fato de que a referida célula é uma célula primária, uma linhagem de célula ou uma célula imortalizada.**

10 78. Método, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizado pelo fato de que a referida célula, embrião, tecido ou órgão é uma célula, embrião, tecido ou órgão mamífero.**

79. Método, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizado pelo fato de que a referida célula, embrião, tecido ou**  
15 **órgão é uma célula, embrião, tecido ou órgão humano.**

80. Método, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizado pelo fato de que a referida célula ou tecido é um hepatócito ou tecido hepático.**

81. Kit ou embalagem **caracterizada pelo fato de compreender**  
20 **o meio conforme definido pela reivindicação 1.**

82. Uso do meio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de ser para a crioconservação de um material biológico.**

83. Extrato de planta compreendendo proteína **caracterizado**

pelo fato de ser para uso em crioconservação.

84. Extrato, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que o referido extrato é derivado de uma planta não-aclimatada.

5 85. Extrato, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que o referido extrato é derivado das partes aéreas ou tecido de folha de uma planta.

86. Extrato, de acordo com a reivindicação 83,  
10 caracterizado pelo fato de que a referida planta é de uma família de planta selecionada de Poaceae (Gramineae), Leguminoseae e Amaranthaceae.

87. Extrato, de acordo com a reivindicação 83,  
15 caracterizado pelo fato de que a referida planta é selecionada de trigo, centeio, cevada, alfafa e espinafre.

88. Extrato, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que o referido extrato é substancialmente solúvel.

89. Extrato, de acordo com a reivindicação 83,  
20 caracterizado pelo fato de que o referido extrato é enriquecido de proteína.

90. Extrato, de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que o referido extrato enriquecido de proteína foi preparado através de

precipitação de sal.

91. Extrato, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que o referido extrato enriquecido de proteína foi preparado através da precipitação de sulfato de amônio.

92. Extrato, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que o referido extrato é usado sob condições de crioconservação que são substancialmente isento de DMSO.

93. Extrato, de acordo com a reivindicação 83 ou 92, caracterizado pelo fato de que o referido extrato é usado sob condições de crioconservação que são substancialmente isentas de soro de animal exógeno.

94. Extrato, de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que o referido soro de animal é soro de bovino fetal.

95. Extrato, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que o referido extrato é substancialmente isento de glúten.

96. Extrato, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que a viabilidade após descongelamento de um material biológico crioconservado usando o referido extrato é maior do que ou igual a 40%.

97. Extrato, de acordo com a reivindicação 96,

caracterizado pelo fato de que a viabilidade após descongelamento de um material biológico crioconservado usando o referido extrato é maior do que ou igual a 50%.

98. Extrato, de acordo com a reivindicação 97,  
5 caracterizado pelo fato de que a viabilidade após descongelamento de um material biológico crioconservado usando o referido extrato é maior do que ou igual a 60%.

99. Extrato, de acordo com a reivindicação 83,  
10 caracterizado pelo fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento de um material biológico crioconservado usando o referido extrato é maior do que ou igual a 40%.

100. Extrato, de acordo com a reivindicação 99,  
15 caracterizado pelo fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento de um material biológico crioconservado usando o referido extrato é maior do que ou igual a 50%.

101. Extrato, de acordo com a reivindicação 100,  
20 caracterizado pelo fato de que o nível ou atividade de um parâmetro funcional após descongelamento de um material biológico crioconservado usando o referido extrato é maior do que ou igual a 60%.

102. Extrato, de acordo com a reivindicação 101,  
caracterizado pelo fato de que o referido parâmetro

funcional é selecionado da eficiência de plaqueamento, aderência, morfologia celular, secreção celular, síntese de proteína, desintoxicação de amônio e atividade enzimática.

103. Extrato, de acordo com a reivindicação 83,  
5 **caracterizado pelo fato de que o referido extrato é para**  
crioconservação de um material biológico selecionado de uma molécula, organela, célula, embrião, tecido e órgão.

104. Extrato, de acordo com a reivindicação 103,  
**caracterizado pelo fato de que a referida célula é uma**  
10 célula eucariota.

105. Extrato, de acordo com a reivindicação 104,  
**caracterizado pelo fato de que a referida célula é uma**  
célula primária, uma linhagem de célula ou uma célula imortalizada.

15 106. Extrato, de acordo com a reivindicação 103,  
**caracterizado pelo fato de que a referida célula, embrião,**  
tecido ou órgão é uma célula, embrião, tecido ou órgão mamífero.

107. Extrato, de acordo com a reivindicação 106,  
20 **caracterizado pelo fato de que a referida célula, embrião,**  
tecido ou órgão é uma célula, embrião, tecido ou órgão humano.

108. Extrato, de acordo com a reivindicação 106,  
**caracterizado pelo fato de que a referida célula ou tecido**

é um hepatócito ou tecido hepático.

109. Kit ou embalagem **caracterizado pelo** fato de compreender o extrato, conforme definido pela reivindicação 83, juntamente com instruções para a  
5 crioconservação de um material biológico.

110. Uso do extrato, de acordo com a reivindicação 83, **caracterizado pelo** fato de ser para a crioconservação de um material biológico.

111. Método para crioconservação de um material biológico,  
10 o referido método **caracterizado pelo** fato de compreender a introdução do extrato, conforme definido pela reivindicação 83, em um meio de crioconservação antes do congelamento.

112. Composição **caracterizada pelo** fato de compreender o extrato, conforme definido pela reivindicação 83, e um  
15 material biológico.

113. Composição, de acordo com a reivindicação 112, **caracterizada pelo** fato de que a referida composição é congelada.

114. Composição **caracterizada pelo** fato de compreender o  
20 extrato, conforme definido pela reivindicação 83, e um carreador ou veículo biologicamente compatível ou aceitável.

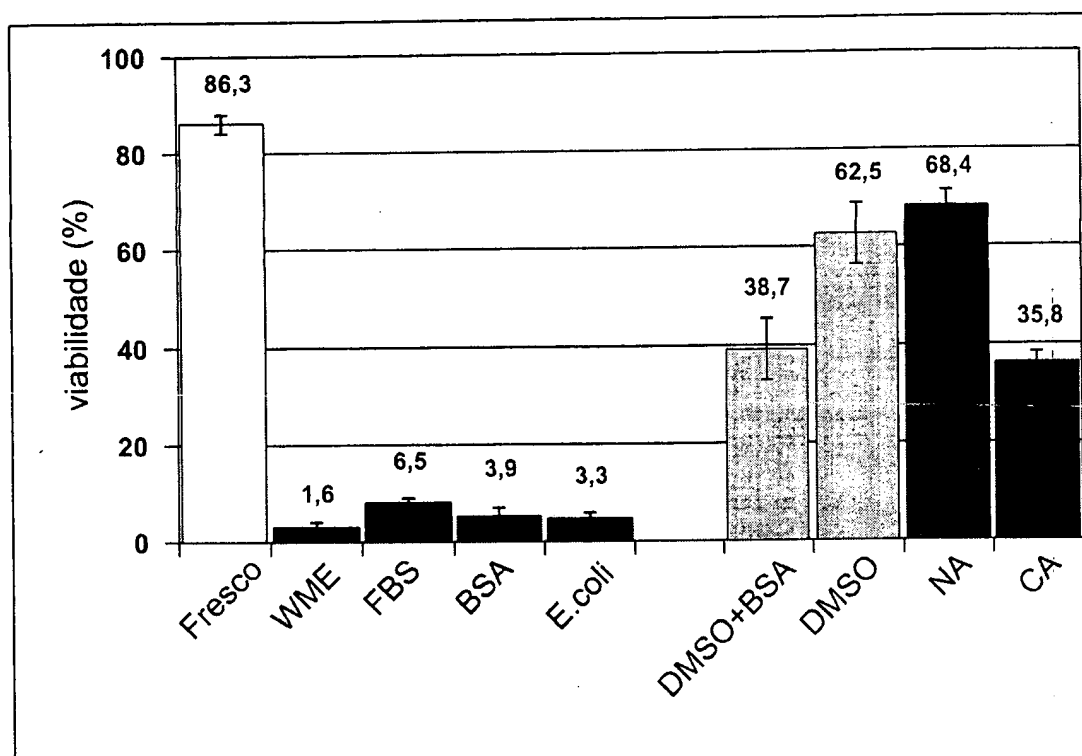


FIGURA 1

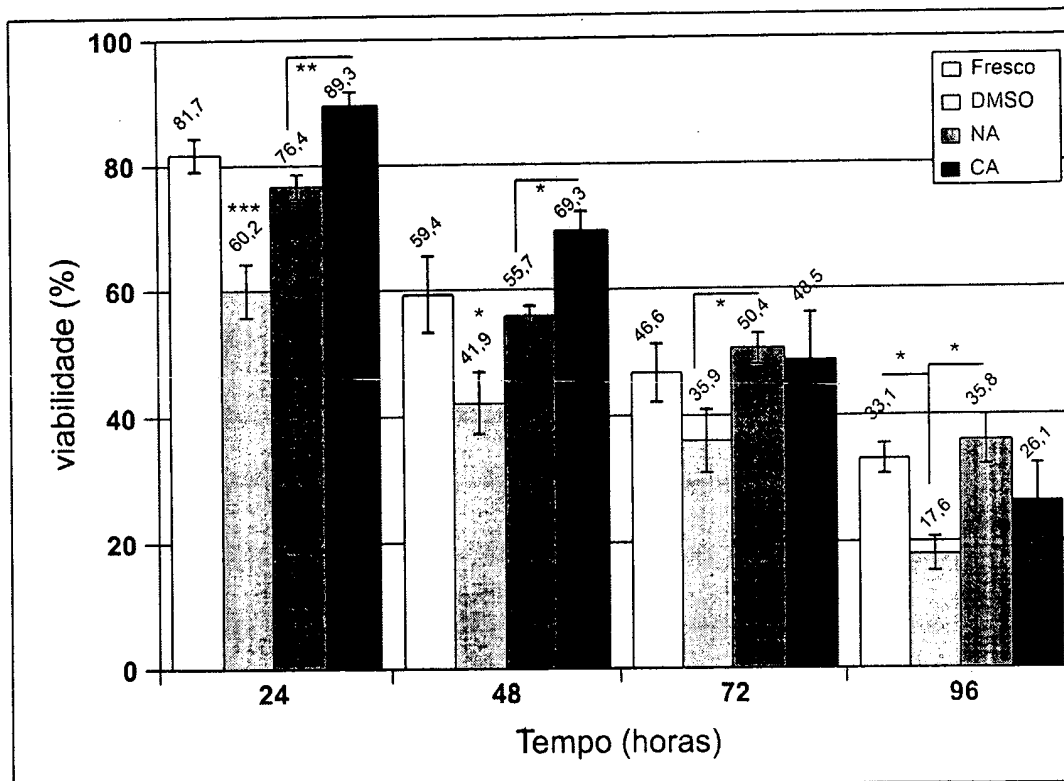


FIGURA 2

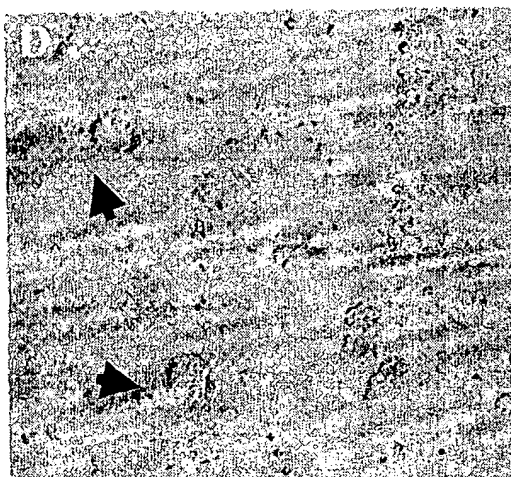
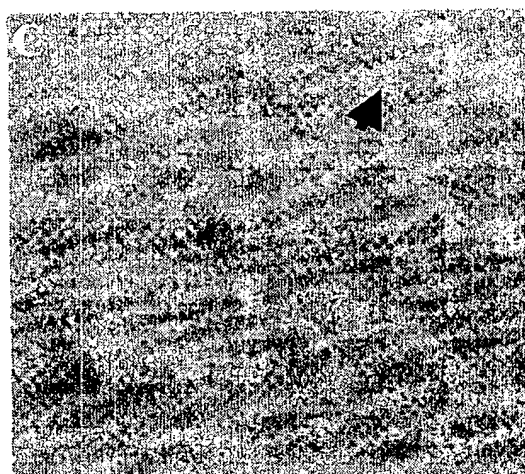
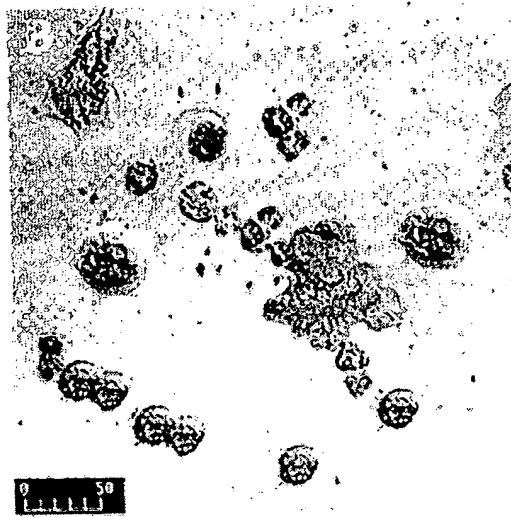
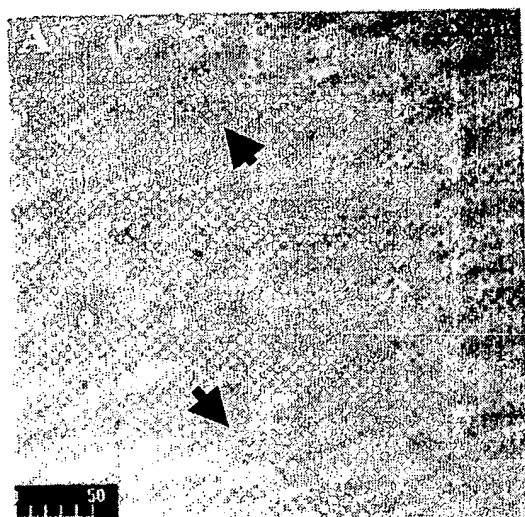


*FIGURA 3*

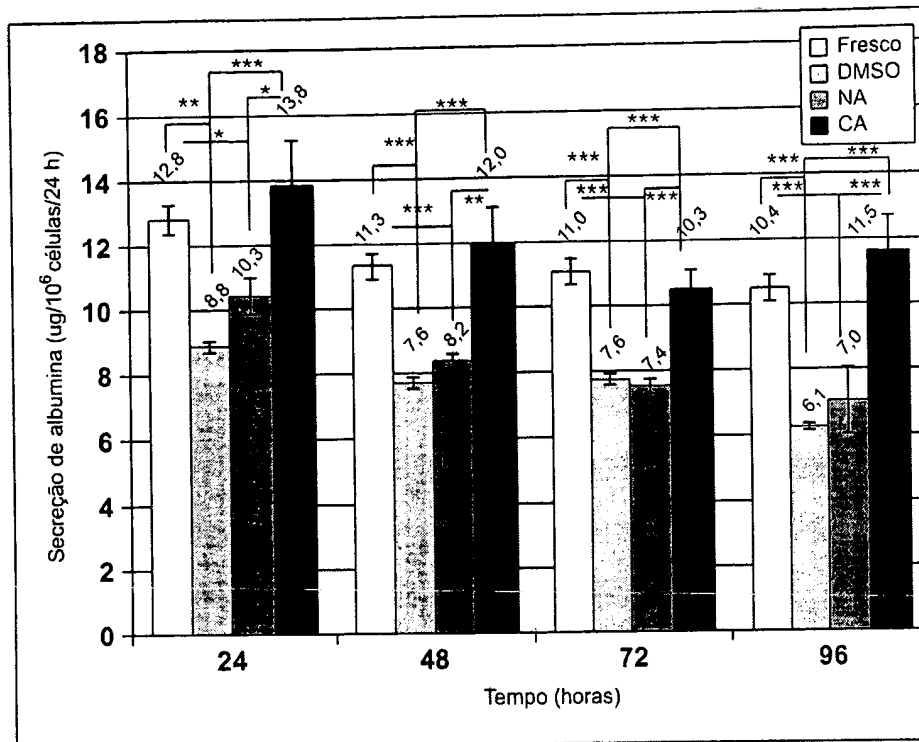


FIGURA 4A

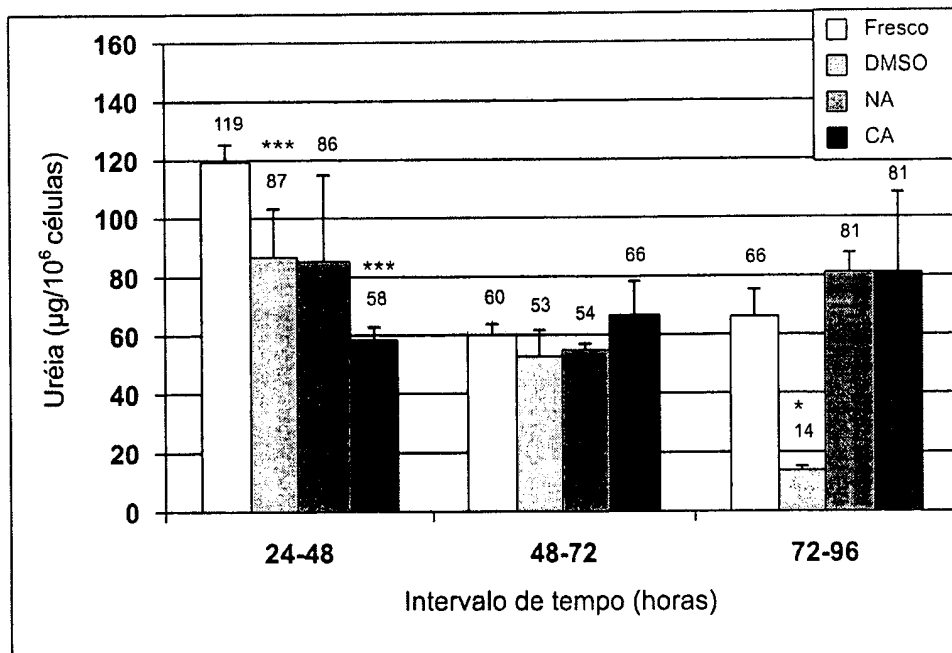


FIGURA 4B

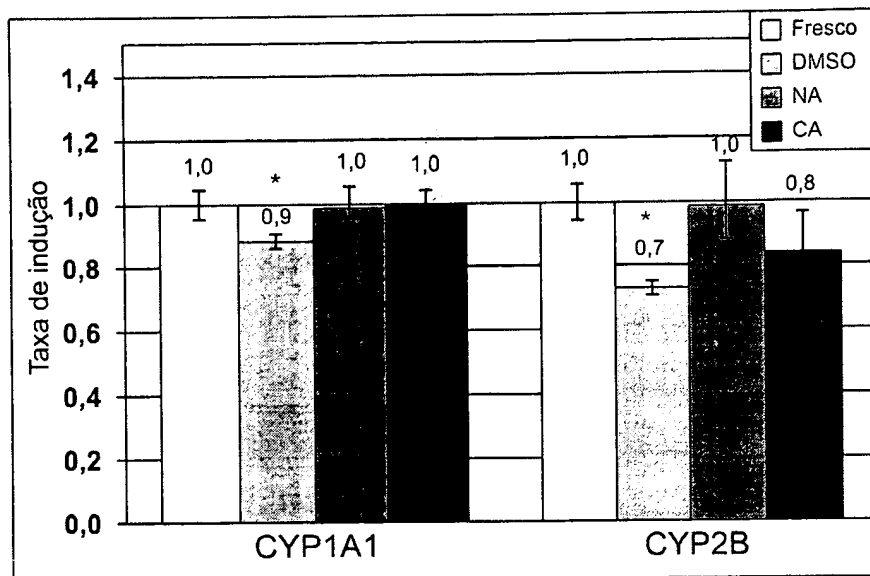


FIGURA 5A

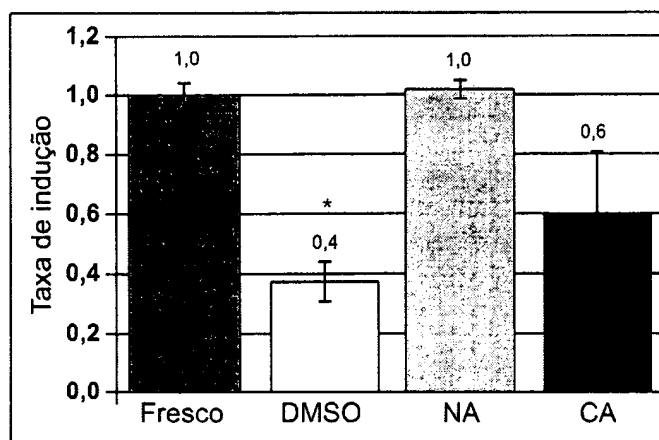
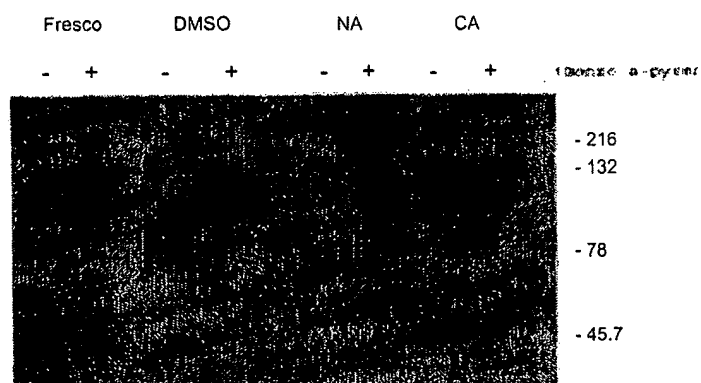
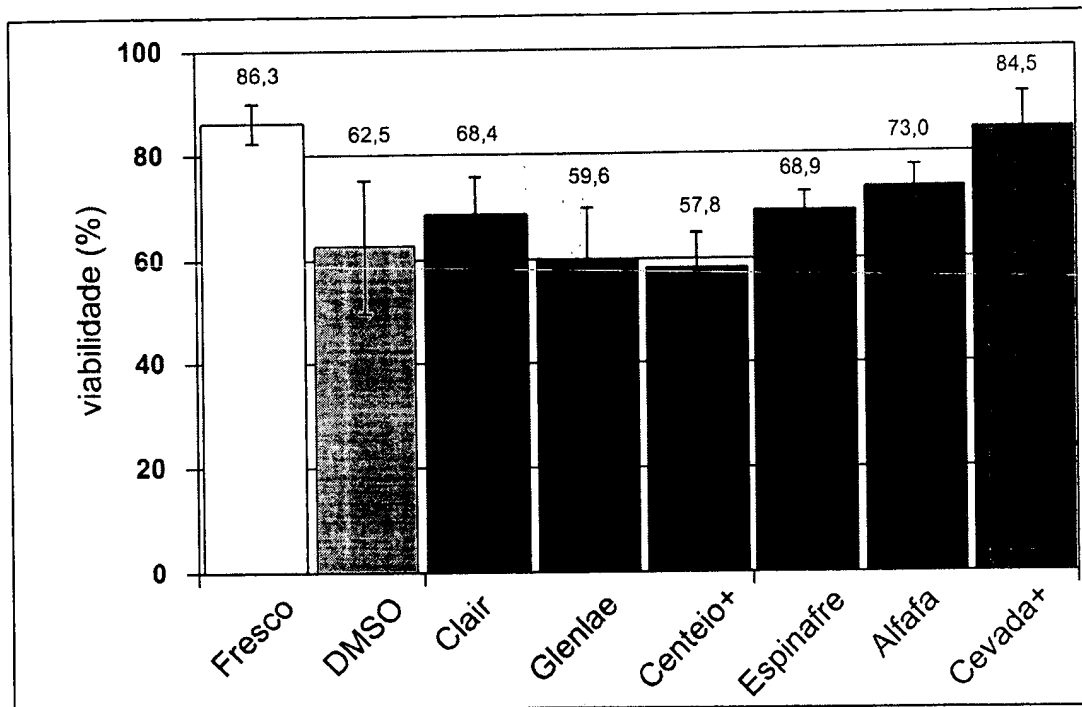


FIGURA 5B

*FIGURA 6*

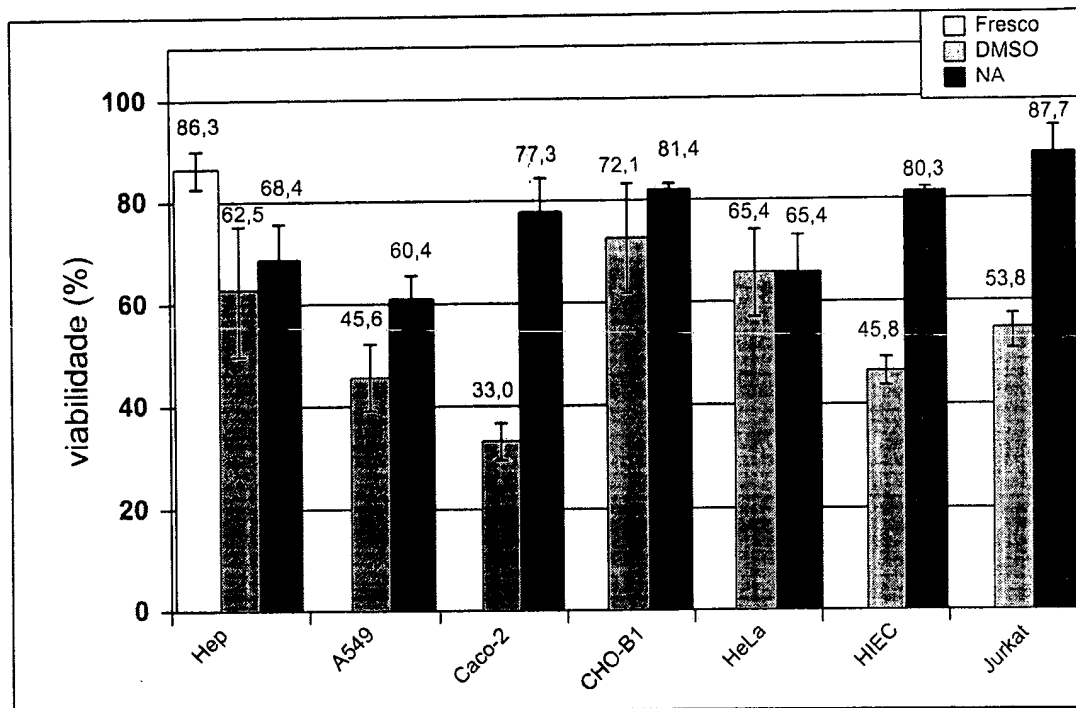
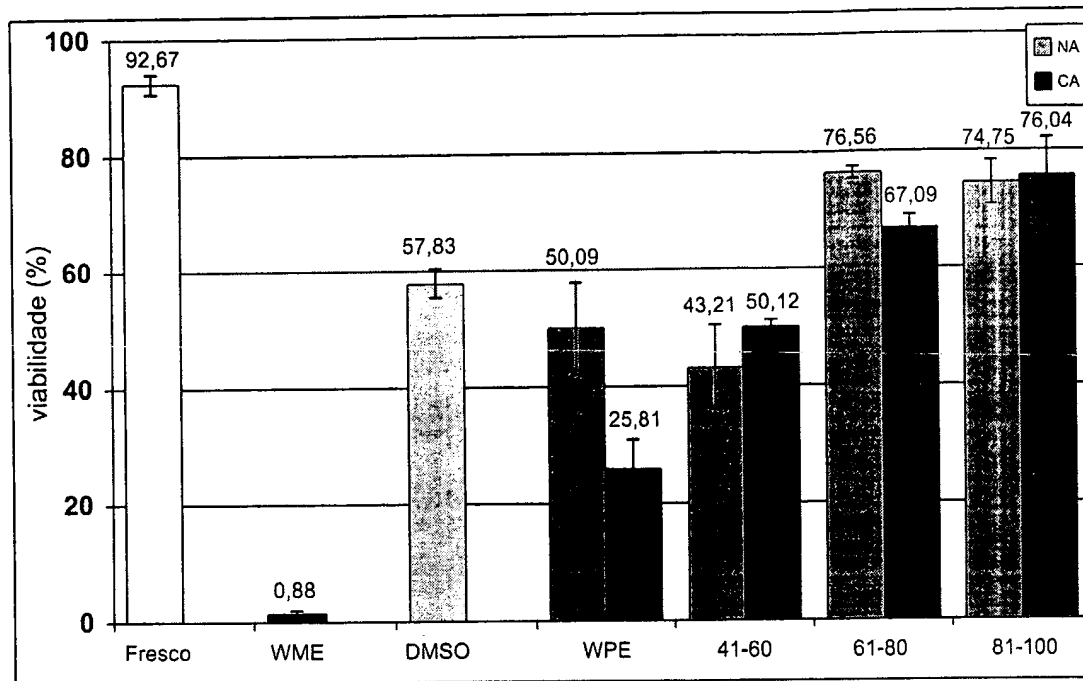
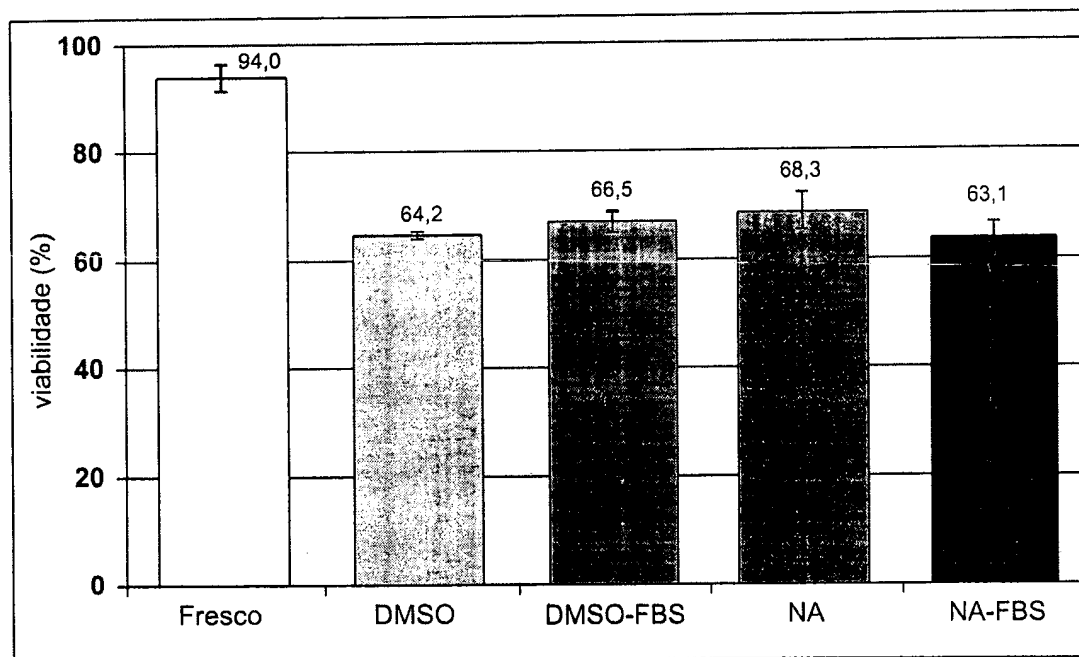
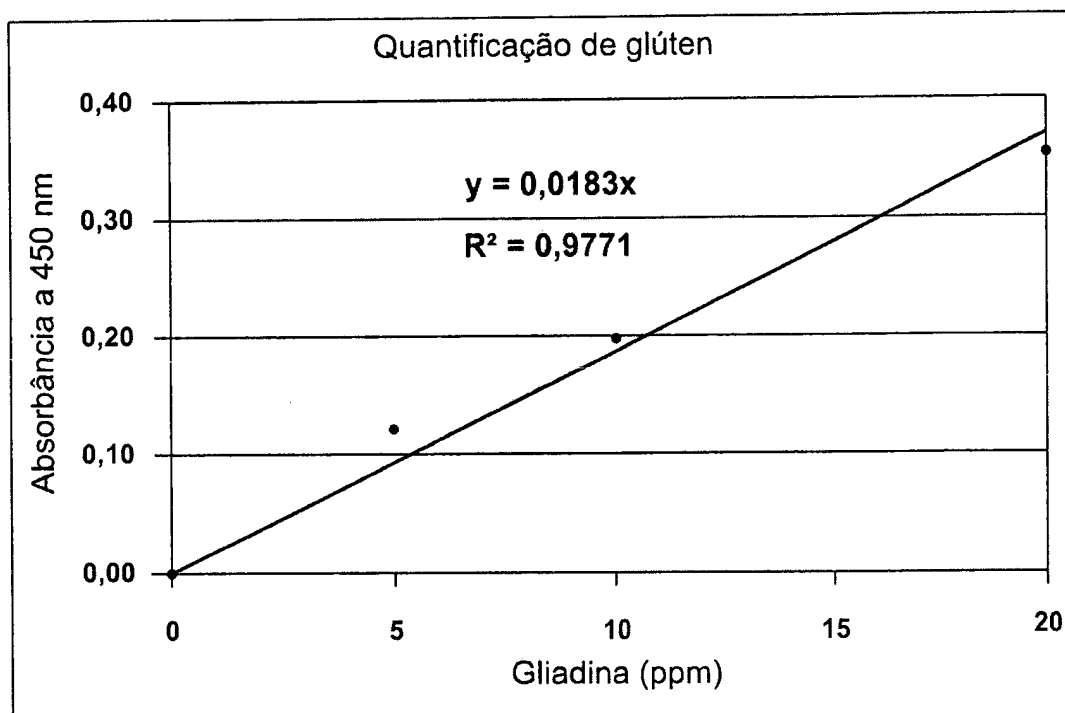


FIGURA 7

*FIGURA 8*

*FIGURA 9*



| WPE | A <sub>450 nm</sub> | ppb (ug/kg) | ppm    | SEM    |
|-----|---------------------|-------------|--------|--------|
| NA  | 0,0437              | 43,7158     | 0,0437 | 0,0609 |
| CA  | -0,2322             | 0,0000      | 0,0000 | 0,0524 |

**FIGURA 10**

R 0615730-0

Resumo da Patente de Invenção para: "EXTRATO DE PLANTA E  
USO DO MESMO COMO UM AGENTE CRIOPROTETOR".

Um meio de crioconservação compreendendo um extrato de  
planta contendo proteína é revelado. Métodos, composições,  
5 usos e kits para crioconservação de material biológico, tal  
como uma molécula, organela, célula, embrião, tecido ou  
órgão também são revelados.