



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00596

(22) Data de depozit: 30/09/2021

(41) Data publicării cererii:  
28/04/2023 BOPI nr. 4/2023

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL ONCOLOGIC "PROF.DR.  
ION CHIRICUȚĂ" DIN CLUJ-NAPOCA,  
STR.REPUBLICII NR.34-36,  
CLUJ- NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• NEAGOE IOANA CORNELIA STANCA,  
STR.NICOLAE TITULESCU, NR.2, AP.57,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• SORITAU OLGA, STR. SOMEȘUL RECE,  
NR.1233C, COMUNA GILAU, CJ, RO;  
• BRAICU CORNELIA, STR. FABRICII DE  
ZAHĂR NR. 11, AP. 35, CLUJ-NAPOCA, CJ,  
RO;  
• JURJ MARIA- ANCUȚA, STR.TARINEI,  
NR.11, BAIA DE ARIEȘ, AB, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE ȘI MENȚINERE ÎN CULTURĂ  
A CELULELOR DE TIP EPITELIAL DIN ȚESUTUL MAMAR  
NORMAL**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere și menținere în cultură a celulelor de tip epitelial din țesutul mamar normal, celulele fiind utilizate în domeniul medical pentru studii funcționale și moleculare. Procedeu conform invenției are următoarele etape:

a) în prima etapă se obțin celule în suspensie monocelulară prin procesare mecanică și digestie enzimatică, urmată de cultivarea acestora pe plăci acoperite de substrat de colagen/fibronectină/laminină în mediu selectiv specific celulelor epiteliale, rezultând celule cu fenotip epitelial și recapitulare a arhitecturii 3D a țesutului mamar normal,

b) realizarea substratului de cultivare de tip epitelial obținute din țesutul mamar normal care este constituit din soluție de colagen/fibronectină/laminina la concentrații finale în tampon fosfat salin de: 20 μg/ml PBS colagen, 10 μg/ml PBS soluție de fibronectină și 10 μg/ml PBS laminină, și

c) selecția celulelor, obținute ca suspensie monocelulară prin procesarea țesutului mamar normal, se face folosind un mediu selectiv care este format astfel: DMEM/F12 - HAM fără fenol red, 15% ser fetal bovin, 100 U/ml penicilin, 100 μg/ml, 100 μg/ml streptomycin, 2 mM L - glutamină, 1% aminoacizi neesențiali, 100 μg/ml toxină holerică, 40 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor), 40 ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), 20 nM dexametazonă și 2% ITS (insulin, transferină, selenium).

Revendicări: 3  
Figuri: 7



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. .... a 2021 0596
Data depozit .... 30-09-2021

18

**Titlu brevet: PROCEDEU DE OBTINERE SI MENTINERE IN CULTURA A  
CELULELOR DE TIP EPITELIAL DIN TESUTUL MAMAR NORMAL**

**Descrierea invenției**

**Domeniul Invenției:**

Prezenta invenție are adresabilitate domeniului medical și se referă la o metoda de izolare și cultivare a celulelor de tip epitelial din tesutul mamar normal pentru studii functionale și moleculare.

**Stadiul actual al cunoașterii în domeniu**

În cercetarea cancerului mamar se fac eforturi considerabile de stabilire a cauzei care duce la carcinogeneza și a factorilor favorizanti care induc statusul de pre-malignitate. Acest tip de studiu necesita modele experimentale preclinice care pot recapitula *in vitro* evenimentele care au loc *in vivo*. De aici deriva importanta elaborarii unui sistem de izolare și cultivare a celor mai afectate celule în timpul carcinogenezei, celulele epiteliale. Studiile de biologie a cancerului de sân au favorizat în mod tradițional utilizarea catorva linii celulare derivate în principal din tumori primare umane sau murine. Mai recent, au fost dezvoltate tehnici care permit obtinerea de culturi de celule epiteliale mamare normale. Celulele normale pot fi obținute din mamoplastii de reducere iar celulele canceroase pot fi obținute din biopsii tumorale. Se mai pot preleva de asemenea celule normale de la paciente cu cancer din situsuri aflate la distanta de tumora, celule ce pot fi utilizate apoi ca și controale intra-patient, sau pot fi utilizate pentru a studia modificările premaligne comparativ cu celulele obtinute de la femeii fara cancer mamar. Celulele derivate din tesutul mamar normal sunt dificil de cultivat, proliferarea acestora în cultura, cu pastrarea caracterelor fenotipice și genetice fiind mult mai greu de mentinut decat celulele maligne. [Bergstraesser LM, Weitzman SA. Culture of normal and malignant primary human mammary epithelial cells in a physiological manner simulates *in vivo* growth patterns and allows discrimination of cell type. Cancer Res. 1993 Jun 1;53(11):2644-54.PMID: 8495428] Cancerul mamar, reprezinta principala cauza de deces în randul populatiei feminine, la nivel global. Dezvoltarea carcinomului în sân se asociaza cu un set complex de modificări fenotipice și genetice în celulele epiteliale mamare și stroma lor asociată. Cu toate acestea, în ciuda dovezilor crescânde ale rolului critic jucat de micro-mediul celular în stabilirea arhitecturii normale a țesutului mamar și a comportamentului său aberant în inițierea și dezvoltarea cancerului, explicații mai precise ale acestor procese desfasurate la diferite niveluri de complexitate biologică se pot obtine prin utilizarea unor sisteme de modele "surogat" *in vitro*. Mai multe linii celulare au fost utilizate în cultura bidimensională (2D) pentru a investiga evenimente celulare în morfogeneza mamară și carcinogeneza. Modelele 2D prezinta avantaje cum sunt: reproductibilitatea experimentelor, posibilitatea de a manipula materialul genetic și obtinerea unui numar suficient de celule pentru evaluarile complexe biochimice. Dezavantajele culturilor 2D sunt ca acestea nu recapitulează nici arhitectura țesuturilor, nici funcțiile epiteliului mamar *in vivo* și nu pot aduce informatii despre rolul stromei în dezvoltarea fiziologică și carcinogeneza țesutului mamar. [Wang X, Sun L, Maffini MV, Soto A, Sonnenschein C, Kaplan DL. A complex 3D human tissue culture system based on mammary stromal cells and silk scaffolds for modeling breast morphogenesis and function. Biomaterials. 2010 May;31(14):3920-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.118. Epub 2010 Feb 24.PMID: 20185172 Free PMC article.] Cultura de organ/organoizi oferă un micromediu tisular intact, dar dificultățile în obținerea probelor și viabilitatea redusă a țesuturilor în cultură reprezintă obstacole majore pentru

adoptarea sa largă ca model experimental. [Bissell MJ, Rizki A, Mian IS. *Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:753–762. [PMC free article] [PubMed]] Modelele pe animale și studiile *in vivo* pe de alta parte sunt costisitoare, imprevizibile și complexe, care în plus ridică probleme etice. [Bergstraesser LM, Weitzman SA. *Culture of normal and malignant primary human mammary epithelial cells in a physiological manner simulates in vivo growth patterns and allows discrimination of cell type. Cancer Res.* 1993 Jun 1;53(11):2644-54. PMID: 8495428] Inițierea *in vitro* a unor culturi primare de celule derivate din țesuturi normale este dificilă cu o rată de succes relativ mică în ceea ce privește menținerea fenotipului țesutului de origine dar și în ceea ce privește expansiunea și creșterea celulară pe termen mediu și lung. Pentru menținerea în culturi îndelungate s-a încercat imortalizarea celulelor epiteliale prin diferite metode. Este raportată o imortalizare spontană a celulelor epiteliale mamare umane numite **MCF10A**. Această linie a fost izolată dintr-o proliferare benignă mamară și este caracterizată prin faptul că nu dezvoltă tumori și nu exprimă receptorii de estrogeni. Această linie de celule este cel mai frecvent utilizat model de celule mamare normale. [Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, Giuliano AE, Cui X. *Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. PLoS One.* 2015 Jul 6;10(7):e0131285. doi: 10.1371/journal.pone.0131285. eCollection 2015. PMID: 26147507 Free PMC article.] Caracteristicile lor moleculare includ deleția locusului cromozomial care conține genele p16 și p14ARF, ambele fiind critice în reglarea senescenței și amplificarea genei Myc. [Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr., Brenz R, McGrath CM, et al. *Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. Cancer Res.* 1990;50(18):6075–86. [PubMed]] În culturi 3D, pe substrat de Matrigel, aceste celule sunt capabile să mimeze arhitectura țesutului de origine, dezvoltând sferoizi asemănători unei structuri acinare, acoperite de membrana bazală și formate din celule polarizate și organizate. Acest model 3D este valoros pentru studiul interacțiunilor celulă-celulă în dezvoltarea glandei mamare, precum și pentru evaluarea efectelor micromediului asupra funcției celulelor mamare și ale efectelor diferitelor modificări genetice sau non-genetice asupra transformării celulelor mamare. [Vidi PA, Bissell MJ, Lelievre SA. *Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. Methods Mol Biol.* 2013;945:193–219. doi: 10.1007/978-1-62703-125-7\_13 [PMC free article] [PubMed]] Wang et al, 2010, au construit un sistem “surrogat” de cultură tridimensională (3D) care să mimeze din punct de vedere fiziologic țesutul mamar uman, un sistem tri-cultură format din celule epiteliale mamare umane (MCF10A), fibroblaste umane și adipocite, adică cele două tipuri de celule stromale mamare dominante, într-un amestec Matrigel™ / collagen pe substrat poroasă construită din proteine de proveniență din firele de mătase. Prezența celulelor stromale a inhibat proliferarea celulelor MCF10A și a indus atât morfogeneza alveolară, cât și cea ductală și îmbunătățirea expresiei caseinei. Spre deosebire de polaritatea imatură prezentată de co-culturi fie cu fibroblaste, fie cu adipocite, structurile alveolare formate din tri-culturi au prezentat polaritate adecvată similară cu cea observată în țesutul mamar *in vivo*. În monoculturile MCF10A au fost observate numai structurile alveolare cu polaritate inversată. [Wang X, Sun L, Maffini MV, Soto A, Sonnenschein C, Kaplan DL. *A complex 3D human tissue culture system based on mammary stromal cells and silk scaffolds for modeling breast morphogenesis and function. Biomaterials.* 2010 May;31(14):3920-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.118. Epub 2010 Feb 24. PMID: 20185172 Free PMC article.] Există o lipsă de modele cât mai simplificate care să fie reproductibile și ușor de executat dar care să păstreze proprietățile funcționale și structurale ale țesutului mamar observate *in vivo*. O abordare foarte întâlnită este dezvoltarea unor modele din ce în ce mai complexe, care utilizează mai mult de două tipuri de celule și de asemenea componente ale matricei extracelulare (ECM). S-a demonstrat că atât compoziția ECM, cât și/sau prezența celulelor

stromale sunt capabile să moduleze fenotipul epitelial în modelele de cultură 3D. [Duss S, Brinkhaus H, Britschgi A, Cabuy E, Frey DM, Schaefer DJ, et al. *Mesenchymal precursor cells maintain the differentiation and proliferation potentials of breast epithelial cells. Breast Cancer Res. 2014;16(3):R60 10.1186/bcr3673 [PMC free article]*]

Dificultatile initierii unei culturi primare pure de celule epiteliale normale din fragmentele de tesut mamar normal constau in mai multe aspecte:

1. Fragmentele sunt bogate în țesut conjunctiv și tesut grasos, care face dificila desprinderea celulelor epiteliale din tesut, necesitand metode mecanice și enzimatice de disociere a tesutului.
2. In tesutul mamar normal sunt prezente numeroase alte tipuri celulare cum sunt fibroblaste, miofibroblaste, celule endoteliale, adipocite, infiltrat ale celulelor sistemului imun sau alte celule specifice țesutului mamar).
3. Celulele epiteliale se află în diferite etape de diferențiere, și prezintă o rată de proliferare în general scăzută la inițierea cultivării *in vitro*.
4. Celulele de tip epitelial au o capacitate scăzută de aderență la placile standard de cultivare *in vitro*. Substratele care mimează matricea extracelulară cresc aderența acestor celule dar le mențin și fenotipul specific de celule epiteliale.
5. Menținerea unei culturi primare de celule de tip epitelial normal în stare proliferativă este dificilă, celulele necesitând suplimentarea mediului de cultură cu hormoni, factori de creștere sau alte bio-molecule active.
6. Cultivarea prelungită *in vitro* a celulelor epiteliale normale poate să ducă la modificarea caracteristicilor inițiale, astfel încât acestea își pot schimba fenotipul de celule epiteliale diferențiate spre celule mai puțin diferențiate, cu pierderea markerilor epiteliali specifici și tranziție epitelio-mezenchimală, susținut de studiile de transcriptomică
7. Celulele din culturile primare normale își încetinesc creșterea după 10-40 replicări celulare datorită instalării fenomenului de senescență.

Multe studii din literatura utilizează **linii celulare de tip epitelial imortalizate** care prin definiție reprezintă o populație celulară care prezintă anomalii cromozomiale sau mutații ce le permit să prolifereze la nesfârșit și pot fi astfel cultivate pentru perioade lungi de timp fără să își modifice semnificativ fenotipul. Aceste populații celulare pot fi obținute și prin manipulare genetică prin transfectarea unor gene implicate în proliferare sau inhibiția morții celulare. Avantajul utilizării acestor linii este posibilitatea menținerii în culturi de lungă durată și obținerea unui număr relativ mare de celule pentru evaluările necesare experimentelor. Liniile celulare imortalizate comerciale prezintă mai multe **dezavantaje**: în primul rând sunt date insuficiente despre originea lor. [EUROPEAN PATENT APPLICATION, Application number: 98116459.3 "Epithelial cell cultures for *in vitro* testing"]. În general, sunt foarte puține informații despre originea liniilor disponibile. Un alt dezavantaj este prezența mutațiilor care pot modifica rezultatele experimentale care nu se suprapun întotdeauna cu comportamentul celulelor *in vivo*.

Un alt aspect în obținerea culturilor de celule epiteliale normale sunt metodele de disociere a tesutului mamar normal. Fiind un tesut bogat în collagen majoritatea metodelor de procesare a fragmentelor tisulare, descrise în literatura, presupun o fragmentare mecanică și o digestie enzimatică cu collagenază, în combinație și cu alte proteaze cum sunt tripsina, dispază sau hialuronidază. [Linnemann JR, Miura H, Meixner LK, Irmeler M, Kloos UJ, Hirschi B, Bartsch HS, Sass S, Beckers J, Theis FJ, Gabka C, Sotlar K, Scheel CH. *Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. Development. 2015 Sep*

15;142(18):3239-51. doi: 10.1242/dev.123554. Epub 2015 Jun 12.] Dupa eliberarea celulelor din structurile tisulare se trece la etapa izolarii celulelor de tip epitelial de celelalte tipuri celulare. Metodele de izolare pot fi de mai multe feluri: utilizarea de medii selective care permit dezvoltarea numai unui anumit tip celular, sau separarea cu ajutorul anticorpilor monoclonali specifici celulelor epiteliale mamare cum sunt MUC1, CD227, CD44, CD24 sau EpCAM. [Zubeldia-Plazaola A, Ametller E, Mancino M, Prats de Puig M, López-Plana A, Guzman F, Vinyals L, Pastor-Arroyo EM, Almendro V, Fuster G, Gascón P. Comparison of methods for the isolation of human breast epithelial and myoepithelial cells. *Front Cell Dev Biol.* 2015 May 21;3:32. doi: 10.3389/fcell.2015.00032. eCollection 2015.]

Metodele de disociere si de izolare a celulelor epiteliale diferă în numărul de celule obtinute și viabilitatea celulelor. **Mediile de cultivare** care permit mentinerea fenotipului de tip epitelial și care sustin cresterea și proliferarea celulara raportate sunt destul de diferite în ceea ce privește compoziția lor. În prezent mediul de cultură celulară comercial cel mai frecvent utilizat pentru a sustine creșterea *in vitro* a celulelor mamare de tip epitelial este mediul MCDB 170 fără ser, dezvoltat în anii 1980 de Ham și Stampfer [Stampfer, Martha R., Smith, Helene S., and Hackett, Adeline J. Enhanced growth medium and method for culturing human mammary epithelial cells. United States: N. p., 1983. Web. <https://www.osti.gov/biblio/864822-enhanced-growth-medium-method-culturing-human-mammary-epithelial-cells>], un mediu suplimentat cu hormoni estrogenici (estradiol), insulina, hidrocoziton, și factori de creștere (Epidermal Growth Factor-EGF) și extract de glanda pituitara. Un dezavantaj al acestui mediu este inducerea unei senescențe rapide a culturilor celulare [Lee JK, Bloom J, Zubeldia-Plazaola A, Garbe JC, Stampfer MR, LaBarge MA. Different culture media modulate growth, heterogeneity, and senescence in human mammary epithelial cell cultures. *PLoS One.* 2018 Oct 1;13(10):e0204645. doi: 10.1371/journal.pone.0204645. eCollection 2018.] dar și prezenta extractului de glanda pituitara.

**Substratul de cultivare** este un alt element important în mentinerea unei culturi celulare de tip epitelial. Cel mai frecvent se folosesc proteine componente ale matricei extracelulare, care vor permite adeziunea celulara, interacțiunea celula-celula și vor mentine celulele în stare diferentiată. Cel mai folosite substrate sunt colagenul și fibronectina.

Pentru obtinerea de informații despre stadiul actual al cercetarilor și brevetelor de inventive elaborate, s-au efectuat cautari în bazele de date nationale și internationale pentru brevetele de inventii, cu motor de cautare: <https://patents.google.com/?q=C12N5%2f0631> și s-au retinut ca apropiate de inventia propusa urmatoarele brevete:

[1] Stampfer, Martha R., Smith, Helene S., and Hackett, Adeline J. **Enhanced growth medium and method for culturing human mammary epithelial cells.** United States: N. p., 1983.;

[2] Soule et al : **Immortal Human Mammary Epithelial Cell Lines**, United States Patent, Patent Number: 5,026,637, Jun. 25, 1991;

[3] Jean J. Latimer: **Epithelial Cell Cultures for in vitro testing** , USOO6074874A, Patent Number: 6,074,874, Jun. 13, 2000;

**Brevetul [1] Stampfer, M. et al.** se refera la elaborarea unui mediu de cultura complex selectiv pentru izolarea celulelor epiteliale mamare umane și cresterea lor ca **agregate celulare in cultura**. Metoda include descrierea izolarii agregatelor celulare prin metoda enzimatica, a mediului de cultivare și a obtinerii unor clone celulare prin subcultivare. Mediul descris este serum-free, contine factori de creștere (EGF) și hormoni (insulina, hidrocoziton), toxina holerica precum și mediu conditionat obtinut de la alte linii celulare stabilizate umane (Hs74Int-linie de epitelium intestinal fetal) și Hs767Bi (linie de epitelium de vezica urinara fetala). Metoda nu descrie evaluarea expresiei de markeri caracteristici epiteliali. Un dezavantaj major este folosirea mediului conditionat obtinut de la culturile celulare de epitelium fetal uman, care nu poate fi usor de standardizat și care ar putea prezenta diferente de

la o cultura la alta. Patentul a stat la baza a numeroase cercetari in domeniul culturilor primare de epitelii mamare. Metoda prezentata este destul de laborioasa si costisitoare.

**Brevetul [2]** Soule et al. prezinta metoda de obtinere a doua linii imortalizate de celule epiteliale mamare, cu descrierea obtinerii culturilor din tesut mamar normal prin digestie enzimatica cu collagenaza si hialuronidaza. Mediul de cultura este DMEM+F12, cu 5% ser de cal, toxina holerica 100 ng/ml, EGF 20ng/ml, insulina 10µg/ml si cortizol  $1.4 \times 10^{-6}$ M. Cele doua linii izolate MCF-10A si MCF10B se caracterizeaza prin diviziuni nelimitate (imortalizate) datorate achizitiei unei mutatii in timpul cultivarii cu concentratii crescute cu ioni de  $Ca^{2+}$ , dupa ziua 667. Brevetul ofera un instrument de cercetare a celulelor epiteliale mamare normale.

**Brevetul [3]** Jean J. Latimer prezinta o metoda de izolare a celulelor epiteliale din tesut mamar normal, folosind doar procesarea mecanica si cultivarea pe substrat de Matrigel in mediul Magee-Women's Research Institute-I ("MWRI-I"): mediu DMEM cu diferite concentratii de ser fetal bovin tip Hyclone, si β-mercapto-etanol. Dezavantajul metodei prezentate consta in utilizarea substratului de Matrigel, produs comercial mai greu de manipulat, fiind necesar sa fie utilizat la temperaturi de 4°C pentru a nu permite gelificarea necontrolata.

### Descrierea inventiei

**Problema tehnica** pe care o rezolva prezenta inventive se refera la eficientizarea obtinerii de celule de tip epitelial din tesutul mamar normal cu un timp de procesare cat mai scurt si costuri cat mai scazute. Acesta metoda va permite procesarea probelor tisulare si crearea de modele experimentale pentru investigarea mecanismului de tumorigeneza dar si utilizarea acestor celule in medicina regenerativa in studiile de reconstructie mamara la pacientele cu defecte postterapiei oncologice sau in alte conditii medicale de distrugere a tesutului mamar normal. Inventia propune utilizarea a doua elemente esentiale inovative: un substrat de cultivare complex si un mediu de cultivare de tip selectiv, care vor permite mentinerea in cultura a celulelor epiteliale mamare normale cu pastrarea caracterelor initiale si cu rata de proliferare crescuta.

**Metodologie** : fragmentele tisulare obtinute din tesut mamar normal sunt procesate in aceeasi zi sau pana la 24 ore de la recoltare (cu pastrare in frigider la 4°C pana la procesare). Fragmentele tisulare sunt transferate in placi Petri cu diametru de 3 cm, spalate de mai multe ori cu tampon fosfat salin (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline-PBS) cu ajutorul unei seringi. Intreg procesul are loc in conditii de sterilitate (nisa in flux laminar, instrumente si consumabile de plastic sterile).

**Procesarea mecanica** prin care se obtin fragmente mai mici se face cu pense si foarfeci sterile, in mediu complet: DMEM cu 4.5g glucoza/F-12 raport 1:1, suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic, 1% aminoacizi neesentiali, 2mM L-glutamina. Celulele eliberate prin dezagregarea mecanica sunt preluate cu o seringa si pentru obtinerea unei suspensii monocelulare sunt filtrate cu filtre Filcons cu retea de 70µm si colectate in erubeta tip Falcon de 15 ml. Micile fragmente ramase sunt supuse apoi unei digestii enzimactice pentru eliberarea celulelor prinse in retea conjunctiva.

**Digestia enzimatica** consta in folosirea unui cocktail format din collagenaza IV in dilutie de 0.1% si dispaza (reactivi Sigma) in concentratie finala de 250µg/ml PBS. Expunerea fragmentelor la enzime se efectueaza timp de 30 minute in agiator rotativ la 37°C, urmata de pipetare viguroasa a fragmentelor si inactivare cu mediu cu 10% ser fetal (50 ml) si centrifugare la 1200 rpm timp de 7 min. Suspensia de celule este apoi filtrata prin dispozitive tip Filcons (cu retea de 70µm) pentru obtinerea unei suspensii monocelulare si in final din nou centrifugata. Se determina viabilitatea celulelor prin coloratie cu tripan blue.

Substratul de cultivare: pentru selectia celulelor de tip epitelial mamar se utilizeaza un complex de substrat format din de fibronectina, colagen si laminina cu care se vor tapeta placile de cultura.

Mediul de cultivare consta in mediu selctiv ce favorizeaza expansiunea celulelor de tip epitelial: DMEM /F12-HAM fara fenol red, 15 % ser fetal bovin, 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2mM L-glutamina, 1% aminoacizi neesentiali, 100µg/ml toxina holerica, 40ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor), 40ng/ml basicFGF, 20nM dexametazona, 2% ITS (insulin, transferina, selenium). Celulele sunt insamantate si periodic vor fi vizualizate in microscopia optica.

#### **Avantajele aduse de aplicarea acestei inventii:**

- Obtinerea de celule de tip epitelial de la fiecare pacienta, cu posibilitatea folosirii acestora in terapiile regenerative si transplantologie fara aparitia unei reactii de rejet al celulelor.
- Eficienta crescuta de obtinere de culturi primare cu o rata de succes de 90%.
- Timpul de prelucrare al fragmentelor bioptice este relativ scurt, in jur de 2 ore
- Nu necesita conditii speciale de cultivare, procedura poate fi efectuata intr-un laborator clasic de culturi de celule, fara a necesita aparatura suplimentara costisitoare.
- Timp relativ scurt de obtinere a unui numar suficient de celule epiteliale, de 2-3 saptamani, care permite realizarea unui panel complex de studii functionale sau moleculare cu aplicabilitate in biomedicina

In continuare se prezinta **un exemplu** de realizare a procedului de obtinere de celule de tip epitelial din tesutul normal recoltat de la o pacienta cu cancer mamar. Recoltarea s-a efectuat dintr-o regiune anatomica libera de tumora.

Procedeul presupune mai multe etape:

Recoltarea biopsiilor: fragmentele bioptice sunt recoltate in timpul actului chirurgical in conditii de sterilitate, sunt imersate in 5 ml de mediu de cultura complet (DMEM 4.5 g/l glucoza+F-12 HAM, suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic (penicilina+streptomicina), 1% aminoacizi neesentiali, 2mM L-glutamina) si trimise la laboratorul de culturi de celule pentru prelucrare. Fragmentele tisulare pot fi procesate imediat sau in interval de 24 ore de la recoltare, daca acestea sunt pastrate in mediul de recoltare la 4°C pana la procesare.

Procesarea biopsiilor: Intreg procesul are loc in conditii sterile (nisa in flux laminar, instrumente si consumabile sterile). Fragmentele tisulare sunt plasate in placi Petri cu diametru de 3 cm si spalate de cateva ori cu tampon fosfat salin. Se indeparteaza portiunile de tesut grasos si apoi fragmentele sunt prelucrate mecanic cu forfecute fine in fragmente cat mai mici de ordinul 2-3 mm, fragmentele fiind mereu imersate in solutie de tampon fosfat. Prin procesarea mecanica sunt eliberate celule individuale in mediul de tampon, care vor fi preluate periodic cu ajutorul unei seringi si trecute prin filtre Filcons tip cupa, cu retea de 70 µm. Prin filtrarea suspensiei celulare in eprubete de 15 ml se obtine o suspensie monocelulara care este apoi centrifugata la 1100 rpm timp de 7 min.

Digestia enzimatica: pentru eliberarea celulelor epiteliale din retea de colagen dar si pentru ruperea legaturilor inter-celulare se aplica o digestie enzimatica a micilor fragmente deja procesate mecanic. Se foloseste un cocktail enzimatic format dintr-o solutie de 0.1% colagenaza IV in PBS la care se adauga 250µg/ml dispaza. Se aplica 1ml din acest amestec enzimatic peste fragmentele tisulare. Placuta Petri este apoi incubata la 37°C, timp de 30-40 mim, cu agitatie continua intr-un agitator rotativ setat la 150-200rpm. La finalul acestei etape enzimele sunt inactivate prin adaugarea a 5 ml de mediu complet (DMEM 4.5 g/l glucoza+F-12 HAM, suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic (penicilina+streptomicina), 1% aminoacizi neesentiali, 2mM L-glutamina). Se efectueaza prin pipetare viguroasa a

fragmentelor tisulare cu o pipeta cu varf larg, iar suspensia celulara este filtrata din nou prin filtre Filcons iar mediul cu celule este colectat si centrifugat la 1100 rpm timp de 7 min. Suspensiile monocelulare obtinute sunt numarate si evaluate cu tripan blue pentru viabilitate folosind un numarator automat de celule EVE<sup>TM</sup>.

Pregatirea substratului de colagen/fibronectina/laminina: se folosesc flacoane Cole cu suprafata de 25cm<sup>2</sup>, destinate culturilor celulare. Se pregateste un amestec solutii a caror concentratii finale vor fi: colagen (20 µg/ml in PBS), solutie de fibronectina (10 µg/ml PBS) si laminina (10 µg/ml PBS). Din acesta solutie se adauga in fiecare flacon Cole cate 1 ml si se incubeaza la 37°C timp de 20 min. Dupa terminarea perioadei de incubare solutia este recuperata (se poate permite re folosirea ei la 3-4 astfel de proceduri) si flacoanele se lasa cu capacul deschis in nisa de flux laminar petru uscare.

Insamantarea si cultivarea suspensiilor monocelulare in mediul selectiv: se insamnteaza in flacoanele Cole tapetate cu substrat 2x10<sup>5</sup> celule in 7 ml de mediu selectiv pentru celule epiteliale. Acest mediu contine factori de crestere ce permit selectia celulelor tumorale de tip epitelial (diferentiate) si este formulat dupa cum urmeaza: mediu DMEM /F12-HAM fara fenol red, 15 % ser fetal bovin, 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2mM L-glutamina, 1% aminoacizi neesentiali, 100µg/ml toxina holerica, 40ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor), 40ng/ml basicFGF, 20nM dexametazona, 2% ITS (insulin, transferina, selenium). Culturile se mentin la 37 °C intr-un incubator cu 5% CO<sub>2</sub> si se vizualizeaza periodic la un microscop inversat in contrast de faza. Dupa aderare, mediul se schimba periodic la 3-4 zile. Culturile celulare au fost evaluate microscopic periodic, cu ajutorul unui microscop Zeiss Axiovert in faza inversata cu preluare de imagini cu ajutorul unei camere AxioCam MRC. In primele zile au aderat la suprafata placilor si au prezentat o morfologie mixta: celule cu morfologie epiteliala dispuse in placarde si celule cu morfologie mezenchimala dispuse in septe. Rata de proliferare a fost relativ crescuta, primul pasaj s-a efectuat dupa 2 saptamani. In **Figura 1** este ilustrata o primo-cultura la 14 zile in care se observa un placard de celule de tip epiteliale cu morfologie cuboidala aderate la substratul de colagen + fibronectina+ laminina, cu aparitia unor structuri tri-dimensionale asemanatoare unor acini.

**Figura 1 Cultura primara de celule de tip epitelial din tesut mamar normal, celule aderate la substratul de colagen + fibronectina+ laminina cultivate in mediu selectiv timp de 14 zile. Microscopie optica in contrast de faza (magnificatie x100)**

Pasajul celulelor izolate. Dupa 2 saptamani, cand celulele ajung la subconfluenta, celulele sunt spalate de 3x cu tampon fosfat salin si la flaconul Cole de 25cm<sup>2</sup> se adauga 1 ml de 0.25% tripsina cu EDTA. Dupa detasarea celulelor de la substrat se inactiveaza trispina 5ml cu mediu complet (DMEM 4.5 g/l glucoza+F-12 HAM, suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 1% antibiotic (penicilina+streptomicina), 1% aminoacizi neesentiali, 2mM L-glutamina), si suspensia celulara este transferata intr-un tub Falcon de 15 ml si centrifugata timp de 7 min la 1100rpm. Peletul celular este reluat in 1 ml mediu si celulele sunt numarate si pregatite pentru reinsamantare. In paralel se pregateste o noua serie de 3 flacoane Cole de 25cm<sup>2</sup>, care se tapeteaza cu amestecul de colagen + fibronectina+ laminina. Celulele sunt distribuite egal in cele 3 flacoane Cole. Aceasta etapa este necesara expansiunii celulelor. In acest moment se pot face si primele stocari de celule prin inghetare in azot lichid.

La pasajul 2 se observa o organizare a celulelor cu mimarea unei strome celulare (celule alungite de tip mezenchimal) ce inconjura placarde de celule de tip epitelial, precum si aparitia unor sferoizi (structuri celulare tri-dimensionale). Se observa astfel ca o parte din celule se diferentiaza in alte tipuri celulare (de exemplu are loc o tranzitie epitelio-mezenchimala) care in final mimeaza arhitectura tesutului mamar de origine. (Figura 2)



**Figura 2. Aspectul in microscopia optica in contrast de faza a unei culturi de celule de tip epitelial din tesut normal la pasajul 2 (magnificatie x100)**

Caracterizarea imunofenotipica a celulelor izolate din tesutul mamar normal. S-au efectuat coloratii imunocitochimice pentru confirmarea originii epiteliale a celulelor cultivate la pasajul 3. Coloratiile imunocitochimice s-au efectuat folosind cu anticorpi specifici celulelor mezenchimale (vimentin) si celulelor de tip epitelial (EpCAM, Pancitokeratina, si E-Cadherin), dar si specifici pentru celulele epiteliale mamare (CD44 si CD24). La pasajul 3 celulele au fost insamantate pe placute camerale cu 8 godeuri. Dupa 2 zile celulele aderate au fost fixate cu paraformaldhida 4% timp de 20min, dupa 3 spalari cu PBS. Fixarea a fost urmata de o etapa de permeabilizare cu TritonX100 , solutie 0.1% timp de 15 min, urmata de 3 spalari cu PBS. Dupa o blocare a legarii nespecifice a anticorpilor, prin incubare cu BSA (Bovin Serum Albumin) 10%, timp de 20min, s-a efectuat marcarea cu anticorpii monoclonali primari: EpCAM FITC, pancitokeratina PE si dubla coloratie pentru Vimentin FITC si E-Cadherina PE, respectiv CD44 FITC si CD24 PE. Probele au fost incubate la 4°C timp de 30min, iar apoi au fost spalate de 3X cu PBS, iar placutele camerale au fost montate cu colorantul DAPI pentru evidentiarea nucleilor. Probele au fost vizualizate in fluorescenta folosind filtrele de 346, 488 si 546 nm, cu un microscop Zeiss Axiovert D1, iar preluarea de imagini s-a efectuat cu un program de morfometrie Axiovert 4.6. Coloratiile imunocitochimice au confirmat originea epiteliala a celulelor izolate, acestea fiind pozitive pentru EpCAM (Fig. 3B), pan-citokeratina (Fig. 3C), e-Cadherina si CD24 (Fig. 3D). Un aspect particular l-a reprezentat prezenta celulelor de tip mezenchimal (pozitive pentru vimentin) care s-au dispus sub forma unor septe care inconjurau placardele de celule epiteliale (aspect asemanator intalnit in preparatele tisulare anatomo-patologice). (Figura 3)

**Figura 3 Coloratii imunocitochimice vizualizate in microscopia in fluorescenta pentru markerilor de suprafata prezenti pe celulelor izolate din testul mamar normal la pasajul 3, cultivate in mediu selectiv. Fig. 3A: CD44 FITC (verde)+CD29 PE (rosu)+DAPI; Fig. 3B: EpCAM FITC +DAPI; 3C: pancitokeratin PE+DAPI; 3D: vimentin FITC+E-cadherina PE+DAPI**

**Aplicatie a inventiei in studii de transcriptomica (mRNA/lncRNA si miARN) folosind tehnica de microarray**

Pentru a evidenta implicatiile terapeutice ale modificarilor statusului inflamator am folosit un model experimental pentru diferentierea tesutului primar si a fost urmarita modularea proceselor imunologice *in vitro*, prin evaluarea modificarilor la nivel transcripțional folosind tehnologia microarray (Agilent).

În urma analizei bioinformatică folosind programul Gene Spring pentru lina de sân au fost identificate 600 gene (308 supraexprimate și 292 subexprimate), 223 lncRNA (149 supraexprimate și 74 subexprimate) și 60 (31 supraexprimate și 29 subexprimate) cu nivel de expresie alterat. În **Tabelul 1** sunt prezentate top 10 upregulate respectiv downregulated gene lncRNA și miRNA.

Linia celulară de sân	RNA species	Upregulated	Downregulated
Analiza P3 versus P0	Gene	PPBP FAM83A SCEL DHRS9 ZPLD1 SPRR3 POU2AF1 RHCG TMPRSS11B CREG2	IL1RL1 SLC7A2 CSF3 HGF HAS1 ESM1 THBS2 CES1 PDPN TRPA1
	lncRNA	C10orf99 FAM83A-AS1 lnc- BMP7-2 LOC100505664 LOC101928569 SEMA3B-AS1 lnc-IGFL3-1 lnc-C17orf97-4 LINC01587 lnc-CCDC33-1	SNORD114-20 SNORD114-22 SNORD114-28 C14orf132 LOC102723367 SNORD114-14 APCDD1L-AS1 LINC00993 <b>MEG3</b> APCDD1L-AS1
	miRNA	miR-1281 miR-766-3p miR- 6870-3p miR-132-3p miR-7114- 3p miR-361-3p miR-4749-3p miR-129-1-3p miR-6889-3p miR- 6515-3p	miR-5703 miR-199b-5p miR- 376c-3p miR-376a-3p miR-30b- 3p miR-377-3p miR-431-3p miR-188-5p miR-4800-5p miR- 4270

**Tablel 1. Lista de gene lncRNA și miRNA semnificativ statistice în cazul comparației p3 versus p0 pe liniile de sân ( $p < 0.01$  iar valoarea fold change (fc)  $\geq 1.5$ )**

Au fost identificate gene țintă pentru miRNA alterate observându-se a fi implicate în diferite mecanisme ale progresiunii celulare în procesele normale și maligne evidențiind cu preponderență acele gene implicate în modularea proceselor inflamatorii care favorizează dobândirea fenotipului malign invaziv. Transcripții cu nivel de expresie alterat au fost incluși în de rețele moleculare (Figura 4 și 5). Reprezentarea grafică a rețelelor moleculare a făcut posibilă stabilirea genelor nodale a tipului de interacțiune dintre acestea și produșii acestora de tip direct sau indirect. În Figura 6 sunt prezentate implicarea miRNA cu un nivel de expresie alterat iar în figura 6 implicarea miRNA supraexprimate în celulele mamare în reglarea căii de semnalizare TGF $\beta$ , un modulator important al răspunsului imun și a mecanismului de tumorigeneză mamar.

Astfel a fost realizată o clasificare a acestor gene alterate în cazul liniilor de sân, dar și interconexiune cu miRNA țintite (Figura 6). În figura 7 sunt exemplificate interconexiunile dintre lncRNA și miRNA.

**Figura 4. Evaluarea profilului miRNA pentru linia de sân. (A) Organizarea miRNA în clustere pentru probele de analizate (P3 versus P0) pentru linia celulară de sân (B) PCA și ANOVA test (C) clasificare pe mecanisme moleculare, generate folosind programul online Panther Gene Ontology (D) Rețeaua implicată în reglarea ciclului celular pentru miRNA supraexprimate pentru linia de sân**

**Figura 5. MiRNA cu nivel de expresie alterat în cazul celulelor de sân țintesc gene importante în reglarea căii de semnalizare TGF $\beta$  în cazul celulelor de sân**

**Figura 6. Evaluarea profilului expresie genică pentru linia de sân (A) Organizarea în clustere a genelor cu nivel de expresie alterat pentru probele analizate (P3 versus P0) pentru linia celulară de sân (C) PCA și ANOVA test pentru linia de sân (E) Rețeaua implicată în reglarea ciclului celular pentru miRNA supraexprimate pentru linia de sân**

**Figura 7. Interconexiune între lcrRNA alterate și miRNA pentru pentru linia de sân, generată cu ajutorul programului miRNET (<https://www.mirnet.ca/>)**

După cum se observă din Figura 3, miRNA supraexprimate în linia de sân țintesc gene importante în reglarea căii de semnalizare TGF $\beta$ . Calea de semnalizare TGF $\beta$  a fost dovedită că cooperează și controlează expresia sau activitățile factorilor cheie de transcripție care promovează fie diferențierea epitelială, fie tranziția la fenotipul mezenchimal. Acest lucru este confirmat și de datele de expresie genică unde se observă în cazul liniei de sân activarea proceselor de transcripție.

### Revendicari

1. Procedeu de obtinere si mentinere in cultura a celulelor de tip epitelial izolate din tesutul mamar normal in scopul unui instrument de cercetare dar si a folosirii acestor celule in medicina regenerativa. Procedeu este **caracterizat prin aceea ca** in prima etapa se obtin celule in suspensie monocelulara prin procesare mecanica si digestie enzimatica, cultivarea acestora pe placi acoperite de substrat de colagen/fibronectina/laminina in mediu selectiv specific celulelor epiteliale, rezultand celule cu fenotip epitelial si recapitulare a arhitecturii 3D a tesutului mamar normal.
2. Procedeu conform **revedicarii 1**, caracterizat prin aceea ca substratul de cultivare a celulelor de tip epitelial obtinute din tesutul mamar normal este constituit din solutie de colagen/fibronectina/laminina la concentratii finale in tampon fosfat salin de: colagen (20  $\mu\text{g/ml}$  in PBS), solutie de fibronectina (10  $\mu\text{g/ml}$  PBS) si laminina (10  $\mu\text{g/ml}$  PBS).
3. Procedeu conform **revedicarii 2**, caracterizat prin aceea ca selectia celulelor obtinute ca suspensie monocelulara prin procesarea tesutului mamar normal, se face folosind un mediu selectiv care este formulat astfel: DMEM /F12-HAM fara fenol red, 15 % ser fetal bovin, 100U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin, 2mM L-glutamina, 1% aminoacizi neesentiali, 100 $\mu\text{g/ml}$  toxina holerica, 40ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor), 40ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), 20nM dexametazona, 2% ITS (insulin, transferina, selenium).

### Declaratie privind sponsorizarea inventiei

Aceasta inventie s-a bazat pe un studiu de cercetare finantat de un grant national cod proiect PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0782, nr. PCCDI Nr. 65/2018 cu titlul **Abordări inovative avansate pentru medicină regenerativă predictivă, acronim REGMED.**

g

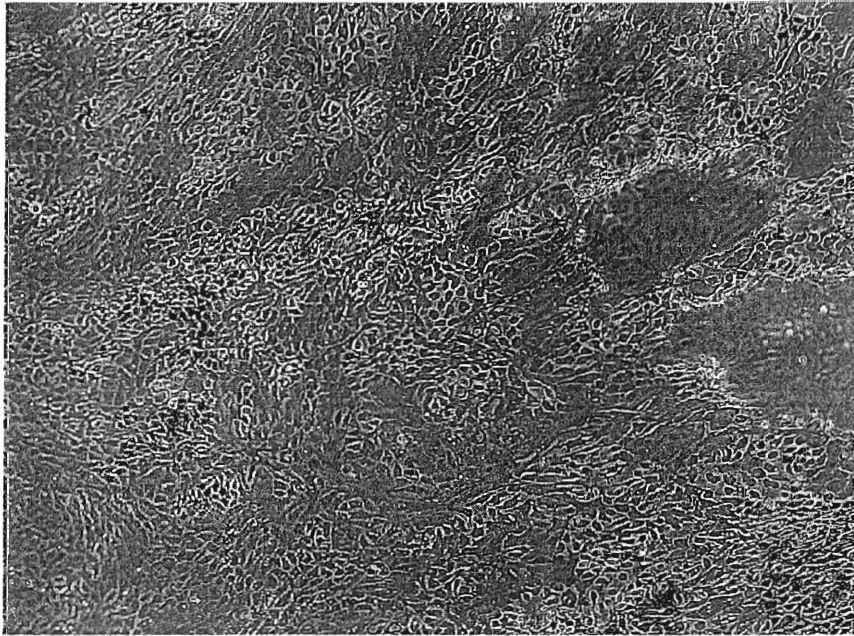


Figura 1

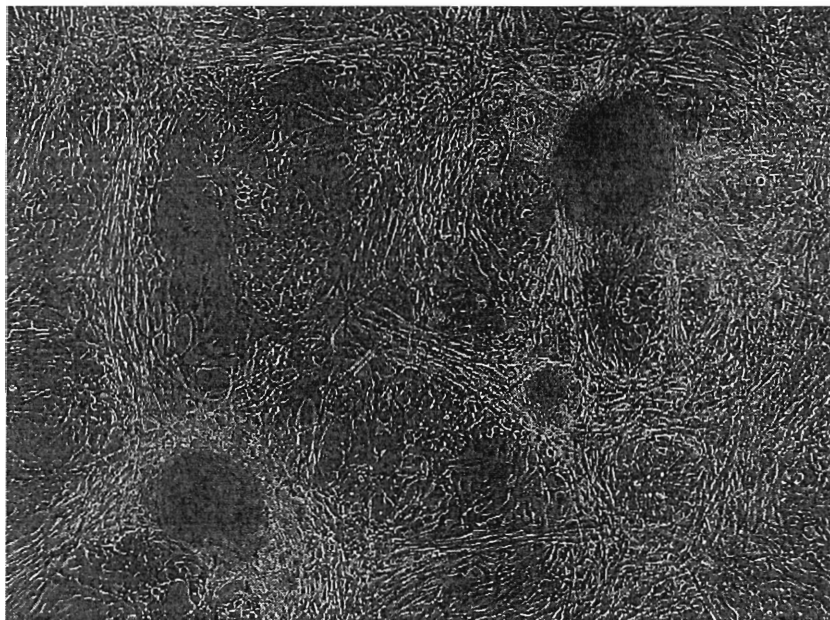


Figura 2

6

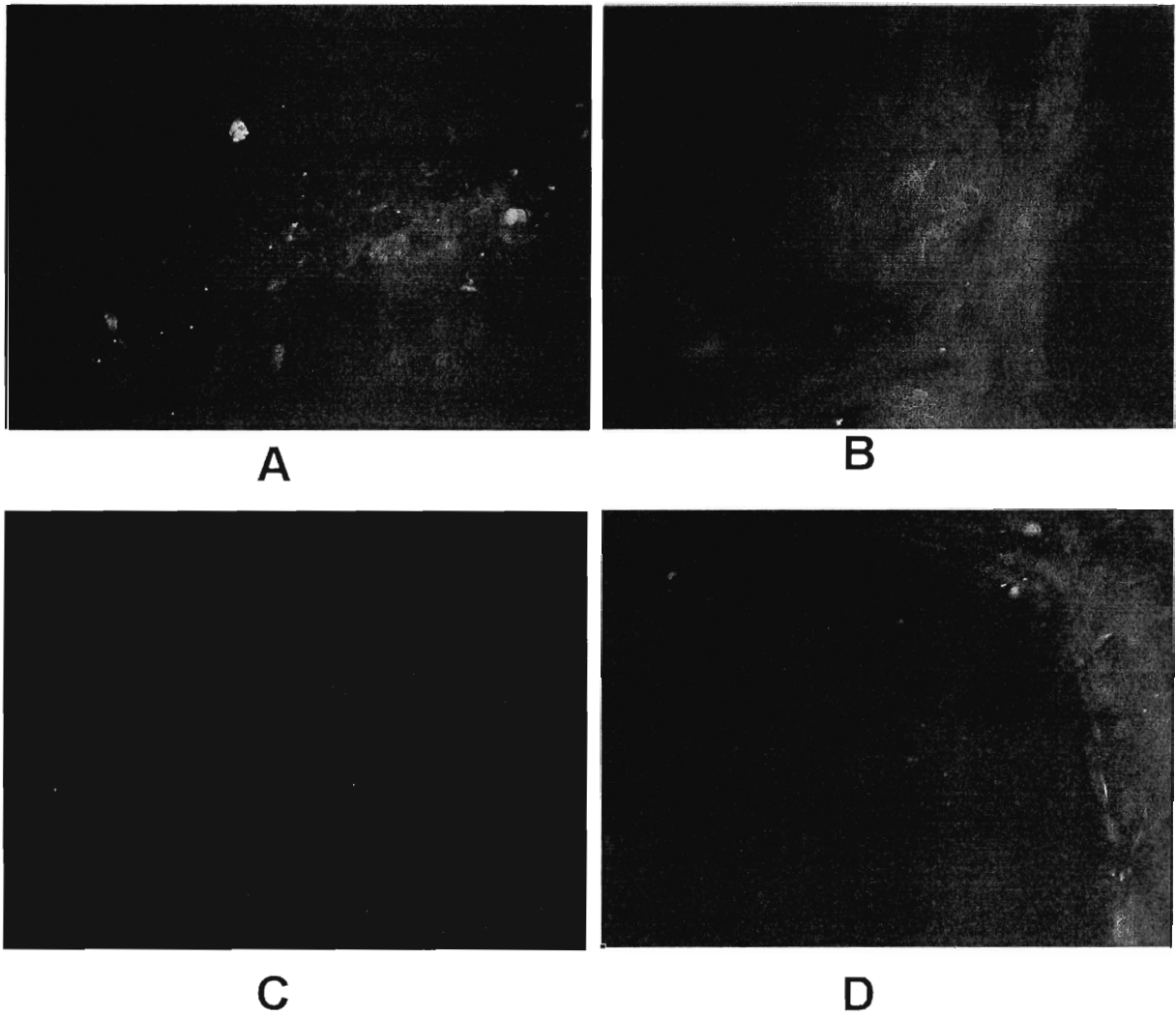


Figura 3



5

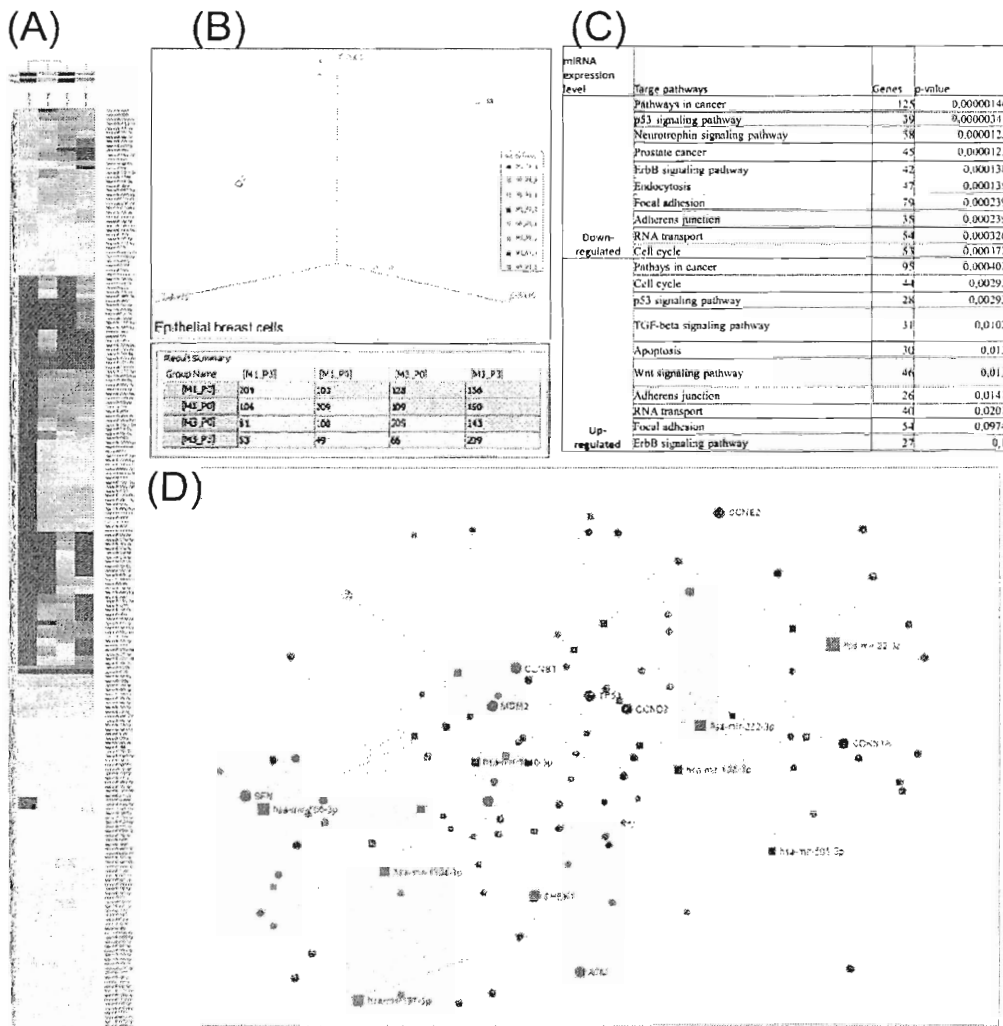


Figura 4

f

1



Figura 5

Handwritten signature and a circular stamp containing the text "PROF. DR. L. ENRIQUE" and other illegible text.



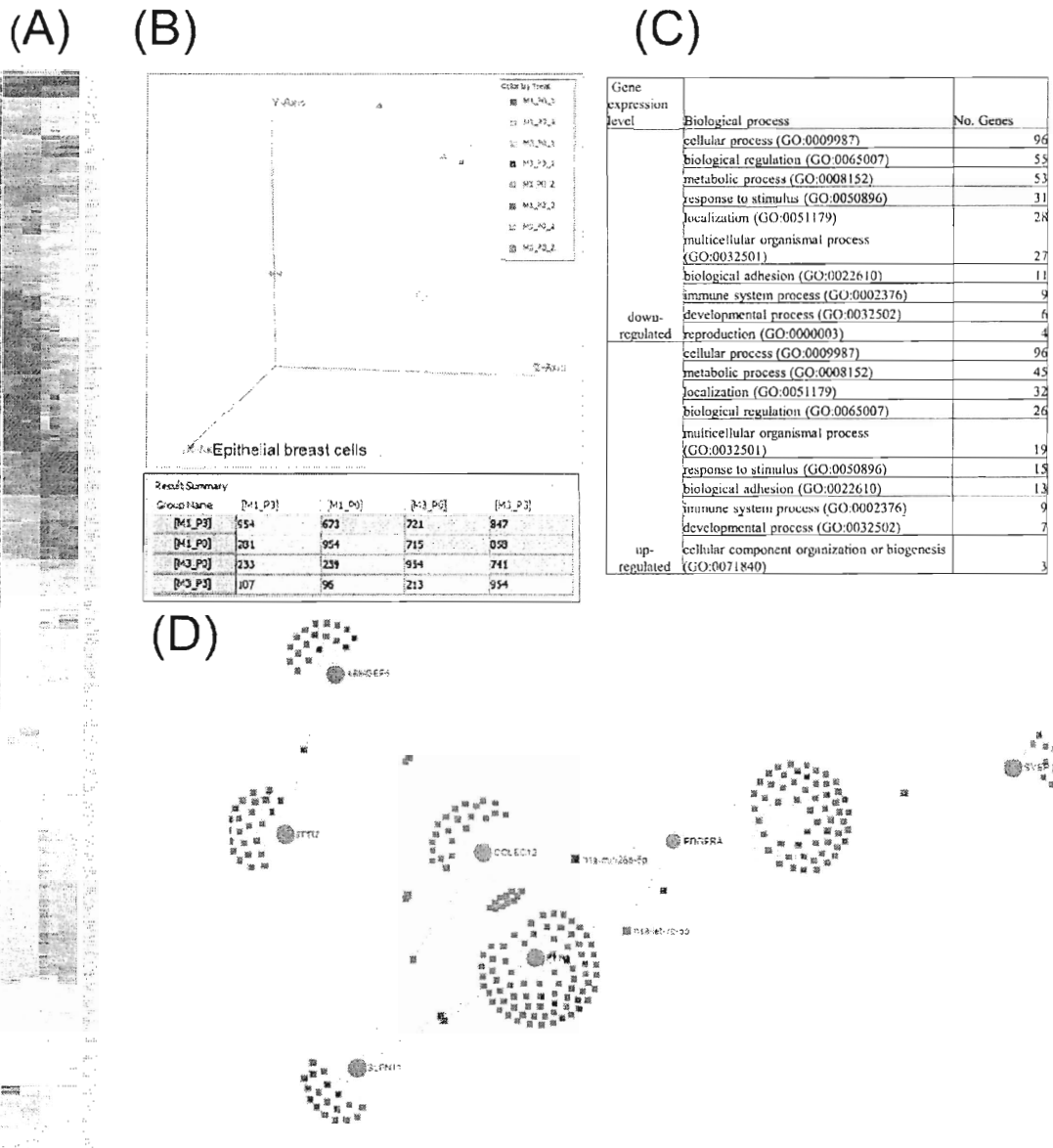
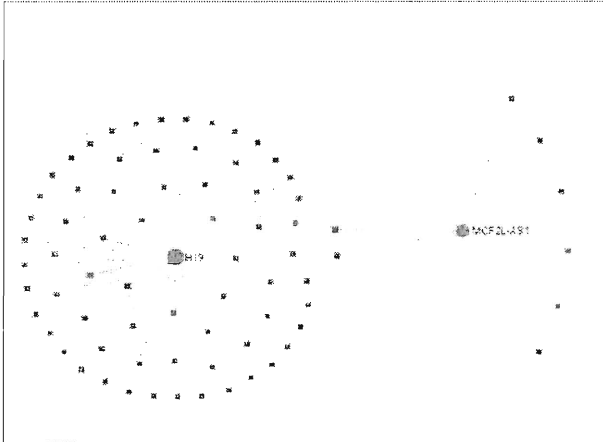


Figura 6



Breast:down-regulated lncRNA



Breast:up-regulated lncRNA



Figura 7

