

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2017/004686 A1

(43) Data de Publicação Internacional
12 de Janeiro de 2017 (12.01.2017) **WIPO | PCT**

(51) Classificação Internacional de Patentes :
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01) *C12N 5/078* (2010.01)

5075, Casa 86 - Cavallhada, 91751831 Porto Alegre/RS (BR).

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2016/050119

(74) Mandatário : **MAULER, Raquel**; Praça Argentina, s/número, Prédio 11102, Chateau, Bairro Centro, 90020040 Porto Alegre/RS (BR).

(22) Data do Depósito Internacional :
1 de Junho de 2016 (01.06.2016)

(81) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes*) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
BR102015016451-3
8 de Julho de 2015 (08.07.2015) BR

(71) Requerente : **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL [BR/BR]**; Av. Paulo Gama, 110 - Centro, 90040-060 Porto Alegre - RS (BR).

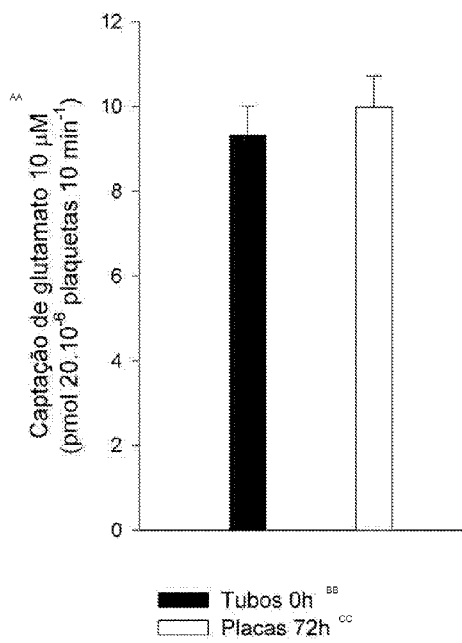
(72) Inventores : **FRIZZO, Marcos Emílio**; Rua José Carlos Ferreira, 249 - IAPI, 90520130 Porto Alegre/RS (BR).
FONSECA MOREIRA, José Cláudio; Av. Cavallhada,

(84) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : USE OF PLATELETS, DETECTION AND/OR TRACKING METHOD, DETECTION AND/OR TRACKING KIT

(54) Título : USO DE PLAQUETAS, PROCESSO DE DETECÇÃO E/OU DE RASTREAMENTO, KIT DE DETECÇÃO E/OU DE RASTREAMENTO



AA 10 μM glutamate uptake (pmol 20.10⁻⁶ platelets 10 min⁻¹)
BB Tubes 0h
CC Plates 72h

Figura 7

(57) Abstract : The present invention describes the use of platelets in a method for evaluating *in vitro* a chemical and/or biological substance, a method for detecting and/or detecting *in vitro* a chemical and/or biological substance, and a kit for detecting and/or tracking *in vitro* a chemical and/or biological substance. More specifically, the platelets are arranged in a single layer. The present invention pertains to the fields of pharmacy, medicine and chemistry.

(57) Resumo : A presente invenção descreve: o uso de plaquetas em um processo de avaliação *in vitro* de substância química e/ou biológica, um processo de detecção e/ou rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica, e kit de detecção e/ou de rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica. Especificamente, as plaquetas são dispostas em uma monocamada. A presente invenção situa-se nos campos da Farmácia, da Medicina e da Química.



WO 2017/004686 A1



SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*
- *antes da expiração do prazo para modificar as reivindicações e a republicar na eventualidade de receção de tais modificações (Regra 48.2(h))*

Declarações sob a Regra 4.17 :

- *relativa à autoria da invenção (Regra 4.17(iv))*

USO DE PLAQUETAS, PROCESSO DE DETECÇÃO E/OU DE RASTREAMENTO, KIT DE
DETECÇÃO E/OU DE RASTREAMENTO

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve o uso de plaquetas em um processo de avaliação *in vitro* de substância química e/ou biológica, um processo de detecção e/ou rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica, e kit de detecção e/ou de rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica. Especificamente, as plaquetas são dispostas em uma monocamada. A presente invenção situa-se nos campos da Farmácia, da Medicina e da Química.

Antecedentes da Invenção

[0002] Para a maioria da comunidade científica, as plaquetas ainda são consideradas apenas fragmentos de células com um tempo de vida entre 5 e 10 dias. Inclusive, nos bancos de sangue são mantidas à temperatura ambiente (21°C-22°C) por, no máximo, 5 dias. Após este período, se não utilizadas, as bolsas contendo as plaquetas são descartadas. Desta forma, os resultados que fundamentam a presente invenção e descritos no presente pedido de patente, revelam novas propriedades biológicas de plaquetas humanas e suas diversas e variadas aplicações.

[0003] Plaquetas humanas apresentam várias similaridades funcionais com células neurais (neurônios e astrócitos) e por isso têm sido utilizadas como indicadores periféricos de alterações no sistema nervoso central (SNC) associadas a diferentes patologias, tais como Alzheimer (Ferrarese C, Begni B, Canevari C, Zoia C, Piolti R, Frigo M, Appollonio I, Frattola L. 2000. Glutamate uptake is decreased in platelets from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol* 47:641-643.), Parkinson (Ferrarese C, Zoia C, Pecora N, Piolti R, Frigo M, Bianchi G, Sala G, Begni B, Riva R, Frattola L. Reduced platelet glutamate uptake in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 1999;106(7-8):685-92.) e isquemia (Tremolizzo L, Piazza F, Longoni M, Ferrarese C. Platelets might

mediate the increase of plasma glutamate in acute ischemic stroke: relevance for early neurological deterioration. *MedHypotheses*. 2009 Oct;73(4):553-4.). O uso de plaquetas para fins comparativos com células do SNC fundamenta-se em aspectos biológicos comuns entre estas diferentes células. Um exemplo deste interesse relaciona-se ao glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos. Plaquetas humanas liberam glutamato (conforme já mostrados em diversos estudos científicos, tais como Aliprandi, A., M. Longoni, L. Stanzani, L. Tremolizzo, M. Vaccaro, B. Begni, G. Galimberti, R. Garofolo, C. Ferrarese. 2005. Increased plasma glutamate in stroke patients might be linked to altered platelet release and uptake. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25: 513 – 519.; Da Prada M, Cesura AM, Launay JM, Richards JG. 1988. Platelets as a model for neurones? *Experientia* 44:115-126.; e Ferrarese, C., G. Sala, R. Riva, B. Begni, C. Zoia, L. Tremolizzo, G. Galimberti, A. Millul, A. Bastone, T. Mennini, et al. 2001. Decreased platelet glutamate uptake in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 56:270-272.), expressam diferentes tipos de receptores glutamatérgicos e também apresentam um sistema de transporte deste neurotransmissor idêntico ao encontrado no SNC. Baseado nestas similaridades, alguns pesquisadores sustentaram a hipótese de que plaquetas poderiam ser utilizadas como modelos periféricos no estudo de alterações bioquímicas e farmacológicas em doenças agudas e neurodegenerativas.

[0004] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foi encontrado o seguinte documento que trata sobre o tema:

[0005] O documento US 6,087,118 (Aronson et al.) revela um método para diagnóstico da doença de Alzheimer utilizando-se plaquetas de sangue humano para o diagnóstico da doença de Alzheimer. Na invenção é descrito um método para imobilizar plaquetas humanas em um filtro onde são realizados testes farmacológicos para verificar o comportamento dos canais de potássio dependentes de cálcio. Entretanto, o referido documento US 6,087,118 de Aronson et al. não revela nem sugere a detecção e/ou screening

de substâncias químicas e/ou biológicas com a etapa de contatar a dita substância com plaquetas que estejam em monocamada e não ativadas.

[0006] O documento mencionado acima indica que as plaquetas são utilizadas em experimentos de curta duração (máximo de poucas horas), sendo mantidas em suspensão.

[0007] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0008] Portanto, é evidente no estado da técnica que não se revela ou sugere-se o uso de plaquetas que estejam em monocamada para a detecção e/ou rastreamento de substâncias químicas e/ou biológicas.

Sumário da Invenção

[0009] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir do uso de plaquetas em processos/métodos de avaliação ou rastreamento de substâncias químicas e/ou biológicas e em que as ditas plaquetas estão em monocamada e não estão ativadas.

[0010] É um dos objetos da presente invenção o uso de plaquetas em um processo/método de avaliação *in vitro* de substância química e/ou biológica compreendendo a etapa de contatar pelo menos uma substância química e/ou biológica com uma cultura de plaquetas em monocamada *in vitro*.

[0011] É outro objeto da presente invenção um processo/método de detecção e/ou de rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica compreendendo a etapa de contatar pelo menos uma substância química e/ou biológica com uma cultura de plaquetas em monocamada *in vitro*.

[0012] É outro objeto da presente invenção um kit de detecção e/ou de rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica compreendendo:

a) pelo menos uma cultura de plaquetas em monocamada: e

b) pelo menos um meio para contatar a substância química e/ou biológica com a cultura de plaquetas em monocamada.

[0013] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados refere-se ao uso de plaquetas em processos/métodos de avaliação ou rastreamento de substâncias químicas e/ou biológicas.

[0014] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0015] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente são apresentadas as seguintes figuras:

[0016] A Figura 1 mostra uma imagem da monocamada de plaquetas humanas *in vitro*. Plaquetas foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de $40 \cdot 10^6$ por poço e mantidas a temperatura ambiente por 4 h ou por cinco dias a 4°C.

[0017] A Figura 2 mostra a quantidade de proteína em diferentes densidades de plaquetas humanas. Plaquetas foram semeadas em placas de 96 poços em três densidades diferentes. Após 4 h em temperatura ambiente a quantidade de proteína nas monocamadas foi determinada pelo método de Bradford. Os dados são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=3).

[0018] A Figura 3 mostra a quantidade de proteína em monocamadas de plaquetas humanas. Plaquetas foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas a temperatura ambiente por 24 h, o meio de incubação foi removido e a quantidade de proteína nas monocamadas foi determinada pelo método de Bradford. Amostras de cada doador, contendo a mesma densidade de células foram avaliadas imediatamente após a obtenção do PC, sem terem sido plaqueadas (tempo 0 h). A quantidade de proteína obtida nestas monocamadas

foi considerada como 100% e comparada com os dados de monocamadas 24 h dos respectivos doadores.

[0019] A Figura 4 mostra a determinação do efeito de repetidas lavagens sobre a quantidade de proteína de monocamadas de plaquetas humanas. Plaquetas foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de $20 \cdot 10^6$ e mantidas a temperatura ambiente por 4 h. O meio de incubação (150 μ L) foi removido e substituído por 150 μ L de PBS 4°C. Este procedimento de lavagem foi realizado três vezes e após as monocamadas foram lisadas para determinação da quantidade de proteína pelo método de Bradford. Amostras de cada doador, contendo a mesma densidade de células foram avaliadas imediatamente após 4 h, sem terem sido lavadas. A quantidade de proteína obtida nestas monocamadas não lavadas foi considerada como 100% e comparada com os dados de monocamadas lavadas dos respectivos doadores.

[0020] A Figura 5 mostra o transporte de glutamato em monocamadas de diferentes densidades. Plaquetas humanas foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas à temperatura ambiente por 4 h antes do ensaio. Densidades de plaquetas: $20 \cdot 10^6$ plaquetas e $40 \cdot 10^6$ plaquetas. Os dados são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=3).

[0021] A Figura 6 mostra o transporte de diferentes concentrações de glutamato em monocamadas. Plaquetas humanas foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de $20 \cdot 10^6$ por poço e mantidas à temperatura ambiente por 4 h antes do ensaio. Os dados são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=3).

[0022] A Figura 7 mostra o transporte de glutamato por plaquetas em suspensão e em monocamadas. Painel A representa a captação de glutamato obtida em tubos, imediatamente após a obtenção das células e em placas após três dias. As plaquetas foram obtidas de um mesmo doador e foram semeadas em placas de 96 poços ou adicionadas em tubos, numa densidade de $20 \cdot 10^6$. As placas foram mantidas à temperatura de 4°C por 72 h antes do

ensaio; a captação em tubos foi realizada imediatamente após a obtenção das células. Os dados são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=1).

[0023] A Figura 8 mostra o transporte de glutamato em monocamadas. Plaquetas humanas obtidas de um mesmo doador foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de $20 \cdot 10^6$ por poço. As placas foram mantidas a 4°C por diferentes tempos. No momento do ensaio de captação, as placas foram pré-incubadas por 1 h a temperatura ambiente seguido de 15 min 36,5°C antes da adição do glutamato triciado. Os dados são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=3).

[0024] A Figura 9 mostra o efeito da sertralina sobre o transporte de glutamato em monocamadas. Plaquetas humanas foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h à temperatura ambiente. No momento do ensaio de captação, as placas foram pré-incubadas por 15 min a 36,5°C antes da adição do glutamato triciado. Os dados são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=5).

[0025] A Figura 10 mostra a viabilidade das plaquetas após o período de incubação, avaliada através da determinação da atividade redutora com a técnica de MTT. As plaquetas foram semeadas em placas de 96 poços e foi utilizado meio de incubação aerado e não aerado. Para tempos de 24 h, as células foram mantidas a 4°C em atmosfera umidificada por 19 h. Antes da adição de MTT as células foram mantidas por 1 h a temperatura ambiente, seguido pela adição de MTT e uma incubação de 4 h (36,5°C) no escuro. Após lise com DMSO é realizada a leitura no espectrofotômetro a 570 nm. A atividade redutora é expressa em unidades de absorbância (UAbs) $20 \cdot 10^6$ plaquetas (n=3).

[0026] A Figura 11 mostra a viabilidade das plaquetas após o período de incubação avaliada através da determinação da redução do MTT. As plaquetas foram semeadas em placas de 96 poços e foi utilizado meio de incubação não aerado. Para tempos superiores a 4h, as células foram mantidas a 4°C em atmosfera umidificada. Antes da adição de MTT, as células foram mantidas por

1h à temperatura ambiente, seguido pela adição de MTT e uma incubação de 4h (36,5°C) no escuro. Após lise com DMSO é realizada a leitura no espectrofotômetro a 570 nm. A atividade redutora é expressa em unidades de absorbância (UAbs) $20 \cdot 10^6$ plaquetas (n=3).

[0027] A Figura 12 mostra o efeito do fármaco sertralina sobre a viabilidade de plaquetas avaliado com a técnica de MTT. Após lise com DMSO, foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 570 nm. Foi observada uma diferença significativa entre as concentrações mais baixa e a mais alta de sertralina em ambos os tempos estudados ($p < 0,05$). A atividade redutora é expressa em unidades de absorbância (UAbs) $20 \cdot 10^6$ plaquetas (n=6).

[0028] A Figura 13 mostra o efeito do fármaco riluzole sobre a viabilidade de plaquetas, tendo sido avaliado com a técnica de MTT. Após lise com DMSO, foi realizada a leitura em 570 nm. Não foram observadas diferenças significativas entre os tempos e os tratamentos estudados. A atividade redutora é expressa em unidades de absorbância (UAbs) $20 \cdot 10^6$ plaquetas (n=27).

[0029] A Figura 14 mostra a determinação de glicogênio em monocamadas de plaquetas humanas. Plaquetas obtidas de um mesmo doador foram incubadas por 4 h e 24 h. Após o término do período de incubação o glicogênio das respectivas monocamadas foi extraído e quantificado. Os resultados demonstram que as plaquetas sintetizam glicogênio *in vitro* e que não há influência da saturação de oxigênio no meio de incubação (n=6).

[0030] A Figura 15 mostra a determinação de ATP em monocamadas de plaquetas humanas. Plaquetas obtidas de um mesmo doador foram incubadas em duas densidades determinadas. Após 4 h, as respectivas monocamadas foram lisadas e o ATP quantificado (n=3).

[0031] A Figura 16 mostra o efeito da sertralina sobre os níveis de ATP de monocamadas de plaquetas humanas. Plaquetas obtidas de um mesmo doador foram incubadas na densidade de $20 \cdot 10^6$ plaquetas por poço. Após 24 h de tratamento com sertralina, as respectivas monocamadas foram lisadas e o

ATP quantificado. Os resultados demonstram que sertralina 30 μ M reduz significativamente a quantidade de ATP das plaquetas (n=6).

[0032] A Figura 17 mostra o gráfico de dispersão ilustrando o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) liberado de plaquetas humanas. Plaquetas obtidas de doadores saudáveis foram semeadas numa densidade de $20 \cdot 10^6$ por poço numa placa de 96 poços e foram incubadas por 4 horas. O valor médio de BDNF (92.9 ± 11.1 pg. 10^{-6} plaquetas) é indicado pela linha pontilhada (n=27).

[0033] A Figura 18 mostra o efeito estimulatório do riluzole sobre a liberação de BDNF de monocamadas de plaquetas humanas. Plaquetas obtidas de doadores foram semeadas numa densidade de $20 \cdot 10^6$ por poço numa placa de 96 poços e foram incubadas com diferentes concentrações de riluzole (1, 10, 40 ou 100 μ M) por 4 horas. Controle é representado pela linha pontilhada. Dados são expressos como média $\pm$ SEM. * Diferente do controle (n=27, p < 0,05).

Descrição Detalhada da Invenção

[0034] É um dos objetos da presente invenção o uso de plaquetas em um processo/método de avaliação *in vitro* de substância química e/ou biológica compreendendo a etapa de contatar pelo menos uma substância química e/ou biológica com uma cultura de plaquetas em monocamada *in vitro*.

[0035] Em uma concretização, a substância química e/ou biológica é uma substância farmacologicamente ativa.

[0036] Em uma concretização, a substância farmacologicamente ativa é de ação no sistema nervoso central e/ou periférico.

[0037] Em uma concretização, a substância farmacologicamente ativa é de ação glutamatérgica, GABAérgica, serotoninérgica e/ou dopaminérgica.

[0038] Em uma concretização, a substância farmacologicamente ativa é um neurofármaco selecionado do grupo que consiste de: riluzole, sertralina, fluoxetina, ceftriaxona, carbamazepina, topiramato e lamotrigina.

[0039] É outro objeto da presente invenção um processo/método de detecção e/ou de rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica compreendendo a etapa de contatar pelo menos uma substância química e/ou biológica com uma cultura de plaquetas em monocamada *in vitro*.

[0040] Em uma concretização, a substância química e/ou biológica é uma substância farmacologicamente ativa.

[0041] Em uma concretização, a substância farmacologicamente ativa é de ação no sistema nervoso central e/ou periférico.

[0042] Em uma concretização, a substância farmacologicamente ativa é de ação glutamatérgica, GABAérgica, serotoninérgica e/ou dopaminérgica.

[0043] Em uma concretização, a substância farmacologicamente ativa é um neurofármaco selecionado do grupo que consiste de: riluzole, sertralina, fluoxetina, ceftriaxona, carbamazepina, topiramato e lamotrigina.

[0044] É outro objeto da presente invenção um kit de detecção e/ou de rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica compreendendo:

a) pelo menos uma cultura de plaquetas em monocamada: e

b) pelo menos um meio para contatar a substância química e/ou biológica com a cultura de plaquetas em monocamada.

[0045] Em uma concretização, a substância química e/ou biológica ser uma substância farmacologicamente ativa.

[0046] Em uma concretização, a substância farmacologicamente ativa é de ação no sistema nervoso central e/ou periférico.

[0047] Em uma concretização, a substância farmacologicamente ativa é de ação glutamatérgica, GABAérgica, serotoninérgica e/ou dopaminérgica.

[0048] Em uma concretização, a substância farmacologicamente ativa é um neurofármaco selecionado do grupo que consiste de: riluzole, sertralina, fluoxetina, ceftriaxona, carbamazepina, topiramato e lamotrigina.

[0049] Definição de algumas expressões/termos utilizados no presente pedido de patente

[0050] Substância química e/ou biológica

[0051] No contexto do presente pedido de patente, o termo “substância química e/ou biológica” refere-se a quaisquer substâncias químicas, por exemplo, que sejam de interesse para a avaliação toxicológica e também se refere a fármacos como, por exemplo, os neurofármacos que compreendem riluzole, sertralina, fluoxetina, ceftriaxona, carbamazepina, topiramato e lamotrigina, bem como outros fármacos de ação no sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP), como, por exemplo, os fármacos de ação glutamatérgica, de ação GABAérgica, serotoninérgica e/ou dopaminérgica, dentre outros tipos de ação. As substâncias biológicas compreendem proteínas, peptídeos, anticorpos, hormônios, intermediários de sínteses biológicas, bem como nanocompostos biológicos e nanoestruturas biológicas.

[0052] Processo de avaliação *in vitro* de substância química e/ou biológica

[0053] No contexto do presente pedido de patente, o termo “Processo de avaliação *in vitro* de substância química e/ou biológica” refere-se a um processo/método de avaliação *in vitro* (isto é, *ex-vivo*, fora do corpo do ser humano/do animal) para avaliação de substâncias químicas como, por exemplo, mas não se limitando a, compostos químicos com interesse para avaliação toxicológica e/ou farmacológica. Incluem-se nas substâncias químicas os fármacos como, por exemplo, riluzole, sertralina, fluoxetina, ceftriaxona, carbamazepina, topiramato e lamotrigina, bem como outros fármacos de ação no sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP) como, por exemplo, os fármacos de ação glutamatérgica, de ação GABAérgica, serotoninérgica e/ou dopaminérgica, dentre outros. Processos/métodos de rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica bem como os processos/métodos de detecção *in vitro* de substância química e/ou biológica também estão englobados pelo referido termo.

[0054] Processo de detecção e/ou de rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica

[0055] No contexto do presente pedido de patente, o termo “Processo de detecção e/ou de rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica” refere-se a um processo/método para identificação de potenciais aplicações farmacológicas da substância química e/ou biológica, incluindo-se substâncias endógenas bioativas ou não e fármacos sintéticos.

[0056] Plaquetas estarem dispostas em uma monocamada

[0057] No contexto do presente pedido de patente, o termo “Plaquetas estarem dispostas em uma monocamada” refere-se ao fato de que as plaquetas são cultivadas *ex-vivo* e/ou preservadas *ex-vivo* em meio de cultura adequado para a sobrevivência das plaquetas, estando as referidas plaquetas em uma única camada na superfície de cultivo (ou seja, estando em uma monocamada) mesmo sem estarem ativadas. Deve-se entender também que, no contexto do presente pedido de patente, as plaquetas podem ser de origem humana ou de qualquer outro mamífero. Também se deve entender que a superfície na qual se dá a formação da monocamada pode ser qualquer superfície adequada para tal finalidade, por exemplo, superfícies plásticas.

[0058] Neurofármaco

[0059] O termo “neurofármaco” refere-se a qualquer tipo de substância química e/ou biológica que possua ação no sistema nervoso central (SNC) e/ou no sistema nervoso periférico (SNP). O termo compreende, por exemplo, mas não se limitando a, os fármacos de ação glutamatérgica, de ação GABAérgica, serotoninérgica e/ou dopaminérgica.

[0060] Substância farmacologicamente ativa

[0061] No contexto do presente pedido de patente, o termo “substância farmacologicamente ativa” refere-se a qualquer substância química e/ou biológica que possua potencial ação/efeito farmacológico no ser humano ou em qualquer outro ser vivo. Inclui-se no contexto de substância farmacologicamente ativa os neurofármacos como, por exemplo, riluzole, sertralina, fluoxetina, ceftriaxona, carbamazepina, topiramato e lamotrigina, bem como outros fármacos de ação no sistema nervoso central (SNC) como,

por exemplo, os fármacos de ação glutamatérgica, de ação GABAérgica, serotoninérgica e/ou dopaminérgica, dentre outros.

[0062] Kit de detecção e/ou de rastreamento *in vitro* de substância química e/ou biológica

[0063] No contexto do presente pedido de patente, o termo “kit de detecção *in vitro* de substância química e/ou biológica” refere-se a um kit com finalidade de detecção e/ou de rastreamento em processos/métodos de detecção *in vitro* de substância química e/ou biológica, substância esta como, por exemplo, neurofármacos compreendendo riluzole, sertralina, fluoxetina, ceftriaxona, carbamazepina, topiramato e lamotrigina, bem como outros fármacos de ação glutamatérgica e também substâncias endógenas como, por exemplo, hormônios, peptídeos, proteínas, etc.

[0064] São inúmeras as vantagens proporcionadas pela presente invenção. Dentre as vantagens, destacam-se: aplicações nas avaliações toxicológicas, aplicação como modelo substituto ao uso de animais em testes farmacológicos, aplicação em triagem de fármacos ou de agentes químicos, testes farmacológicos de equivalência ou de segundo uso (novas aplicações terapêuticas para medicamentos já conhecidos – *reprofiling*), além de outras vantagens técnicas que serão prontamente reconhecidas por um técnico no assunto com base nos conhecimentos aqui revelados neste pedido de patente.

Exemplo 1. Obtenção de monocamada de plaquetas humanas

[0065] Embora os exemplos aqui mostrados sejam descritos com detalhes específicos, tais exemplos têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar o escopo da mesma.

[0066] As etapas para a obtenção e posterior utilização da monocamada de plaquetas estão indicadas conforme segue:

[0067] Etapa a)- Obtenção e lavagem das plaquetas:

1) Obtenção de um determinado volume de sangue em tubos a vácuo (EDTA-K₃), segundo protocolo de venopunção padrão. Imediatamente

após a retirada de cada tubo o conteúdo é homogeneizado com repetidas inversões do mesmo.

2) Parâmetros plaquetários são determinados com uso de analisador hematológico.

3) Os tubos são centrifugados para obtenção do plasma rico em plaquetas (abreviadamente indicado como PRP no presente pedido de patente).

4) A fração de PRP de cada tubo é coletada e transferida para minitubos.

5) Os minitubos são centrifugados. O sobrenadante dos tubos é descartado.

6) O PRP é ressuspendido em solução tampão sacarose, adiciona-se mais certa quantidade do mesmo tampão. Procedimento idêntico é realizado no outro minitubo.

7) Os minitubos são centrifugados. O sobrenadante dos dois minitubos é descartado.

8) O pellet resultante (obtido do PRP) de cada minitubo é ressuspendido em 1/5 do volume inicial de PRP obtido em tampão sacarose.

9) Os volumes dos minitubos são reunidos originando o concentrado de plaquetas (PC).

10) Parâmetros plaquetários são determinados no PC com uso de analisador hematológico.

[0068] Etapa b)- Utilização de monocamadas de plaquetas humanas:

1) Uma densidade conhecida de plaquetas humanas é transferida em tampão sacarose para poços de placas multipoço.

2) Acrescenta-se certa quantidade de solução tampão Tris-citrato.

3) É necessário um período de tempo para sedimentação e adesão das células.

4) Nesta invenção, diferentes ensaios podem ser empregados para avaliar o efeito de produtos ou tratamentos sobre diversos parâmetros biológicos nestas células humanas.

[0069] Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos, são apresentados abaixo alguns exemplos não limitantes. Todos os exemplos apresentados na presente invenção foram obtidos a partir de monocamadas de plaquetas humanas de doadores saudáveis. Cabe salientar que este modelo também pode ser estabelecido com células de pacientes e também a partir de sangue de quaisquer animais.

[0070] Os exemplos **1-4** são referentes às condições das monocamadas de plaquetas e demonstram características fundamentais para a compreensão do invento, tais como parâmetros das células, adesividade e resistência a trocas de meio de incubação.

[0071] Os exemplos **5-8** demonstram que monocamadas de plaquetas mantêm uma importante função biológica dependente de energia (captação de glutamato), que tem sido amplamente utilizada na literatura científica como correspondência de uma condição do SNC. O exemplo **6** inclusive compara o transporte de glutamato obtido com o método descrito na literatura científica (células em suspensão) com o obtido com a presente invenção (células aderidas). O exemplo **8** demonstra um efeito biológico ainda não descrito de um fármaco comercial sobre a captação de glutamato.

[0072] Os exemplos **9** e **10** demonstram a viabilidade das monocamadas de plaquetas em diferentes tempos e condições, inclusive com tratamento farmacológico.

[0073] Nos exemplos **11-13** são avaliadas reservas energéticas das monocamadas de plaquetas em diferentes tempos e condições, inclusive com tratamento farmacológico.

[0074] Nos exemplos **14** e **15** é determinada a secreção de BDNF de monocamadas de plaquetas em diferentes tempos e condições, inclusive com

tratamento farmacológico. O exemplo **15** demonstra um novo efeito biológico de um fármaco comercial sobre a liberação de BDNF descoberto com a utilização do modelo de monocamadas de plaquetas.

[0075] Nos exemplos acima indicados é utilizado tampão sacarose e Tris-citrato, mas não é descartado o uso de soluções alternativas.

[0076] **Tampão sacarose** (composição em mM): Sacarose (320); NaCl (137); KCl (2,7); KH_2PO_4 (1,5); NaH_2PO_4 (8,1).

[0077] **Tampão Tris-citrato** (composição em mM): NaCl (112,8); KCl (4,5); MgSO_4 (1,1); KH_2PO_4 (1,1); Tris-HCl (25); Citrato-Na (11); D-glicose (10,2).

[0078] **Exemplo 1: Obtenção de parâmetros plaquetários**

[0079] Na presente invenção são descritos resultados obtidos a partir de amostras de 8 mL de sangue, mas o volume pode ser menor (4 mL) uma vez que o modelo utiliza uma densidade de células conhecida.

[0080] Os índices volume plaquetário médio (VPM), amplitude de distribuição de plaquetas (PDW), plaquetócrito (PCT) e número de plaquetas por volume (PLT) são obtidos com analisador hematológico, por exemplo, Horiba (Micros ES60) e são essenciais para ajustar a densidade de plaquetas, avaliar se as mesmas encontram-se ativadas e se foi selecionada alguma subpopulação durante o processamento da amostra. Os índices VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no sangue total e novamente após o processamento das células, no concentrado de plaquetas (PC), desta forma, possíveis variações nestes parâmetros podem ser avaliadas (tabela 1).

1) Obtenção de 8 mL de sangue (doador ou paciente) em 2 tubos a vácuo (EDTA-K_3), segundo protocolo de venopunção padrão. Imediatamente após a retirada de cada tubo o conteúdo é homogeneizado com repetidas inversões do mesmo (10 vezes).

2) Os índices VPM, PDW, PCT e PLT da amostra são determinados no sangue total através do analisador hematológico.

3) Os tubos são centrifugados (1400 rpm por 5 min à 4°C) para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).

4) A fração de PRP de cada tubo é coletada e transferida para minitubos.

5) Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 10 min a 4°C). O sobrenadante dos dois tubos é descartado.

6) O PRP é ressuspendido em 0,5 mL de tampão sacarose (0,32 M, pH 7,4). É adicionado mais 0,5 mL do mesmo tampão (4°C). Procedimento idêntico é realizado no outro minitubo.

7) Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 5 min à 4°C). O sobrenadante dos dois minitubos é descartado.

8) O pellet resultante (obtido do PRP) de cada mini-tubo é ressuspendido em 1/5 do volume inicial de PRP obtido (centrifugação descrita no item 3) em tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C.

9) Os volumes dos 2 minitubos são reunidos originando o concentrado de plaquetas (PC).

10) Os parâmetros plaquetários VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no PC com uso de analisador hematológico.

Tabela 1. Parâmetros plaquetários no sangue total e no concentrado de plaquetas (PC)

Parâmetros	PLT ($\times 10^3$ mm ⁻³)	VPM (μm^3)	PCT (%)	PDW (%)	Rendimento (%)
Sangue	223 $\pm$ 44	7,9 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,1	15 $\pm$ 1,2	
PC	1543 $\pm$ 371	8,1 $\pm$ 06	1,2 $\pm$ 0,3	15 $\pm$ 1,3	40 $\pm$ 9

Rendimento é o valor obtido a partir da diferença entre o número de plaquetas no sangue total e o obtido no PC. Os dados são expressos em média $\pm$ DP, n=56.

[0081] No referido Exemplo 1, podem ser empregadas outras formas de obtenção de plaquetas (por exemplo, obtenção por aférese), assim como poderiam ser utilizados outros tampões para manutenção das células.

[0082] Exemplo 2: Imagem representativa de monocamada de plaquetas

1) Obtenção de 8 mL de sangue (doador ou paciente) em 2 tubos a vácuo (EDTA-K₃), segundo protocolo de venopunção padrão. Imediatamente após a retirada de cada tubo o conteúdo é homogeneizado com repetidas inversões do mesmo (10 vezes).

2) Os índices VPM, PDW, PCT e PLT da amostra são determinados no sangue total através do analisador hematológico.

3) Os tubos são centrifugados (1400 rpm por 5 min à 4°C) para obtenção do PRP.

4) A fração de PRP de cada tubo é coletada e transferida para minitubos.

5) Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 10 min à 4°C). O sobrenadante dos dois tubos é descartado.

6) O PRP é ressuspenso em 0,5 mL de tampão sacarose (0,32 M, pH 7,4). É adicionado mais 0,5 mL do mesmo tampão (4°C). Procedimento idêntico é realizado no outro minitubo.

7) Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 5 min à 4°C). O sobrenadante dos dois minitubos é descartado.

8) O pellet resultante (obtido do PRP) de cada minitubo é ressuspenso em 1/5 do volume inicial de PRP obtido (centrifugação descrita no item 3) em tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C.

9) Os volumes dos 2 minitubos são reunidos originando o PC.

10) Os parâmetros plaquetários VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no PC com uso de analisador hematológico.

11) Uma densidade de $40 \cdot 10^6$ de plaquetas é transferida para um poço de uma placa de 96 poços em um volume de 50 µL de tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C.

12) É acrescentado um volume de 100 µL de tampão Tris-citrato (pH 6,5) à 4°C.

13) Após 4 h a temperatura ambiente é realizada a aquisição da imagem da monocamada (figura 1).

[0083] Exemplo 3: Quantificação proteica de monocamadas de plaquetas

1. Obtenção de 8 mL de sangue (doador ou paciente) em 2 tubos a vácuo (EDTA-K₃), segundo protocolo de venopunção padrão. Imediatamente após a retirada de cada tubo o conteúdo é homogeneizado com repetidas inversões do mesmo (10 vezes).
2. Os índices VPM, PDW, PCT e PLT da amostra são determinados no sangue total através do analisador hematológico.
3. Os tubos são centrifugados (1400 rpm por 5 min à 4°C) para obtenção do PRP.
4. A fração de PRP de cada tubo é coletada e transferida para minitubos.
5. Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 10 min à 4°C). O sobrenadante dos dois tubos é descartado.
6. O PRP é ressuspendido em 0,5 mL de tampão sacarose (0,32 M, pH 7,4). É adicionado mais 0,5 mL do mesmo tampão (4°C). Procedimento idêntico é realizado no outro minitubo.
7. Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 5 min à 4°C). O sobrenadante dos dois minitubos é descartado.
8. O pellet resultante (obtido do PRP) de cada minitubo é ressuspendido em 1/5 do volume inicial de PRP obtido (centrifugação descrita no item 3) em tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C.
9. Os volumes dos 2 minitubos são reunidos originando o PC.
10. Os parâmetros plaquetários VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no PC com uso de analisador hematológico.

11. Densidades de 20, 40 e 60.10⁶ de plaquetas são transferidas para poços de uma placa de 96 poços em volumes de 50 µL de tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C.
12. É acrescentado um volume de 100 µL de tampão Tris-citrato (pH 6,5) à 4°C a cada poço.
13. Manter por 4 h a temperatura ambiente.
14. Remover 100 µL (não danificar a monocamada com a ponteira).
15. Acrescentar 50 µL de solução de lise.
16. Homogeneizar devagar cada poço, transferindo o conteúdo para minitubo.
17. Leitura em espectrofotômetro a 595 nm (figura 2).

[0084] Em relação ao exemplo 3 acima descrito, a quantificação da proteína total pode ser realizada em monocamadas mantidas por tempos superiores a 04 (quatro) horas como, por exemplo, exemplo 24 (vinte e quatro) horas (figura 3).

[0085] Exemplo 4: Quantificação proteica de monocamadas de plaquetas submetidas a repetidas lavagens

[0086] O exemplo a seguir demonstra que as monocamadas de plaquetas aderem à superfície plástica, resistindo a repetidas substituições do meio de incubação.

- 1) Obtenção de 8 mL de sangue (doador ou paciente) em 2 tubos a vácuo (EDTA-K3), segundo protocolo de venopunção padrão. Imediatamente após a retirada de cada tubo o conteúdo é homogeneizado com repetidas inversões do mesmo (10 vezes).
- 2) Os índices VPM, PDW, PCT e PLT da amostra são determinados no sangue total através do analisador hematológico.
- 3) Os tubos são centrifugados (1400 rpm por 5 min a 4°C) para obtenção do PRP.
- 4) A fração de PRP de cada tubo é coletada e transferida para minitubos.

5) Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 10 min a 4°C). O sobrenadante dos dois tubos é descartado.

6) O PRP é ressuspensionado em 0,5 mL de tampão sacarose (0,32 M, pH 7,4). É adicionado mais 0,5 mL do mesmo tampão (4°C). Procedimento idêntico é realizado no outro minitubo.

7) Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 5 min a 4°C). O sobrenadante dos dois minitubos é descartado.

8) O pellet resultante (obtido do PRP) de cada minitubo é ressuspensionado em 1/5 do volume inicial de PRP obtido (centrifugação descrita no item 3) em tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) a 4°C.

9) Os volumes dos 02 minitubos são reunidos originando o PC.

10) Os parâmetros plaquetários VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no PC com uso de analisador hematológico.

11) Densidades de $20 \cdot 10^6$ de plaquetas são transferidas para poços de uma placa de 96 poços em volumes de 50 µL de tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) a 4°C.

12) É acrescentado um volume de 100 µL de tampão Tris-citrato (pH 6,5) a 4°C a cada poço.

13) Manter por 4 h a temperatura ambiente.

14) Remover 150 µL do meio de incubação.

15) Acrescentar 150 µL de PBS 4°C.

16) Repetir este processo de lavagem três vezes.

17) Na última lavada remover 100 µL.

18) Acrescentar 50 µL de solução de lise.

19) Homogeneizar devagar cada poço, transferindo o conteúdo para minitubo.

20) Leitura em espectrofotômetro a 595 nm (figura 4).

[0087] Exemplo 5: Captação de glutamato em monocamadas de plaquetas

[0088] No exemplo a seguir é utilizado um sistema de transporte celular dependente de energia. Os resultados obtidos demonstram que as monocamadas de plaquetas são biologicamente funcionais (figuras 5 e 6).

1) Obtenção de 8 mL de sangue (doador ou paciente) em 2 tubos a vácuo (EDTA-K3), segundo protocolo de venopunção padrão. Imediatamente após a retirada de cada tubo o conteúdo é homogeneizado com repetidas inversões do mesmo (10 vezes).

2) Os índices VPM, PDW, PCT e PLT da amostra são determinados no sangue total através do analisador hematológico.

3) Os tubos são centrifugados (1400 rpm por 5 min à 4°C) para obtenção do PRP.

4) A fração de PRP de cada tubo é coletada e transferida para minitubos.

5) Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 10 min à 4°C). O sobrenadante dos dois tubos é descartado.

6) O PRP é ressuspendido em 0,5 mL de tampão sacarose (0,32 M, pH 7,4). É adicionado mais 0,5 mL do mesmo tampão (4°C). Procedimento idêntico é realizado no outro minitubo.

7) Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 5 min à 4°C). O sobrenadante dos dois minitubos é descartado.

8) O pellet resultante (obtido do PRP) de cada minitubo é ressuspendido em 1/5 do volume inicial de PRP obtido (centrifugação descrita no item 3) em tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C.

9) Os volumes dos 2 minitubos são reunidos originando o PC.

10) Os parâmetros plaquetários VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no PC com uso de analisador hematológico.

11) Densidades definidas de plaquetas são transferidas para poços de uma placa de 96 poços em volumes de 50 µL de tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C. Observação: no caso da figura 5, foram utilizadas as densidades

de 20 e 40.10⁶ de plaquetas, na figura 6 foram semeadas 20.10⁶ de plaquetas por poço.

12) É acrescentado um volume de 80 µL de tampão Tris-citrato (pH 6,5) à 4°C a cada poço.

13) Manter por 4 h a temperatura ambiente.

14) Aquecer a placa a 36,5°C por 15 min. Observação: no caso de adição de fármaco o mesmo deve ser diluído em Tris-citrato (pH 6,5).

15) Acrescentar 20 µL de uma solução contendo glutamato-[H3] (0,2 µCi/poço) e glutamato não marcado (na concentração desejada). Observação: A adição da solução contendo o radioativo deve ocorrer com intervalos de 2 min entre cada poço e deve ser de uma sequência de no máximo cinco poços.

16) O tempo de incubação com a solução contendo o radioativo deve ser de 10 min a 36,5°C.

17) Ao término da incubação descartar o meio e acrescentar 150 µL de PBS 4°C contendo 1 mM de glutamato não marcado.

18) Realizar três lavados em cada poço mantendo ao final a monocamada sem meio.

19) Ao finalizar o último poço, adicionar 200 µL de NaOH (0,5 N) a cada poço.

20) Após 30 min transferir o volume de cada poço para um mini vial de cintilação.

21) Acrescentar 2 mL de líquido de cintilação a cada mini vial.

22) Realizar 7 inversões nos mini vials.

23) Determinar a radioatividade no cintilador. Observação: No cálculo considerar como referência a média da contagem de três mini vials contendo 20 µL da solução de glutamato marcado, 200 µL de NaOH (0,5N) e 2 mL de líquido de cintilação.

[0089] Exemplo 6: Captação de glutamato por plaquetas em suspensão e em monocamadas

[0090] No exemplo a seguir, foi comparada a capacidade de transporte de glutamato (10 μM) de plaquetas em suspensão (denominado clássico) e em monocamadas (a presente invenção). O protocolo realizado em tubos foi descrito por Mangano & Schwarcz, 1981. O protocolo utilizado para obtenção e tratamento das monocamadas foi descrito no exemplo 5. Nos ensaios comparativos foram utilizadas plaquetas obtidas de um mesmo doador, tendo sido utilizada a mesma densidade de células em ambos os métodos. Os resultados obtidos com os dois protocolos são apresentados na tabela 2 abaixo e na figura 7.

Tabela 2. Resultados obtidos com plaquetas em suspensão e com plaquetas em monocamadas

	Tubos (clássico)	Placas (invenção)
Captção de 10 μM de glutamato (pmol $20 \cdot 10^{-6}$ plaquetas 10 min^{-1})	$11,4 \pm 1,75$ (n=3)	$9,1 \pm 2,0$ (n=3)

[0091] Exemplo 7: Captção de glutamato por monocamadas de plaquetas de diferentes tempos

[0092] O exemplo a seguir demonstra que monocamadas de plaquetas apresentam capacidade de transportar glutamato mesmo quando armazenadas por semanas *ex vivo*. O aumento na capacidade de transporte observada depois de 15 dias de armazenamento esta sendo investigada pelo laboratório NEBICEL-UFRGS. Este resultado provavelmente seja devido a um aumento na expressão dos transportadores de glutamato durante este período e indica boas condições fisiológicas das plaquetas armazenadas. O protocolo utilizado para obtenção e tratamento das monocamadas foi descrito no exemplo 5 e os resultados são apresentados na figura 8.

[0093] Exemplo 8: Efeito de fármaco na captação de glutamato de monocamadas de plaquetas humanas

[0094] O exemplo a seguir demonstra o efeito do tratamento por 24 h com sertralina sobre o transporte de glutamato de monocamadas de plaquetas humanas. O protocolo utilizado para obtenção e tratamento das monocamadas foi descrito no exemplo 5 e os resultados são apresentados na figura 9.

[0095] Exemplo 9: Determinação da viabilidade de monocamadas de plaquetas humanas

[0096] No exemplo a seguir é utilizado um método que avalia a atividade redutora de enzimas citosólicas e mitocondriais. O ensaio de MTT é amplamente aceito pela comunidade científica como teste de viabilidade celular. Os resultados obtidos demonstram que as monocamadas de plaquetas são viáveis após diferentes tempos (figuras 10 e 11).

1) Obtenção de 8 mL de sangue (doador ou paciente) em 2 tubos a vácuo (EDTA-K₃), segundo protocolo de venopunção padrão. Imediatamente após a retirada de cada tubo o conteúdo é homogeneizado com repetidas inversões do mesmo (10 vezes).

2) Os índices VPM, PDW, PCT e PLT da amostra são determinados no sangue total através do analisador hematológico.

3) Os tubos são centrifugados (1400 rpm por 5 min à 4°C) para obtenção do PRP.

4) A fração de PRP de cada tubo é coletada e transferida para minitubos.

5) Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 10 min à 4°C). O sobrenadante dos dois tubos é descartado.

6) O PRP é ressuspendido em 0,5 mL de tampão sacarose (0,32 M, pH 7,4). É adicionado mais 0,5 mL do mesmo tampão (4°C). Procedimento idêntico é realizado no outro minitubo.

7) Os minitubos são centrifugados (8400 rpm por 5 min à 4°C). O sobrenadante dos dois minitubos é descartado.

- 8) O pellet resultante (obtido do PRP) de cada minitubo é ressuspenso em 1/5 do volume inicial de PRP obtido (centrifugação descrita no item 3) em tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C.
- 9) Os volumes dos 2 minitubos são reunidos originando o PC.
- 10) Os parâmetros plaquetários VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no PC com uso de analisador hematológico.
- 11) Densidades de $20 \cdot 10^6$ de plaquetas são transferidas para poços de uma placa de 96 poços em volumes de 50 µL de tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C.
- 12) É acrescentado um volume de 80 µL de tampão Tris-citrato (pH 6,5) à 4°C a cada poço. **Observação:** no caso de adição de fármaco o mesmo deve ser diluído em Tris-citrato (pH 6,5).
- 13) Acrescentar 20 µL de uma solução de MTT (5 mg.mL⁻¹).
- 14) A incubação com a solução de MTT deve ser de 4 h (36,5°C) no escuro.
- 15) Acrescentar 150 µL de DMSO a cada poço.
- 16) Homogeneizar o material de cada poço até dissolver o produto formado (formazan).
- 17) Realizar a leitura da absorbância em leitor de placa em 570 nm.

[0097] Exemplo 10: Efeito de fármacos sobre a viabilidade de monocamadas de plaquetas humanas

[0098] O efeito dos neurofármacos sertralina e riluzole sobre a viabilidade de plaquetas foi avaliado em diferentes tempos de incubação (figura 12 e 13). O protocolo utilizado para obtenção e tratamento das monocamadas foi descrito no exemplo 9.

[0099] Exemplo 11: Quantificação de glicogênio monocamadas de plaquetas humanas

[0100] Plaquetas apresentam grandes reservas de glicose armazenadas sob a forma de grânulos de glicogênio. Recentemente foi publicada uma técnica bioquímica para quantificar o glicogênio de plaquetas humanas (Rocha

DS, Souza SK, Onsten TGH, da Silva RSM, Frizzo ME (2014) A Simple Method to Quantify Glycogen from Human Platelets. *J Cytol Histol* 5: 217. doi:10.4172/2157-7099.1000217).

[0101] O glicogênio de monocamadas de plaquetas humanas foi quantificado em diferentes tempos (figura 14). As plaquetas são obtidas segundo o exemplo 1 e o ensaio para determinar o conteúdo de glicogênio compreende as seguintes etapas: (1) lise celular e extração do glicogênio, (2) precipitação do glicogênio e sua lavagem, (3) conversão do glicogênio a glicose livre, (4) neutralização, e (5) detecção da glicose livre.

[0102] Etapa 1: Para lisar as plaquetas, 0,25 mL KOH (30%) é adicionado e a suspensão é homogeneizada com repetidas passagens (15x) por ponteira plástica de 1 mL. O volume é transferido para um tubo cônico onde é adicionado mais 0,25 mL KOH (30%) e a mistura é novamente homogeneizada (15x). Para a extração de glicogênio o tubo é fervido por 1 h e 50 μ L Na₂SO₄ saturado (35%) é adicionado.

[0103] Etapa 2: O glicogênio obtido é precipitado com 1 mL de etanol anidro e o tubo é agitado rapidamente no agitador vórtex. Em seguida o tubo é centrifugado 750 x g por 10 min, o sobrenadante é cuidadosamente descartado e o precipitado ressuspendido em 0,5 mL de água destilada. As etapas de precipitação e lavagem foram repetidas, conforme descrito acima, e o glicogênio foi finalmente ressuspendido em 0,3 mL de água destilada para sua determinação.

[0104] Etapa 3: O glicogênio total obtido foi convertido a glicose livre por hidrólise ácida. Uma curva padrão é estabelecida a partir de uma solução stock (1 mg.mL⁻¹) de glicogênio tipo III (Sigma), e quantidades diferentes de glicogênio, 50 (S1), 100 (S2), 150 (S3) e 200 μ g (S4) são usadas como uma referência. O glicogênio obtido da amostra e aquele usado na curva padrão são hidrolisados com HCl (4 N) em fervura por 1 h. Neste processo, 0,3 mL de HCl é adicionado a S1, S2, S3, S4 e a amostra.

[0105] Etapa 4: Depois que a mistura resfriou, 0,3 mL de Na₂CO₃(2 M) são lentamente adicionados a cada ponto da curva padrão e também na amostra para neutralizar a solução. Este processo produz grande formação de bolhas e deve ser realizado cuidadosamente.

[0106] Etapa 5: Depois da neutralização, a glicose livre obtida a partir da hidrólise do glicogênio dos padrões (S1-S4) e da amostra é determinada usando kit de glicose-oxidase comercial. Para isso, uma alíquota de 40 µL da amostra (ou da curva padrão) é incubada com a enzima reagente por 5 min a 37°C. A absorbância é lida a 505 nm.

[0107] Cálculo do glicogênio

[0108] O número de plaquetas no PC é usado no cálculo do glicogênio. A equação usada para calcular a quantidade de glicogênio está indicada conforme a seguir (equação 1):

$$G = \frac{\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{G_{sn}}{Abs_{sn}} \right) \times Abs_e \times V}{N} \times 10^6$$

Equação 1

[0109] onde, na Equação 1, G=glicogênio (µg.10⁻⁶plaquetas); G_s=concentração do padrão de glicogênio (µg.mL⁻¹); Abs_s=absorbância do padrão de glicose; Abs_e=absorbância da glicose da amostra; V=volume total de glicogênio da amostra; N=número total de plaquetas.

[0110] Exemplo 12: Quantificação do ATP total de monocamadas de plaquetas humanas

[0111] As plaquetas são obtidas segundo o exemplo 1. Os parâmetros plaquetários VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no PC com uso de analisador hematológico. Uma densidade determinada de plaquetas é transferida para um poço de uma placa de 96 poços em um volume de 50 µL de tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C. É acrescentado um volume de 100 µL de tampão Tris-citrato (pH 6,5) à 4°C. Após 4 h a temperatura ambiente

o meio é substituído por tampão de lise para extração do ATP citosólico (figura 15). A quantificação do ATP total utiliza Kit comercial bioluminescente (Exemplo: Kit ATP Determination Invitrogen, A22066) ou outra técnica comercial de detecção.

[0112] Tampão de lise: PBS (pH 7,8); azida sódica (2 mM); Triton-X 100 (1%). Pode ser utilizado produto comercial.

[0113] Exemplo 13: Efeito de fármaco sobre o ATP total de monocamadas de plaquetas humanas

[0114] As plaquetas são obtidas segundo o exemplo 1. Os parâmetros plaquetários VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no PC com uso de analisador hematológico. Uma densidade de $20 \cdot 10^6$ plaquetas é transferida para um poço de uma placa de 96 poços em um volume de 50 μ L de tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C. É acrescentado um volume de 100 μ L de tampão Tris-citrato (pH 6,5) à 4°C. O fármaco foi diluído em Tris-citrato (pH 6,5). Após 24 h a temperatura ambiente o meio é substituído por tampão de lise para extração do ATP citosólico (figura 16). A quantificação do ATP total utiliza Kit comercial bioluminescente (ex. Kit ATP Determination Invitrogen, A22066) ou outra técnica comercial de detecção.

[0115] Tampão de lise: PBS (pH 7,8); azida sódica (2 mM); Triton-X 100 (1%). Pode ser utilizado produto comercial.

[0116] Exemplo 14: Determinação de secreção protéica de monocamadas de plaquetas humanas

[0117] As plaquetas são obtidas segundo o exemplo 1. Os parâmetros plaquetários VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no PC com uso de analisador hematológico. Uma densidade de $20 \cdot 10^6$ plaquetas é transferida para um poço de uma placa de 96 poços em um volume de 50 μ L de tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C. É acrescentado um volume de 100 μ L de tampão Tris-citrato (pH 6,5) à 4°C. Após 4 h (ou tempo superior) a temperatura ambiente uma alíquota do meio é retirada para determinação do BDNF liberado (figura 17).

[0118] Observação: no caso de adição de fármaco o mesmo deve ser diluído em Tris-citrato (pH 6,5). Os níveis de BDNF no sobrenadante foram medidos com o kit ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor Sandwich ELISA kit (Millipore, USA) seguindo as instruções do fabricante, entretanto, também pode ser utilizado outro kit comercial. Todas as medidas foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços e uma curva padrão foi calculada para cada experimento. Na determinação do BDNF, as amostras dos sobrenadantes foram diluídas 1:16 em PBS (pH 7,4). A densidade óptica de cada poço foi medida usando um leitor de microplaca (EZ Read 400, Biochrom, UK) em 450 nm e os dados foram analisados com o software Galapagos (Biochrom, UK).

[0119] Exemplo 15: Efeito de fármaco sobre a secreção protéica de monocamadas de plaquetas humanas

[0120] As plaquetas são obtidas segundo o exemplo 1. Os parâmetros plaquetários VPM, PDW, PCT e PLT são determinados no PC com uso de analisador hematológico. Uma densidade de $20 \cdot 10^6$ plaquetas é transferida para um poço de uma placa de 96 poços em um volume de 50 μ L de tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C. É acrescentado um volume de 100 μ L de tampão Tris-citrato (pH 6,5) à 4°C.

[0121] Observação: O fármaco riluzole foi diluído em Tris-citrato (pH 6,5). Após 4 h a temperatura ambiente uma alíquota do meio é retirada para determinação do BDNF liberado (figura 18). Os níveis de BDNF no sobrenadante foram medidos com o kit ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor Sandwich ELISA kit (Millipore, USA) seguindo as instruções do fabricante, entretanto, também pode ser utilizado outro kit comercial. Todas as medidas foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços e uma curva padrão foi calculada para cada experimento. Na determinação do BDNF, as amostras dos sobrenadantes foram diluídas 1:16 em PBS (pH 7,4). A densidade óptica de cada poço foi medida usando um

leitor de microplaca (EZ Read 400, Biochrom, UK) em 450 nm e os dados foram analisados com o software Galapagos (Biochrom, UK).

[0122] Desse modo, os exemplos de concretização da invenção acima descritos comprovam o uso de plaquetas em um processo de avaliação *in vitro* de substância química e/ou biológica sendo, portanto, totalmente factível a aplicação da presente invenção para qualquer fármaco/molécula bioativa (não se limitando apenas a neurofármacos) e, ainda, para qualquer teste de comparação de eficácia e equivalência de medicamentos (por exemplo, comparação entre medicamento genérico e um medicamento referência).

[0123] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. USO DE PLAQUETAS, PROCESSO DE DETECÇÃO E/OU DE RASTREAMENTO, KIT DE DETECÇÃO E/OU DE RASTREAMENTO **caracterizado** por ser em um processo de avaliação *in vitro* de substância química e/ou biológica, sendo que as ditas plaquetas estão dispostas em monocamada.
2. USO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela substância química e/ou biológica ser uma substância farmacologicamente ativa.
3. USO, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pela substância farmacologicamente ativa ser de ação no sistema nervoso central e/ou periférico.
4. PROCESSO DE DETECÇÃO E/OU DE RASTREAMENTO *in vitro* de substância química e/ou biológica **caracterizado** por compreender a etapa de contatar pelo menos uma substância química e/ou biológica com uma cultura de plaquetas em monocamada *in vitro*.
5. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pela substância química e/ou biológica ser uma substância farmacologicamente ativa.
6. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pela substância farmacologicamente ativa ser de ação no sistema nervoso central e/ou periférico.
7. KIT DE DETECÇÃO E/OU DE RASTREAMENTO *in vitro* de substância química e/ou biológica **caracterizado** por compreender:
 - a) pelo menos uma cultura de plaquetas em monocamada: e
 - b) pelo menos um meio para contatar a substância química e/ou biológica com a cultura de plaquetas em monocamada.
8. KIT, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pela substância química e/ou biológica ser uma substância farmacologicamente ativa.
9. KIT, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pela substância farmacologicamente ativa ser de ação no sistema nervoso central e/ou periférico.

FIGURAS

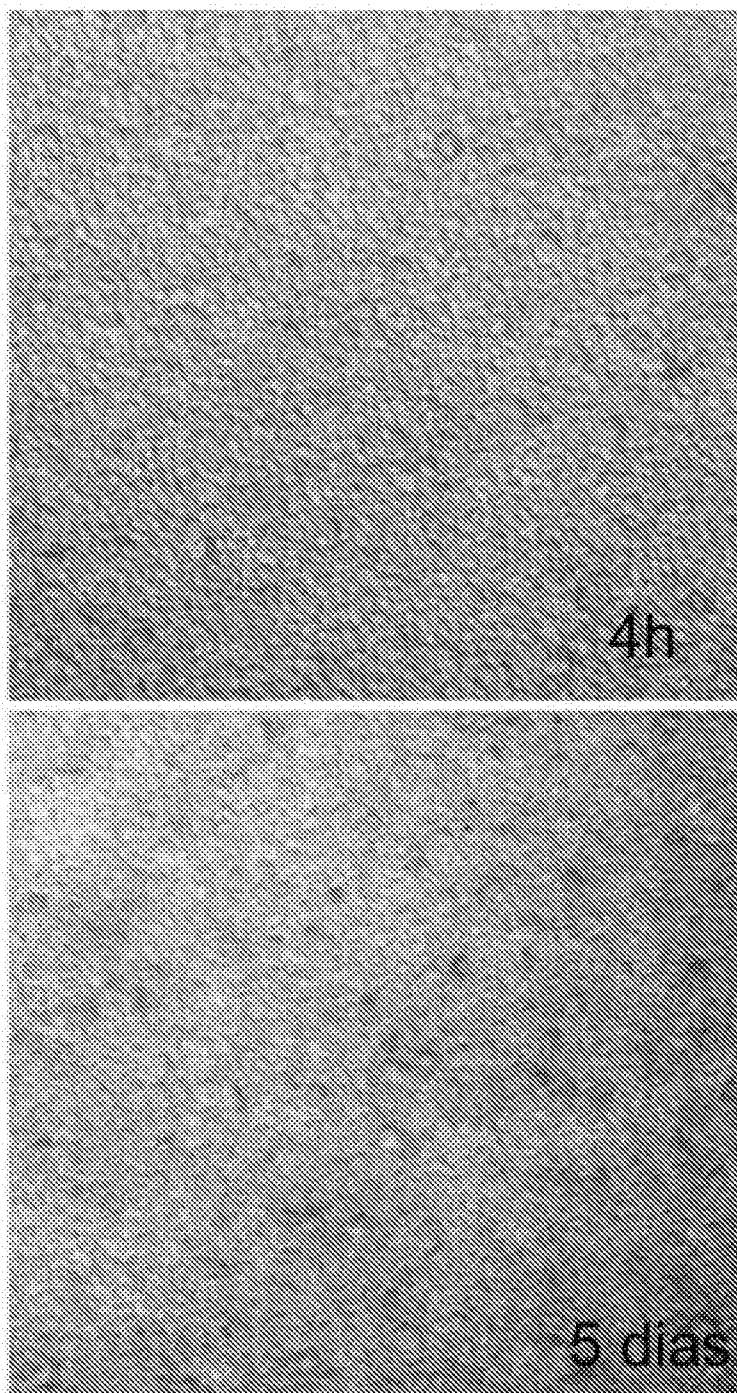


Figura 1

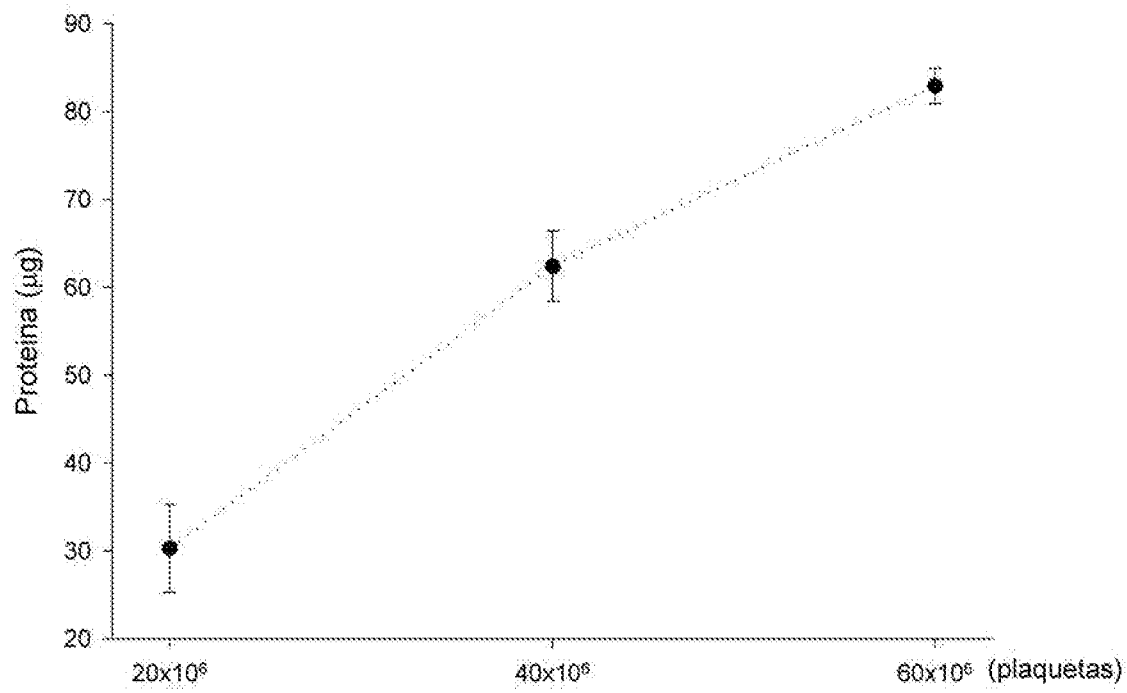


Figura 2

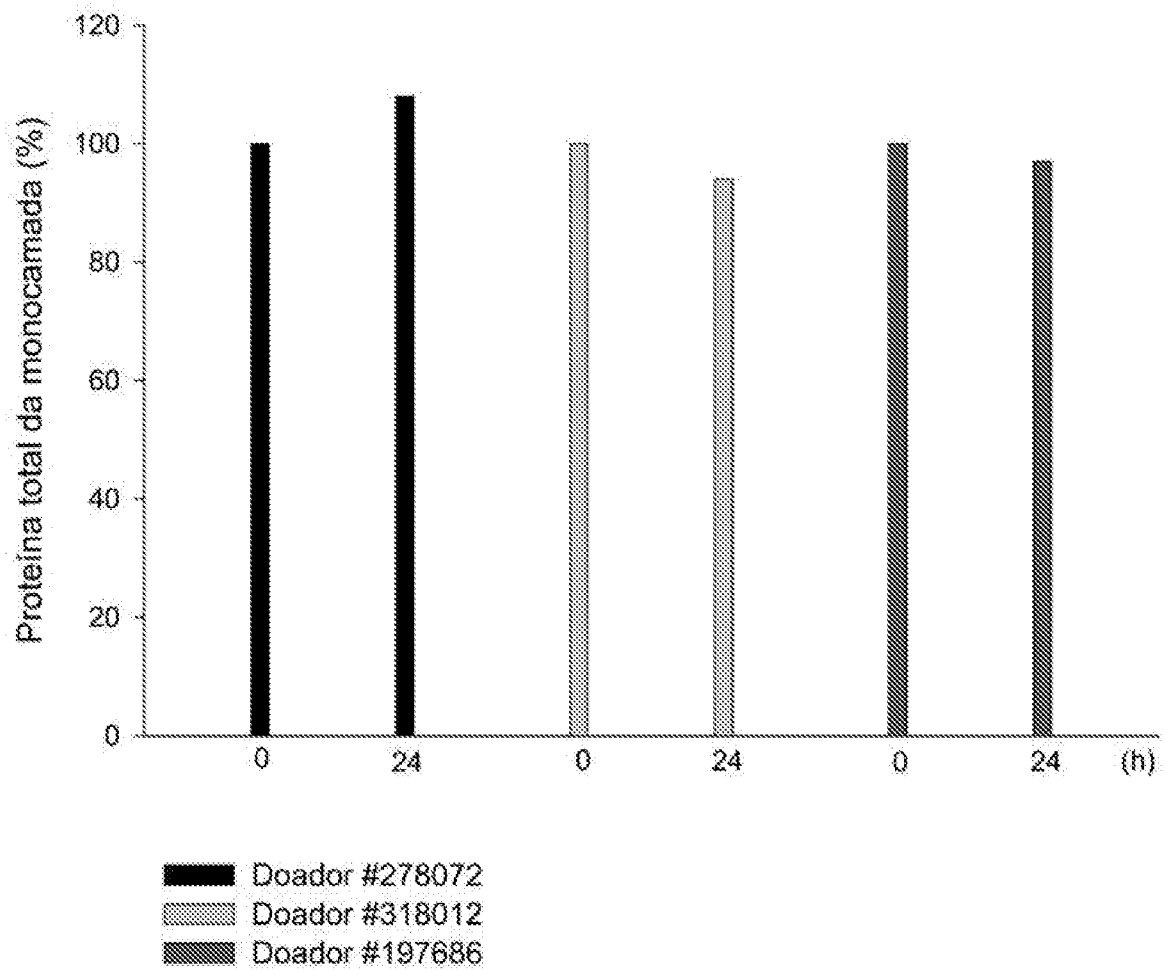


Figura 3

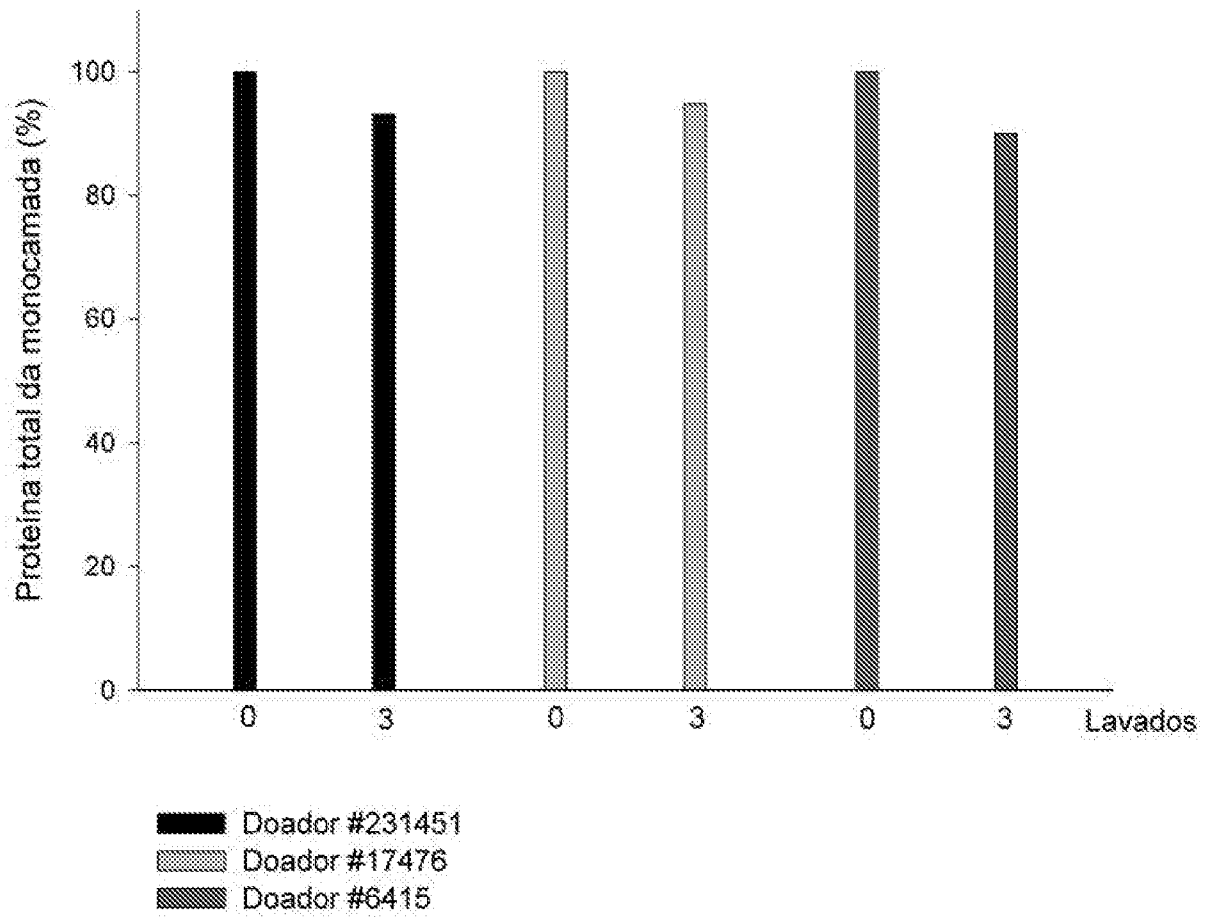


Figura 4

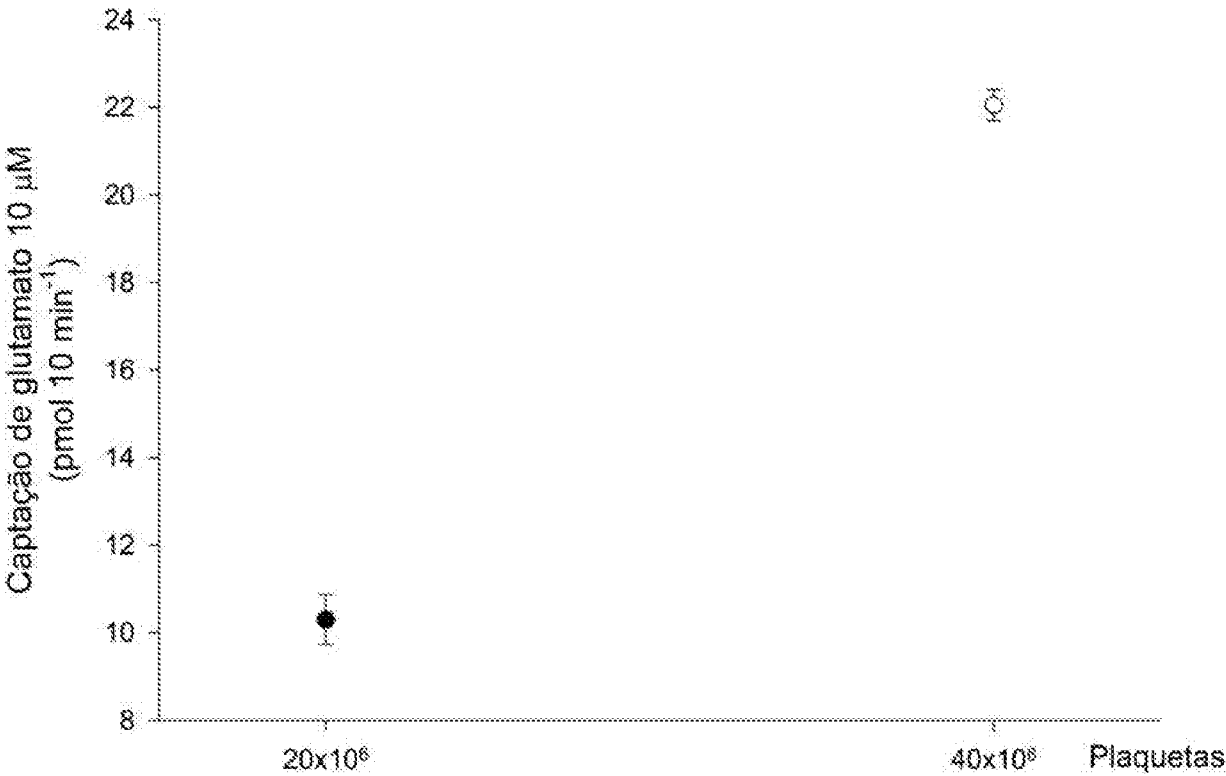


Figura 5

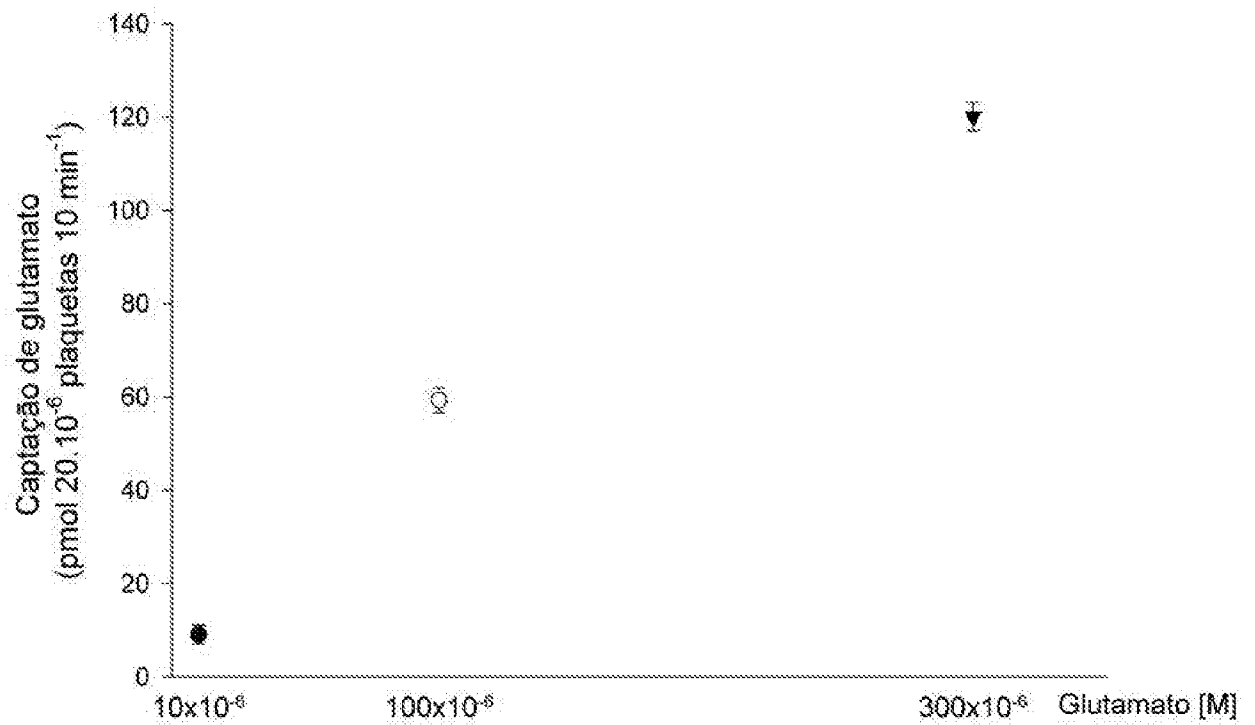


Figura 6

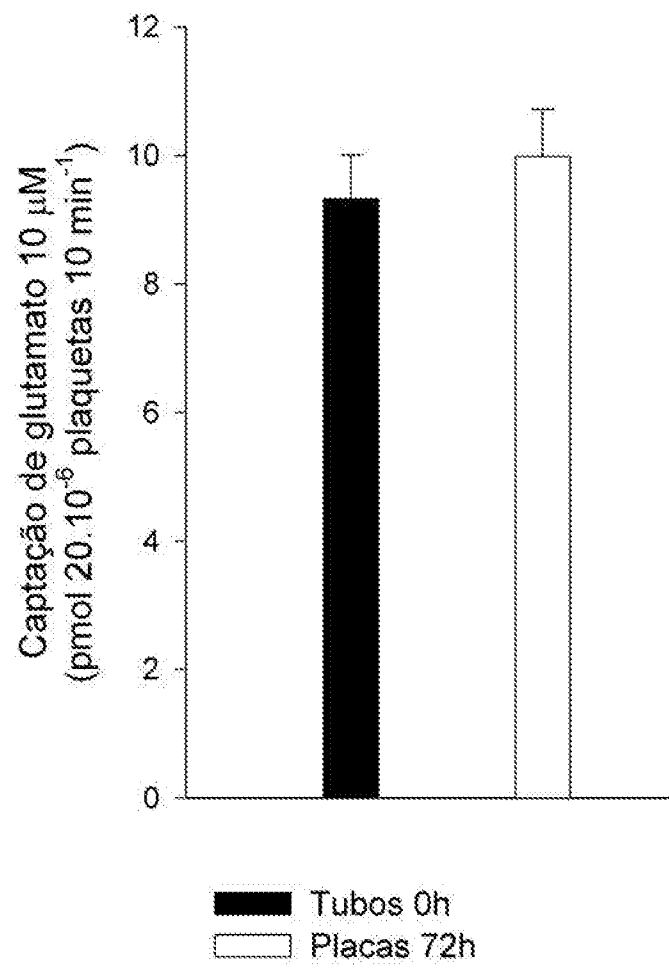


Figura 7

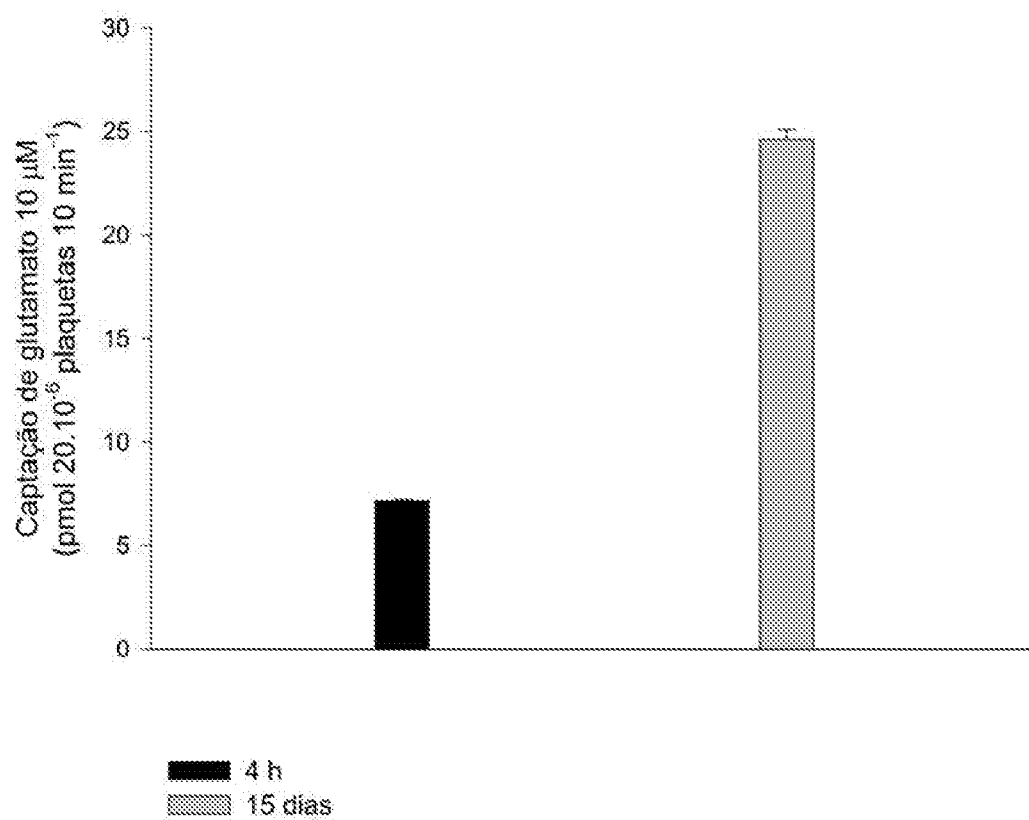


Figura 8

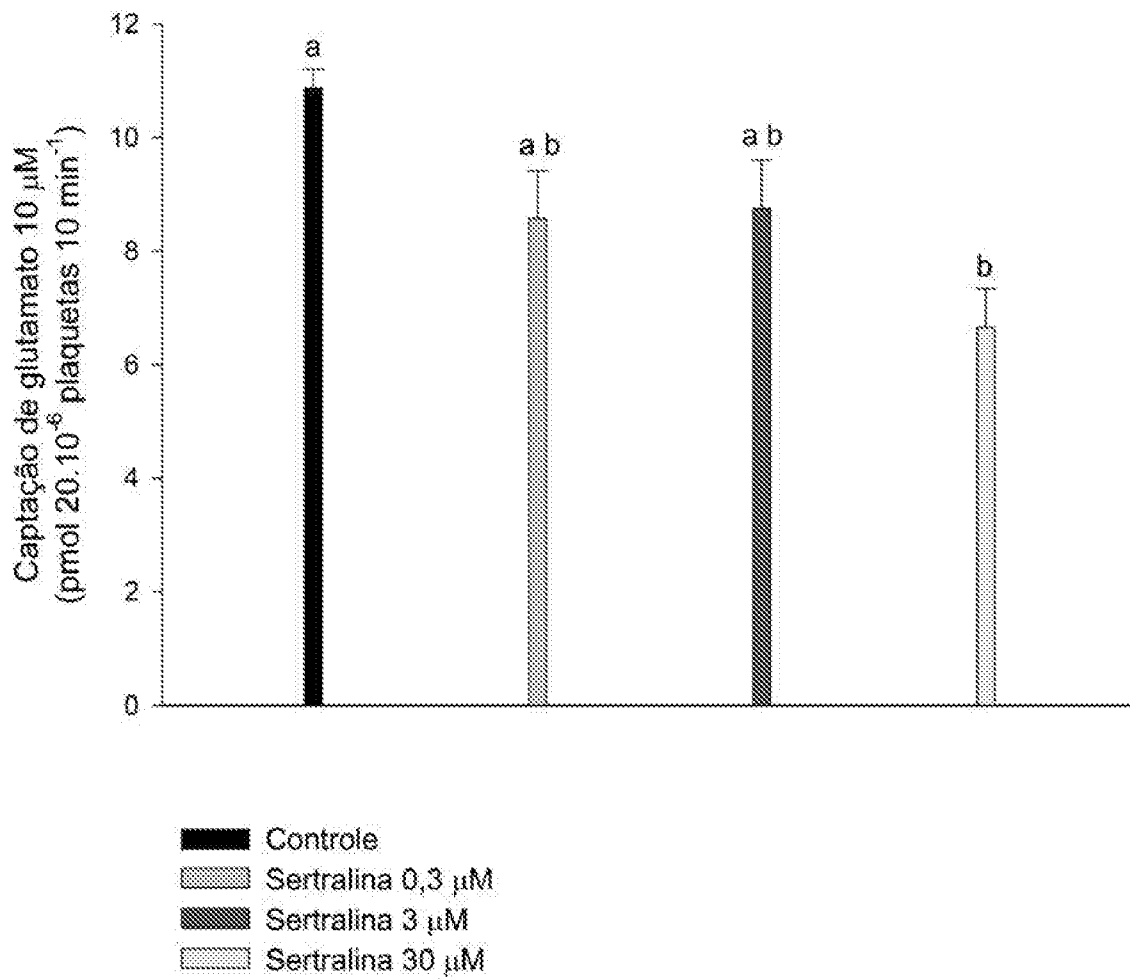


Figura 9

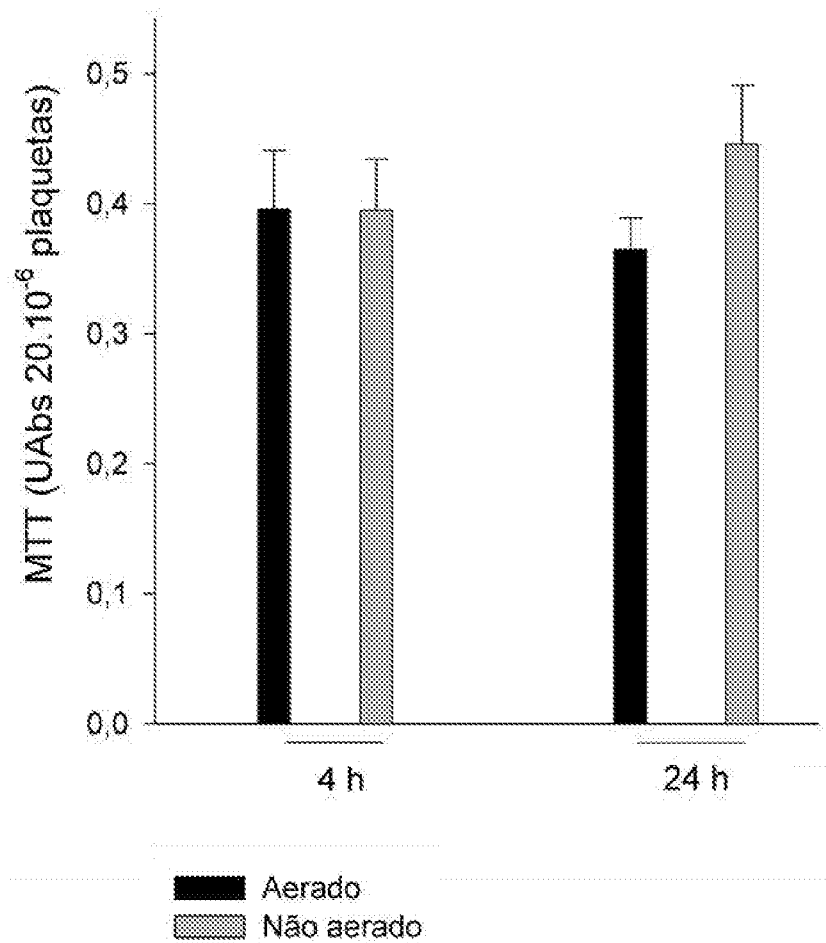


Figura 10

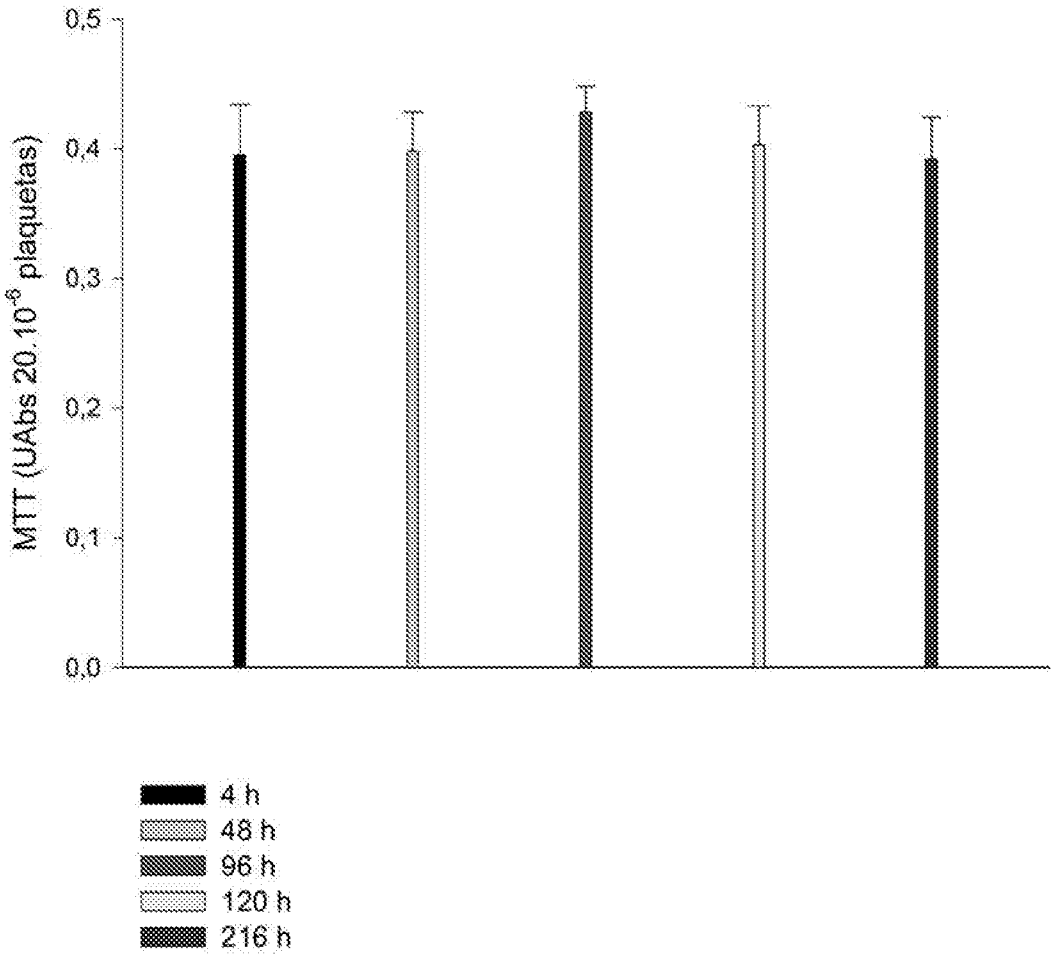


Figura 11

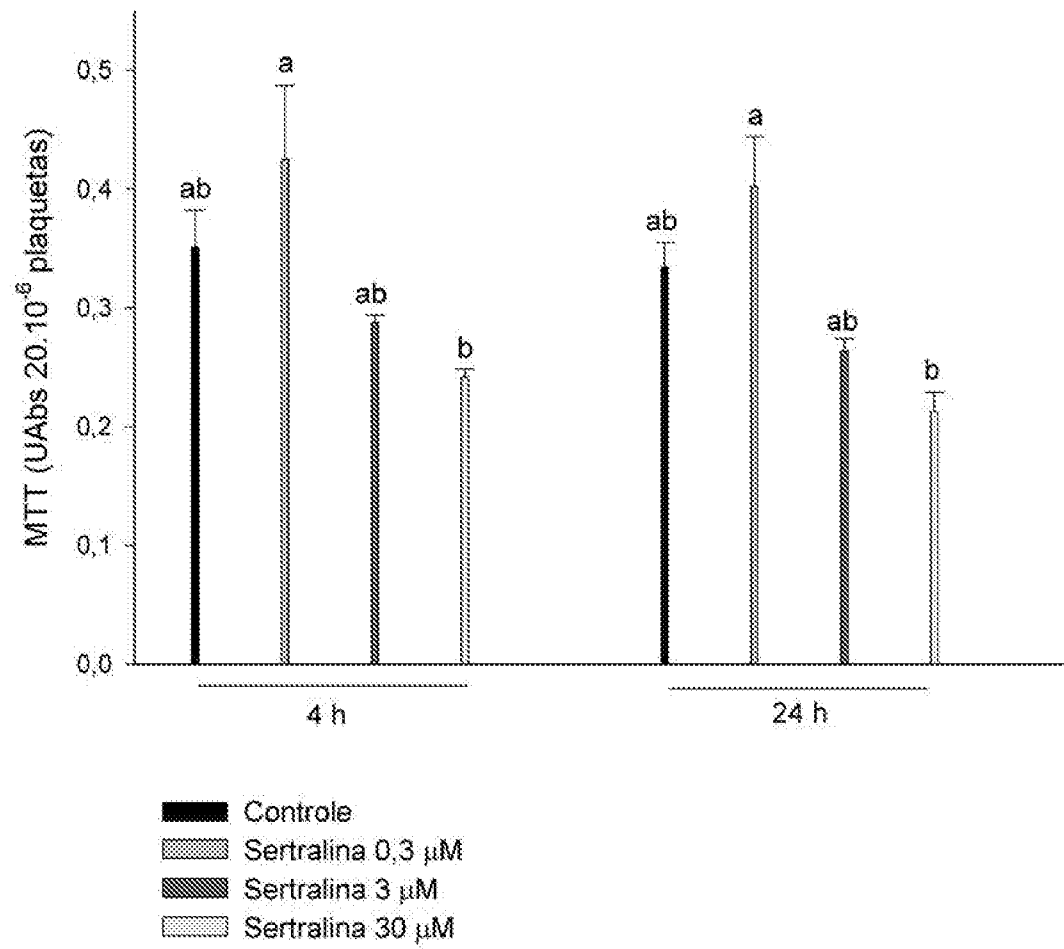


Figura 12

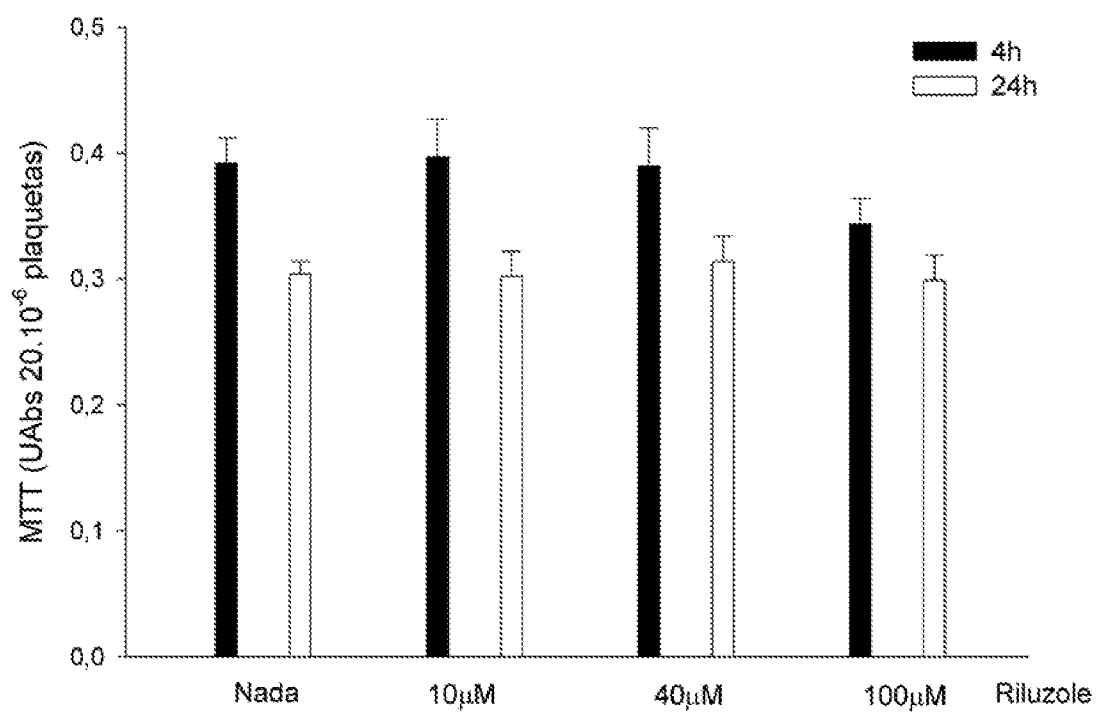


Figura 13

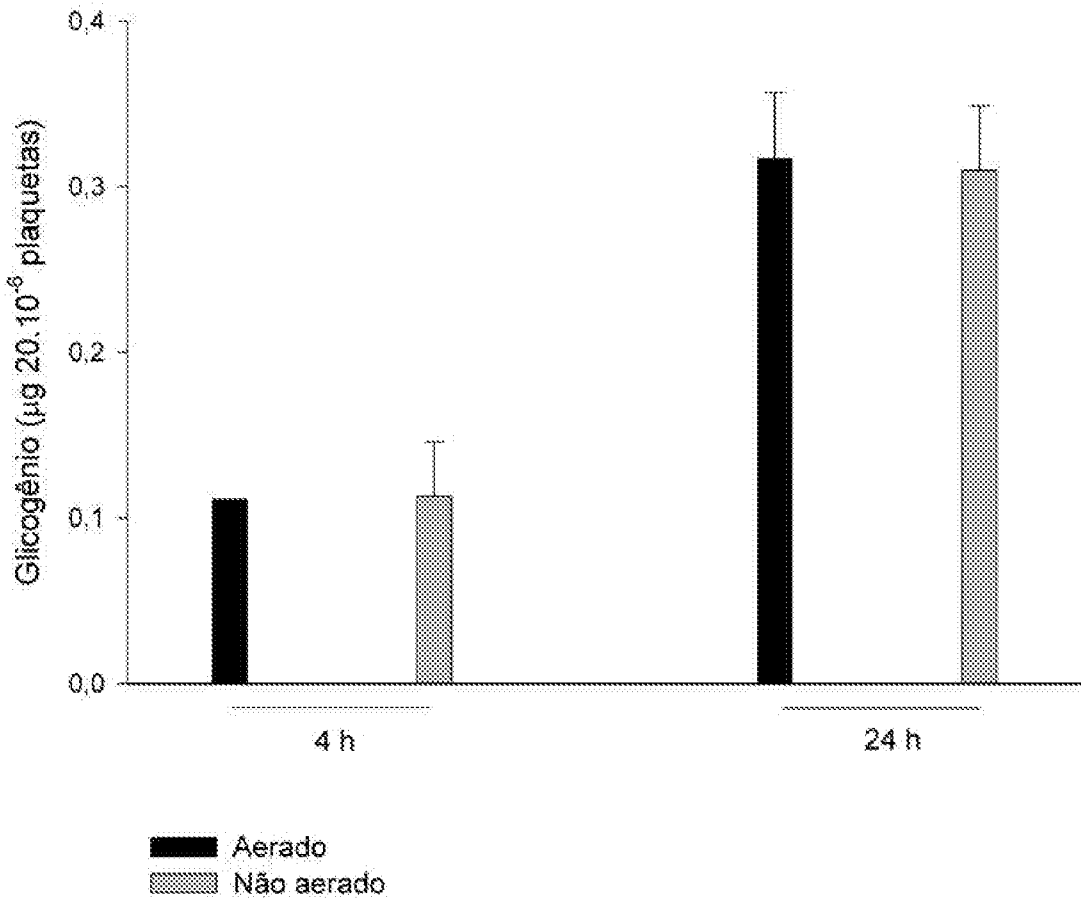


Figura 14

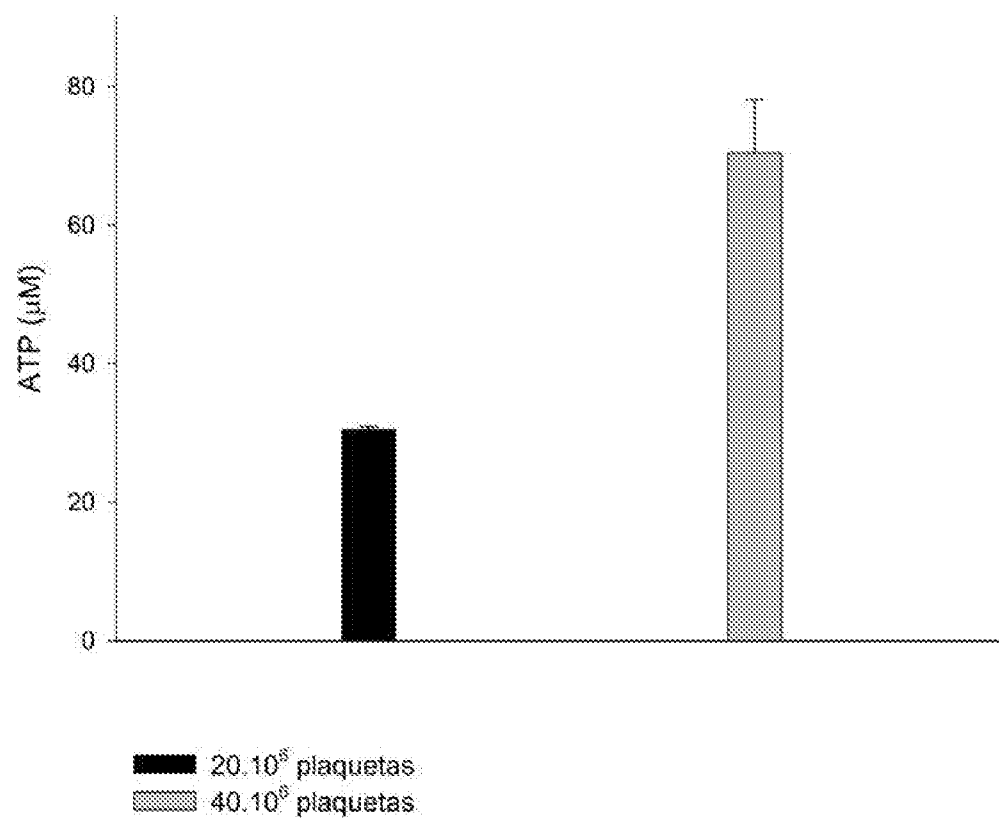


Figura 15

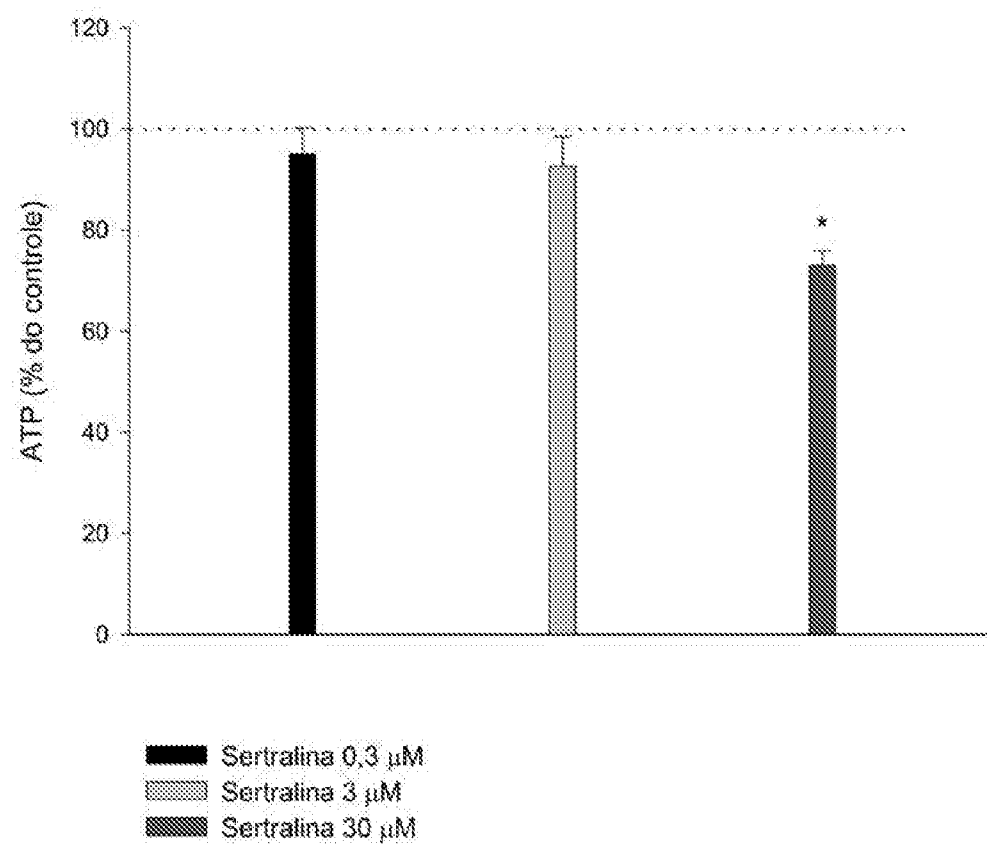


Figura 16

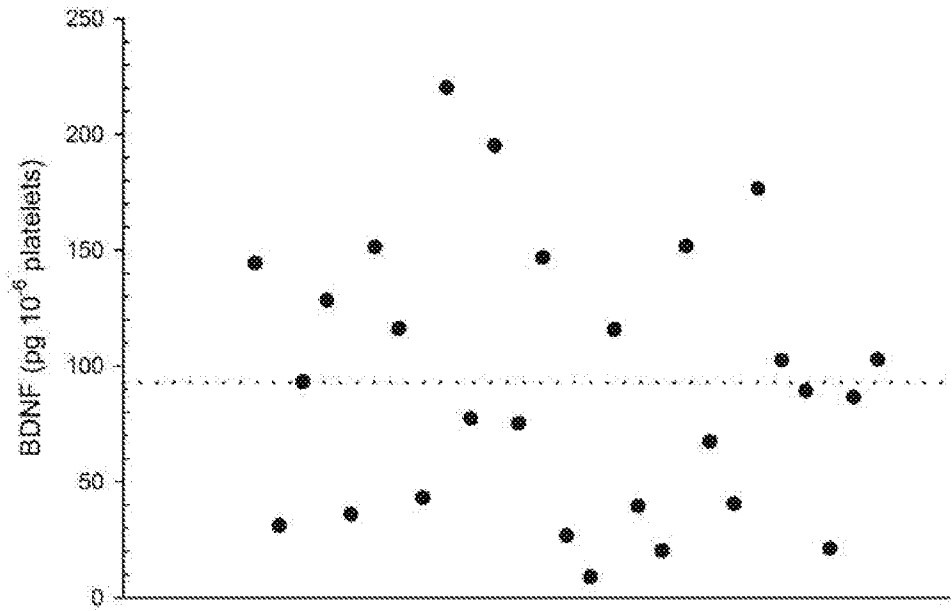


Figura 17

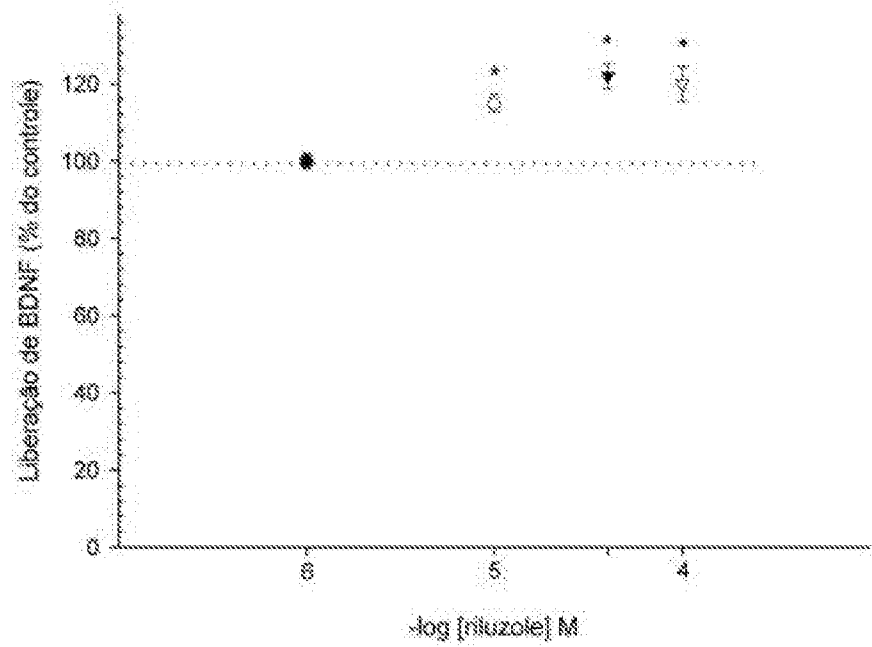


Figura 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2016/050119

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/02 (2006.01), G01N 33/15 (2006.01), G01N 33/48 (2006.01), C12N 5/078 (2010.01),

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

GOOGLE, Base de patentes do INPI-BR (SINPI)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**NPL, MEDLINE, EPODOC, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE
TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPEB, TXPES, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB,
TXPWOEA, XP3GPP, XPIETF, XPIPCOM, XPJPEG, XPMISC, XPOAC, XPTK, PUBCOMP, PUBSUBS, TDB.**

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	HORAI, S. <i>et al.</i> Detection of platelet antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on artificial monolayers of platelets. Immunol Lett. 1981. Vol. 3, No. 2, pages 67-72. PMID: 7262916. abstract, sub-items 3.2, 3.3 e 3.4.	1, 4, 7 2, 3, 5, 6, 8 e 9
X Y	TURCK, P. & FRIZZO, M. E. Riluzole Stimulates BDNF Release from Human Platelets. BioMed Research International. January 2015 Vol. 2015, Article ID 189307, 6 pages doi:10.1155/2015/189307. abstract, sub-items 2.2 a 2.4.	1 a 3 4 a 9
P, X P, Y	RODRIGUES, D. O. <i>et al.</i> Sertraline Reduces Glutamate Uptake In Human Platelets. Neurotoxicology. October 2015. Vol. 51, pages : 192-197. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.10.014 abstract, sub-items 2.2.	1 a 3 4 a 9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20/10/2016

Date of mailing of the international search report

01/11/2016

Name and mailing address of the ISA/

**INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua Sao Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ**

Facsimile No.

Authorized officer

Flávia Riso Rocha

Telephone No.

+55 21 3037-3493/3742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2016/050119

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ELZAGALLAI, A. A. <i>et al.</i> The <i>In Vitro</i> Platelet Toxicity Assay (IPTA): A Novel Approach for Assessment of Drug Hypersensitivity Syndrome. The Journal of Clinical Pharmacology. 2011. Vol. 51, pages 428-435. doi:10.1177/0091270010365554. First and second paragraphs of page 429, page 430, figure 2	1 a 3 4 a 9
X Y	EP 1962091 A1 (AMERICAN DIAGNOSTICA INC [US]) 27 agosto 2008 (2008-08-27) Abstract, examples 8 and 15.	1, 4, 7 2, 3, 5, 6, 8 e 9
Y	MANGANO, R. M & SCHWARCZ, R. The human platelet as a model for the glutamatergic neuron: platelet uptake of L-glutamate. J Neurochem. 1981. Vol, 36, No. 3, páginas 1067-76. PMID: 7205257. Cited in the description. Abstract, section "Materials and methods", last paragraph of section "discussion", table 5.	1 a 9
Y	HOCHSTRASSER, T. <i>et al.</i> Antidepressants and anti-inflammatory drugs differentially reduce the release of NGF and BDNF from rat platelets. Pharmacopsychiatry. 2013. Vol. 46, No.1, pages 29-34. doi: 10.1055/s-0032-1314843. Abstract, section "Materials and methods"	1 a 9
A	FRIZZO, M. E. Putative role of glycogen as a peripheral biomarker of GSK3 β activity. Medical Hypotheses. 2013. Vol. 81, No. 3, pages : 376-378, ISSN 0306-9877.	1 a 9
A	US 6087118 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]) 11 July 2000 (11.07.2000) Cited in the description.	1 a 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2016/050119

EP 1962091 A1	2008-08-27	EP 1962091 B1	08/12/10
		AT 441860 T	2009-09-15
		AT 491155 T	2010-12-15
		DE 602005016420 D1	2009-10-15
		DE 602008003850 D1	2011-01-20
		EP 1774327 A2	2007-04-18
		ES 2335022 T3	2010-03-18
		US 2006014233 A1	2006-01-19
		US 7270976 B2	2007-09-18
		US 2006073535 A1	2006-04-06
		US 2008138837 A1	2008-06-12
		WO 2006019431 A2	2006-02-23
-----	-----	-----	-----
US 6087118 A	2000-07-11	NONE	
-----	-----	-----	-----

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

C12Q 1/02 (2006.01), G01N 33/15 (2006.01), G01N 33/48 (2006.01), C12N 5/078 (2010.01),

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C12Q, G01N

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

GOOGLE, Base de patentes do INPI-BR (SINPI)

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

NPL, MEDLINE, EPODOC, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE (continua em folha suplementar)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X Y	HORAI, S. <i>et al.</i> Detection of platelet antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on artificial monolayers of platelets. Immunol Lett. 1981. Vol. 3, No. 2, páginas 67-72. PMID: 7262916. Resumo, subitens 3.2, 3.3 e 3.4.	1, 4, 7 2, 3, 5, 6, 8 e 9
X Y	TURCK, P. & FRIZZO, M. E. Riluzole Stimulates BDNF Release from Human Platelets. BioMed Research International. Janeiro de 2015. Vol. 2015, Article ID 189307, 6 páginas. doi:10.1155/2015/189307. Resumo, subitens 2.2 a 2.4.	1 a 3 4 a 9
P, X P, Y	RODRIGUES, D. O. <i>et al.</i> Sertraline Reduces Glutamate Uptake In Human Platelets. Neurotoxicology. Outubro de 2015. Vol. 51, páginas: 192-197. http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.10.014. Resumo, subitem 2.2.	1 a 3 4 a 9

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C☒ Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

“A” documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

“E” pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

“L” documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

“O” documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

“P” documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

“T” documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

“X” documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

“Y” documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

“&” documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

20/10/2016

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

01/11/2016

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua São Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

Nº de fax:

+55 21 3037-3663

Funcionário autorizado

Flávia Riso Rocha

Nº de telefone:

+55 21 3037-3493/3742

Quadro Suplementar

No caso do espaço em qualquer quadro precedente não for suficiente.

Continuação de: base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional.

TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPEPEA, TXPEPEB, TXPES, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, XP3GPP, XPIETF, XPIPCOM, XPJPEG, XPMISC, XPOAC, XPTK, PUBCOMP, PUBSUBS, TDB.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

[illegible]

Depósito internacional Nº

PCT/BR2016/050119

Formulário PCT/ISA/210 (anexo da família de patentes) (Julho 2009)