



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

(21) BR 102020025951-2 A2



(22) Data do Depósito: 17/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 28/06/2022

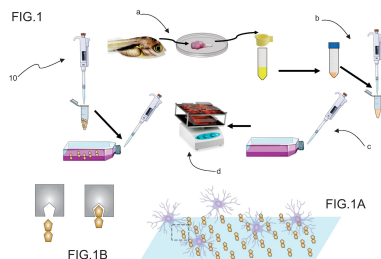
(54) **Título:** MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE CULTURAS HOMOGÊNEAS DE MICRÓGLIAS CEREBRAIS DE TILÁPIAS-DO-NILO E USO

(51) **Int. Cl.:** C12N 5/079; C12N 5/07; C12N 5/071.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** SILAS FERNANDES ETO; DAYANNE CARLA FERNANDES; IVES CHARLIE DA SILVA; JOÃO MARTINS PIZAURRO JUNIOR; MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO.

(57) **Resumo:** Trata-se de método (10) para obtenção de culturas homogêneas de micróglia cerebral de tilápias-do-nilo ? *Oreochromis niloticus*? para serem armazenamento, comercialização e utilização para ensaios ?in vitro?; dito método (10) utiliza a fragmentação mecânica do tecido cerebral em filtro tamis 0.22 um e neutralização das enzimas endógenas, bem como, o uso da afinidade dos receptores do tipo Toll (TLR2) nas micróglia ácido teicóico e para outros Padrões Moleculares Associados a Patógenos ou PMAPs, presentes nas proteínas de membrana do ?*S. agalactiae*?.



“MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE CULTURAS HOMOGÊNEAS DE MICRÓGLIAS CEREBRAIS DE TILÁPIAS-DO-NILO E USO”.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente de invenção trata de método para obtenção de culturas homogêneas de micróglias cerebrais de tilápias-do-nilo '*Oreochromis niloticus*' para armazenamento, comercialização e utilização para ensaios '*in vitro*' onde, notadamente, dito método é compreendido por técnica de extração e cultura celular viabilizando a aplicação, principalmente, na indústria farmacêutica e biotecnológica, especificamente no cultivo celular em escala industrial, provendo uma nova metodologia de isolamento e cultura células primárias e secundárias, mais eficaz e menos oneroso. Ditas culturas homogêneas de micróglias cerebrais de tilápias-do-nilo '*Oreochromis niloticus*' podem ser utilizadas para ensaios laboratorial nas áreas da imunologia, microbiologia, patologia, toxicologia experimental e genética dentre outras áreas aplicáveis.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] Em pesquisa em bancos de dados especializados nacional e internacional não foram encontrados produtos comerciais relacionados a cultura de micróglias de tilápia-do-nilo '*Oreochromis niloticus*', porém foram identificados apenas linhagens deste fenótipo celular, providas de modelos mamíferos como os murinos e uma linhagem celular isolada de embrião de *Chinook salmon* '*Oncorhynchus tshawytscha*' fornecida pela '*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, produto CHSE-214 Cell Line from salmon*.

[003] Em bases científicas, foram encontrados documentos que descrevem células isoladas da hipófise de peixe teleósteos por '*Chang et al., 1994*' entretanto apesar de ser célula de peixe teleósteo o fenótipo/tipo celular é diferente e o método de isolamento é o tradicional baseado no uso de enzimas para a dissociação e força gravitacional para a separação por gradiente de densidade.

[004] Fryer & Lannan (1994) descrevem uma lista completa de todas as linhagens celulares, obtidas de peixes teleósteos, e novamente não é encontrada referência do isolamento ou uso da micróglia da tilápia-do-nilo. E por fim, o isolamento de hepatócitos de *rainbow trout* '*Oncorhynchus mykiss*' (Braunbeck & Segner, 2000; Fay et al., 2015) que apresenta técnicas de isolamento e fenótipo celular distintos ao proposto na

presente tecnologia.

[005] Com relação as bases de patentes não foram identificados processos de extração e cultura celular similar à presente invenção, qual seja a obtenção de linhagens de micróglia provida da espécie tilápia-do-nilo ou seu uso como modelo de estudo '*in vitro*' para as doenças infecciosas ou neurodegenerativas.

[006] No documento de nº. JP2008035735A o intuito foi a inserção do Gene da proteína 43 (GAP43) e gene da proteína 1 da proteína 1 (PLP1) associados ao crescimento para produzir transgenia para estudos de crescimento e outro documento semelhante foi o de nº. WO2008079408A1 que trata-se de um teleósteo trpm7 mutantes, utilizado para estudos biomédicos de doenças degenerativas, e por fim o documento de nº. JP2007112736A que teve como objetivo produzir um reagente para marcação de células e tecidos e detecção não invasiva de células e tecidos após transplante usando um método de ressonância magnética nuclear.

[007] O documento de nº. US20030074682A1 traz a sequências de um ácido, nucleico e polipeptídico associado ao gene ERG de teleósteo, que codificam os canais de potássio da família ERG de teleósteo. A invenção fornece um modelo para o estudo das funções cardíacas e métodos de triagem para agentes cardioativos usando larvas de teleósteos mutantes com atividade ERG. Apesar de utilizar o teleósteo, a metodologia e o objetivo são distintos a patente ora requerida, que visa o isolamento e a obtenção de células através do uso de afinidade por receptores.

[008] Ainda, foram encontrados outros documentos como de nº. US20030232752A1 que descreve linhas de células tumorais úteis para aumentar o potencial de proliferação de qualquer célula humana ou animal em cultura, proporcionando assim linhas e culturas celulares imortalizadas ou contínuas, e o documento de nº. EP2393915A1 que fornece um método de produção de células progenitoras, tais como células capazes de serem diferenciadas em uma pluralidade de tipos diferentes de células, a partir de células diferenciadas. Ditos documentos tem objetivos similares de imortalização de linhagens celulares, e tratamento regenerativo celular, diferenciando no quesito metodologia e objetivo, descritos para a presente invenção que visa um método de isolamento utilizando moléculas e receptores alvos e de alta afinidade para selecionar

as células em um extrato celular total, utilizando apenas a força cinética.

PESQUISA

[009] Inicialmente, foram testados e comparados dois métodos de isolamento da micróglia cerebral da tilápia-do-nilo '*Oreochromis niloticus*'. O primeiro método foi baseado na literatura e utilizado como parâmetro comparativo, e envolve o uso de enzimas comerciais, para a síntese das ligações intercelulares e a separação destas células por gradiente de percoll utilizando a força gravitacional/centrifugação.

[010] O método desenvolvido trata-se da não utilização de enzimas comerciais, e sim, fragmentação mecânica do tecido cerebral em filtro tamis 0.22 um e neutralização das enzimas endógenas, e o uso da afinidade dos receptores do tipo Toll (TLR2) nas micróglias ácido teicóico e para outros Padrões Moleculares Associados a Patógenos ou PMAPs, presentes nas proteínas de membrana do '*S. agalactiae*'.

[011] Assim, o primeiro passo foi a obtenção das proteínas de membrana desta bactéria por ultracentrifugação analítica e sua caracterização molecular por eletroforese em Gel de poliacrilamida, após confirmar a separação as mesmas foram utilizadas no segundo método que será descrito com maiores detalhes no tópico. Após a execução dos dois métodos as células foram avaliadas quanto ao número de células obtidas e taxa de viabilidade destas.

[012] O primeiro método de isolamento das micróglias propiciou a obtenção de $7,4 \times 10^5$ de células/ mL, e destas 74% viáveis e o segundo $9,0 \times 10^5$ de células/ mL, e destas 92% viáveis. Na sequência, a cultura celular foi caracterizada morfolologicamente por microscopia invertida e fenotipadas por imuno-histoquímica utilizando marcadores específicos para micróglias como o MHC classe II, CD68, TNF- α e o iNOS. Nesta fase concluímos que o método utilizando a afinidade dos receptores da micróglia, além de reduzir os gastos no processo, confere a obtenção de um numero de células equivalente aos métodos já postulados, e maximiza a viabilidade destas células. Além disso, foi possível identificar duas morfologias distintas, células arredondadas (inativas) e pleomórficas (pré-ativadas). Em seguida, após a estabilização por 72 horas da cultura celular incubada em atmosfera controlada a 5% de CO₂ a 28 °C. nós testamos a utilização destas células para os ensaios in vitro e dois ativadores celulares o forbol-12-miristato-

13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich, St. Louis, lipopolissacarídeos (LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) na concentração de 20 µg/mL foram avaliados.

[013] E por fim, testou-se a infecção experimental destas células '*in vitro*' com o '*S. agalactiae*', e observando a capacidade fagocítica destas células, através da microscopia invertida e eletrônica, imuno-histoquímica e teste de índice fagocítico e por viabilidade intracelular dos microrganismos.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[014] É objetivo da invenção apresentar um método para obtenção de culturas homogêneas de micróglia cerebrais de tilápias-do-nilo '*Oreochromis niloticus*' que permite o isolamento de culturas celulares de células fagocíticas ou que tenham receptores de afinidade por qualquer molécula ligante, utilizando a interação receptor-molécula ligante, para a separação destas células de sua matriz tecidual, seja fluida como o tecido sanguíneo ou sólida como o tecido cerebral e o baço por exemplo. Minimizando o stress e morte celular envolvidos nos métodos tradicionais de isolamento e cultivo de células primárias com o uso de enzimas comerciais e força gravitacional/centrifuga dentre outros reagentes químicos nocivos a células.

[015] É objetivo da invenção apresentar um método para obtenção de culturas homogêneas de micróglia cerebrais de tilápias-do-nilo '*Oreochromis niloticus*' que mimetiza as condições naturais, a qual as células no caso dos fagócitos são expostas em seu estado fisiológico utilizando a afinidade molecular para atrair e separar estas células.

[016] Por fim, devido a expansão do uso de modelos teleósteos para o estudo de doenças neurodegenerativas e infectocontagiosas como a meningite microbiana, a obtenção da micróglia da tilápia, traz novas possibilidades em seu uso aplicado a medicina veterinária e humana.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[017] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de figuras, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

[018] a figura 1 refere-se a uma vista esquemática das etapas que compõe o método

por afinidade para o isolamento de micróglia cerebral de tilápia-do-nilo '*Oreochromis niloticus*';

[019] a figura 1A mostra a interação e ligação dos receptores '*Toll Like Receptor*' 2 (TLR2) das micróglia as proteínas de membrana (PMs) do '*S. agalactiae* a *CspA*';

[020] a figura 1B apresenta o esquema ilustrado da interação receptor +molécula. Solução Balanceada de *Hank's* = HBSS. Eto et al., (2020);

[021] a figura 2 mostra a caracterização morfológica e fenotípica da cultura de micróglia isoladas de tecido cerebral de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Em (a) é revelada uma imagem representativa da cultura de micróglia 42 horas após a primeira troca do meio de cultura, com diversos tipos celulares morfolologicamente distintos; em (b) 72 horas após a segunda troca do meio de cultura apresentando três tipos morfolologicamente distintos de células, provável neurônios (ponta da seta) e micróglia na forma inativa e com tamanho inferior as demais (seta) e em (c) 96 horas cultura homogênea de micróglia;

[022] a figura 2A revela um gráfico de viabilidade celular durante o processo de isolamento pelo método de MTT avaliando a atividade mitocondrial da célula cultivada;

[023] a figura 2B em (e-f-g) Fenotipagem da cultura celular por imunocitoquímica (IC), utilizando marcador para o complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II+) que marca as células sem serem pré-ativadas com o lipopolissacarídeo (LPS). Em (f-g) células 48 horas ativadas com 20 ng de LPS positivas para cluster de diferenciação 68 (CD68) e TNF- α . Barra 10 μ m; (IC) hematoxilina de Harris e 3,3'-Diaminobenzidina (DAB). Colunas verticais representam o erro padrão da média (n= 3) e letras minúsculas comparam os tratamentos no mesmo período de tempo (exceção gráfico "e") e maiúsculas entre os tempos, letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05);

[024] a figura 3 mostra a infecção '*in vitro*' das micróglia tilápias-do-nilo '*Oreochromis niloticus*' por '*Streptococcus agalactiae*' (a-b) Cultura de micróglia ajustadas a 7.2×10^3 células/poço e infectadas com 1.5×10^4 de '*S. agalactiae*' (a) microscopia invertida, 6 horas após a infecção, mostrando uma célula ameboide (micróglia ativada) e vários cocos intracelulares representando a atividade fagocítica (ponta da seta) e setas

apontam para duas células arredondadas/ovoides representando a micróglia inativa e (b) imunofluorescência direta utilizando o anticorpo primário, FITC anti-Sta IgY provando a internalização dos cocos e a identidade bacteriana do '*S. agalactiae*';

[025] a figura 3A revela um gráfico da produção do óxido nítrico; e

[026] a figura 3B mostra em (d) imunocitoquímica (IC) indireta positiva para *S. agalactiae* e em (e) marcação positiva para a enzima óxido nítrico sintase, provando a associação da fagocitose, com a produção do óxido nítrico. Barra 10 µm; (IC) hematoxilina de Harris e 3,3'-Diaminobenzidina (DAB); (IC) isotiocianato de fluoresceína (FITC); 4',6-diamidino-2-fenylindole dihydrochloride (DAPI); Colunas verticais representam o erro padrão da média (n= 3) e letras minúsculas comparam os tratamentos no mesmo período de tempo (exceção gráfico "e") e maiúsculas entre os tempos, letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[027] A presente patente de invenção se refere à "MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE CULTURAS HOMOGÊNEAS DE MICRÓGLIAS CEREBRAIS DE TILÁPIAS-DO-NILO E USO", mais precisamente trata-se de método (10) para obtenção de culturas homogêneas de micróglia cerebral de tilápias-do-nilo '*Oreochromis niloticus*' para serem armazenamento, comercialização e utilização para ensaios '*in vitro*'.

[028] Segundo a presente invenção, dito método (10) utiliza a fragmentação mecânica do tecido cerebral em filtro tamis 0.22 um e neutralização das enzimas endógenas, bem como, o uso da afinidade dos receptores do tipo Toll (TLR2) nas micróglia ácido teicóico e para outros Padrões Moleculares Associados a Patógenos ou PMAPs, presentes nas proteínas de membrana do '*S. agalactiae*'. Dito método (10) é compreendido pelas seguintes etapas:

- a) Interação receptor-molécula ligante para a separação de populações celulares específicas de sua matriz tecidual, seja fluida como o tecido sanguíneo ou sólida como o tecido cerebral, adsorvendo e fixando as proteínas de membrana de '*S. agalactiae*' em uma matriz sólida de poliestireno;
- b) Adição do extrato cerebral, pré-macerado em filtro Tamis e as enzimas endógenas desativado com soro fetal bovino;

- c) Incubação do extrato por 24 horas em atmosfera controlada a 5% de CO₂ a 28° C e os poços lavados com meio de cultura celular DMENF12 onde as micróglia podem ser utilizadas ou recuperadas para congelamento e uso posterior;
- d) Agitação orbital por 96 horas trocando o meio de cultura e lavando com DMEN F12 no tempo de 42 e 72 horas.

[029] Em conclusão, o método de isolamento da micróglia do tecido cerebral da tilápia por afinidade receptor-molécula alvo, pode ser mais eficaz, e as células podem ser utilizadas para ensaio de ativação com moléculas inertes como PMA ou LPS, e para ensaios de infecção in vitro, servindo como promissor, modelo de estudo para doenças neurodegenerativas tais como as doenças de Parkinson e Alzheimer, como nas meningites, fúngicas, virais e bacterianas.

[030] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações no que se refere a certos detalhes, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substantiados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

[031] Referências

[032] *Braunbeck, T. and Segner, H. 2000. Isolation and cultivation of teleost hepatocytes. In The Hepatocyte Review* (M. Berry and A. Edwards, eds.) pp. 49-72. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

[033] Fay, K.A., Nabb, D.L., Mingoia, R.T., Bischof, I., Nichols, J.W., Segner, H., Johanning, K., and Han, X. 2015. **Determination of metabolic stability using cryopreserved hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Curr. Protoc. Toxicol.* 65:4.42.1-4.42.29. doi: 10.1002/0471140856.tx0442s65

[034] Chang, J.P., Jobin R.M., 1994. **Teleost pituitary cells: isolation, culture and use. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes: Analytical Techniques**, vol. 3. Elsevier Inc., Amsterdam, pp. 205–213 (Chapter 18).

[035] Fryer, J.L., Lannan, C.N. **Three decades of fish cell culture: A current listing of cell**

lines derived from fishes. *Journal of Tissue Culture Methods* 16, 87–94 (1994).

<https://doi.org/10.1007/BF01404816>

REIVINDICAÇÕES

1) **“MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE CULTURAS HOMOGÊNEAS DE MICRÓGLIAS CEREBRAIS DE TILÁPIAS-DO-NILO”**, mais precisamente trata-se de método (10) para obtenção de culturas homogêneas de micróglias cerebrais de tilápias-do-nilo '*Oreochromis niloticus*' para serem armazenamento, comercialização e utilização para ensaios 'in vitro'; caracterizado por método (10) utilizar a fragmentação mecânica do tecido cerebral em filtro tamis 0.22 um e neutralização das enzimas endógenas, bem como, o uso da afinidade dos receptores do tipo Toll (TLR2) nas micróglias ácido teicóico e para outros Padrões Moleculares Associados a Patógenos ou PMAPs, presentes nas proteínas de membrana do '*S. agalactiae*'; dito método (10) é compreendido pelas etapas:

- a) interação receptor-molécula ligante para a separação de populações celulares específicas de sua matriz tecidual, seja fluida como o tecido sanguíneo ou sólida como o tecido cerebral, adsorvendo e fixando as proteínas de membrana de '*S. agalactiae*' em uma matriz sólida de poliestireno;
- b) adição do extrato cerebral, pré-macerado em filtro Tamis e as enzimas endógenas desativado com soro fetal bovino;
- c) incubação do extrato por 24 horas em atmosfera controlada a 5% de CO₂ a 28° C e os poços lavados com meio de cultura celular DMENF12 onde as micróglias podem ser utilizadas ou recuperadas para congelamento e uso posterior;
- d) agitação orbital por 96 horas trocando o meio de cultura e lavando com DMEN F12 no tempo de 42 e 72 horas.

2) **“USO”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por micróglia da tilápia ser aplicado a medicina veterinária e humana.

3) **“USO”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por células obtidas do isolamento da micróglia do tecido cerebral da tilápia por afinidade receptor-molécula alvo serem utilizadas para ensaio de ativação com moléculas inertes como PMA ou LPS, e para ensaios de infecção '*in vitro*' para modelos de estudos para doenças neurodegenerativas tais como as doenças de Parkinson e Alzheimer, como nas meningites, fúngicas, virais e bacterianas.

FIG.1

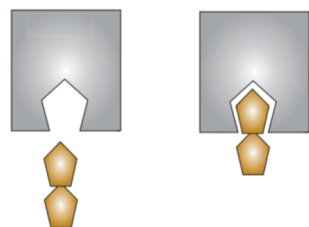
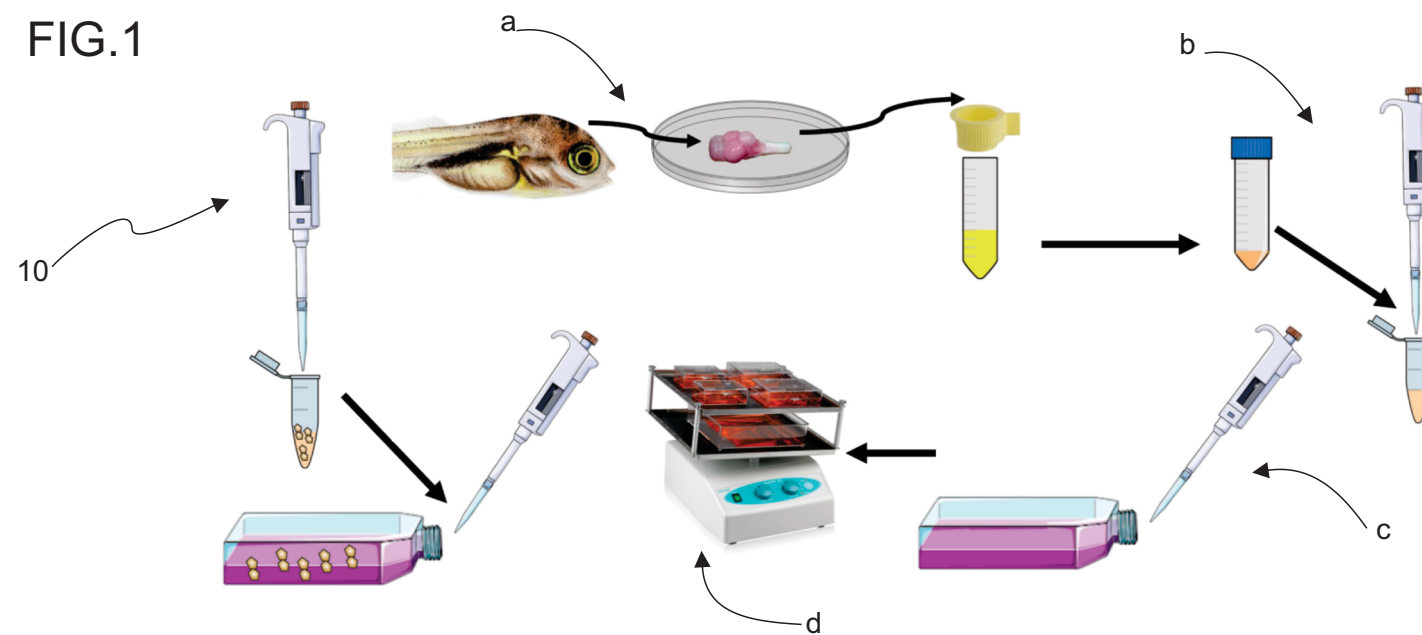


FIG.1B

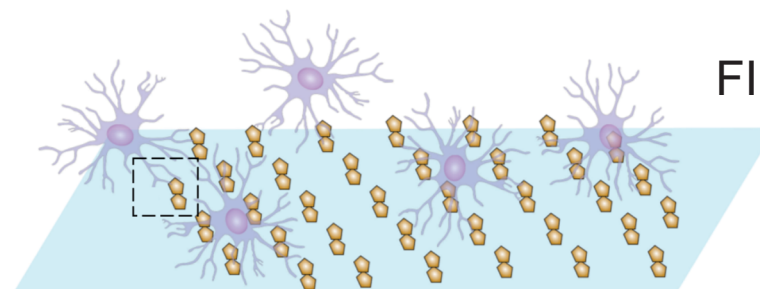


FIG.1A

FIG.2

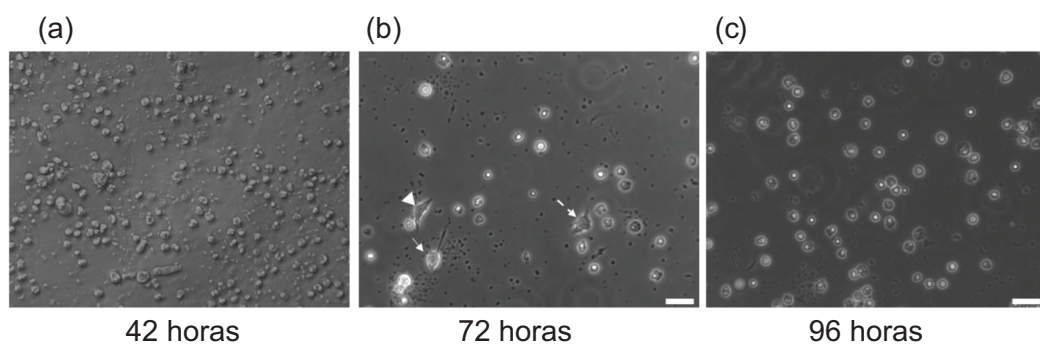


FIG.2A

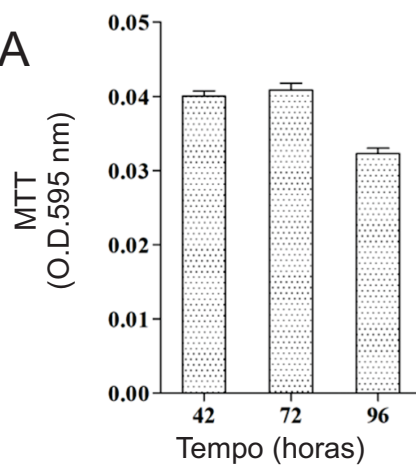


FIG.2B

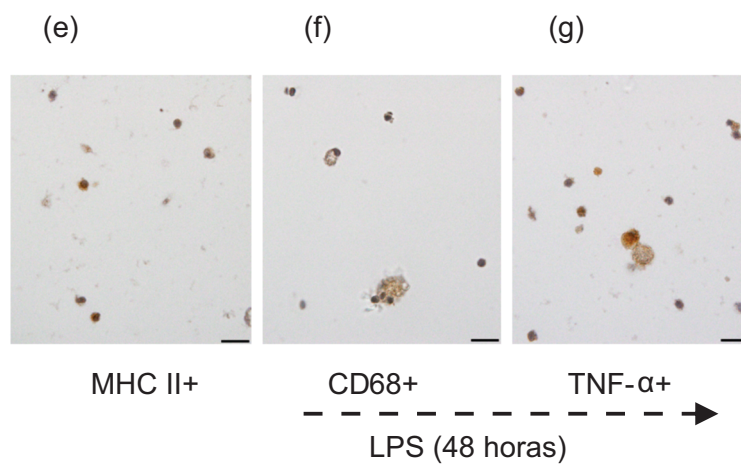


FIG.3

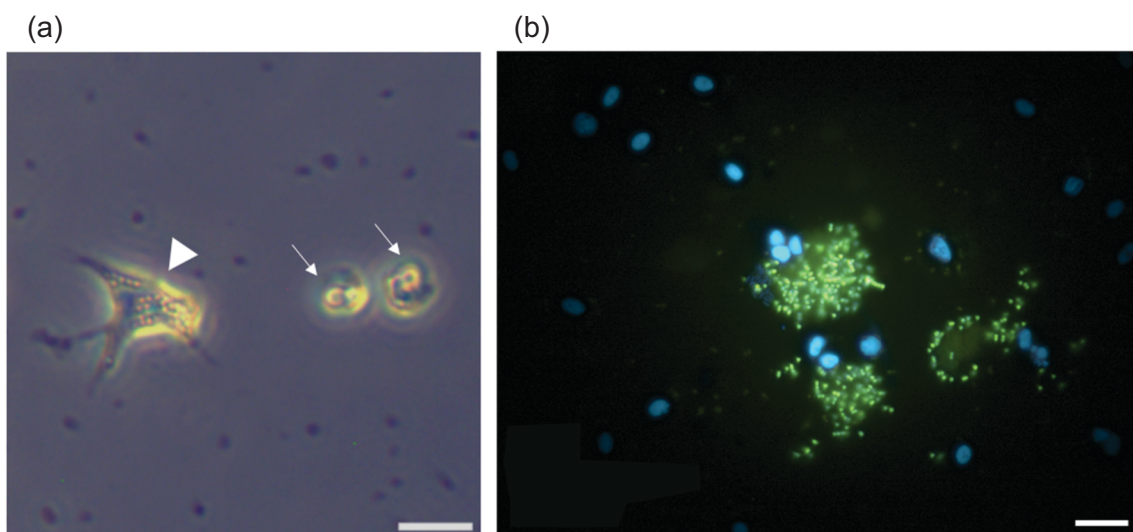


FIG.3A

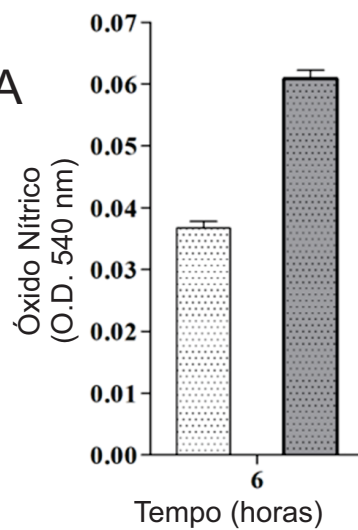
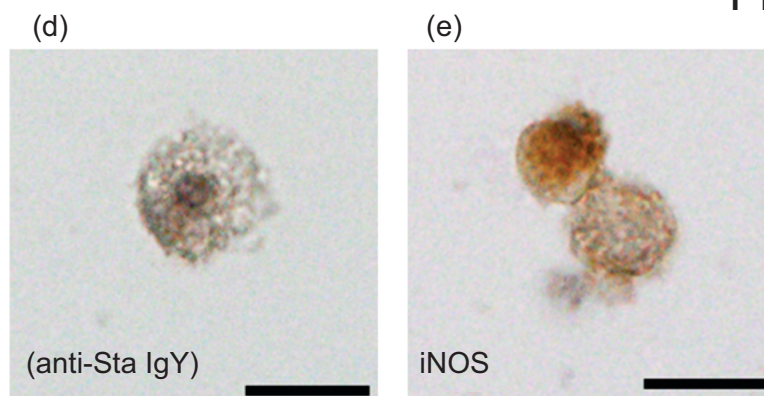


FIG.3B



RESUMO

“MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE CULTURAS HOMOGÊNEAS DE MICRÓGLIAS CEREBRAIS DE TILÁPIAS-DO-NILO E USO”.

Trata-se de método (10) para obtenção de culturas homogêneas de micróglia cerebrais de tilápias-do-nilo '*Oreochromis niloticus*' para serem armazenamento, comercialização e utilização para ensaios 'in vitro'; dito método (10) utiliza a fragmentação mecânica do tecido cerebral em filtro tamis 0.22 um e neutralização das enzimas endógenas, bem como, o uso da afinidade dos receptores do tipo Toll (TLR2) nas micróglia ácido teicóico e para outros Padrões Moleculares Associados a Patógenos ou PMAPs, presentes nas proteínas de membrana do '*S. agalactiae*'.