



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

(21) BR 102013028692-3 A2



(22) Data do Depósito: 07/11/2013

(43) Data da Publicação: 29/09/2015

(RPI 2334)

(54) Título: PROCESSO DE CULTIVO DE CÉLULAS

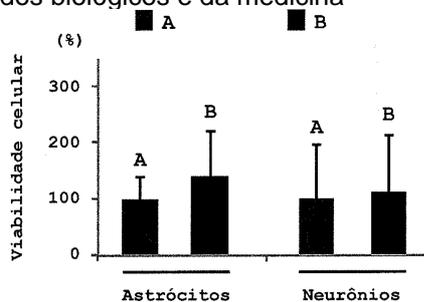
(51) Int. Cl.: C12N 5/07; C12N 11/12; C12N 5/071; C12N 5/079; C12N 5/0793

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

(72) Inventor(es): BELMIRA LARA DA SILVEIRA ANDRADE DA COSTA, CATARINA SOFIA GONÇALVES PIMENTEL

(57) Resumo: PROCESSO DE CULTIVO DE CÉLULAS. A presente invenção revela um

processo de cultivo de células compreendendo o cultivo de células de tecido nervoso em um meio de cultura adequado e revestido de membrana de biopolímero da cana-de-açúcar. A presente invenção situa-se nos campos da engenharia de tecidos biológicos e da medicina



## Relatório Descritivo de Patente de Invenção

### PROCESSO DE CULTIVO DE CÉLULAS

#### Campo da Invenção

5 A presente invenção revela um processo de cultivo de células compreendendo a etapa de cultivar células em um meio de cultura em um meio de cultura adequado e revestido de membrana de biopolímero da cana-de-açúcar.. A presente invenção situa-se nos campos da engenharia de tecidos biológicos e da medicina.

#### 10 Antecedentes da Invenção

A busca por biomateriais para usos em culturas de tecidos biológicos e na medicina regenerativa tem crescido no sentido de substituir materiais sintéticos não absorvidos pelo organismo e que podem induzir respostas inflamatórias intensas ou indesejáveis (Novikova *et al*, 2003).

15 O biopolímero da cana-de-açúcar é um exopolissacarídeo obtido por fermentação microbiológica pelo emprego da bactéria *Zoogloea sp*, a partir do melaço de cana-de-açúcar. A estrutura química do exopolissacarídeo é constituída por: glicose 87,57%; xilose 8,58%; ribose 1,68%; ácido glicurônico 0,83%; manose 0,82%; arabinose 0,37%; galactose 0,13%; ramnose 0,01% e  
20 fucose 0,01% (Paterson-Beedle *et al.*, 2000).

Tem sido testada a potencial aplicação do biopolímero da cana-de-açúcar em curativos cirúrgicos (Coelho *et al.*, 2001), reconstrução de uretra (Chagas *et al.*, 2005), reparo da parede abdominal (Falcão *et al.*, 2008), angioplastia (Aguiar *et al.*, 2007) e miringoplastia (Silva *et al.*, 2006).

25 Adicionalmente, ensaios realizados em ratos evidenciaram a potencial aplicação do biopolímero da cana-de-açúcar como substituto da dura-máter em cirurgias neurológicas que envolvem, por exemplo, craniotomia fronto-parietal (Lima *et al.*, 2008). A ausência de resposta inflamatória encefálica sugeriu a potencial aplicação do biopolímero como substrato biocompatível e  
30 biodegradável para implante de células nervosas em casos de degeneração por trauma ou doença.

A busca nas literaturas patentária e não patentária indicaram alguns documentos parcialmente relevantes, indicados a seguir:

O documento "A *cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a Zoogloea sp*" de M Paterson-Beedle *et al.* (2002) revela o  
5 isolamento de um polissacarídeo extracelular produzido a partir da bactéria *Zoogloea sp.*

A presente invenção difere deste documento pelo fato de revelar uma aplicação do biopolímero e que não havia sido prevista pelo documento, a aplicação no cultivo de células.

10 O documento "*Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual*" de Santos Jr. (2007) trata de biomateriais poliméricos desenvolvidos para uso como substitutos de tecidos danificados e/ou estimular a regeneração dos tecidos danificados.

A presente invenção difere deste documento pelo fato de revelar um  
15 processo de cultivo celular *in vitro* em um meio de cultura revestido de biopolímero da cana-de-açúcar.

O documento PI0301912-8 revela um gel de biopolímero produzido a partir da síntese do melaço da cana-de-açúcar e de outros açúcares, via microrganismo *Zoogloea sp.* A presente invenção difere deste documento pelo  
20 fato de revelar um processo de cultivo celular *in vitro* em um meio de cultura revestido de biopolímero da cana-de-açúcar sob a forma de membrana.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui, sob a percepção dos inventores,  
25 novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

Assim, a presente invenção apresenta uma solução alternativa àquelas encontradas no estado da técnica atual, de modo a prover um processo de cultivo de células compreendendo a etapa de cultivar células em um meio de  
30 cultura revestido de membranas de biopolímero da cana-de-açúcar. Desse modo, torna-se possível o cultivo e a proliferação celular *in vitro* e vislumbra-se

seu grande potencial de aplicação nas áreas de engenharia de tecidos biológicos e na área de pesquisas em neurociências.

Em um de seus aspectos, a presente invenção provê um processo de cultivo de células compreendendo o cultivo de células de tecido nervoso em um meio de cultura adequado e revestido de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar.

Em uma concretização preferencial, o tecido nervoso é de mamíferos.

Em uma concretização preferencial, as células são células da glia ou neurônios.

Em uma concretização preferencial, as células da glia ou neurônios são de culturas primárias.

Em uma concretização preferencial, os neurônios são cultivados sobre uma camada de células da glia.

Em uma concretização preferencial, o meio de cultura adequado é selecionado do grupo consistindo de: meio DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle), meio DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle) sem glicose, meio DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle), com baixa glicose, meio DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle) com elevada glicose, meio MEM Eagle (Meio Mínimo Essencial Eagle).

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

#### **Breve Descrição das Figuras**

A figura 1 mostra os resultados de viabilidade celular no biopolímero da cana-de-açúcar, mostrando-se o gráfico de porcentagem de viabilidade celular no biopolímero (indicado pela letra B) normalizada para controle poliestireno (indicado pela letra A). Barras de erro mostram desvio padrão.

#### **Descrição Detalhada da Invenção**

##### **Cultivo celular ou cultivo de células**

No contexto do presente pedido de patente, a expressão deve ser entendida como a cultura de quaisquer tipos de células de mamíferos,

incluindo-se células de humanos. A cultura celular ou cultivo de células pode envolver a mistura de diferentes tipos de células como, por exemplo, astrócitos e neurônios.

#### Culturas primárias de células nervosas

5 No contexto do presente pedido de patente, a expressão refere-se a culturas de células nervosas preparadas diretamente de tecidos de qualquer ser vivo, em especial os mamíferos incluindo os seres humanos. O preparo da cultura primária de células nervosas pode compreender ou não compreender o fracionamento das células.

#### 10 Células da glia

No contexto do presente pedido de patente, a expressão deve ser entendida como células não neuronais e que geralmente proporcionam suporte e nutrição aos neurônios. As células da glia compreendem micróglia (macrófagos especializados) e macroglia (astrócitos, oligodendrócitos, glioblastos).

#### 15 Substrato de biopolímero da cana-de-açúcar

No contexto do presente pedido de patente, a expressão deve ser entendida como o biopolímero da cana-de-açúcar sob a forma de membrana que é utilizado na presente invenção como substrato para o cultivo de células de mamíferos, incluindo-se as células de seres humanos. Deve-se entender que as culturas de células podem ser mistas ou não. Ou seja, pode haver mais de um tipo de célula na cultura celular. Por exemplo, uma cultura de astrócitos e neurônios, sendo que os neurônios crescem sobre a camada de astrócitos previamente cultivada.

#### 25 Meio de cultura previamente revestido de membranas de biopolímero da cana-de-açúcar

No contexto do presente pedido de patente, a expressão deve ser entendida como revestir o recipiente em que se procederá o cultivo celular com membranas de biopolímero da cana-de-açúcar. O referido biopolímero, desse modo, revestirá o recipiente formando ao menos uma camada de biopolímero da cana-de-açúcar.

### Meio de cultura adequado ou meio de cultivo

No contexto do presente pedido de patente, as expressões devem ser entendidas como quaisquer meios que forneçam os nutrientes necessários para a cultura, crescimento e/ou proliferação das células cultivadas. Ainda o

5 contexto do presente pedido de patente, as expressões compreendem os meios nutritivos comumente empregados no estado da técnica para o cultivo de células animais, incluindo-se células de mamíferos como, por exemplo, as células nervosas de mamíferos. Exemplos não limitantes de meios nutritivos comumente empregados para o cultivo de células de mamíferos são: meio

10 DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle), meio DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle) sem glicose, meio DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle), com baixa glicose, meio DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle) com elevada glicose, meio MEM Eagle (Meio Mínimo Essencial Eagle), dentre outros.

### 15 **Exemplo 1. Realização Preferencial**

#### **Material e Métodos**

##### Animais e biopolímero

Foram utilizados ratos Wistar criados nos biotérios dos Departamentos de Nutrição e de Antibióticos da UFPE (Recife, Brasil), e mantidos no biotério

20 do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE (Recife, Brasil) em ambiente controlado (ciclos de luz/escuro de 12 horas, temperatura ambiente de 22°C, 68% umidade). Ração comercial (Labina) e água foram disponibilizadas *ad libitum*. As membranas de biopolímero da cana-de-açúcar foram preparadas e fornecidas Departamento de Cirurgia da UFPE (Recife,

25 Brasil).

##### Culturas primárias corticais

Foram utilizados ratos Pn0-Pn3 (Pn0 = dia do nascimento) para culturas de astrócitos e E16 (E1 = primeiro dia de gestação) para culturas de neurônios. Após decapitação, o cérebro foi isolado, as meninges removidas e as

30 estruturas mantidas em TSF-glicose (tampão salina fosfato com glicose 0,6%). O córtex cerebral isolado foi dissociado com micropipeta, após centrifugação

das células em suspensão (1500 RPM, 5 minutos), estas foram ressuspensas em: DMEM-F12 (Meio Eagle Modificado por Dulbecco com nutriente F-12, Gibco) suplementado com 33 mM glicose, 2 mM glutamina, 3 mM bicarbonato de sódio, 0,5 mg/ml penicilina/estreptomicina, 2,5 µg/ml fungizona e 10% de soro fetal bovino para cultura de astrócitos; ou meio Neurobasal (Invitrogen) suplementado com 2 mM glutamina, 0,5 mg/ml penicilina/estreptomicina e 1% B-27 para cultura de neurônios. As culturas foram mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 85% umidade, havendo troca do meio a cada dois dias.

Os neurônios foram plaqueados ( $5 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  células) diretamente em placas ou garrafas de cultura previamente revestidas com o biopolímero. No caso dos astrócitos, o plaqueamento no biopolímero ( $5 \times 10^4$  -  $7 \times 10^5$  células) foi feito após os 7-10 dias em cultura necessários para obtenção de uma cultura pura de astrócitos. Para co-cultura, quando as culturas gliais sobre o biopolímero atingiram confluência, foram lavadas 3 vezes com meio DMEM-F12 sem soro e sobre elas plaqueados neurônios corticais frescamente preparados ( $5 \times 10^4$  células/poço). As co-culturas foram mantidas em meio DMEM-F12 sem soro, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 85% umidade durante 24-48hrs.

#### Imunocitoquímica

As células foram fixadas com 4% para-formaldeído por 20 minutos, lavadas 3 vezes com tampão fosfato (TF) 0.1M (pH 7.4) bloqueadas com 3% BSA 1% Triton em TF por 30 minutos e incubadas com anticorpo primário (8-12 horas a 4°C). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-GFAP (camundongo, 1:200, Sigma; coelho, 1:200, Diag. Biosystems; coelho, 1:100, Invitrogen) e anti-beta Tubulina III (camundongo, 1:100, Santa Cruz). Após 3 lavagens com TF as células foram incubadas durante 1 hr com anticorpo secundário biotilado adequado (Jackson Immuno Res., 1:1000). Após lavagem, as células foram incubadas com avidina-biotina-HRP (Kit ABC Vector, 1:200 em TF) por 1 hr seguida de lavagem e reação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB, Sigma) por 5 minutos. Fotografias das células imunorreativas foram tiradas em microscópio invertido.

#### Viabilidade celular

A viabilidade celular foi aferida através do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Liu *et al.*, 1997), que é um formazan amarelo convertido em cristais roxos por redutases mitocondriais. Células plaqueadas (10000/poço) em placas de 96 poços foram mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 85% umidade durante 5 dias. A cada poço foram adicionados 10 µl de MTT 5 mg/ml e incubado no mínimo por 2,5 hrs. Após o término do período de incubação, foram adicionados 100 µl/poço de solução de solubilização 10% Triton-X 100 em isopropanol ácido (0,1N HCl) e a placa foi então incubada durante a noite a 37°C. Foi feita a leitura da absorbância a 490nm num espectrofotômetro.

### **Resultados**

Utilizando membranas de biopolímero da cana-de-açúcar como substrato de cultura primária de astrócitos, foi possível obter células imunorreativas para a proteína fibrilar glial (GFAP), um marcador de astrócitos diferenciados (conforme indicado no anexo 1).

No caso de culturas primárias de neurônios corticais, as células sobre o biopolímero apresentam marcação para beta-Tubulina III, um marcador neuronal (conforme indicado no anexo 2).

A viabilidade celular não foi comprometida pela presença do biopolímero nos dois tipos de cultura (como mostra a figura 1, teste de Mann-whitney, astrócitos  $p=0,144$ ; neurônios  $p=0,873$ ).

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

### Reivindicações

#### PROCESSO DE CULTIVO DE CÉLULAS

1. Processo de cultivo de células *in vitro* **caracterizado** por compreender  
5 o cultivo de células de tecido nervoso em um meio de cultura adequado e  
revestido de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo tecido  
nervoso ser de mamíferos.
3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelas  
10 células serem células da glia ou neurônios.
4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelas  
células da glia ou neurônios serem de cultura primária.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelos  
neurônios serem cultivados sobre uma camada de células da glia.
- 15 6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4,  
**caracterizado** pelo meio de cultura adequado ser selecionado do grupo  
consistindo de: meio DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle), meio  
DMEM (Meio Dulbecco Modificado por Eagle) sem glicose, meio DMEM (Meio  
Dulbecco Modificado por Eagle), com baixa glicose, meio DMEM (Meio  
20 Dulbecco Modificado por Eagle) com elevada glicose, meio MEM Eagle (Meio  
Mínimo Essencial Eagle).

FIGURAS

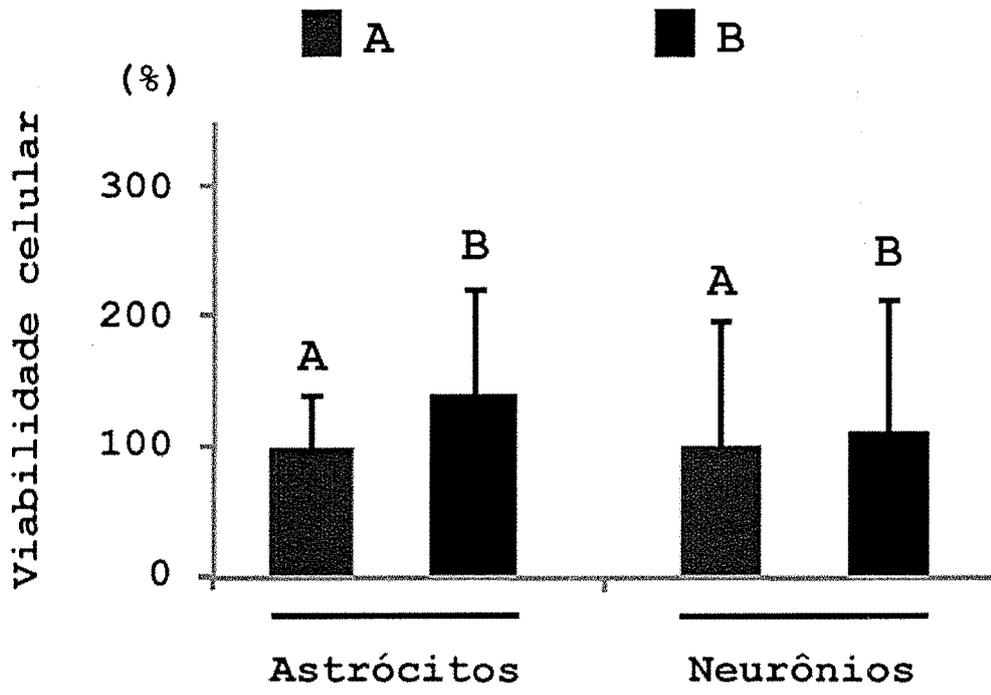


Figura 1

**Resumo**

**PROCESSO DE CULTIVO DE CÉLULAS**

5 A presente invenção revela um processo de cultivo de células compreendendo o cultivo de células de tecido nervoso em um meio de cultura adequado e revestido de membrana de biopolímero da cana-de-açúcar. A presente invenção situa-se nos campos da engenharia de tecidos biológicos e da medicina.