



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

(21) BR 102015025791-0 A2

(22) Data do Depósito: 09/10/2015

(43) Data da Publicação: 25/04/2017



(54) **Título:** MÉTODO IN VITRO PARA PREDIZER A TOXICIDADE DE UMA SUBSTANCIA TESTE, USO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS HUMANAS PARA PREDIZER A TOXICIDADE DE UMA SUBSTANCIA TESTE, E, KIT DE DIAGNÓSTICO

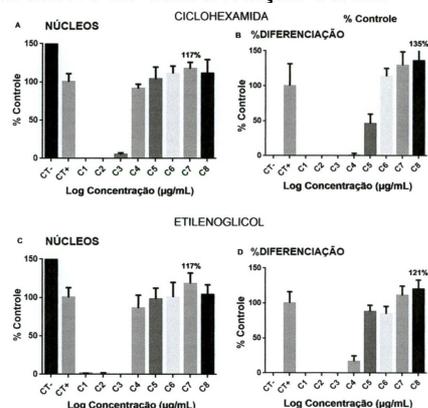
(51) **Int. Cl.:** G01N 33/50; C12N 5/074

(73) **Titular(es):** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

(72) **Inventor(es):** BRUNO DALLAGIOVANNA; ALESSANDRA MELO DE AGUIAR; ANA PAULA RESSETTI ABUD

(74) **Procurador(es):** BHERING, ALMEIDA & ASSOCIADOS (KATIA F DE ALMEIDA)

(57) **Resumo:** "MÉTODO IN VITRO PARA PREDIZER A TOXICIDADE DE UMA SUBSTANCIA TESTE, USO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS HUMANAS PARA PREDIZER A TOXICIDADE DE UMA SUBSTANCIA TESTE, E, KIT DE DIAGNÓSTICO" A presente invenção se refere a um método in vitro para predizer a toxicidade de uma substancia teste, através do uso de células-tronco mesenquimais adultas humanas. Mais particularmente, a presente invenção se refere à triagem toxicológica in vitro com método e/ou kit de diagnóstico para a determinação de concentrações tóxicas e predição de toxicidade de substâncias teste compreendendo substâncias químicas, fármacos, compostos, misturas, particulados, e semelhantes. A invenção provê a utilização de células-tronco adultas humanas, ou células específicas derivadas de células- tronco adultas humanas em modelos de diferenciação celular



## **“MÉTODO IN VITRO PARA PREDIZER A TOXICIDADE DE UMA SUBSTANCIA TESTE, USO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS HUMANAS PARA PREDIZER A TOXICIDADE DE UMA SUBSTANCIA TESTE, E, KIT DE DIAGNÓSTICO”**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção se refere a um método *in vitro* para prever a toxicidade de uma substancia teste, através do uso de células-tronco adultas humanas. Mais particularmente, a presente invenção se refere à triagem toxicológica *in vitro* com método e/ou kit de diagnóstico de substâncias teste compreendendo substâncias químicas, fármacos, compostos, misturas, particulados, e semelhantes. A invenção provê a utilização de células-tronco adultas humanas, que podem ser obtidas de vários tecidos humanos como por exemplo as células obtidas de tecido adiposo (ADSC) ou células específicas derivadas de células-tronco adultas humanas assim como metodologias para utilizar essas células para avaliação da citotoxicidade, baseados na ação não apenas na viabilidade celular ou número de células, mas em seu efeito no processo de diferenciação celular em adipócitos. De forma mais específica, a invenção provê uma metodologia *in vitro* para avaliar a toxicidade sobre a diferenciação celular de células-tronco adultas, entre elas ADSC. Adicionalmente, marcadores de predição do efeito tóxico são identificados e providos pela presente invenção como a alteração no percentual ou na área de diferenciação celular, entre outros, de forma a correlacionar o efeito tóxico identificado com o efeito inibitório na diferenciação celular.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[002] Tanto produtos já estabelecidos no mercado quanto produtos obtidos ao longo de seu processo de desenvolvimento, principalmente aqueles destinados a uso humano na forma de fármacos e seus correlatos, são submetidos a uma série de ensaios que avaliam não apenas a sua eficácia e/ou potência, mas também a segurança e toxicidade.

[003] Tradicionalmente, os estágios iniciais de descoberta e desenvolvimento de medicamentos têm se concentrado na otimização de ligação e potência de compostos experimentais. Tipicamente, são realizados estudos em animais no estágio pré-clínico dos compostos candidatos a fármacos para caracterizar farmacocinética (PK), farmacodinâmica (PD) e

toxicidade fisiológica. No entanto, os estudos animais são dispendiosos, demorados e são limitados. Além disso, muitas drogas têm mostrado efeitos colaterais imprevistos ou imprevisíveis apenas depois de chegar ensaios clínicos ou libertação em larga escala para o público.

[004] Grande parte dos ensaios de toxicidade aplicados tanto no controle de qualidade quanto no desenvolvimento de produtos que utilizam animais em seus processos, são questionados mundialmente já de longa data, sendo primeiramente mencionado em 1959 por William Russell e Rex Burch, que descreveram o princípio dos 3Rs, do Inglês "Replacement, Reduction and Refinement", como substituir, reduzir e refinar o uso de animais (Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen; 1959.), princípio este que é amplamente revisto desde então (Flecknell P. *ALTEX* 2002; 19(2):73-8. Replacement, reduction and refinement., e Kandárová H. & Letasiová S. *Interdiscip Toxicol.* 2011 Sep; 4(3): 107–113. *Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods.*). Liebsch e seus colaboradores (Liebsch M. et al, 2011. *Arch Toxicol* 85. 841-858. *Alternatives to animal testing: current status and future perspectives*) também notaram que é muito importante o uso de células ou tecidos humanos para predição de toxicidade ao invés do uso de animais. Existem diversos esforços nacionais (Eskes, C. et al 2009. *Altex* 26, 303-306. *Proposal for a Brazilian centre on alternative test methods.* *Altex* 26, 303-306) e internacionais (Kandárová & Letašiová, 2011) para a redução, substituição e refinamento do uso de animais. Devido a essa urgência, se faz necessário o desenvolvimento de métodos alternativos para a predição de toxicidade em humanos (Halle, W., 2003. *ATLA* 31, 89-198. *The Registry of Cytotoxicity: toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD50) and to reduce testing in animals.*). Apesar da redução do uso de animais ter grande impacto econômico e social na pesquisa e desenvolvimento tecnológico, métodos alternativos capazes de prever a toxicidade de produtos nos mais diversos substratos celulares precisam passar por um longo processo de avaliação para então serem e aprovados pelas agências regulatórias de ensaios de citotoxicidade. A aplicabilidade desses ensaios precisa ser comprovada, baseada em estudos validados e reconhecidos internacionalmente. Para isto comitês internacionais e nacionais foram criados com a finalidade de organizar a validação de

métodos alternativos como o ICCVAM (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), ECVAM (European Centre for the Evaluation of Alternative Methods ) e o recentemente criado em 2012, o BRACVAM (Brazilian Centre for the Evaluation of Alternative Methods).

[005] Além disso, as autoridades regulatórias no Brasil reconheceram 17 métodos alternativos ao uso de animais em 2014 (Resolução Normativa no. 18 de 24 de setembro de 2014), e é mandatório que os laboratórios que realizam os ensaios correspondentes em animais façam a substituição completa até 2019. Desses métodos, 4 são para avaliação da toxicidade aguda, sendo que apenas um deles é *in vitro* para triagem, baseado apenas na avaliação do efeito do composto teste sobre a captação do corante vermelho neutro, indicador de viabilidade celular (OECD. 2010. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests N°. 129. OECD Environment, Health and Safety Publications, Paris). Esse método não é 100% acurado para predizer a toxicidade das drogas testadas, especialmente aquelas de maior toxicidade, contudo sua utilização já permite reduzir o uso de animais em 28% (substância referência) e até 50% (substâncias não classificadas) (OECD N°. 129, 2010).

[006] Entre os principais substratos celulares utilizados em ensaios de citotoxicidade estão o uso de cultivos celulares primários e as linhagens transformadas (Hook, L.A., 2012. Drug Discovery today 17, 336-342. Stem cell technology for drug discovery and development.). Cada um dos substratos apresenta vantagens e desvantagens, principalmente relacionadas com o alto custo dos ensaios, variabilidade de lotes de cultivos primários e a instabilidade genética e resposta não fisiológica de linhagens transformadas. Além disso, dependendo do ensaio utilizado, a predição da toxicidade não é perfeita, o que constitui um dos principais contrapontos da substituição de ensaios animais por testes alternativos de citotoxicidade.

[007] As células-tronco são apontadas como um bom modelo para predição de toxicidade, pois além de possibilitarem a avaliação do efeito citotóxico na viabilidade, proliferação e sobrevivência celular, permitem avaliar a citotoxicidade no processo de diferenciação celular e esta é a principal vantagem de seu uso para predição da toxicidade. Existe apenas uma metodologia validada pelo ECVAM (Comitê Europeu para Validação de

Métodos Alternativos) que utiliza células-tronco embrionárias murinas em comparação com fibroblastos murinos da linhagem Balb/c 3T3 (Scholz G. et al., 1999. *Toxicology in vitro* 13: 675-681. Prevalidation of the Embryonic Stem Cell Test (EST) -A New In Vitro Embryotoxicity Test\* e, ECVAM, 2010. Embryonic Stem Cell Test: DB-ALM Protocol No. 113. 1-31.). Apesar da alta acurácia da metodologia de predição da embriotoxicidade, de 78% frente ao painel de substâncias de referência utilizadas na validação do teste, o ensaio por si só não é suficiente e deve ser utilizado em uma estratégia integrada de testes. Além disso, é um ensaio que utiliza células murinas e não humanas, desta forma, vários ensaios utilizando células embrionárias humanas estão em desenvolvimento (Rajamohan, D. et al. 2013. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 35, 281-298. Current status of drug screening and disease modelling in human pluripotent stem cells. e Behar, R.Z. et al. 2012. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 66, 238-245. A method for rapid dose-response screening of environmental chemicals using human embryonic stem cells) sem contudo terem sido validados até o momento.

[008] O uso de células-tronco mesenquimais adultas humanas em ensaios de citotoxicidade também já está em discussão (Chang J. et al., 2007. *biochemical pharmacology* 74. 1371-1382. Effects of anti-inflammatory drugs on proliferation, cytotoxicity and osteogenesis in bone marrow mesenchymal stem cells, Scanu, M. et al, 2011. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 25, 1989-1995. Evaluation of the use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests., e Guo, L.W. et al., 2012. *Toxicology and applied pharmacology* 262, 117-123. Cytotoxicity and inhibitory effects of low-concentration triclosan on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells), embora sem o estabelecimento de controles e critérios necessários para o estabelecimento de um ensaio baseado na inibição da diferenciação celular. As principais vantagens da utilização deste tipo celular é que constituem células de origem humana e tanto sua capacidade de proliferação/sobrevivência podem ser avaliadas e também a sua capacidade de diferenciação celular em diferentes tipos celulares como adipócitos, osteoblastos, entre outros, constituindo um ensaio de avaliação de citotoxicidade mais sensível e com potencial de predição de efeito tóxico em

humanos mais acurado do que os sistemas *in vitro* atualmente disponíveis. Desta forma o desenvolvimento de ensaios de citotoxicidade com células-tronco adultas humanas é uma grande inovação tecnológica com aplicabilidade para avaliação de citotoxicidade de compostos químicos e de produtos já estabelecidos ou em desenvolvimento.

[009] Além disso, as células-tronco derivadas de tecido adiposo podem ser obtidas de material adiposo que normalmente é descartado em procedimentos como lipoaspiração e cirurgia bariátrica. Essa grande disponibilidade é uma vantagem para fins biotecnológicos, uma vez que as células-tronco podem ser largamente isoladas de tecidos que são normalmente descartados, sem a necessidade de qualquer outro procedimento invasivo no doador. Por exemplo, um (1) grama de tecido adiposo produz aproximadamente 5000 células tronco, enquanto que o rendimento a partir de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BM-MSCs) é de 100 a 1000 células/mL de medula. Em média, o rendimento de células ADSC de lipoaspirado processado compreende aproximadamente 2% de células nucleadas. (Hakan Orbay H. et al. 2012. Stem Cells Int. 2012; 2012: 461718. Published online 2012 May 14. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications). Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea foram avaliadas como bons substratos celulares para a predição de classificação de toxicidade por captação de vermelho neutro comparado com NHKs e fibroblastos murinos 3T3 (Scanu, M., Mancuso, L., Cao, G., 2011.). Embora estes resultados sejam promissores, células-tronco derivadas de medula óssea não são tão facilmente obtidas, de modo que outras fontes de células-tronco multipotentes devem ser avaliadas para ensaios de citotoxicidade.

[010] Apesar das tentativas que têm sido desenvolvidas para validar métodos alternativos de predição de toxicidade, existe uma preocupação especial sobre a má correlação entre os dados *in vitro*, que são expressos pelo IC<sub>50</sub> (dose que causa 50% de inibição da atividade desejada) e valores de dados *in vivo*, que são expressos pelo DL<sub>50</sub> (dose que causa 50% das mortes nos animais). Essa correlação foi estabelecida pelo Registry of Citotoxicity (RC) (Halle, W., 2003) e foi ainda complementada pelo ICCVAM para obter uma predição DL<sub>50</sub> mais confiável, não só para substâncias puras, mas também

para misturas (ICCVAM, 2006. Test Method Evaluation Report (TMER): in vitro cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. National Institute for Environmental Health Sciences. NIH Publication No: 07-4519, Research Triangle Park, NC).

[011] Células 3T3 e NHKs (queratinócitos humanos normais) são amplamente aceitos como substratos celulares para o ensaio de captação de vermelho neutro para determinar as doses iniciais para testes de toxicidade oral aguda e correlação entre IC<sub>50</sub> e predição DL<sub>50</sub> (ICCVAM, 2006a. Background Review Document: in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating acute oral systemic toxicity. National Institute for Environmental Health Sciences. NIH Publication No: 07-4518, Research Triangle Park, NC. Vol 1., ICCVAM, 2006b. Background Review Document: in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating acute oral systemic toxicity. National Institute for Environmental Health Sciences. NIH Publication No: 07-4518, Research Triangle Park, NC., Research Triangle Park, NC. Vol 2., ICCVAM, 2006c. Recommended Test Method Protocol: BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method., ICCVAM, 2006d. Recommended Test Method Protocol: Normal Human Keratinocyte NRU Cytotoxicity Test Method e ICCVAM, 2006e. Test Method Evaluation Report (TMER): in vitro cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. National Institute for Environmental Health Sciences. NIH Publication No: 07-4519, Research Triangle Park, NC.) Os principais substratos celulares usados em ensaios de citotoxicidade são culturas de células primárias e as cepas transformadas. Cada um dos substratos tem vantagens e desvantagens. As desvantagens são principalmente relacionadas com o alto custo e a variabilidade de culturas primárias e instabilidade genética ou a resposta fisiológica de cepas transformadas; assim, as células-tronco são muito promissoras para estudos de toxicologia (Hook, L.A., 2012. Drug discovery today 17, 336-342. Stem cell technology for drug discovery and development).

[012] Dados prévios de nosso grupo, aqui descritos como referência, correspondente a artigo científico aceito para publicação (Abud, APR., et al. 2015. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. Regul Toxicol Pharmacol. 2015 Sep 14. pii: S0273-2300(15)30063-5. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.09.015), indicam que células-

tronco derivadas de tecido adiposo são substratos adequados para a realização de ensaios de citotoxicidade baseado na avaliação do efeito do composto teste sobre a captação do corante vermelho neutro, indicador de viabilidade celular (OECD. 2010. No. 129). Neste trabalho, foram comparados os dados para 12 substâncias de referência entre a linhagem de referência 3T3 e amostras de 2 doadores de ADSC. Os dados obtidos indicaram que ADSC são equiparáveis aos modelos celulares disponíveis, além de permitirem a predição da classe de toxicidade de 50% das drogas avaliadas, em comparação com 50% da linhagem murina de referência (Balb 3T3) ou mesmo 30% da linhagem humana (NHK) também utilizada neste tipo de ensaio. Apesar de ter acurácia comparável do que os sistemas disponíveis, a principal limitação deste método *in vitro* com modelos celulares é acertar a classe de toxicidade das drogas mais tóxicas. Adicionalmente, foi observado por nosso grupo que para as células-tronco adultas, os valores de IC<sub>50</sub> calculados são maiores do que para 3T3, indicando que essas células são mais resistentes do que a linhagem de referência, apesar de serem equivalentes a linhagem celular de referência para a predição de DL<sub>50</sub> (Abud, APR., et al. 2015. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. 2015 Sep 14. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.09.015). Embora tenhamos demonstrado dados promissores com o uso de ADSC para o ensaio *in vitro* para a previsão de doses iniciais para ensaios de toxicidade aguda, não foi possível determinar a classe de GHS correta para as substâncias teste mais tóxicas, em nosso estudo. (Abud, APR., et al. 2015. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. 2015 Sep 14. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.09.015) e em outros (ICCVAM, 2006c. Recommended Test Method Protocol: BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method e Scanu et al. 2011). Assim, este método pode ser usado para uma triagem inicial da substâncias teste, embora os métodos mais precisos e sensíveis têm de ser ainda desenvolvidos.

[013] Assim, existe a necessidade técnica de desenvolvimento de metodologia *in vitro*, com células humanas de fácil cultivo e obtenção para predição mais sensível da toxicidade de compostos teste.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[014] O objetivo da presente invenção é promover a aplicabilidade do

uso de células-tronco adultas humanas em ensaios de citotoxicidade baseados na inibição da diferenciação celular, como uma alternativa ao uso de animais e para a predição da toxicidade de substâncias teste como substâncias químicas, fármacos, compostos, misturas, particulados, etc., de produtos já estabelecidos ou em desenvolvimento.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[015] A Figura 1 mostra a inibição da diferenciação adipogênica utilizando células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo (ADSC) e a substância teste SDS para os três parâmetros avaliados: número de núcleos, % de diferenciação e área.

[016] A Figura 2 mostra o resultado de um ensaio de viabilidade celular utilizando células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo (ADSC) e a substância teste dicromato de sódio.

[017] A Figura 3 mostra a inibição da diferenciação adipogênica utilizando células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo (ADSC) e a substância teste dicromato de sódio para os três parâmetros avaliados: número de núcleos, % de diferenciação e área.

[018] A Figura 4 mostra o resultado de um ensaio de viabilidade celular utilizando células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo (ADSC) e a substância ciclohexamida.

[019] A Figura 5 mostra a inibição da diferenciação adipogênica utilizando células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo (ADSC) e a substância ciclohexamida para os três parâmetros avaliados: número de núcleos, % de diferenciação e área.

[020] A Figura 6 mostra o resultado de um ensaio de viabilidade celular utilizando células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo (ADSC) e a substância ácido tricloroacético (TCA).

[021] A Figura 7 mostra a inibição da diferenciação adipogênica utilizando células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo (ADSC) e a substância ácido tricloroacético (TCA) para os três parâmetros avaliados: número de núcleos, % de diferenciação e área.

[022] A Figura 8 mostra exemplos da detecção de efeito tóxico estimulatório como o exemplo de drogas que apresentaram efeito estimulatório.

A e B – cicloheximida; C e D – etilenoglicol para número de núcleos e % de diferenciação celular.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA INVENÇÃO**

[023] As células-tronco apresentam capacidade de autorrenovação e diferenciação em diferentes tipos celulares, conforme revisto (National Institute Of Health, Stem Cell Basics, 2002. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics1.aspx>> Acesso em: 07/01/2015). A presente invenção provê que a ação de substâncias durante o processo de diferenciação celular, poderá ser uma maneira de avaliação de toxicidade, ou seja, a avaliação durante o processo de diferenciação poderia prever com maior acurácia na avaliação da toxicidade de compostos teste. Nenhuma metodologia validada existente, de conhecimento dos inventores, utiliza células-tronco adultas humanas como substratos para a realização de ensaios de citotoxicidade baseadas na sua capacidade de diferenciação celular. Células-tronco isoladas de tecido adiposo são de mais fácil obtenção que outras fontes de células-tronco mesenquimais como a medula óssea (Baer, P.C., 2014. World journal of stem cells 6, 256-265. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro.), utilizadas previamente em outro estudo, onde se avaliou apenas a ação de substâncias na viabilidade celular (Scannu, et al 2011).

[024] Existem vários ensaios de citotoxicidade no estado da técnica, contudo uma questão a ser levada em consideração é a capacidade de predição da toxicidade para seres humanos, que nem sempre é acurada para os sistemas disponíveis. Desta forma, ensaios alternativos ao uso de animais que tenham correlação com os efeitos *in vivo*, precisam ser desenvolvidos. As células-tronco adultas humanas, além de constituírem uma promissora fonte de células para terapias celulares, também podem ter aplicação biotecnológica como substrato celular para ensaios de citotoxicidade. As principais vantagens da utilização deste tipo celular é que constituem células de origem humana e que tanto sua capacidade de proliferação/sobrevivência podem ser avaliadas quanto sua capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares como adipócitos, osteoblastos, entre outros, constituindo um ensaio de avaliação de citotoxicidade possivelmente mais sensível e com potencial de predição de efeito tóxico em humanos mais acurado do que os sistemas *in vitro* atualmente

disponíveis. Não há relatos sobre o uso de células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo (ADSC) para avaliação de toxicidade por uma metodologia validada. ADSC são facilmente obtidos a partir de lipoaspirados do tecido adiposo subcutâneo. Este tecido é normalmente descartado, o que representa uma fonte disponível para o isolamento de células-tronco (Gimble, J.M., Katz, A.J., Bunnell, B.A., 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100, 1249-1260.).

[025] Desta forma o desenvolvimento de ensaios de citotoxicidade com células-tronco adultas humanas é uma grande inovação tecnológica com aplicabilidade para avaliação de citotoxicidade de compostos químicos e de produtos já estabelecidos ou em desenvolvimento.

[026] Assim a presente invenção, em seu aspecto mais geral, provê o estabelecimento de processo metodológico que seja vantajoso em comparação com as metodologias que constituem o estado da técnica, compreendendo as seguintes etapas:

(a) preparar todos os reagentes e insumos necessários a realização da metodologia;

(b) cultivar manter, repicar e plaquear as células-tronco mesenquimais adultas humanas em meio adequado utilizando insumos adequados preparados de acordo com a etapa (a) e em condições controladas e adequadas de temperatura, pressão, umidade e controle atmosférico de gases bem como;

(c) preparar a substancia de teste através da determinação de sua solubilidade e diluente apropriado com uso de insumos e reagentes preparados de acordo com a etapa (a);

(d) aplicar sobre a monocamada celular de células-tronco adultas humanas oriunda da etapa (b), as diluições das substancias teste oriundas da etapa (c) e manter em meio de diferenciação celular adipogênica, reservando poços para manter os controles internos positivos e negativos da diferenciação celular, sem adição da substância teste, e manter os cultivos celulares em condições controladas e adequadas de temperatura, pressão, umidade e controle atmosférico de gases, onde são avaliadas características qualificáveis e/ou quantificáveis, específicas das células em diferenciação ou já diferenciadas em adipócitos;

(e) trocar o meio de cultura, tanto o meio controle quanto o meio de diferenciação celular contendo as diluições da substância teste de acordo com a etapas (b a d) periodicamente, pro duas vezes na semana, para renovação dos componentes do meio de cultura e remoção dos subprodutos celulares, até o término do período de indução da diferenciação celular de 14 dias mais ou menos de acordo com a diferenciação celular, perfazendo o tempo necessário para avaliação da citotoxicidade pela inibição da diferenciação celular;

(f) interromper o ensaio de forma a preservar os fenômenos característicos da diferenciação celular e/ou citotoxicidade dos cultivos celulares obtidos após conclusão da etapa (e) e realizar lavagem com solução salina tamponada ou similar e fixar os cultivos celulares com fixador aldeídico ou similar pelo tempo necessário para que todos os cultivos estejam fixados, seguida de lavagens com solução salina tamponada ou similar para remoção do fixador e seguir com metodologia adequada a fim de avaliar de forma qualitativa e/ou quantitativa a inibição da diferenciação celular pela substância teste;

(g) corar os cultivos celulares fixados de acordo com a etapa (f) com solução de Vermelho Nilo, ou outro corante adequado para visualização de gotículas lipídicas na temperatura ambiente por tempo adequado seguido de lavagens com solução salina tamponada ou similar;

(h) corar os cultivos celulares fixados de acordo com a etapa (f) e previamente corados de acordo com a etapa (g) para evidenciar os núcleos celulares com solução de solução de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), ou outro corante nuclear adequado, por tempo adequado, seguido de lavagens com solução salina tamponada ou similar;

(i) com os cultivos celulares processados de acordo com as etapas (f – h), quantificar os parâmetros característicos de número de células e de diferenciação celular por microscopia ou técnica semelhante, através de parâmetros celulares avaliados para caracterizar a diferenciação celular e a inibição da diferenciação celular pela substância teste;

(j) realizar análise e interpretação de dados obtidos na etapa (i) a fim de avaliar o perfil de citotoxicidade, caracterizado pela análise dos parâmetros avaliados de acordo com (i) e estabelecer índice desses efeitos a fim de

estabelecer concentrações tóxicas e não tóxicas da substância teste e predição de efeito tóxico;

(k) realizar o ensaio em paralelo compreendendo as etapas (a – j) com substância teste de conhecida citotoxicidade, chamada de substância teste controle, e considerar o ensaio válido se a performance do ensaio para a substância teste controle for satisfatório.

[027] Uma primeira concretização da presente invenção está relacionada com o uso de células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo para análise de substância teste, sejam substâncias puras ou misturas, durante a diferenciação adipogênica. Outras concretizações podem envolver o uso de células-tronco adultas derivadas de outras fontes, ou mesmo ação sobre células derivadas de células-tronco adultas humanas já diferenciadas, ou purificadas e/ou enriquecidas por algum procedimento para este fim. Uma vez que as células-tronco mesenquimais de origem humana, independentemente do tecido de origem ou do processo de obtenção, são caracterizadas por apresentar características comuns de adesão ao plástico em condições padrão de cultivo; devem expressar os marcadores CD105, CD90 e CD73 e não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR e finalmente, devem diferenciar-se em osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* (DOMINICI, M. et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, Greenville, v. 8, n. 4, p. 315-7), é possível extrapolar os resultados e exemplos obtidos para a diferenciação adipogênica com o uso de células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo para células-tronco adultas humanas obtidas de outros tecidos humanos. A invenção provê a utilização de células-tronco adultas humanas, ou células específicas derivadas de células-tronco adultas humanas em modelos de diferenciação celular *in vitro*, e o uso de células-tronco adultas humanas derivadas de outros tecidos seriam variações da mesma invenção original. Originalmente o método foi concebido e comprovado por exemplos utilizando como indicador do efeito tóxico, a análise fenotípica da diferenciação celular, conferida pela avaliação das vesículas lipídicas características da diferenciação adipogênica nestes exemplos. contudo outras abordagens tecnológicas para quantificar o efeito da ação da substância teste sobre a diferenciação de células-tronco

mesenquimais adultas humanas, constituiriam variações da invenção, previstas pelos inventores. Por exemplo, uso de outros corantes para avaliar o mesmo fenômeno biológico. Além disso, a análise da expressão gênica de marcadores da diferenciação celular, sejam ácidos nucleicos ou metabólitos secundários relacionados com a diferenciação celular, poderiam ser utilizados como marcadores e a inibição de sua expressão e/ou detecção poderia ser relacionada com efeito tóxico sobre a diferenciação celular.

[028] Para facilitar a compreensão, é incluído um pequeno sumário dos termos utilizados nesta invenção:

- (1) In vitro: Refere-se ao que está fora de um organismo ou aos fenômenos que são observados no laboratório em tubo de ensaio, placas ou garrafas de cultura, etc.
- (2) Cultura de células: Refere-se a manter células fora dos organismos vivos de origem, em laboratório em placas ou garrafas de cultura, etc em condições ambientais adequadas e controladas e em meios de cultivo adequados.
- (3) Células-tronco: população celular caracterizada por sua capacidade de se autorrenovar, mantendo a população original e sob estímulos adequados é capaz de se diferenciar em diferentes tipos celulares de determinados órgãos e tecidos, com funções especializadas.
- (4) Células-tronco adultas humanas: são células-tronco obtidas a partir de diferentes órgãos e tecidos humanos, como medula óssea e tecido adiposo, etc
- (5) Diferenciação celular: é o processo pelo qual as células-tronco, sob condições e indutores apropriados adquire uma função especializada, caracterizada por um fenótipo típico correspondente ao tipo celular diferenciado, com características fenotípicas distintas da população celular não induzida a diferenciação.
- (6) Repique celular: as células são removidas de suas garrafas ou frascos de cultura por processos de lavagem e/ou ação enzimática a fim de obter suspensão celular que é utilizada para preparação de novas garrafas ou frascos de cultivo ou para realização de ensaios.
- (7) Indutores: conjunto de compostos e substâncias capazes de induzir a diferenciação celular
- (8) Plaqueamento celular: as células-tronco em forma de suspensão celular obtidas a partir de um repique celular são semeadas em placas de cultivo em

concentração e volumes definidos para a realização de ensaios *in vitro*. Citotoxicidade: é capacidade um composto ou substância de causar efeito tóxico a nível celular, alterando características celulares.

(9) Ensaio de citotoxicidade: ensaio, normalmente *in vitro*, capaz de identificar e/ou quantificar o efeito citotóxico de um composto ou substância.

(10) Substância química de referência (ICCVAM): substância química conhecida e caracterizada, previamente descrita como substância de referência para realização de avaliação da capacidade de uma técnica em comparação com ensaio de citotoxicidade previamente validado. Estas substâncias fazem parte de uma listagem de 30 substâncias recomendadas pelo ICCVAM (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) em 2006.

(11) Controle positivo: substância com efeito citotóxico conhecido que é utilizada em todos os ensaios, em paralelo as substâncias ou compostos em teste. Sua finalidade é para verificação e constatação de que o ensaio foi realizado adequadamente e que seus resultados são confiáveis.

(12) Vermelho Nilo: é um corante lipofílico. Este corante marca intensamente e com excelente definição gotículas lipídicas intracelulares visualizadas com microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo.

(13) DAPI: 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride. Corante nuclear, que emite fluorescência azul quando se liga a regiões AT do DNA. Sua marcação é visualizada com microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo.

(14) Contagem celular: determinação do número total de células nucleadas por sistema manual ou automatizado, por exemplo câmara de Neubauer ou sistema automático de contagem celular.

(15) % de células diferenciadas: é o percentual de células positivas para diferenciação celular. Por exemplo: a razão entre o número de células marcadas para vermelho nilo e o número total de células marcadas com DAPI multiplicadas por 100.

(16) Área de células diferenciadas: área correspondente a marcação por vermelho nilo das células diferenciadas.

(17) ADSC - *Human adipose-derived stem cells*. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano.

- (18) BRACVAM - *Brazilian Centre for the Evaluation of Alternative Methods*. Centro Brasileiro para a validação de métodos alternativos.
- (19) DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. Meio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco.
- (20) DMSO - Dimetil sulfóxido. Solvente orgânico utilizado para diluição de compostos apolares.
- (21) D-PBS - *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, solução tamponada por fosfato, modificada por Dulbecco.
- (22) ECVAM - *European Centre for the Evaluation of Alternative Methods*. Centro europeu para avaliação de métodos alternativos.
- (23) GHS - *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*. Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos.
- (24) CAS - *Chemical Abstract Service*. Serviço de resumos químicos.
- (25) IC<sub>50</sub> – a dose que causa redução de 50% do controle *in vitro*.
- (26) ICCVAM - The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. Comitê de coordenação da interagência para validação de métodos alternativos.
- (27) LD50 - dose letal de 50%
- (28) NHK - *Normal human keratinocytes*. Queratinócitos humanos normais.
- (29) NRU - *Neutral red uptake assay*. Ensaio de captação do vermelho neutro.
- (30) OECD - *The Organization for Economic Co-operation and Development*. Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico.
- (31) RC - *Registry of Cytotoxicity*. Registro de citotoxicidade.
- (32) Kit de diagnóstico *in vitro* – produto contendo os reagentes, insumos, controles e protocolo necessários para a realização da metodologia proposta, em sua totalidade ou em partes.
- (33) Características fenotípicas – são características observáveis a nível individual ou mesmo a nível celular, como por exemplo morfologia, desenvolvimento, propriedades bioquímicas ou fisiológicas e comportamento. O fenótipo resulta da expressão dos genes do organismo, da influência de fatores ambientais e da possível interação entre os dois. São exemplos de características fenotípicas celulares a expressão de determinadas proteínas ou ácidos nucleicos mensageiros, que podem ser observadas por técnicas de

microscopia, citometria de fluxo, ou mesmo análises de larga escala, como o sequenciamento de RNA ou RNAseq, entre outras técnicas.

(34) Características genóticas – são as informações hereditárias de um organismo contidas em seu genoma. Podem ser analisadas por técnicas de larga escala como o sequenciamento do genoma, mas também análises citogenéticas e de estabilidade cromossômica, entre outras.

[029] Os Exemplos da presente invenção indicam que ao avaliar o processo da inibição da diferenciação de células-tronco adultas humanas em adipócitos foi possível realizar a predição correta da classe de toxicidade de uma droga que não havia sido predita corretamente com ensaios baseados na viabilidade celular. A classe predita pelo método do estado da arte foi de 3, enquanto a classe correta é 2 conforme mostrou a aplicação do método da presente invenção. Além disso, o método se mostra mais sensível pois o valor de IC<sub>50</sub> calculado pelo método de inibição da adipogênese é várias vezes menor do que o valor calculado pelo vermelho neutro, indicando maior sensibilidade, conforme figuras 1 a 8.

[030] Considerando que as células-tronco apresentam capacidade de diferenciação celular, nestes exemplos caracterizada pela análise de característica fenotípica como a presença de gotículas lipídicas e sua caracterização morfológica, e a ação de drogas durante esse processo de diferenciação celular, é uma maneira de avaliação de toxicidade, ou seja, a avaliação durante o processo de diferenciação pode predizer com maior acurácia a toxicidade de drogas alvo.

[031] A invenção será a seguir descrita na forma de uma realização preferida.

[032] A seguir apresentamos a metodologia empregada para demonstrar a eficácia do uso de células-tronco adultas humanas em modelo de diferenciação celular *in vitro* como substrato celular para ensaios de citotoxicidade e predição de toxicidade. Como exemplo, apresentamos a utilização de células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo e ação de substância teste na diferenciação adipogênica.

### **1. Células e condições de cultura**

[033] Células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC) de lipoaspirados foram adquiridas de uma fonte comercial (Lonza®, Walkersville,

EUA; número de catálogo PT-5006). As ADSCs de três lotes diferentes foram cultivadas em conformidade com as instruções do fabricante. Em resumo, as células foram cultivadas em meio de manutenção composto por Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 4 mM L-glutamina (Gibco Invitrogen®, Carlsbad, Califórnia, EUA) e foram mantidas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ . As ADSC foram mantidas na densidade de 0,2 a  $0,5 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ , com um repique e uma troca de meio semanal em dias distintos.

## 2. As substâncias teste

[034] Para avaliar predição da citotoxicidade, foram utilizados 5 substâncias de referência reconhecidas pelo ICCVAM (2006c), com efeitos tóxicos conhecidos de acordo com a classificação do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS). Todos os produtos químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA).

[035] A preparação da substância teste foi realizada em conformidade com as recomendações do ICCVAM (ICCVAM, 2006c). Foram determinados adequadamente a solubilidade e o diluente. Em resumo, cada droga foi imediatamente solubilizada, e diluições em série foram aplicadas as placas de cultura de células previamente preparadas. No total, oito cavidades foram usadas para cada concentração de fármaco. A Tabela 1 apresenta a relação das substâncias teste que foram usadas.

Tabela 1: Substâncias teste.

Classe GHS*	Substância Teste	Número CAS**	Diluente
$\text{LD}_{50} \leq 5 \text{ mg/kg}$ (classe 1)	ciclohexamida	66-81-9	Meio de Cultura
$5 < \text{LD}_{50} \leq 50 \text{ mg/kg}$ (classe 2)	dicromato de sódio dihidrato	7789-12-0	Meio de Cultura
$300 < \text{LD}_{50} \leq 2000 \text{ mg/kg}$ (classe 4)	dodecil sulfato de sódio	151-21-3	Meio de Cultura
$\text{LD}_{50} > 5000 \text{ mg/kg}$ (não classificada - classe 6)	etilenoglicolol	107-21-1	Meio de Cultura

\* Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, \*\*Serviço de resumos químicos.

para área de diferenciação. Estes dados foram confirmados com mais 2 amostras de ADSC (dados não mostrados).

### **Exemplo 5**

#### **Efeito estimulatório da diferenciação adipogênica: ciclohexamida e Etiléglicol**

[055] Utilizando os mesmos dados obtidos nos exemplos de 1 a 4 e incluindo dados para a substância teste a etilenoglicol (classe 6), foi possível verificar que em algumas condições, a substância teste aumentava o parâmetro analisado em relação ao % do controle (figura 8). Desta forma, uma outra aplicabilidade do método, a qual não é usualmente utilizada em outros modelos de avaliação da toxicidade, seria considerar como um indício de efeito tóxico, um aumento do percentual do controle para quaisquer dos parâmetros avaliados por essa metodologia, desde que este percentual seja identificado como estatisticamente diferente do controle e com valor maior que 100% utilizando ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett's, conforme figura 8. Ressaltando que esta aplicação é inédita, podendo favorecer a identificação de análises posteriores para confirmação do efeito estimulatório da substância, no parâmetro avaliado, e sua relevância para determinação do efeito tóxico.

[056] Os gráficos mostram a análise do número de núcleos (viabilidade celular) e a porcentagem de células diferenciadas, após o tratamento com as substâncias, em comparação com o controle positivo (células induzidas à diferenciação mas que não estiveram em contato com as substâncias). Com essa análise, foi possível indicar as concentrações das substâncias que reduzem tanto o número de núcleos quanto a porcentagem de células diferenciadas, mas também as concentrações que aumentam esses parâmetros. Esses dados fornecem uma maneira a mais de constatar a toxicidade de uma determinada substância.

[057] Resumindo, as principais vantagens da invenção com relação ao estado da técnica são o uso de células tronco adultas de origem humana, que podem ser facilmente obtidas de material de descarte, e também o fato de que ao se utilizar as células-tronco e sua diferenciação celular é possível avaliar a citotoxicidade de forma mais sensível que as metodologias que constituem o estado da técnica.

### 3. Ensaio de diferenciação celular:

[036] Células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo foram mantidas durante 14 dias, sob ação da substância teste e também sob o estímulo da diferenciação. As células eram previamente plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas a  $37 \pm 1$  °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Para o ensaio eram utilizadas células onde a confluência celular no dia do ensaio esteja entre 50% a 80% de confluência celular, como por exemplo  $3,5 \times 10^4$  cels/mL de ADSC, plequeadas no dia anterior a adição da substância teste.

[037] No dia do ensaio, o meio de cultura era removido, adicionava-se a todos os poços metade do volume total por poço de cultivo com meio de manutenção. Adicionava-se metade dos seguintes meios de cultura ou de indução ou diluição das drogas a fim de que cada placa de ensaio contivesse: controle negativo da diferenciação celular, controle positivo da diferenciação celular e diluições da substância teste, da seguinte forma, por exemplo: nas colunas 1 e 12 as culturas eram mantidas apenas com o meio de crescimento celular (controle negativo da diferenciação celular) e as colunas 2 e 11 foram mantidas com o meio de diferenciação celular (controle positivo da diferenciação celular) esses controles internos do processo eram utilizados para avaliar a homogeneidade do plaqueamento. Das colunas 3 a 10 eram, adicionadas diluições seriadas da substância teste em meio de diferenciação celular 2x, para a concentração final de cada indutor ficar em 1x, contendo DMEM 10% de SFB, suplementado com 0,2 mM de indometacina, 50µM de IBMX, 1µM de dexametasona 1µg/mL de insulina em sua concentração final, modificado a partir da composição previamente descrita por Rebelatto CK et al., 2008 (Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp. Biol. Med* (Maywood). 2008 Jul; 233(7):901-13. Epub 2008 Apr 29). Outras composições de meio de cultivo celular de indução da diferenciação celular adipogênica que contenham os indutores apropriados nas concentrações adequadas também podem ser utilizados.

[038] As diluições das drogas foram realizadas em meio de diferenciação celular 2x concentrado e aplicadas sobre a monocamada celular.

[058] A presente invenção tem como campo de aplicação os ensaios de controle de qualidade de produtos e também na predição de toxicidade de novas drogas nas mais diferentes instituições onde é necessário avaliar a toxicidade de uma substancia de teste que pode ser quaisquer substâncias química fármacos, compostos, misturas, particulados, e semelhantes.

Para cada ensaio foram realizadas 8 diluições, em escala logarítmica, da substância teste. Foram utilizados os fatores de diluição de 10, 3,16, 2,15, 1,78, 1,47 e 1,21, de acordo com a substância teste. Num primeiro ensaio exploratório era utilizada a diluição de 10 ou 3,16 por compreenderem faixas de concentração de 8 e 4 log respectivamente. Num segundo ensaio, o fator de diluição era ajustado para que o melhor ajuste a função matemática de Hill fosse alcançado e normalmente se utilizava um fator de diluição capaz de compreender faixa de concentrações que compreendessem de 0 a 100% do efeito tóxico, com pelo menos 1 ponto entre 0 e 50 % e 1 ponto entre 50 e 100% e  $R^2 \geq 0,85$ .

[039] Após adição da substância teste. As células foram mantidas em incubadora à  $37 \pm 1$  °C com 5% de atmosfera de  $CO_2$ . O meio de diferenciação contendo as diluições da substância teste é trocado periodicamente duas vezes por semana, como por exemplo a cada 3-4 dias até o término de 14 dias.

[040] A diferenciação celular é monitorada até completar período adequado para avaliar a diferenciação, que pode ser de 7 a 28 dias, mas em nosso exemplo, foi realizada por 14 dias, quando os cultivos celulares foram lavados com solução salina balanceada tamponada, com por exemplo, solução salina tamponada de tampão fosfato (PBS) e fixados com um fixador adequado, por exemplo fixador aldeídico pelo tempo necessário para fixação, por exemplo, paraformaldeído 1 a 4%, por 10 a 30 minutos.

[041] As células foram, então, coradas com corante para evidenciar vesículas lipídicas, por exemplo, solução de Vermelho Nilo na concentração de  $1 \mu\text{g/ml}$  a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de duas lavagens com solução salina balanceada tamponada (PBS). Os núcleos celulares são corados com solução de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) (Invitrogen®) na concentração de 0,1% por 5 a 15 minutos. Após esse procedimento as células foram lavadas 3 vezes com solução salina balanceada tamponada (PBS) e mantidas a 4°C até o momento da análise. Outros corantes, soluções salinas tamponadas ou mesmo anticorpos para estas finalidades de corar vesículas ou núcleo e etapas de lavagem podem ser utilizados em concentrações adequadas para estas finalidades.

[042] A quantificação da diferenciação foi realizada por microscopia de alta performance (ImagexPress, Molecular Devices), sendo que foram

analisados os seguintes parâmetros celulares: número total de células, porcentagem de células diferenciadas e área média das células marcadas (área) pelo total de células positivas (diferenciadas). Os resultados são expressos em percentual do controle e do calculado, obtendo-se o IC<sub>50</sub> ou seja, a dose da droga capaz de causar redução em 50% dos parâmetros avaliados, seja número de células indicado pelo número de núcleos, % de células diferenciadas marcadas pelo vermelho Nilo e a área de diferenciação celular. Outros parâmetros celulares também podem ser avaliados, desde que sejam relacionados diretamente com características fenotípicas específicas da diferenciação celular.

[043] A cada ensaio era realizada placa de controle positivo, como o SDS para avaliar a reprodutibilidade do ensaio. Outras substâncias podem ser utilizadas para controle positivo do ensaio, desde que atendam as características citadas no exemplo 1.

#### **4. Dados e Análises estatísticas**

[044] Os dados foram analisados de acordo com as recomendações do ICCVAM (ICCVAM, 2006c, e; OECD, 2010; Scanu M. et al., 2011). Foi utilizado o programa Microsoft Office Excel, 365® para determinar o número de núcleos, a número de núcleos, o valor da porcentagem de células diferenciadas marcadas pelo Vermelho Nilo e o valor da área de diferenciação celular. Para calcular o valor de IC<sub>50</sub>, os dados foram transferidos para GraphPad Prism® 6,0 para aplicar uma dose-resposta Sigmoidal (declive variável) com quatro parâmetros. Estes parâmetros foram utilizados com a Função de Hill rearranjada, o qual é considerado como sendo o melhor modelo matemático para ajustar os dados in vitro de resposta à dose (ICCVAM, 2006e; Scanu M. et al, 2011.). Dois valores extremos, de cada diluição, foram eliminados para efeitos de cálculo. Outros programas ou versões dos mesmos programas de análise de dados podem ser utilizados nesta etapa.

[045] O IC<sub>50</sub> foi utilizado para predizer a LD<sub>50</sub> e classe GHS para as substâncias de teste. A média geométrica de IC<sub>50</sub> foi utilizada para predizer a LD<sub>50</sub> pela equação 1: do registro de citotoxicidade com dados de rato, regressão por peso (RC-rat only weight regression), utilizando a fórmula  $\log LD_{50} \text{ (mg/kg)} = 0,372 \log IC_{50} \text{ (}\mu\text{g/ml)} + 2,024$  ( $R^2 = 0,325$ ) ou a equação 2: do registro de citotoxicidade com dados de rato, regressão por milimol (RC-rat

only millimole regression) utilizando a fórmula  $\log LD_{50} \text{ (mmol/kg)} = 0,439 \log IC_{50} \text{ (mM)} + 0,621$  ( $R^2 = 0,452$ ) (ICCVAM, 2006c; Scanu M. et al, 2011). Ambas as regressões podem ser usadas para a predição de  $LD_{50}$  embora a equação 1 seja normalmente utilizada para misturas em que as substâncias de teste estão em combinação com outras, enquanto a equação 2 é normalmente utilizada para substâncias puras (ICCVAM, 2006e).

[046] Adicionalmente, outras análises foram realizadas, com por exemplo, comparar os dados entre si utilizando ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett's, para determinar as doses da substância teste capaz de ter efeito tóxico em relação ao % do controle.

## **5. Resultados - ADSC é um substrato celular adequado para captação de vermelho neutro (NRU) em ensaios de citotóxicos**

[047] Com base nos dados de que as células-tronco derivadas de tecido adiposo são mais resistentes do que a linhagem celular de referência 3T3 e de que a predição da toxicidade é semelhante (Abud, APR., et al 2015), outras estratégias são necessárias para a busca de ensaios de predição de toxicidade mais sensíveis. Com o exposto, apresentamos as evidências de nossa invenção de que estamos propondo um método mais sensível para a predição da toxicidade, apresentado nos exemplos abaixo.

[048] Os achados da presente invenção são descritos em detalhes com os exemplos a seguir. É de suma importância ressaltar que a invenção não está limitada a esses exemplos, mas que também inclui variações e modificações aplicáveis dentro dos limites nos quais ela funciona e se aplica.

### **Exemplo 1**

#### **Teste de conceito, estabelecimento de controle positivo para ensaio da inibição da diferenciação celular e critérios de validade do ensaio**

[049] A primeira etapa da invenção foi realizar o teste de conceito, ou seja, avaliar se a ideia original que conceituou essa invenção, de que avaliar a inibição da diferenciação celular frente a ação de substâncias teste, poderia ser mais sensível que métodos validados, como a captação do vermelho neutro realizado em ADSC. Desta forma, A Figura 1 mostra a inibição da diferenciação adipogênica utilizando células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo (ADSC) e a substância teste SDS num ensaio de inibição da diferenciação celular por 14 dias. Os Parâmetros utilizados foram número de

núcleos, % de células diferenciadas e área de células diferenciadas. Estes parâmetros foram normalizados para % do controle de diferenciação celular, sem tratamento. Os resultados mostram que o SDS (droga classe 4 de toxicidade) apresenta uma ação dose-resposta de inibição, se encaixa na função de Hill, para os 3 parâmetros avaliados, número de núcleos, % de diferenciação e área, inclusive com o valor calculado de  $R^2 > 0,85$ , indicando um ótimo ajuste ao modelo matemático (figura 1). Desta forma, tanto número de núcleos, % de células diferenciadas e área de diferenciação celular responderam de forma dose-resposta ao SDS. A partir da equação de Hill, foi possível calcular o  $IC_{50}$  e prever o  $DL_{50}$ . A classe predita correspondeu a classe de toxicidade 4, desta forma, a predição da classe de toxicidade foi acertada. Seguindo as análises a fim de verificar se a metodologia proposta nesta invenção era mais sensível, foi feita a razão entre o valor de  $IC_{50}$  calculado pelo ensaio do vermelho neutro e os valores de  $IC_{50}$  obtidos com a invenção. Valores menores que 1 indicam que o método proposto é menos sensível, valores maiores que 1 indicam que o método proposto é mais sensível, desta forma a metodologia proposta se mostrou mais sensível pois a razão foi de 1,5x para número de núcleos, 2,1x para % de diferenciação e 1,9x para área de diferenciação. Desta forma, concluímos que o teste de conceito foi satisfatório. Estes dados foram confirmados com mais 2 amostras de ADSC (dados não mostrados).

[050] Uma questão importante no desenvolvimento de um método analítico é a existência de controles que monitorem o desempenho da metodologia. Desta forma, A partir dos resultados obtidos, foi definido que a substância SDS seria utilizada como controle positivo do ensaio, ou seja, a cada ensaio, seria feita a avaliação da ação do SDS em paralelo, que seria o parâmetro para avaliação da robustez do método. O ensaio seria considerado válido se o  $R^2 > 0,85$ , pelo menos 1 ponto entre 0 e 50% e 1 ponto entre 50 e 100% do controle além da avaliação da variabilidade % entre das duas colunas de controle negativo e controle positivo. Caso o ensaio fosse considerado inválido, os dados referentes a outras substâncias teste realizadas em paralelo seriam desconsiderados.

**Exemplo 2****Avaliação de outras substâncias teste pela metodologia proposta: dicromato de sódio**

[051] A partir dos resultados para o SDS, drogas representativas de outras classes de toxicidade foram selecionadas para realização da metodologia proposta por esta invenção. As substâncias utilizadas na presente invenção são drogas com toxicidade conhecida de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde, e escolhidas como substâncias de referência conforme citado (Scanu et al., 2011) e foram selecionadas da listagem fornecida pelo Comitê de coordenação das agências de validação de métodos alternativos (*“Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM, 2006)*). A seguir estão citadas as substâncias utilizadas: ciclohexamida, dicromato de sódio, ácido tricloroacético e etilenoglicol, sendo que todas são provenientes da Sigma-Aldrich®. É interessante ressaltar que foram escolhidas drogas representativas de 5 das 6 categorias de toxicidade, com base em sua DL<sub>50</sub> (dose letal 50% em camundongos).

[052] Utilizando o mesmo procedimento do Exemplo 2, a inibição da diferenciação adipogênica foi realizada utilizando ADSC. Foi utilizada a droga dicromato de sódio, primeiramente no ensaio de viabilidade celular por 48h pela captação do vermelho neutro, com predição da classe de toxicidade 3 (Figura 2), ao realizar o ensaio de inibição da diferenciação por 14 dias, com os 3 Parâmetros utilizados, número de núcleos, % de células diferenciadas e área de células diferenciadas foram normalizados para % do controle de diferenciação celular, sem tratamento, sendo que destes 3 parâmetros, todos foram utilizados para cálculo de IC<sub>50</sub> e predição do LD<sub>50</sub> com classe 2 (Figura 3). Da mesma forma que para o SDS, esta a metodologia proposta para o dicromato de sódio se mostrou mais sensível pois a razão foi de 4,7x para número de núcleos, 17x para % de diferenciação e 9,4x para área de diferenciação. Estes dados foram confirmados com mais 2 amostras de ADSC (dados não mostrados).

**Exemplo 3****Avaliação de outras substâncias teste pela metodologia proposta: ciclohexamida**

[053] Utilizando o mesmo procedimento dos exemplos anteriores, a inibição da diferenciação adipogênica foi realizada utilizando ADSC. Foi utilizada a droga ciclohexamida (classe 1), primeiramente no ensaio de viabilidade celular por 48h, com predição da classe de toxicidade 4 (Figura 4). Ao realizar o ensaio de inibição da diferenciação por 14 dias, com os 3 Parâmetros utilizados, número de núcleos, % de células diferenciadas e área de células diferenciadas foram normalizados para % do controle de diferenciação celular, sem tratamento, sendo que destes 3 parâmetros, todos foram utilizados para cálculo de  $IC_{50}$  e predição do  $LD_{50}$  como classe 3 para núcleos e classe 2 para % de diferenciação e área de diferenciação, com resultado mais próximo da classe real de toxicidade da substância utilizada (Figura 5). Da mesma forma que para o SDS, a metodologia proposta para a ciclohexamida se mostrou ainda mais sensível pois a razão foi de 8,5x para número de núcleos, 188,2x para % de diferenciação e 138x para área de diferenciação. Estes dados foram confirmados com mais 2 amostras de ADSC (dados não mostrados).

#### **Exemplo 4**

##### **Avaliação de outras substâncias teste pela metodologia proposta: TCA**

[054] Utilizando o mesmo procedimento dos exemplos anteriores, a inibição da diferenciação adipogênica foi realizada utilizando ADSC. Foi utilizada a droga ácido tricloroacético (TCA) (classe 5), primeiramente no ensaio de viabilidade celular por 48h, com predição da classe de toxicidade 5 (Figura 6). Ao realizar o ensaio de inibição da diferenciação por 14 dias, com os 3 Parâmetros utilizados, número de núcleos, % de células diferenciadas e área de células diferenciadas foram normalizados para % do controle de diferenciação celular, sem tratamento, sendo que destes 3 parâmetros, número de núcleos não pode ser utilizado pois para todas as concentrações utilizadas, não se observou efeito na redução do número de núcleos, enquanto que os demais parâmetros foram utilizados para cálculo de  $IC_{50}$  e predição do  $LD_{50}$  como classe 4 para % de diferenciação e área de diferenciação, com resultado subestimado (Figura 7). Ao contrário que para o SDS, a metodologia proposta subestimou a classe de toxicidade para o TCA, embora surpreendentemente se mostrou mais sensível pois a razão foi de 10,4x para % de diferenciação e 7,7x

diferenciadas e área média das células marcadas (área) pelo total de células positivas (diferenciadas), entre outros.

3. Método de acordo com as etapas (a até e) da reivindicação 1 caracterizado pela quantificação da diferenciação celular adipogênica, ser utilizada com outros métodos de análise fenotípica da diferenciação celular.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células-tronco adultas humanas serem isoladas de tecido adiposo proveniente de tecido adiposo de lipoaspiração.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células-tronco adultas humanas serem isoladas de tecido adiposo proveniente de tecido adiposo de dermolipectomia.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células-tronco adultas humanas serem isoladas de tecido dentário.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células-tronco adultas humanas serem isoladas de tecido cardíaco.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células-tronco adultas humanas serem isoladas de medula óssea.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células-tronco adultas humanas serem isoladas de sangue menstrual.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células-tronco adultas humanas serem isoladas de sangue periférico.

11. Uso de células tronco adultas de origem humana para predizer in vitro a toxicidade de uma substancia teste onde o dito uso consiste na inibição da diferenciação de células-tronco mesenquimais em adipócitos.

12. Kit de diagnóstico, caracterizado por utilizar o método descrito em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, para realizar análises de citotoxicidade de substâncias teste como substâncias químicas, fármacos, compostos, misturas, particulados, etc., de produtos já estabelecidos ou em desenvolvimento.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método in vitro para prever a toxicidade de uma substância teste, caracterizado por o dito método ser baseado na diferenciação celular de células tronco adultas de origem humana em adipócitos, compreendendo as etapas de:

(a) preparar todos os reagentes e insumos necessários a realização da metodologia;

(b) cultivar manter, repicar e plaquear as células-tronco mesenquimais adultas humanas em meio adequado utilizando insumos adequados preparados de acordo com a etapa (a) e em condições controladas e adequadas de temperatura, pressão, umidade e controle atmosférico de gases;

(c) preparar a substância de teste através da determinação de sua solubilidade e diluente apropriado com uso de insumos e reagentes preparados de acordo com a etapa (a);

(d) aplicar sobre a monocamada celular de células-tronco adultas humanas oriunda da etapa (b), as diluições das substâncias teste oriundas da etapa (c) e manter em meio de diferenciação celular adipogênica, reservando poços para manter os controles internos positivos e negativos da diferenciação celular, sem adição da substância teste, e manter os cultivos celulares em condições controladas e adequadas de temperatura, pressão, umidade e controle atmosférico de gases, onde são avaliadas características qualificáveis e/ou quantificáveis, específicas das células em diferenciação ou já diferenciadas em adipócitos;

(e) trocar o meio de cultura, tanto o meio controle quanto o meio de diferenciação celular contendo as diluições da substância teste de acordo com a etapas (b - d) periodicamente, por duas vezes na semana, para renovação dos componentes do meio de cultura e remoção dos subprodutos celulares, até o término do período de indução da diferenciação celular de 14 dias mais ou menos de acordo com a diferenciação celular, perfazendo o tempo necessário para avaliação da citotoxicidade pela inibição da diferenciação celular;

(f) interromper o ensaio de forma a preservar os fenômenos característicos da diferenciação celular e/ou citotoxicidade dos cultivos celulares obtidos após conclusão da etapa (e) e realizar lavagem com solução salina tamponada ou similar e fixar os cultivos celulares com fixador aldeídico

ou similar pelo tempo necessário para que todos os cultivos estejam fixados, seguida de lavagens com solução salina tamponada ou similar para remoção do fixador e seguir com metodologia adequada a fim de avaliar de forma qualitativa e/ou quantitativa a inibição da diferenciação celular pela substância teste;

(g) corar os cultivos celulares fixados de acordo com a etapa (f) com solução de Vermelho Nilo, ou outro corante adequado para visualização de gotículas lipídicas em temperatura adequada, como a na temperatura ambiente, por tempo adequado seguido de lavagens com solução salina tamponada ou similar;

(h) corar os cultivos celulares fixados de acordo com a etapa (f) e previamente corados de acordo com a etapa (g) para evidenciar os núcleos celulares com solução de solução de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), ou outro corante nuclear adequado, por tempo adequado, seguido de lavagens com solução salina tamponada ou similar;

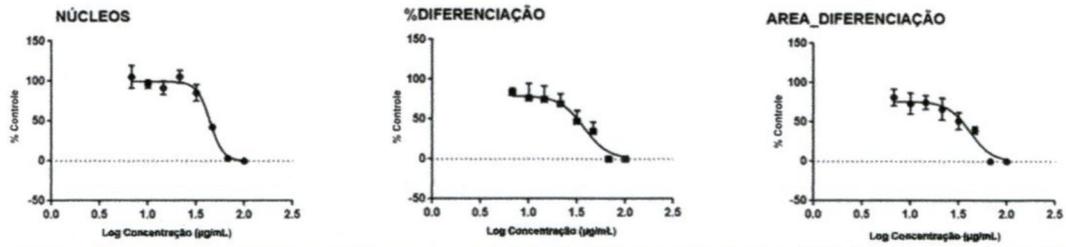
(i) com os cultivos celulares processados de acordo com as etapas (f – h), quantificar os parâmetros característicos de número de células e de diferenciação celular por microscopia ou técnica semelhante, através de parâmetros celulares avaliados para caracterizar a diferenciação celular e a inibição da diferenciação celular pela substância teste;

(j) realizar análise e interpretação de dados obtidos na etapa (i) a fim de avaliar o perfil de citotoxicidade, caracterizado pela análise dos parâmetros avaliados de acordo com (i) e estabelecer índice desses efeitos a fim de estabelecer concentrações tóxicas e não tóxicas da substância teste e predição de efeito tóxico; e,

(k) realizar o ensaio em paralelo compreendendo as etapas (a – j) com substância teste de conhecida citotoxicidade, chamada de substância teste controle, e considerar o ensaio válido se a performance do ensaio para a substância teste controle for satisfatório.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pela quantificação da diferenciação celular adipogênica ser realizada por microscopia de alta performance, onde são analisados os seguintes parâmetros celulares: número total de células, porcentagem de células

Figura 1



$$R^2 = 0,9871$$

$$IC_{50} = 44,09 \mu\text{g/mL}$$

$$DL_{50} = 528,34 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Classe} = 4$$

$$\text{Classe Predita} = 4$$

$$IC_{50} \text{ VN} / IC_{50} \text{ ADIPOGÊNESE} = 1,5x$$

$$R^2 = 0,9726$$

$$IC_{50} = 32,14 \mu\text{g/mL}$$

$$DL_{50} = 459,84 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Classe} = 4$$

$$\text{Classe Predita} = 4$$

$$IC_{50} \text{ VN} / IC_{50} \text{ ADIPOGÊNESE} = 2,1x$$

$$R^2 = 0,9626$$

$$IC_{50} = 34,91 \mu\text{g/mL}$$

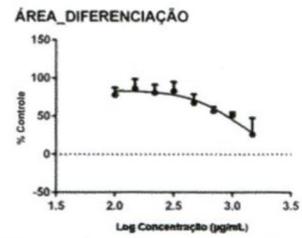
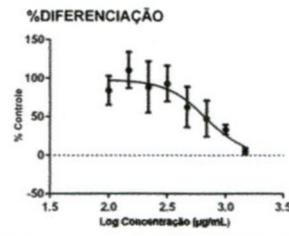
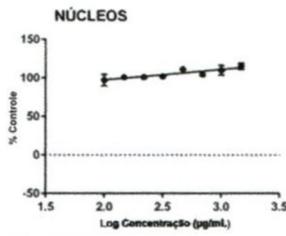
$$DL_{50} = 476,89 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Classe} = 4$$

$$\text{Classe Predita} = 4$$

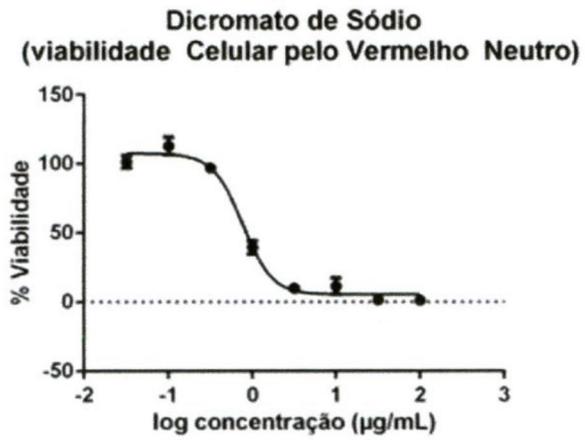
$$IC_{50} \text{ VN} / IC_{50} \text{ ADIPOGÊNESE} = 1,9x$$

Figura 7



$R^2 = \text{-----}$	$R^2 = 0,9303$	$R^2 = 0,9555$
$IC_{50} = \text{-----}$	$IC_{50} = 668,61 \mu\text{g/mL}$	$IC_{50} = 903,80 \mu\text{g/mL}$
$DL_{50} = \text{-----}$	$DL_{50} = 1267,27 \text{ mg/kg}$	$DL_{50} = 1446,56 \text{ mg/kg}$
Classe = 5	Classe = 5	Classe = 5
Classe Predita = -----	Classe Predita = 4	Classe Predita = 4
$IC_{50}VN/IC_{50}ADIPOGÊNESE = \text{-----}$	$IC_{50}VN/IC_{50}ADIPOGÊNESE = 10,4x$	$IC_{50}VN/IC_{50}ADIPOGÊNESE = 7,7x$

Figura 2



$$R^2 = 0,98$$

$$IC_{50} = 0,85 \mu\text{g/mL}$$

$$DL_{50} = 99,34 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Classe} = 2$$

$$\text{Classe Predita} = 3$$

Figura 8

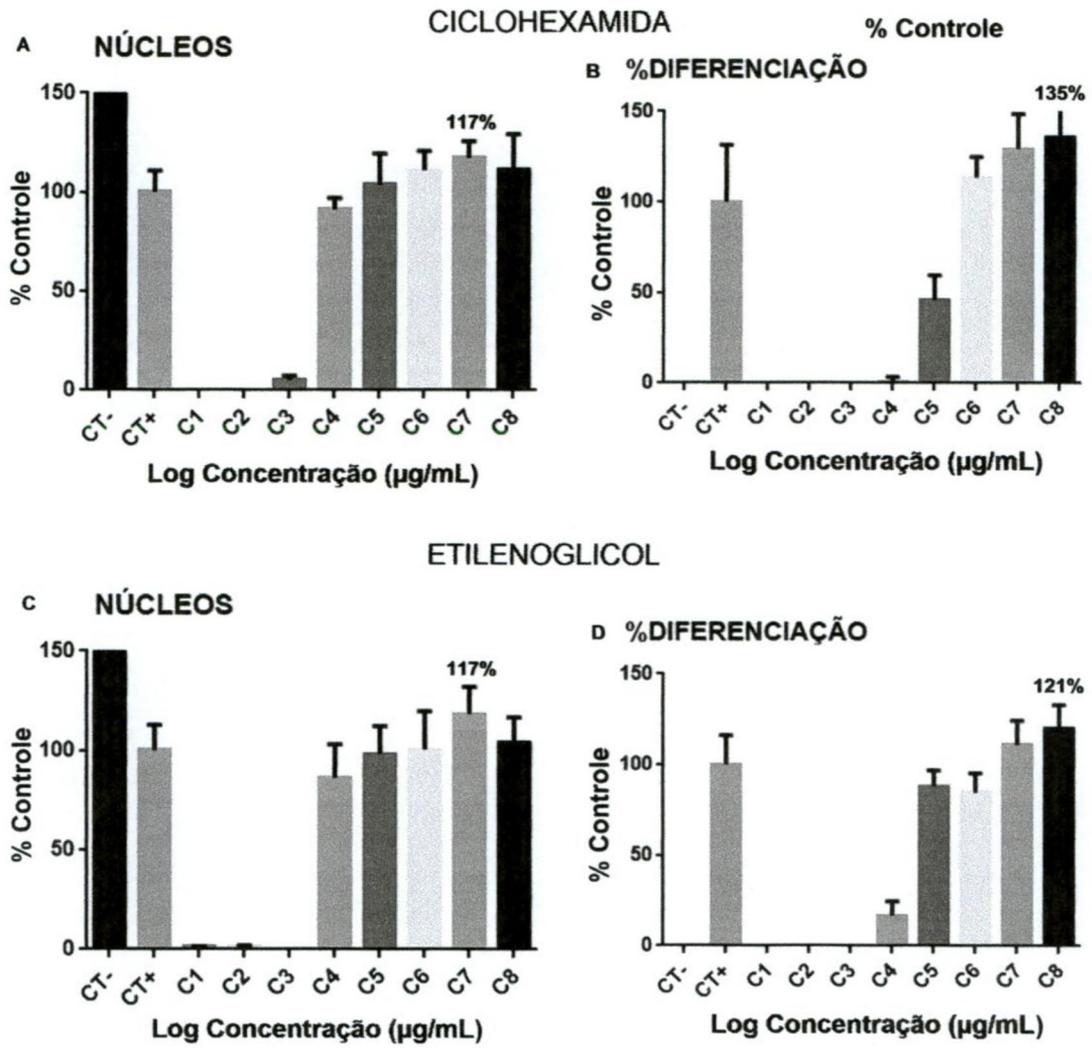
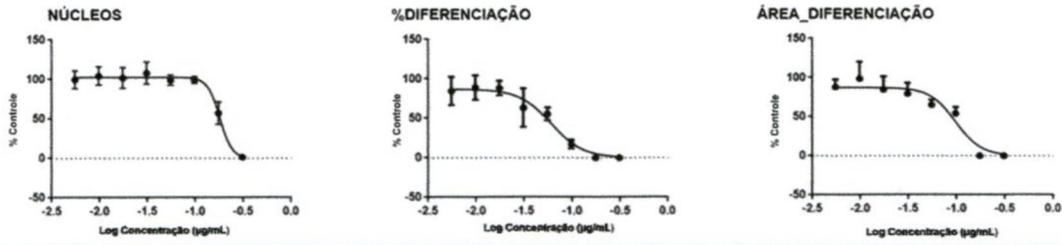
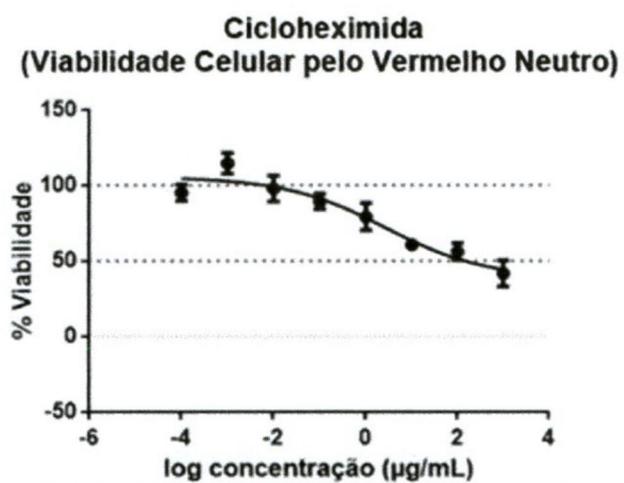


Figura 3



$R^2 = 0,9938$	$R^2 = 0,9786$	$R^2 = 0,9498$
$IC_{50} = 0,18 \mu\text{g/mL}$	$IC_{50} = 0,05 \mu\text{g/mL}$	$IC_{50} = 0,09 \mu\text{g/mL}$
$DL_{50} = 48,20 \text{ mg/kg}$	$DL_{50} = 28,23 \text{ mg/kg}$	$DL_{50} = 35,33 \text{ mg/kg}$
Classe = 2	Classe = 2	Classe = 2
Classe Predita = 2	Classe Predita = 2	Classe Predita = 2
$IC_{50}VN/IC_{50}ADIPOGÊNESE = 4,7x$	$IC_{50}VN/IC_{50}ADIPOGÊNESE = 17x$	$IC_{50}VN/IC_{50}ADIPOGÊNESE = 9,4x$

Figura 4



$$R^2 = 0,95$$

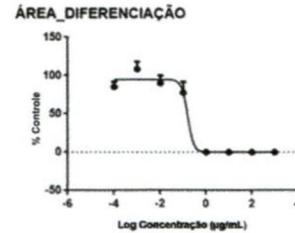
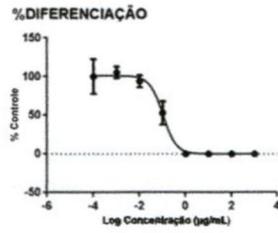
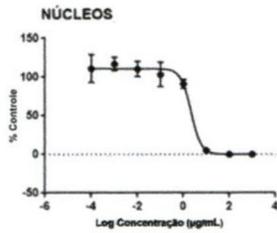
$$IC_{50} = 20,7 \mu\text{g/mL}$$

$$DL_{50} = 326,5 \text{ mg/kg}$$

Classe = 1

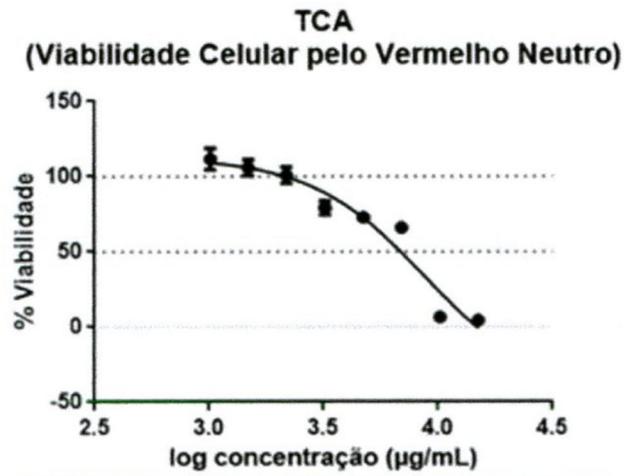
Classe Predita = 4

Figura 5



$R^2 = 0,9958$	$R^2 = 0,9971$	$R^2 = 0,9823$
$IC_{50} = 2,43 \mu\text{g/mL}$	$IC_{50} = 0,11 \mu\text{g/mL}$	$IC_{50} = 0,15 \mu\text{g/mL}$
$DL_{50} = 145,89 \text{ mg/kg}$	$DL_{50} = 36,94 \text{ mg/kg}$	$DL_{50} = 43,34 \text{ mg/kg}$
Classe = 1	Classe = 1	Classe = 1
Classe Predita = 3	Classe Predita = 2	Classe Predita = 2
$IC_{50}VN/IC_{50}ADIPOGÊNESE = 8,5x$	$IC_{50}VN/IC_{50}ADIPOGÊNESE = 188,2x$	$IC_{50}VN/IC_{50}ADIPOGÊNESE = 138x$

Figura 6



$$R^2 = 0,89$$

$$IC_{50} = 6974,1 \mu\text{g/mL}$$

$$DL_{50} = 2843 \text{ mg/kg}$$

Classe = 5

Classe Predita = 5

**RESUMO****“MÉTODO IN VITRO PARA PREDIZER A TOXICIDADE DE UMA SUBSTANCIA TESTE, USO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS HUMANAS PARA PREDIZER A TOXICIDADE DE UMA SUBSTANCIA TESTE, E, KIT DE DIAGNÓSTICO”**

A presente invenção se refere a um método *in vitro* para prever a toxicidade de uma substancia teste, através do uso de células-tronco mesenquimais adultas humanas. Mais particularmente, a presente invenção se refere à triagem toxicológica *in vitro* com método e/ou kit de diagnóstico para a determinação de concentrações tóxicas e predição de toxicidade de substâncias teste compreendendo substâncias químicas, fármacos, compostos, misturas, particulados, e semelhantes. A invenção provê a utilização de células-tronco adultas humanas, ou células específicas derivadas de células-tronco adultas humanas em modelos de diferenciação celular

Figura 8

