



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

(11) PI 0919036-8 B1



(22) Data do Depósito: 25/09/2009

(45) Data de Concessão: 17/11/2020

(54) Título: MÉTODO PARA ORIENTAÇÃO MAGNÉTICA

(51) Int.Cl.: C12N 15/10; C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 25/09/2008 US 61/099,966.

(73) Titular(es): WILLIAM MARSH RICE UNIVERSITY.

(72) Inventor(es): GLAUCO R. SOUZA; RENATA PASQUALINI; WADIH ARAP; THOMAS CHARLES KILLIAN; ROBERT M. RAPHAEL; DANIEL JOSHUA STARK.

(86) Pedido PCT: PCT US2009058473 de 25/09/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/036957 de 01/04/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/03/2011

(57) Resumo: SISTEMAS E MÉTODOS PARA ORIENTAÇÃO MAGNÉTICA E PADRONIZAÇÃO DE CÉLULAS E MATERIAIS. Sistema e métodos geralmente úteis na medicina são revelados, além da biologia celular, nanotecnologia e cultura de células. Especificamente, pelo menos em algumas concretizações, são revelados sistemas e métodos para orientação magnética e padronização das células e materiais. Algumas aplicações específicas destes sistemas e métodos podem incluir cultura de células levitadas afastadas de uma superfície, padrão de fabricação e manipulação das células levitadas além da padronização da cultura das células sobre uma superfície. Um método de cultura de células é apresentado de forma específica. O método pode compreender provisão de várias células, provisão de um campo magnético e levitação e pelo menos algumas das várias células no campo magnético, onde as várias células compreendem nanopartículas magnéticas. O método pode compreender também a manutenção da levitação por um tempo suficiente para permitir o desenvolvimento da célula, de modo a formar um conjunto.

“MÉTODO PARA ORIENTAÇÃO MAGNÉTICA”

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS CORRELATOS

[001]Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório US número de série 61/099.966, depositado em 25 de setembro de 2008 que é incorporado ao presente documento como referência.

DEFINIÇÕES

[002]“Padrão” conforme empregado no presente documento, se refere a uma forma pré-definida, posição, local e/ou orientação tanto em duas quanto em três dimensões.

[003]“Manipula” conforme empregada no presente documento se refere à variação de um padrão com o passar do tempo.

[004]“Nanopartículas,” conforme empregadas no presente documento se referem às partículas com faixas de tamanho geralmente de 0,1 nm a cerca de 100 micra; em algumas modalidades, nanopartículas eu possuem faixas de tamanho de cerca de 5 a cerca de 200 nm.

[005]“Conjunto” conforme empregado no presente documento se refere a um grupamento de uma ou mais células e qualquer matriz extracelular ou outra substância que tenha tendência a permanecer em proximidade com o grupamento.

[006] “Nanopartículas magnéticas,” conforme empregadas no presente documento se referem às nanopartículas nas quais a magnetização em saturação é pelo menos de cerca de 0.001 emu/g; em algumas modalidades, a magnetização em saturação pode estar entre cerca de 10 a 200 emu/g.

[007]“Hidrogel,” conforme empregado no presente documento se refere a um material formado por incorporação de qualquer tipo de bacteriófago (também referido como “fago”) com nanopartículas. Variedades diferentes de hidrogéis podem ser indicadas com níveis diferentes de especificidade. Fago Au pode ser a forma mais comum referindo-se a qualquer tipo de fago e qualquer combinação de nanopartículas, pelo

menos um tipo sendo Au. Fago Au-X especifica que a nanopartícula descrita por X também está presente. Variedades de fago específicas também podem ser especificadas.

[008]“Fago Au-MIO” conforme empregado no presente documento se refere a um material formado por incorporação de qualquer tipo de bacteriófago com nanopartículas, pelo menos um tipo sendo Au e um tipo do mesmo sendo magnético.

[009]“Cultura de célula” conforme empregado no presente documento se refere de modo geral às células em crescimento em um ambiente controlado. Em muitos casos, o ambiente controlado é um ambiente artificial, laboratorial, algumas vezes referido como ambiente in vitro.

[0010]Conforme empregado no presente documento, o termo “alterado em resposta ao campo magnético” e seus derivados incluem qualquer resposta dos sistemas da presente revelação ao campo magnético, incluindo, porém não limitado a, alterações de forma, tamanho, posição, ambiente químico, orientação de moléculas e/ou células, bem como eventos celulares (nas modalidades dos sistemas e métodos da presente revelação nas quais os sistemas e métodos compreendem uma ou mais células) tais como, porém não limitados a expressão gênica, transdução de sinal, alterações de forma, posição, orientação, e/ou ambiente químico local das células. Outras respostas dos sistemas da presente revelação aos campos magnéticos podem ser reconhecidas por um versado na técnica. Tais respostas são consideradas como estando dentro do espírito da presente revelação.

[0011]Se houver qualquer conflito de emprego de uma palavra ou termo neste relatório descritivo e uma ou mais patentes ou outros documentos que possam ser incorporados ao presente documento como referência, as definições que são consistentes com o relatório descritivo devem ser adotadas para fins de entendimento da revelação.

ANTECEDENTES

[0012]A presente revelação se refere aos sistemas e métodos úteis na medicina, biologia celular, nanotecnologia e cultura de células. Especificamente, pelo menos em algumas modalidades, a presente revelação se refere aos sistemas e métodos para orientação magnética e padronização de células e materiais. Algumas aplicações específicas destes sistemas e métodos são cultura de células levitadas fora de uma superfície, fabricação e manipulação de padrões de células levitadas e cultura padronizada das células sobre uma superfície.

[0013]Uma vez que o interesse na nanotecnologia, materiais e biologia celular vem aumentando, se tornou evidente que uma limitação é a capacidade de controlar e manipular o padrão das células e materiais que são úteis para biologia celular e medicina (tais como, cultura de célula, construção de tecidos, pesquisa de célula tronco, distribuição de medicamentos e nanopartículas, biossensores e distribuição gênica), molecular e bioeletrônica e a construção de materiais complexos.

[0014]Durante o desenvolvimento dos organismos vivos, a estrutura e a ordem na forma de padrão naturalmente emergem através dos mecanismos que ainda não estão completamente entendidos. Quando se deseja estudar ou replicar tecido vivo em um ambiente artificial é importante ser capaz de reproduzir o padrão natural. A capacidade de construir e controlar manualmente o padrão das células vivas, especialmente em três dimensões e sobre superfícies, permitirá muitas aplicações na bioengenharia e medicina.

[0015]A cultura de célula é uma ferramenta essencial em muitas áreas da biotecnologia, tal como pesquisa de células tronco, construção de tecidos e descoberta de medicamentos. A cultura tradicional da célula em placas de Petri produz o desenvolvimento bidimensional (2D) da célula com expressão gênica, sinalização e morfologia que podem diferir das condições nos organismos vivos e assim comprometer a revelação clínica. Determinadas limitações da cultura de célula tradicional na recapitulação dos atributos dos tecidos em organismos vivos pode resultar de sua natureza

em 2D Embora bioreatores de rotação e ambientes de gel à base de proteína tenham sido desenvolvidos na tentativa de permitir cultivo tridimensional (3D) da célula, uma ampla aplicação de tais métodos foi severamente impedida em razão dos altos custos ou complexidade. Assim, uma tecnologia de plataforma para permitir cultivo em 3D da célula ainda é uma necessidade não satisfeita.

[0016]Em muitos casos, um ambiente de cultura de célula ideal é um que promova o crescimento rápido e robusto de células saudáveis, onde a morfologia celular e função são dominadas por interações de célula-célula, sinalização específica para célula e/ou variáveis de controle experimental, ao invés das propriedades do meio de cultura artificial. Frequentemente é desejável desenvolver células que lembrem substancialmente de todo modo, as células crescidas nos organismos vivos, incluindo expressão gênica, características funcionais de células diferenciadas e a formação de uma matriz extracelular. O custo e programação da produção são também considerações importantes até o potencial de aplicação de tais tecnologias.

[0017]Adicionalmente, como o emprego de materiais nanodimensionados e células cultivadas continua a se desenvolver, é muito difícil o desenvolvimento de sistemas para manipular de forma segura estas entidades. Por exemplo, agências reguladoras e boas práticas laboratoriais frequentemente tentam minimizar a quantidade de exposição de materiais aos objetos externos, de modo a minimizar a contaminação. Aparte de tais práticas, a integridade de tais materiais pode ser comprometida por tal exposição. Assim, os dispositivos que podem manipular materiais nanodimensionados e células e tecidos sem exposição aos objetos externos são desejáveis.

[0018]Os aspectos e vantagens da presente revelação ficarão claros aos versados na técnica quando da leitura da descrição das modalidades que se seguem.

SUMÁRIO

[0019]A presente revelação se refere, de modo geral, aos sistemas e métodos úteis na medicina, biologia celular, nanotecnologia e cultura de células.

Especificamente, pelo menos em algumas modalidades, a presente revelação se refere aos sistemas e métodos para orientação magnética e padronização de células e materiais. Algumas aplicações específicas destes sistemas e métodos são a cultura de células levitadas fora de uma superfície, fabricação e manipulação de padrões das células levitadas e padronização do cultivo das células sobre uma superfície.

[0020]A presente revelação fornece, em determinadas modalidades, um método para levitação de várias células. O método pode compreender provisão de um campo magnético. O método pode compreender também levitação de pelo menos algumas das várias células no campo magnético, onde as várias células compreendem nanopartículas magnéticas.

[0021]A presente revelação também provê, em algumas modalidades, um método para cultivo das células. O método pode compreender provisão de várias células. O método pode compreender também provisão de um campo magnético. O método pode compreender também levitação de pelo menos algumas das várias células no campo magnético, onde as várias células compreendem nanopartículas magnéticas. O método pode compreender também manutenção da levitação por um tempo suficiente para permitir o crescimento celular para formar um conjunto.

[0022]A presente revelação também provê, em outras modalidades, um método para manipulação de células. O método pode compreender provisão das primeiras várias células. O método pode compreender também provisão de um campo magnético. O método pode compreender também levitação de pelo menos algumas das primeiras várias células no campo magnético, onde as primeiras várias células compreendem nanopartículas magnéticas. O método pode compreender também variação do campo magnético com o passar do tempo, de modo a manipular pelo menos uma primeira porção das primeiras várias células.

[0023]A presente revelação também provê, nas modalidades específicas, um método para preparação de nanopartículas. O método pode compreender

fornecimento de um hidrogel compreendendo nanopartículas magnéticas. O método pode compreender também provisão de um campo magnético. O método pode compreender também a sujeição do hidrogel ao campo magnético.

[0024]A presente revelação também provê, ainda em outras modalidades, um sistema para levitação de várias células. O sistema pode compreender um campo magnético. O sistema pode também compreender as várias células, onde as várias células são dispostas no campo magnético e as várias células compreendem nanopartículas magnéticas.

[0025]Os aspectos e vantagens da presente revelação ficarão claros aos versados na técnica. Embora inúmeras alterações possam ser feitas pelos versados na técnica, tais alterações se encontram dentro do espírito da revelação.

DESENHOS

[0026]Algumas modalidades exemplares específicas da revelação podem ser entendidas com referência, por exemplo, em parte, à descrição que se segue e aos desenhos apensos.

[0027]A figura 1 ilustra um exemplo de hidrogel de fago Au-MIO, de acordo com determinadas modalidades da revelação.

[0028]A figura 2 ilustra deslocamento magnético do fago Au-MIO, de acordo com algumas modalidades da revelação.

[0029]A figura 3 ilustra cultura de células levitadas com base magnética com anexação inicial da célula, de acordo com algumas modalidades da revelação.

[0030]A figura 4 ilustra cultura de células levitadas com base magnética na ausência de anexação da célula, de acordo com determinadas modalidades da revelação.

[0031]A figura 5 ilustra um conjunto levitado magneticamente, de acordo com algumas modalidades da revelação.

[0032]A figura 6 ilustra células tronco neurais de murino levitadas

magneticamente (NSC), de acordo com as modalidades da revelação.

[0033]A figura 7 ilustra astrócitos humanos levitados magneticamente de acordo com determinadas modalidades da revelação.

[0034]A figura 8 ilustra conjuntos de glioblastomas levitados magneticamente de acordo com determinadas modalidades da revelação.

[0035]A figura 9 ilustra células de melanoma levitadas magneticamente, de acordo com determinadas modalidades da revelação.

[0036]A figura 10 ilustra imagens do microscópio eletrônico de transmissão (TEM) de células de glioblastoma humano desenvolvidas com levitação magnética, de acordo com as modalidades da revelação.

[0037]A figura 11 ilustra imagens do microscópio eletrônico de varredura (SEM) mostrando a cultura levitada de estruturas em 3D, de acordo com as modalidades da revelação.

[0038]A figura 12 ilustra uma comparação dos conjuntos de células criados com levitação magnética com um conjunto em 2D e um xenoenxerto de camundongo, de acordo com determinadas modalidades da revelação.

[0039]A figura 13 ilustra a manipulação das células durante a cultura de células, incluindo controle da forma e posição, cocultura e ensaio de confrontação, de acordo com as modalidades da revelação.

[0040]A figura 14 ilustra um exemplo de padronização da célula sobre uma superfície, de acordo com algumas modalidades da revelação.

[0041]A figura 15 ilustra um exemplo de padronização da célula sobre uma superfície, de acordo com uma modalidade da revelação.

[0042]A figura 16 ilustra amostra de padrão litográfico para obtenção de padrão de superfície de células, de acordo com as modalidades da revelação.

[0043]A figura 17 ilustra cálculos de força magnética, aplicável a algumas modalidades da revelação.

[0044]A figura 18 ilustra a construção de protótipo de microdispositivo para fios litograficamente padronizados, de acordo com as modalidades da revelação.

[0045]A figura 19 ilustra um ajuste de microscópio e dispositivo de microchip úteis em algumas modalidades da revelação.

[0046]A figura 20 ilustra manipulação e padronização da superfície de células tronco neurais com microdispositivo de padronização de acordo com as modalidades da revelação.

[0047]A figura 21 ilustra manipulação e padronização do material do fago Au-MIO sem células, de acordo com as modalidades da revelação.

[0048]A figura 22 ilustra gradiente de fago Au-MIO, de acordo com as modalidades da revelação.

[0049]A figura 23 ilustra padronização de célula alvejada por receptor empregando padronização do campo magnético de hidrogéis, de acordo com algumas modalidades da revelação.

[0050]A figura 24 ilustra transdução gênica direcionada, magnética empregando Au-MIO-AAVP, de acordo com as modalidades da revelação.

[0051]A Patente ou o depósito do Pedido apresenta pelo menos um desenho executado em cores. Cópias desta patente ou publicação de pedido de patente com desenho(s) colorido(s) serão fornecidas pelo Escritório, mediante solicitação e pagamento das taxas necessárias.

[0052]Embora a presente revelação seja suscetível a várias modificações e formas alternativas, concretizações exemplares específicas foram mostradas nas figuras e são descritas no presente documento em mais detalhes. Deve ser entendido, contudo, que a descrição das concretizações exemplares específicas não se destina a limitar a invenção às formas específicas reveladas, porém ao contrário, esta revelação cobre todas as modificações e equivalentes conforme ilustrados, em parte, pelas reivindicações apensas.

DESCRIÇÃO

[0053]A presente revelação se refere, de modo geral, aos sistemas e métodos úteis na medicina, biologia celular, nanotecnologia, e cultura de células. Especificamente, pelo menos em algumas modalidades, a presente revelação se refere aos sistemas e métodos para orientação magnética e padronização de células e materiais. Algumas aplicações específicas destes sistemas e métodos são cultura de células levitadas fora de uma superfície, obtenção e manipulação de padrão de células levitadas e padronização da cultura das células sobre uma superfície.

[0054]A presente revelação combina, de modo geral, campos e nanopartículas magnéticas para prover uma plataforma virtual ou arcabouço para controlar o padrão das células e/ou forma dos conjuntos de células cultivados em um ambiente artificial. Em algumas modalidades, os métodos da presente revelação podem ser aplicados aos materiais magnéticos padrão propriamente, de modo a permitir muitas aplicações úteis na medicina, biologia celular, nanotecnologia, e cultura de células. Uma das muitas vantagens em potencial dos dispositivos e métodos da presente invenção, apenas algumas das quais sendo reveladas no presente documento, é que as modalidades da revelação podem permitir que células e materiais sejam manipulados e padronizados com grande flexibilidade. Em algumas modalidades isto pode ser realizado externamente (sem contato direto com a solução sendo manipulada) o que possui valor forçando a manipulação de sistemas biológicos e moleculares, cuja integridade pode ser facilmente comprometida por contaminação ou manuseio¹⁸⁻²⁴. Em algumas modalidades, os sistemas da invenção podem ser portáteis, relativamente baratos e fáceis de serem fabricados. Algumas modalidades da revelação podem ser acopladas a muitas modalidades diferentes de microscopia óptica e microscopia de força.

[0055]Os sistemas e métodos da presente revelação fornecem várias outras vantagens em relação aos sistemas e métodos tradicionais. Por exemplo, em

determinadas modalidades, os sistemas e métodos da presente revelação podem permitir a fabricação de um material sem contato direto dos objetos externos com o material. Tal fabricação isenta de contato pode ser realizada, em parte, pelo uso de campos magnéticos e materiais que respondem a tais campos magnéticos. Adicionalmente, os sistemas e métodos da presente revelação, em determinadas modalidades, podem permitir controle das forças mecânicas colocadas sobre um material durante a fabricação. Tal controle pode ser vantajoso, por exemplo, quando o material compreende uma ou mais células que são sensíveis a tais forças mecânicas, isto é, células mecanossensíveis. Tais células incluem, porém não estão limitadas às células tronco. Adicionalmente, em determinadas modalidades, os sistemas e métodos da presente revelação podem permitir manipulação precisa dos campos magnéticos empregados nos sistemas e métodos da presente revelação, tais como, a capacidade de gerar ou remover tal campo magnético, aumento ou diminuição da resistência de tal campo magnético ou modulação de tal campo magnético.

[0056]As modalidades da presente revelação podem fornecer crescimento da célula em 3D com manipulação flexível, sem arcabouço (“arcabouço virtual”) do conjunto e/ou forma do tecido em tempo real. Determinadas modalidades podem remover a influência perturbadora de uma superfície, partícula de núcleo ou matriz e concentrar rapidamente as células para promover interações célula-célula. Tais modalidades podem não requerer meios específicos ou controle de temperatura e/ou processamento antes do emprego, e assim podem ser compatíveis com técnicas de cultivo e diagnóstico padrão.

[0057]As células podem ser cultivadas, de acordo com as modalidades da revelação, com vários tipos de células. As células podem ser colocadas em proximidade em um modo controlado para facilitar a sinalização celular e outras interações célula-célula que podem ser físicas ou químicas e que possam afetar as propriedades ou comportamento das células. Um exemplo disto seria um ensaio de confronto

da cocultura com monitoramento in situ. A levitação magnética pode não requerer meio específico, construção de arcabouços, géis moldados e/ou bioreatores. As modalidades da revelação podem fornecer métodos simples, flexíveis e eficazes que podem ser apropriado a uma faixa de aplicações na biotecnologia, descoberta de medicamentos, pesquisa de células tronco ou medicina regeneradora.

[0058]A levitação magnética, de acordo com as modalidades da revelação, pode fornecer métodos para cultura de células em 3D com grande potencial para pesquisa e aplicação. A mesma pode apresentar vantagens significativas em relação aos métodos de desenvolvimento tradicionais em 2D e metodologias de cultura em 3D disponíveis atualmente. Em relação ao cultivo em 2D, as células podem se desenvolver mais rapidamente sem a necessidade de passagens de células, o que é importante para o desenvolvimento das células sensíveis onde o tempo é um obstáculo. Em contraste com os métodos de desenvolvimento em 3D estabelecidos, a levitação magnética não precisa de meios específicos ou a fabricação de materiais projetados especialmente, construção de arcabouços, géis moldados e/ou bioreatores. A levitação magnética pode oferecer controle espacial e temporal da forma do conjunto, início mais rápido e controlado das interações célula-célula, integração mais fácil com diagnósticos de imageamento, velocidade de desenvolvimento aperfeiçoada e escalabilidade.

[0059]As modalidades da revelação podem estar voltadas aos desafios existentes para o desenvolvimento de muitas aplicações com base na célula. Algumas modalidades podem fornecer novos métodos para ensaios de tecido. Algumas modalidades podem ser valiosas na descoberta de medicamento com alto rendimento devido à taxa de desenvolvimento rápida, nível disponível de controle, melhora das interações célula-célula e compatibilidade com técnicas de imageamento. Os métodos de acordo com algumas modalidades podem evitar o contato da superfície com as células. Tais métodos podem manter a promessa de uso em pesquisas de célula tronco,

em razão do contato com superfícies poliméricas ou vítreas, frequentemente usadas na cultura da célula em 2D, podendo alterar a biologia das células tronco. A capacidade de padronização espacial e temporária dos conjuntos multicelulares pode prover benefícios à engenharia de tecidos. Do ponto de vista prático, técnicas de acordo com algumas modalidades podem ser rápidas, fáceis, baratas e requerer pouca modificação dos procedimentos padrão de cultura de células.

[0060]Material do fago Au-MIO pode ser padronizado sem, ou antes, da introdução das células, de acordo com algumas modalidades da revelação. A padronização do hidrogel de fago pode ser útil, entre outras coisas, porque o fago pode apresentar muitas propriedades, tais como, a capacidade de servir como arcabouço para o crescimento da célula, armazenamento para nutrientes da célula e vetor para a nanopartícula, liberação de DNA ou RNA que podem ser específicas para célula.

[0061]Para determinadas modalidades da revelação envolvendo células, as células podem conter nanopartículas magnéticas, nanopartículas magnéticas fixadas às mesmas ou apresentar nanopartículas magnéticas embutidas no conjunto de células. Qualquer método para disposição das nanopartículas magnéticas dentro ou sobre as células ou no interior de um conjunto se encontra no escopo desta revelação. Em determinadas modalidades, os hidrogéis podem ser empregados para anexar, infundir e dar entrada de partículas magnéticas no interior ou sobre as células e conjuntos¹³. Por exemplo, os hidrogéis podem ser usados para introduzir nanopartículas magnéticas no interior das células e, conforme as células se desenvolvem com o passar do tempo, as nanopartículas magnéticas podem ser expelidas das células e aprisionadas na matriz extracelular do conjunto. Hidrogéis apropriados podem ser compostos de nanopartículas, tais como, ouro (Au) e/ou óxido de ferro magnético (MIO, magnetita, Fe₃O₄) com bacteriófago (fago Au-MIO). Hidrogéis apropriados conteriam pelo menos uma nanopartícula magnética, se esta for superparamagnética, paramagnética, ferromagnética, e/ou ferrimagnética. Uma modalidade exemplar é ilustrada na figura 1.

Adicionalmente, outras modalidades da revelação fornecem outros métodos pra fabricação de nanopartículas magnéticas que entram nas células, atacam as células na superfície ou incorporam-se ao interior de um conjunto de células. Outros modos conhecidos na arte incluem esferas magnéticas revestidas com uma entidade de alveamento de célula (por exemplo, uma célula ou receptor específico para a proteína) ou lipossomas contendo nanopartículas magnéticas e campos magnéticos aplicados para construir e liberar folhas de células in vitro¹⁴⁻¹⁷. Diferentes métodos podem apresentar vantagens diferentes e um versado na técnica comum com o benefício desta revelação saberá qual método(s) é o mais vantajoso. Por exemplo, os lipossomas podem ser capazes de liberar grandes quantidades de nanopartículas. Hidrogéis e esferas magnéticas revestidas podem ser designadas para as células específicas alvo. Por exemplo, os hidrogéis fabricados do fago da bactéria e um ou mais tipos de nanopartículas podem servir como um arcabouço no desenvolvimento celular, armazenamento para nutrientes celulares ou vetor para nanopartícula, liberação de DNA ou RNA que pode ser específica para célula. Os hidrogéis fabricados de fago de bactéria e um ou mais tipos de nanopartículas podem ter a capacidade de atacar nanopartículas sobre as células e infundir nanopartículas no interior das células, o que pode ser de grande valor para permitir modificação e controle das células no nível químico e mecânico¹³.

[0062]O fago (também referido como bacteriófago) útil nos sistemas e métodos da presente revelação se refere a qualquer um dos inúmeros vírus capazes de infectar bactérias. De modo geral, um bacteriófago compreende uma casca de proteína externa e um espaço interno compreendendo material genético que pode ser DNA ou RNA. Em determinadas modalidades, o fago pode ser um fago filamentado, tal como, porém não limitado ao bacteriófago fd, f1 ou M13. Em determinadas modalidades, o fago é um bacteriófago fd. Exemplos de fagos apropriados, bem como de composições compreendendo fago e nanopartículas e métodos de formação de tais

composições são descritos na Publicação de Pedido de Patente Internacional número WO2006/060171¹³, a revelação completa sendo desta forma incorporada ao presente documento como referência.

[0063] Em determinadas modalidades, os sistemas da presente revelação podem compreender, adicionalmente, uma fração alvo, tal como, porém não limitado ao peptídeo ou uma proteína revelada no bacteriófago ou operativamente acoplada ao bacteriófago. A fração alvo pode ser operativamente acoplada (o que inclui ser revelada sobre a superfície de um bacteriófago) a um bacteriófago, um conjunto condutor ou um conduto de bacteriófago. Em determinadas modalidades, a fração alvo pode ser um peptídeo e nas modalidades específicas, o peptídeo pode ser um peptídeo cíclico. Tais peptídeos cíclicos incluem, porém não estão limitados aos peptídeos cíclicos da forma CX₇C, onde C é cisteína e X é um aminoácido aleatório. Em determinadas modalidades, domínios de proteína maiores, tais como, anticorpos ou anticorpos de cadeia simples podem também ser revelados sobre ou operativamente ligados ao fago, isto é, uma fração alvo⁶⁹. O conjunto também pode compreender uma fração alvo acoplada operativamente, especificamente acoplada covalentemente a um componente do sistema, por exemplo, fago ou nanopartícula. Em determinadas modalidades, a fração alvo é um peptídeo. Frações alvo de peptídeo alvo apropriadas são descritas na Publicação de Pedido de Patente Internacional número WO2006/060171¹³, a revelação relevante da mesma sendo incorporada como referência. Em determinadas modalidades a fração alvo é compreendida de uma proteína pIII ou pVIII do bacteriófago. Em determinadas modalidades, as frações alvo podem ser identificadas por classificação dos peptídeos apresentados ou incluídos na proteína pIII e/ou pVIII, nas concretizações preferidas a proteína pVIII.

[0064] Os sistemas da presente revelação podem compreender, adicionalmente, um agente de organização que promove um empacotamento organizado das nanopartículas condutoras. Um agente de organização pode incluir, porém não está

limitado a um peptídeo, um pirrol, um imidazol, histidina, cisteína ou triptofano. Adicionalmente, os sistemas da presente revelação podem compreender um agente terapêutico, tal como, molécula terapêutica ou ácido nucléico. Em determinadas modalidades, um agente de organização pode induzir a agregação ou acoplar duas ou mais partículas para formar conjuntos e não é limitada aos agentes que induzem uma disposição ordenada das moléculas, tais como, látice. Em determinadas modalidades, o agente terapêutico é um agente de organização. Em determinadas modalidades, os sistemas da presente revelação podem estar compreendidos em uma composição farmacêuticamente aceitável. Determinadas modalidades da revelação incluem sistemas que podem compreender, adicionalmente, uma célula compreendendo ou operativamente acoplada ao bacteriófago.

[0065]Em algumas modalidades, um fago Au-MIO pode ser agrupado a partir de Au, nanopartículas magnéticas de magnetita e fago usando um método de autogrupoamento de baixo para cima^{39, 40}. A cor e a microestrutura podem ser vistas com microscopia de campo escuro e podem ser qualitativamente semelhantes às observações reportadas anteriormente dos grupos de fago-Au (não apresentando MIO)⁴⁰. De modo geral, o sistema de fago Au-MIO pode emular o comportamento dos hidrogéis de fago-Au, que podem ser predominantemente estabilizados por interações eletrostáticas^{39,40}, conforme ilustrado na figura 1. Ambas as partículas de Au e MIO podem adquirir carga negativa sob condições de solução aquosa (pH 6,0)³⁹⁻⁴¹ e podem ser atraídas para o fago carregado positivamente. O fago e MIO podem não formar um hidrogel sem Au, contudo, sugerindo que o MIO pode ser menos eficaz no estabelecimento da ligação cruzada entre o fago. Em alguns exemplos, o tamanho ligeiramente menor das partículas de MIO ou a distribuição de tamanho polidispersa pode reduzir a eficácia no estabelecimento de uma ligação cruzada. As nanopartículas de MIO podem ser um melhorador de contraste no imageamento de ressonância magnética comum (MRI)²⁵ conforme ilustrado na figura 1, as imagens de MR carregadas com T2*

do fago Au-MIO e um hidrogel de fago-Au de controle (MRI).

[0066]As nanopartículas úteis nos sistemas e métodos da presente revelação compreendem, tipicamente, uma ou mais nanopartículas condutoras. Frequentemente, as nanopartículas metálicas condutoras serão capazes de serem magnetizadas ou magnéticas. Em determinadas modalidades, a nanopartícula condutora metálica compreende Au, Ag, Pt, Ti, Al, Si, Ge, Cu, Cr, W, Fe ou um óxido correspondente. Nas modalidades específicas, a nanopartícula condutora é um grupamento de Au, tal como, porém não limitado a um grupamento de Au-magnetita. Em determinadas modalidades, as nanopartículas condutoras podem apresentar um diâmetro de cerca de 2 nm a cerca de 100 μ m. Em determinadas modalidades, várias nanopartículas podem estar embutidas em outros materiais e podem ser condutoras ou não condutoras. Em determinadas modalidades, as nanopartículas podem ser revestidas com materiais condutores ou não condutores. Um exemplo dos sistemas da presente revelação contendo nanopartículas do grupamento Au-magnetita é mostrado na figura 1.

[0067]Em algumas modalidades, nanopartículas magnéticas de modo geral podem ser de qualquer tipo de material magnético. Por exemplo, nanopartículas magnéticas apropriadas podem ser fabricadas de magnetita. Em determinadas modalidades, as nanopartículas magnéticas de magnetita podem apresentar tamanhos abaixo de 30 nm, uma vez que as partículas de magnetita podem ser superparamagnéticas naquela faixa de tamanho. Em outras modalidades, as nanopartículas magnéticas de magnetita podem apresentar tamanhos maiores e podem mostrar característica de magnetização remanescente de ferrimagnetismo em volume. Nanopartículas magnéticas apropriadas podem ser de tamanho de partícula polidisperso < 50 nm e podem ser estabilizadas com um agente tensoativo de PVP (poli vinil pirrolidona). Tais nanopartículas magnéticas apropriadas podem ser comercialmente disponíveis na Sigma-Aldrich. Uma lista parcial dos exemplos de outras opções para nanopartículas magnéticas apropriadas incluem ferro puro, níquel, cobalto, CoFe_2O_4 e NdFeB .

Nanopartículas magnéticas apropriadas podem ser revestidas ou não. Um versado na técnica com os benefícios desta revelação conhecerão qual material e opção de revestimento é melhor para qualquer dada situação específica.

[0068] Nanopartículas magnéticas vêm sendo usadas extensivamente nas aplicações biológicas, tais como, para imageamento de MRI²⁵, classificação da célula²⁵, padronização da superfície²⁶⁻³⁰, mecanocondicionamento das células²⁸ e estudos de propriedades de membranas mechanossensíveis²⁸. A magnetita é uma escolha comum da nanopartícula magnética, uma vez que as nanopartículas magnéticas com tamanhos abaixo de 30 nm podem ser superparamagnéticas e nanopartículas de magnetita de tamanho maior podem revelar característica de magnetização remanescente do ferrimagnetismo em volume. Em ambos os casos, as partículas podem ser atraídas para o máximo de um campo magnético aplicado³¹. Nanopartículas magnéticas de muitos tipos podem ser modificadas para alvejar proteínas específicas e mostraram ser biocompatíveis²⁸. Está dentro do espírito desta revelação usar nanopartículas magnéticas de qualquer tipo de material. Um versado na técnica comum com o benefício desta revelação conhecerá que tipo de material é melhor para uma situação específica. Por exemplo, a magnetita pode ser uma boa escolha porque ela possui uma grande magnetização de saturação, assim, forças relativamente grandes, podem ser geradas relativamente com poucas partículas. A mesma é também facilmente obtida comercialmente e algo padrão porque muito trabalho foi realizado com a mesma. Adicionalmente, as nanopartículas magnéticas podem ser revestidas ou não. Uma lista parcial dos exemplos de outras opções apropriadas inclui ferro puro, níquel, cobalto, CoFe_2O_4 e NdFeB .

[0069] Microveículos³⁴ ou partículas de núcleo³⁵ que podem conter material magnético também vêm sendo empregadas para prover uma superfície para ancoramento de células dependentes e permitem os benefícios de cultura em suspensão. Os microveículos também referidos como partículas de núcleo, esferas, esferas de

cultura de célula, microesferas ou microveículos são partículas sólidas, tipicamente superiores as de tamanho nano, que podem suportar o ancoramento e desenvolvimento das células vivas^{34,35}. Em algumas implementações, os microveículos são maiores que as células. As partículas magnetizadas são preferivelmente revestidas com um material adesivo celular, tal como, colágeno, para facilitar a aderência celular³⁵. As células tipicamente proliferam por algum tempo antes das interfaces de célula-célula serem maiores que as interfaces de célula-esfera. Também, as esferas que permanecem no conjunto podem influenciar as propriedades mecânicas do tecido, o que é importante para as aplicações de construção do tecido. Pode também ser difícil padronizar estruturas pequenas ou números pequenos de células com esferas de microveículo, uma vez que as esferas são muito grandes.

[0070]A figura 1 ilustra um exemplo de hidrogel de fago Au-MIO usado para liberar nanopartículas dentro e sobre as células e dentro dos conjuntos em determinadas modalidades da revelação. A figura 1A ilustra um frasco exemplar de um hidrogel contendo MIO (indicado pela seta) em água. A figura 1B ilustra um esquema exemplar de interação eletrostática de nanopartículas (esferas) com fago (estruturas alongadas). Nanopartículas amarelas (ouro) e marrons (MIO) são ilustradas (não desenhado em escala). A figura 1C ilustra uma imagem MRI exemplar (carregada com T2) de hidrogel purificado na solução. Hidrogel contendo MIO (painel superior), média $T2^* = 76$ ms e controle de hidrogel isento de MIO (painel inferior), média $T2^* = 253$ ms. O contraste da imagem entre o hidrogel contendo MIO e o controle negativo resulta da redução na constante de relaxamento de $T2^*$, na presença de nanopartículas de MIO (barra de escala = 2 mm).

[0071]De acordo com algumas modalidades, os campos magnéticos criados tanto com ímãs permanentes ou fios de transporte de corrente, podem aplicar forças às nanopartículas magnéticas e assim às células e/ou conjuntos. Tais forças podem mover as células e/ou conjuntos à frente ou manter os mesmos na região de amplitude

máxima de campo magnético. Devido à flexibilidade dos campos magnéticos de conformação e alteração, a forma das células e as amostras de tecido resultantes, suas formas podem ser conformadas e alteradas, conforme ilustrado na figura 2. Um versado na técnica comum com o benefício desta revelação conhecerá se é mais vantajoso usar ímãs permanentes, ímãs de transporte de corrente ou alguma combinação. Por exemplo, ímãs permanentes podem produzir campos maiores e forças e coletar mais células. Os fios podem ser mais facilmente padronizados para formar padrões de campo magnético, podem fazer estruturas menores e podem ser mais flexíveis para manipulação.

[0072]A figura 2 ilustra deslocamento magnético do fago Au-MIO, de acordo com algumas modalidades da revelação. Nesta ilustração, o fago Au-MIO pode ser preparado com tamanhos diferentes de nanopartículas de Au (18 nm, painel superior; 30 nm, médio; e 45 nm, inferior) sob a mesma concentração de fago e nanopartícula de MIO. No presente documento, o hidrogel especificamente empregado é Au-MIO AAVP-RGD-4C (AAVP, fago do vírus adeno associado),³⁸ porém o tipo específico de fago não é importante para o sucesso da invenção. Os hidrogéis preparados com os diferentes tamanhos podem mostrar diferentes respostas ao campo magnético, porém, em geral, eles podem ser todos atraídos quando o campo magnético é mais forte. Para estes dados, o ímã permanente pode ser colocado imediatamente do lado de fora do poço, conforme indicado pela seta apontando na direção do ímã.

[0073]Em algumas modalidades, as células podem ser levitadas magneticamente. Conforme ilustrado na figura 3, as células podem ser desenvolvidas em três dimensões fora de uma superfície, algumas vezes referida como cultura de célula levitada. Por exemplo, células tronco neurais (NSC) de murino C17.2 podem ser assim cultivadas²⁵. As células podem ser desenvolvidas na interface de ar-líquido. As células tronco neurais podem ser anexadas à superfície de fundo plana da placa de cultura e uma preparação de hidrogel contendo MIO pode ser dispersa através de pipetagem.

Frequentemente, a distribuição dos fragmentos de hidrogel pode não ser importante. Conforme ilustrado na figura 3A, a mistura pode ser incubada sob condições de cultura de tecido padrão. A incubação por toda noite pode fornecer resultados semelhantes aos estudos anteriores usando microscopia confocal para mostrar que as partículas de fago alvejadas e nanopartículas de ouro aderem às membranas de células externas de mamíferos e sofrem internalização mediada por receptor 39, 40. Conforme ilustrado na figura 3B, as células tronco neurais podem ser enxaguadas com salmoura tamponada com fosfato (PBS) e hidrogel remanescentes pode ser removido. As células tronco neurais podem ser destacadas da superfície com um tratamento padrão de tripsina:EDTA^{39, 40}. Um ímã pode ser colocado acima do prato contendo cultura de tecido, conforme ilustrado na figura 3C. A mistura de células tronco neurais e hidrogel contendo MnO pode coelevar-se para a interface ar-líquido devido à atração das nanopartículas para regiões de campo magnético alto³¹. Em algumas modalidades, o campo magnético pode concentrar conjuntos de células levitadas juntas (nas vizinhanças, em proximidade, e/ou em contato físico) permitindo as interações célula-célula, por exemplo, sinalização da célula através de vias químicas ou mecânicas. As células podem não ser capazes de deixar o líquido devido à tensão superficial. Conforme ilustrado na figura 3D pode haver evidência de aspectos de conjunto multicelular 3D em grande e pequena escala com morfogênese de ramificação reprodutível e característica^{42,43}.

[0074]Em determinadas modalidades da revelação, as células podem ser magneticamente levitadas fora de uma superfície, o que pode permitir o cultivo de conjuntos em 3D, incluindo criação e manipulação de formas e padrão levitados de conjuntos. Em algumas modalidades, a forma de um conjunto pode ser influenciada para formar um padrão ou distribuição específica em 2D ou 3D. Quando mais de um tipo de célula estiver presente a influência da forma de um conjunto também pode incluir alteração da disposição relativa de diferentes populações de células dentro do

conjunto. Por exemplo, camadas de tipos diferentes de células podem ser formadas. As camadas podem ser formadas como folhas ou as camadas podem variar radialmente, como quando um tipo de célula estiver se desenvolvendo ao redor de um conjunto central de outro tipo de célula. Ilustrações de tal modalidade são mostradas nas figuras 3-13.

[0075] Os campos magnéticos usados nos sistemas e métodos da presente revelação podem ser providos por qualquer fonte apropriada. Tais fontes incluem, porém não estão limitadas aos campos magnéticos gerados pelos ímãs, campos magnéticos gerados pelo fluxo de corrente elétrica ou uma combinação dos mesmos. Em determinadas modalidades, campos magnéticos apropriados gerados pelo fluxo de corrente elétrica podem ser providos pelo fluxo de corrente elétrica através de um ou mais fios condutores. Algumas modalidades utilizam especificamente anéis magnéticos. Nanopartículas magnéticas podem ser preferencialmente arrastadas para o eixo geométrico de simetria de um anel magnético, enquanto se permite que a luz passe através da abertura central de um anel magnético. Estes dois efeitos, tomados em conjunto, podem permitir a visualização dos conjuntos e da cultura de células quando as células levitam com os anéis magnéticos. Os anéis magnéticos são tradicionalmente ímãs circulares, permanentes, embora qualquer tipo de ímã de qualquer geometria fornecendo uma abertura central estaria dentro do espírito da revelação. Um exemplo de anel magnético é ilustrado nas figuras 3C e D.

[0076] Campos magnéticos extremamente grandes (> 4 T), tais como, nos orifícios dos ímãs MRI supercondutores vêm sendo empregados para levitar células através do diamagnetismo natural dos materiais biológicos³² e ímãs menores podem ser usados para aprisionar células imersas em um meio com uma concentração alta de sais paramagnéticos³³.

[0077] Outros esquemas para controlar a forma em 3D dos conjuntos podem requerer a fabricação de materiais especialmente projetados, arcabouços

construídos³⁶, géis moldados e/ou bioreatores com base em rotação ou agitação. Frequentemente, tais materiais e instrumentos podem ser caros, específicos para célula e não biocompatíveis o que limita sua aplicabilidade. Arcabouços biodegradáveis porosos e matrizes de proteína que promovem a adesão celular e imitam ou promovem a formação de matriz extracelular são rotineiramente empregados para produção de amostras de tecido ex vivo em 3D³⁷, porém podem sofrer de propagação lenta das células nas construções e estabelecimento de interações célula-célula¹⁴⁻¹⁷ e desafios no projeto de um arcabouço biocompatível que não perturbe as propriedades da célula.^{7, 11}

[0078]As modalidades da presente revelação podem prover desenvolvimento celular em 3D com manipulação flexível, sem arcabouço (“arcabouço virtual”) da forma do tecido em tempo real. Determinadas modalidades removem a influência de perturbação de uma superfície, partícula de núcleo ou matriz e rapidamente concentram as células para promover interações célula-célula. Tais modalidades podem não requerer meios específicos ou controle de temperatura e/ou processamento antes do uso e podem ser compatíveis com técnicas de cultura e diagnóstico padrão.

[0079]A figura 3 ilustra um conjunto de células levitadas de acordo com algumas modalidades da revelação. O painel superior de cada estrutura ilustra um esquema e o painel inferior correspondente pode ser uma microfotografia representativa das células tronco neurais (NSC) no mesmo estágio do processo. A figura 3A ilustra um hidrogel de fago Au-MIO disperso sobre as células, onde a mistura apode ser incubada para liberar nanopartículas por sobre e no interior das células. As manchas pretas ilustram fragmentos macroscópicos do hidrogel. A figura 3B ilustra fragmentos de hidrogel em excesso, não interativos que podem ser removidos durante lavagens. A figura 3C ilustra a mistura magnetizada se elevando para a interface de ar-meio quando o ímã é colocado. Esta imagem ilustra a mistura após 15 minutos de levitação. A figura 3D ilustra estruturas multicelulares características e reprodutíveis formadas

após 12 horas de levitação. As regiões escuras podem resultar do aumento da espessura óptica da massa celular. As barras de escala em cada figura são de 30 μm .

[0080]A figura 4 ilustra a levitação magnética de uma célula na ausência de anexação da célula, de acordo com determinadas modalidades da revelação. A figura 4A ilustra um fago Au-MIO incubado com células suspensas por 15 minutos. Após incubação, o fago Au-MIO mais a mistura de célula podem ser transferidos para uma placa de cultura de célula. Um ímã pode ser adicionado para levantar as células magnetizadas. A figura 4B ilustra fotomicrografias de contraste de fase (esquerda) e fluorescência (direita) de astrócitos humanos normais expressando proteína fluorescente “mCherry” levitados 15 minutos após o início da levitação e 48 horas após o início da levitação, onde a barra de escala é de 200 μm . Em 48 horas, esferoides multicelulares podem ser observados. O painel a extrema direita na figura 4C mostra uma imagem ampliada de um esferoide (fluorescência mCherry, barra de escala de 50 μm).

[0081]Algumas modalidades fornecem um procedimento para cultivo levitado através de levitação magnética sem anexação da superfície. As células suspensas podem ser incubadas com o fago Au-MIO. A incubação pode durar cerca de 15 minutos, após o que as células suspensas podem ser magneticamente levitadas, conforme ilustrado na figura 4. Sem limitar a revelação a uma teoria específica ou mecanismo de ação, acredita-se atualmente que o campo das células levitadas versus não levitadas é influenciado pela quantidade de fago Au-MIO, tempo de incubação, resistência e gradiente do campo magnético e distância do ímã para a superfície inferior. Conforme ilustrado nas figuras 4B e C, os astrócitos humanos normais transfectados com mCherry podem ser cultivados por 15 minutos e 48 horas. Tais procedimentos podem prover uma técnica mais simples e rápida, embora o rendimento das células possa ser menor. Tal procedimento pode aliviar a necessidade de anexação da superfície, de modo que possa ser usado com estoques de células diretamente descongelados de armazenamento congelado. Esta técnica pode ser aplicada a uma variedade de

tipos de células. Por exemplo, as células de glioblastoma humano (figura 5), células tronco diferenciadas (figura 6), astrócitos humanos (figura 7), conjuntos de glioblastoma (figura 8) e melanoma (figura 9).

[0082]A figura 5 ilustra um conjunto de células magneticamente levitadas de acordo com algumas modalidades da revelação. As células de glioblastoma humano (fileira inferior) podem ser tratadas com hidrogel contendo óxido de ferro magnético (MIO) e mantidas na interface de ar-meio pelo campo magnético criado pelo imã anexo à parte superior da placa de cultura de tecido (fileira superior). Isto ilustra a barra de escala como sendo de 5 mm e a imagem realizada em 48 horas de cultura.

[0083]A figura 6 ilustra células tronco neurais de murino, diferenciadas, levitadas magneticamente (NSC), de acordo com as modalidades da revelação. As NSCs anexadas à superfície foram tratadas com mitomicina (1 $\mu\text{g/mL}$ para diferenciação) por 8 horas antes da suspensão das células. A figura ilustra 24 horas após o início da levitação.

[0084]A figura 7 ilustra astrócitos humanos levitados magneticamente, de acordo com determinadas modalidades da revelação.

[0085]A figura 8 ilustra conjuntos de glioblastoma levitados magneticamente de acordo com determinadas modalidades da revelação.

[0086]A figura 9 ilustra células de melanoma suspensas magneticamente (B16), de acordo com determinadas modalidades da revelação, que podem se desenvolver com uma folha. O melanoma, um tipo de câncer de pele raro, porém mortal, é geralmente um tumor maligno que se manifesta do crescimento descontrolado de células de pigmento, denominadas melanócitos.

[0087]Embora as células de mamíferos possam eventualmente processar material biológico, tal como, fago38, a destruição celular das nanopartículas metálicas não é bem entendida. Algumas modalidades da revelação, contudo, podem demonstrar a presença a longo prazo de nanopartículas de MIO nos conjuntos levitados. Por

exemplo, após meses de cultivo levitado, os conjuntos multicelulares viáveis podem cair quando o campo magnético é removido e podem levar novamente quando o campo magnético é reaplicado. A dinâmica de longo prazo das nanopartículas de MIO nas células não é totalmente entendida⁴⁴⁻⁴⁶. Contudo, conforme ilustrado na figura 10, a análise do microscópio eletrônico de transmissão (TEM) pode mostrar que, após cerca de uma semana de cultivo levitado, as células de glioblastoma humano levitadas podem liberar predominantemente nanopartículas para o meio e/ou matriz extracelular. Sem determinação de mecanismo(s) molecular(es) para estas observações (tais como, secreção, morte apoptótica da célula ou uma combinação), a “entrada” aparente das nanopartículas metálicas no conjunto pode explicar a capacidade do sistema de levar os conjuntos por períodos de tempo relativamente expandidos.

[0088]O TEM das seções transversais dos esferoides das células de glioblastoma humano que se desenvolveram através de levitação magnética, de acordo com a presente revelação, mostra a localização das nanopartículas em diferentes estágios, conforme ilustrado na figura 10. Por exemplo, após 24 horas de levitação, o volume das nanopartículas pode estar contido no citoplasma da célula, consistentemente com os relatórios anteriores^{39, 47, 48}. As células podem processar as nanopartículas após 8 dias de cultura e elas podem aparecer na matriz extracelular (ECM). Este pode ser o caso onde a divisão celular e desenvolvimento do esferoide conduz presumivelmente a uma distribuição diferencial das nanopartículas (preferivelmente presentes no centro do esferoide ao invés da região externa).

[0089]A figura 10 ilustra imagens do microscópio eletrônico de transmissão (TEM) de células de glioblastoma humano que se desenvolveram com levitação magnética, de acordo com as modalidades da revelação. Em direção à esquerda da figura 10, as nanopartículas (pretas) podem ser vistas dentro das células após 24 horas de cultivo. Na parte mediana da figura 10, nanopartículas podem ser vistas na região central do esferoide de tecido, porém mais amplamente na matriz extracelular após 8

dias de cultura. Na direção da direita da figura 10, as regiões externas do esferoide (após 8 dias de cultivo) podem ser vistas não contendo nanopartículas detectáveis. Nesta ilustração, a barra de escala é de 5 μm . A coesividade do conjunto e retenção das nanopartículas no conjunto podem permitir que o conjunto seja levantado, conforme descrito no texto.

[0090]Em algumas modalidades, o cultivo por levitação magnética pode produzir conjuntos em 3D. Conforme ilustrado na figura 11, imagens do microscópio eletrônico de varredura (SEM) podem mostrar a natureza em 3D das células de glioblastoma humano desenvolvidas sob levitação magnética, de acordo com as modalidades da revelação. Por exemplo, imagens SEM podem ser capturadas com o microscópio eletrônico de varredura JSM 5900, disponível comercialmente na JEOL USA, Inc., de Peabody, MA, equipado com um detector de elétron retrodifusor e câmera digital. Adicionalmente, estruturas multicelulares de células de glioblastoma humano podem ser fixadas, secas ao ponto crítico e revestidas com Au/Pd.⁴⁹

[0091]A figura 11 ilustra imagens do microscópio eletrônico de varredura (SEM) mostrando cultivo levantado de estruturas em 3D de acordo com as modalidades da revelação. A SEM das células de glioblastoma humano desenvolvidas sob levitação magnética por 24 horas pode ser vista na direção à esquerda, enquanto aquela para e de 8 dias pode ser vista na direção à direita, onde a barra de escala é de 100 μm .

[0092]Algumas modalidades podem prover resultados que comparam favoravelmente com os métodos tradicionais. Por exemplo, o cultivo por levitação magnética pode prover resultados favoráveis quando comparado ao cultivo tradicional em 2D. O crescimento da célula pode ser avaliado através de monitoramento visual e quantitativo da taxa de formação, tamanho e viabilidade das células de glioblastoma humano modificadas geneticamente por um período de 8 dias por monitoramento da fluorescência da expressão de proteína estável de mCherry, conforme ilustrado na figura

12A. As células podem ficar juntas dentro de 30 minutos da levitação. Além disto, um conjunto multicelular coesivo pode emergir por 24 horas e uma forma esferoide pode se formar entre 3-8 dias. Fluorescência vermelho intenso da expressão da proteína mCherry pode ser observada, o que pode confirmar a viabilidade da célula dentro do conjunto em 3D. Em algumas modalidades, os conjuntos podem ser mantidos por pelo menos tanto quanto 12 semanas ou mais. A taxa de crescimento das células levitadas magneticamente em comparação as células cultivadas em placas de cultura em 2D é ilustrada na figura 12B. Em contraste com a tendência exponencial indicada para o crescimento das células levitadas, as células cultivadas em 2D mostram um padrão de desenvolvimento linear, um aspecto típico dos conjuntos anexados na superfície⁵⁰. Em parte devido ao volume acessível durante o desenvolvimento em 3D das células levitadas, um conjunto grande pode ser obtido com ciclos de destacamento/nova colocação em placa (“passagem”) de modo geral necessários no cultivo padrão de tecidos em 2D.

[0093]As células cultivadas por levitação magnética, de acordo com as modalidades da revelação, podem mostrar similaridade aos tecidos in vivo. Tais similaridades podem ser vantajosas para determinadas aplicações. Por exemplo, a expressão da proteína nas células de glioblastoma humano pode exibir similaridades. A figura 12C ilustra uma comparação da expressão do marcador de N-caderina nas células levitadas, células que se desenvolvem em uma superfície 2D de uma placa de Petri e células em xenoinxertos de tumor em camundongos imunodeficientes. Sem limitar a revelação a uma teoria específica ou mecanismo de ação, acredita-se correntemente que a N-caderina, uma proteína de transmembrana que media interações de célula-célula através das interações de adesão da célula homotípica⁵¹ pode fornecer um padrão de expressão que na realidade recapitula pelo menos alguns traços semelhantes in vivo das células que se desenvolvem em 3D. Na realidade, conjuntos 2D podem mostrar N-caderina difundida no citoplasma e núcleo, porém ausente da membrana

enquanto as células levitadas expressam N-caderina na membrana, citoplasma e junções de células (relacionado ao padrão de expressão de proteína observado nos xenoinxertos de tumor). Esta observação é qualitativamente consistente com os resultados reportados recentemente por Ofek e outros.,⁵¹ onde a cartilagem desenvolvida in vitro também rendeu padrão de expressão de N-caderina diferencial em cultura levitada em relação à 2D. Sem levitação, não haverá alteração detectável na expressão de N-caderina nas células de glioblastoma anexadas com qualquer combinação de hidrogéis contendo MIO e/ou campos magnéticos. Assim, em algumas modalidades, a levitação induzida magneticamente das células in vitro pode prover um substituto complementarmente mais barato que a geração em laboratório e de custo intensivo e manutenção de xenoinxertos de tumor de cérebro humano em camundongos imunodeficientes⁵². Em geral, indicações são de que a levitação magnética pode produzir células que são mais semelhantes às células nos organismos vivos que as obtidas com técnicas tradicionais de cultivo artificial.

[0094]A figura 12 ilustra uma comparação do conjunto de células levitadas com conjunto 2D e xenoinxerto de camundongo de acordo com determinadas modalidades da revelação. A figura 12A ilustra fotomicrografias de contraste de fase (superior) e fluorescência (inferior; células expressando mCherry através da transfecção estável) de células de glioblastoma humano levitadas que foram monitoradas em um intervalo de 8 dias. Dentro de algumas horas, as células podem se juntar. Em 24 horas, pode haver um conjunto multicelular definido de células de glioblastoma humano que eventualmente formaram um esferoide. Nesta ilustração, a barra de escala é de 200 μm . Na figura 12B, o número de células como uma função do tempo para o conjunto de células levitado em 12A é ilustrado (quadrados, linha azul indica tendência de desenvolvimento exponencial). Também é ilustrado um conjunto em 2D representativo (triângulos, linha vermelha mostra tendência linear). A figura 12C ilustra imunofluorescência de N-caderina (vermelho, Alexanfluor 555) e coloração nuclear (azul,

DAPI) de cérebro de camundongo contendo xenoenxerto de glioblastoma humano, células de glioblastoma humano cultivadas por levitação magnética em 3D por 48 horas e conjunto padrão em 2D de célula de glioblastoma humano anexada a uma lâmina de vidro com revestimento deslizante, onde a barra de escala é de 10 μm .

[0095] Os métodos de acordo com determinadas modalidades da revelação podem fornecer padronização celular, controle de forma e manipulação da forma dependente do tempo. Conforme discutido anteriormente, a levitação magnética pode resultar da atração das nanopartículas de MIO em relação às regiões de campo magnético alto. Em algumas modalidades, o campo magnético pode ser conformado por ímãs apropriadamente conformados ou temporalmente variados com eletroímãs ou por movimento de ímãs permanentes. Em tais modalidades existe um grande potencial para padronização espacial das células e manipulação das estruturas no tempo. O campo magnético pode funcionar, de modo geral, como um arcabouço invisível, ajustável sobre o qual moldar os conjuntos multicelulares magnetizados, conforme ilustrado na figura 13. Deste modo, formas complexas de células em todas as escalas de comprimento podem ser obtidas, por exemplo, através do uso de eletroímãs e técnicas de microfabricação.

[0096] As estruturas de conjunto de glioblastoma multicelulares com ímãs permanentes conformados em anel de diferentes diâmetros e resistências de força magnética variadas podem ser levitadas, conforme ilustradas na figura 13. As estruturas resultantes podem refletir diretamente as propriedades do campo magnético empregado. O ímã maior e mais forte pode gerar a estrutura maior, conforme ilustrada na figura 13B. Adicionalmente, uma vez que o padrão de campo no menisco pode apresentar um local mínimo sobre o eixo (sob o orifício de imageamento), as células podem se desenvolver em um padrão de anel que traça o máximo do campo. Para ímãs pequenos, também ilustrados na figura 13B, com orifícios menores, o campo mínimo sobre o eixo pode se tornar insignificante ou desaparecer na altura das células. Isto

pode de forma final render um conjunto multicelular compacto ao invés de conformado em anel.

[0097]A levitação magnética, de acordo com as modalidades da revelação, pode fornecer controle temporal e/ou espacial do padrão das células. A colocação das células em proximidade pode facilitar as interações entre populações de células que estavam originalmente afastadas. Isto pode ser realizado em um ambiente que conduz a visualização ou imageamento molecular in situ. Por exemplo, tais atributos do sistema são ilustrados (i) com tipos de célula simples nas figuras 3-9 e (ii) com tipos diferentes de células (ou populações) em ensaios de confronto nas figuras 13C-D entre células de glioblastoma humano cocultivadas (transfectadas com GFP; células verdes) e astrócitos humanos normais (transfectadas com mCherry; células vermelhas). Os conjuntos que foram originalmente cultivados separadamente podem ser confrontados magneticamente, conforme ilustrados na figura 13C (considerado tempo zero) e sua interação pode ser monitorada por 14 dias, conforme ilustrado na figura 13D. Embora uma interface límpida separando as estruturas celulares possa ser inicialmente evidente, por 12 horas, as populações podem começar a fundir e perder suas formas esféricas individuais. Após 3 dias, o ensaio de confronto pode coalescer em um esferoide simples com as células de glioblastoma humano invadindo a estrutura composta de astrócitos humanos normais. Estas modalidades podem apresentar aplicação prática em relação ao glioblastoma multiforme, o tipo mais comum, invasivo e letal de tumor do cérebro astrocítico⁵³⁻⁵⁷. Astrócitos humanos normais estão, de modo geral, entre o principal tipo de célula formando o cérebro e a coluna espinhal e são conhecidos por sustentarem a invasão do glioma maligno no tecido cerebral in vivo⁵⁸. O cultivo levitado pode ser empregado para análise da invasão do tumor cerebral de células do cérebro normais em ensaios de cultura de confrontação, que há muito vêm sendo correlacionada aos resultados clínicos⁵⁸.

[0098]Em algumas modalidades, mais de dois tipos de células e/ou

populações de células podem ser cocultivadas. As células levitadas podem ser cultivadas na presença de uma camada de alimentação. A força que é aplicada às células e receptores pode variar por alteração do campo magnético, por exemplo, por emprego de eletroímãs ou por movimento de ímãs permanentes. Estes métodos podem apresentar aplicação prática na pesquisa de mecanismos mecanossensíveis nas células, tais como na pesquisa de células tronco.

[0099]Em conjunto com a figura 12, que ilustra células levitadas mostrando semelhança impressionante com tecido nos organismos vivos, a figura 13 ilustra o potencial para levitação magnética de acordo com algumas concretizações, para formar a base para eficácia do medicamento e ensaios de classificação de medicamento. Vários compostos podem ser introduzidos para ver se qualquer um deles torna lenta a invasão do câncer. Resultados positivos podem indicar medicamentos promissores para luta contra o câncer. Os resultados podem indicar a eficiência do medicamento nos tumores em organismos vivos, devido ao fato de que as células levitadas lembram tecidos vivos.

[00100]A figura 13 ilustra um controle de forma e posição das células durante o cultivo da célula; cocultivo e ensaio de confrontação, também conhecido como ensaio de invasão de acordo com as modalidades da revelação. A figura 13A ilustra padrão de campo magnético calculado dos ímãs em anel usados para o conjunto de célula em 3-D na figura 13B. Altura e raio foram graduados pelo raio interno do ímã (R). Os ímãs em 13B, i, ii e iii apresentam valores de R de 2,8, 2,3 e 1,7 mm respectivamente. Para cada ímã o raio externo é de cerca de $4R$ e a espessura é igual a R . Um gráfico universal fornece uma aproximação do perfil do campo como uma função das coordenadas normalizadas. A escala de cor é linear e $B_{\max} \sim 3.000, 2.000$ e 1.500 G para estruturas B i, ii e iii. O centro do ímã é tomado como $z = 0$. As linhas pretas indicam as alturas dos conjuntos de células nas estruturas B i, ii e iii. O hidrogel magnetizado e as células podem ser atraídos para regiões de campo máximo, porém não

podem deixar o meio devido à tensão superficial. A figura 13B ilustra os esferoides de glioblastoma humano resultantes agrupados dos campos magnéticos descritos na figura 13A. Para ímãs de raio maior (i), na altura do conjunto o campo é maximizado fora do eixo geométrico de simetria, conduzindo a um padrão de célula conformado em anel. As células mostram esta distribuição espacial imediatamente no início da levitação, onde a barra de escala é de 400 μm . Estas estruturas multicelulares 3D foram cultivadas nas placas de cultura de tecido com revestimentos modificados por anexação de um ímã conformado em anel acima de cada poço. A figura 13C ilustra fotomicrografia de campo brilhante e fluorescência de células de glioblastoma humano (verde; células expressando GFP) e de astrócitos humanos normais (vermelho; marcados mCherry) cultivadas separadamente e então guiadas magneticamente em conjunto (tempo = 0). A figura 13D ilustra confronto entre células de glioblastoma humano e astrócitos normais na figura 13C, monitoradas por dez dias e meio. A invasão do esferoide composto de astrócitos humanos normais por células de glioblastoma humano serve como um ensaio padrão da invasividade do glioma maligno³⁴. Nesta figura, a barra de escala é de 200 μm .

[00101] Outra modalidade da revelação pode fornecer impressão ou padronização celular sobre uma superfície. Por exemplo, isto pode ser realizado por direcionamento magnético de um conjunto de células para uma superfície, permitindo que algumas células sejam anexadas à superfície e movendo a esfera de células sobre a superfície para formar um padrão de células, conforme ilustrado nas figuras 14 e 15. Alternativamente, isto pode ser realizado por emprego de fios para transporte de corrente ou de ímãs permanentes, que podem criar um perfil de campo na forma desejada para as células, pelo que, permitindo que as células inicialmente livres se movam no campo para anexação ao padrão desejado, conforme ilustrado nas figuras 16-20.

[00102] Em algumas modalidades, as células podem ser padronizadas sobre uma superfície através de técnicas de impressão. A impressão das células sobre uma

superfície pode ser benéfica para uma ampla faixa de aplicações médicas, tais como, substituição de tecido/órgão e cura de feridas⁶⁰⁻⁶⁸. As figuras 14 e 15 demonstram o potencial de determinadas modalidades desta revelação para impressão/obtenção de gráfico das células. Em algumas modalidades, este procedimento pode ser obtido durante o tratamento das células com fago Au-MIO. No mesmo, as células podem ser levitadas por um período de tempo desejado, que pode variar de minutos a dias e as células podem ser guiadas magneticamente em direção a superfície para padronização. Em algumas modalidades, após as células começarem a atacar a superfície, as células podem então deslocar a estrutura em 3D para uma nova posição, onde as células anexadas à superfície permanecerão anexadas. Em algumas concretizações, as células podem ser células guiadas magneticamente, direcionadas para o padrão magnético de impressão, desviando da levitação da célula. Com qualquer um destes procedimentos, as células podem atacar a superfície e permanecerem viáveis. Estes procedimentos podem produzir um padrão de células na superfície. Por exemplo, a figura 15 ilustra uma nova letra N escrita sobre uma superfície desta forma.

[00103]A figura 14 ilustra um exemplo de padronização celular sobre uma superfície empregando uma técnica de impressão de célula de acordo com algumas modalidades da revelação. Um conjunto que foi inicialmente levitado foi guiado para uma superfície plástica. Após 12 horas, algumas células migraram para fora do conjunto e se anexaram ao plástico.

[00104]Determinadas modalidades podem combinar litograficamente padronização com ímãs permanentes. Por exemplo, quando se emprega padrão de campo magnético pequeno, um campo de base uniforme pode ser aplicado com um ímã permanente grande ou eletromagnético. A superfície pode ser orientada em qualquer direção com relação à gravidade, não sendo necessariamente plana. Isto pode aumentar a magnetização das partículas magnéticas e aumentar as forças sobre as nanopartículas, células e materiais.

[00105]A figura 15 ilustra um exemplo de padronização celular sobre uma superfície empregando uma técnica de impressão celular, de acordo com uma modalidade da revelação. A imagem de fluorescência de HGBM expressando GFP magneticamente padronizado emprega técnica de impressão celular. Em direção à esquerda, pode ser visto que a letra N foi gerada sobre o plástico de cultura de tecido por direcionamento magnético das células HGBM tratadas com fago Au-MIO em relação aos pontos específicos na superfície de uma placa de cultura de tecido. Em direção à direita, uma fotomicrografia das células HGBM que podem ser vistas anexadas à ponta do padrão N (indicado por linhas pontilhadas).

[00106]Algumas modalidades da revelação podem fornecer padronização celular sobre uma superfície empregando fios transportando corrente ou campos magnéticos permanentes que atraem as células para um padrão sobre a superfície. Os fios de transporte de corrente podem ser criados em ou sobre uma superfície ou afixados em ou sobre uma superfície ou se manterem em proximidade acima ou abaixo de uma superfície por uma variedade de técnicas. Em algumas modalidades, a padronização litográfica do material conduzido sobre a superfície pode ser empregada para fabricação de fios. O padrão das amostras é ilustrado na figura 16. Um exemplo de um perfil de força gerado por tais fios é ilustrado na figura 17. Um protótipo de fios sobre um substrato de safira, com poços de cultura de tecido (também conhecido como amostra biológica) acima do mesmo é ilustrado na figura 18. Fotografias do protótipo, juntamente com equipamento para gerar correntes e incorporação em uma configuração do microscópio, são ilustrados na figura 19. A figura 20 ilustra correntes passando através dos fios para criar um campo magnético que atrai as células e o hidrogel contendo nanopartículas MIO. O padrão dos campos magnéticos que pode produzir efeitos semelhantes pode também ser produzido com padrão de material magnético permanente, tal como, ímãs permanentes em volume, padrão sobre fita de gravação magnética ou padrão de materiais, tais como os usados nos HD dos

computadores para armazenamento magnético de dados.

[00107]A figura 16 ilustra uma imagem tomada próxima do padrão litográfico de amostra para fios de transporte de corrente para fabricação do padrão de superfície das células, de acordo com as modalidades da revelação. A barra de escala de 50 μm se aplica apenas as 3 formas superiores.

[00108]A figura 17 ilustra cálculos da força magnética da amostra, aplicáveis a algumas modalidades da revelação. O perfil de força pode ser normalizado para corrente ao quadrado e momento dipolar do ímã para uma seção transversal através de dois fios de transporte de corrente paralelos de 1 μm acima dos fios. Hidrogel contendo MIO e células podem ser atraídos para posições onde a força cruza zero.

[00109]A figura 18 ilustra protótipo da construção de microdispositivo para os fios litograficamente padronizados, de acordo com as modalidades da revelação. Os fios de transporte de corrente podem ser padronizados empregando técnicas padrão de litografia, seguido por eletro galvanização de ouro. Um fotoresistor tanto negativo quanto positivo pode ser empregado, onde o padrão resultante é inverso a máscara empregada. Os exemplos da máscara litográfica são mostrados no lado esquerdo da figura. No lado direito se encontra uma lâmina para microscópio de safira com os fios de ouro litograficamente padronizados. Na parte superior da lâmina se encontra uma fileira de poços de amostra de plástico. A safira pode ser uma boa escolha de substrato uma vez que a mesma é opticamente transparente, eletricamente isolada, termicamente condutora, opticamente polida e não suscetível a fratura quando do aquecimento local.

[00110]A figura 19 ilustra uma preparação de microscópio e dispositivo de microchip útil em algumas modalidades da revelação. O lado esquerdo mostra o microscópio com um microchip. O lado direito mostra uma imagem tomada próxima do chip, mostrando conexões elétricas e poços de amostra de plástico.

[00111]A figura 20 ilustra a manipulação e padronização de superfície de

células tronco neurais com microdispositivo de padronização, de acordo com as modalidades da revelação. Células tronco neurais de murino C17.2 podem ser cultivadas dentro do hidrogel por 48 horas. A figura 20A não ilustra corrente sendo aplicada. A figura 20B ilustra conjuntos de células revelados na direção do padrão de fio Au quando uma corrente 4A é aplicada. No presente documento, os fios estão abaixo do plástico formando o recipiente para as células e meios, de modo que as células não estão em contato com os fios. As células nos poços foram ainda viáveis por 48 horas após o experimento ter sido realizado.

[00112] Ainda outra modalidade da revelação pode utilizar os mesmos sistemas e métodos para padronizar uma superfície de fago Au-MIO sem células, conforme ilustrado nas figuras 21-24.

[00113] A figura 21 ilustra a formação de padrão de fago Au-MIO empregando fios transportando corrente para gerar um campo magnético padronizado. Padrão semelhante pode ser gerado com ímãs permanentes, tais como, fita de gravação magnética ou com material magnético sólido, tal como é usado nos HD (discos rígidos) do computador. O padrão levitado pode também ser formado e manipulado. Um gradiente de fago Au-MIO pode também ser formado por criação de um gradiente no campo magnético, conforme ilustrado na figura 22.

[00114] A figura 21 ilustra manipulação e padronização de material de fago Au-MIO sem células, demonstrado com microdispositivo de padronização, de acordo com as modalidades da revelação. A padronização do hidrogel pode ser gerada por aplicação de corrente aos íons Au litograficamente padronizados. Isto pode mover o hidrogel na direção máxima do campo magnético que está localizado entre os fios ou no centro dos laços. Ambas as figuras 21A e 21B ilustram as sequências sem corrente sendo aplicadas na primeira estrutura e a corrente em elevação até 4.0 A em um intervalo de 45 segundos, o que produz padrão de hidrogel mostrado no padrão na extrema direita.

[00115]De acordo com as modalidades da revelação, o campo pode apresentar uma resistência e gradiente de resistência suficiente para elevar a célula da superfície inferior do recipiente de cultura ou coletar as células em suspensão ou tracionar as células para a superfície, dependendo do efeito desejado. As células podem ser levitadas no volume do meio ou trazidas para a interface de ar-líquido quando a tensão de superfície impedirá que as células deixem o meio líquido. De modo a controlar a posição das células, a quantidade de material magnético por célula e a resistência e gradiente do campo magnético podem ser suficientes para superar as outras forças sobre as células que poderiam interromper a padronização. Isto pode ser realizado em uma grande faixa de parâmetros previstos por fórmulas padrão, porém os parâmetros podem depender da modalidade específica da revelação. Por exemplo, para superfície ou padronização levitada e manipulação das células, pelo menos 0,01 pg/célula de magnetita é necessário. Mais material magnético pode ser empregado, até 100 µg/célula o que pode produzir mais força. Material com magnetização maior ou menor necessitaria de concentrações menores ou maiores, respectivamente. Campos magnéticos típicos na ordem de 1G a 105 G e gradientes de campo de 0,01 G/cm a 105 G podem ser usados dependendo da aplicação. Experimentação simples pode ser realizada para encontrar ótimas condições.

[00116]A figura 22 ilustra uma geração de gradiente de fago Au-MIO empregando gradiente de campo magnético, de acordo com as modalidades da revelação, mostrada com fotomicrografia de campo claro (luz transmitida) (barra de escala de 20 µm). Esta imagem mostra uma troca na luz transmitida resultante do gradiente de hidrogel (densidade mais alta na região escura, indicada pela seta abaixo da figura) gerada da colocação de um ímã permanente próximo ao micropoço no qual a solução de nanopartículas de Au-FeO foi adicionada à solução de fago como parte da síntese do hidrogel.

[00117]As células podem se concentrar espontaneamente nas regiões de

concentração alta de hidrogel, assim a padronização do hidrogel primeiro pode fornecer outro modo de padronizar as células, conforme ilustrado na figura 23. O hidrogel pode ser formado do diferentes tipos de fago sem alterar significativamente a capacidade de formar um hidrogel ou incorporar nanopartículas magnéticas. O fago pode ser projetado com receptores específicos para célula que preferivelmente se ligam às células, tais como, fago expressando o peptídeo RGD-4C. Um padrão de hidrogel Au-MIO-RGD-4C, formado em uma modalidade com dois ímãs permanentes abaixo do poço de cultivo, pode conduzir a uma padronização das células de Melanoma (B16) incubadas por 16 horas (superior, mediado por receptor). O fago expressando o peptídeo fd-tet pode não se ligar às células tão fortemente, assim, o hidrogel Au-MIO-fd-tet pode servir como um controle (inferior, controle). Dois ímãs permanentes podem ser colocados sob cada poço, com os campos magnéticos apontados para direções opostas, de modo que os ímãs se repelem propriamente. O hidrogel e as nanopartículas podem ser absorvidos e/ou anexados às células através do motivo de peptídeo ligando a integrina, o que media a adesão celular, revelada sobre o fago. Isto pode conduzir a mais de uma concentração das células nas áreas de campo forte próximas a cada ímã (indicado pela fenda das células entre os ímãs). Em contraste, as células de hidrogel de controle (inferiores) podem cobrir todo o micropoço.

[00118]A figura 23 ilustra a padronização celular alvejada para receptor usando padronização de campo magnético de hidrogéis, de acordo com algumas modalidades da revelação. Um hidrogel pode ser formado com tipos diferentes de fago, sem alterar significativamente a capacidade de formar um hidrogel ou incorporar nanopartículas magnéticas. O fago pode ser projetado com receptores específicos para célula que se combinam preferivelmente com as células, tais como, fago expressando o peptídeo RGD-4C. Um padrão de hidrogel Au-MIO-RGD-4C formado neste caso com dois ímãs permanentes abaixo do poço de cultivo pode conduzir a uma padronização das células de Melanoma (B16) incubadas por 16 horas (parte superior,

mediada por receptor). O fago expressando peptídeo fd-tet pode não se ligar às células tão fortemente, assim o hidrogel Au-MIO-fd-tet pode servir como um controle (parte inferior, controle). Dois ímãs permanentes foram colocados sob cada poço, com campos magnéticos apontados para direções opostas (ímãs repelidos um do outro). O sistema onde o hidrogel e as nanopartículas são absorvidos e/ou anexados às células através do motivo de peptídeo de ligação de integrina, que media a adesão celular, deslocado sobre o fago conduz a mais concentração de células nas áreas de campo forte próximo de cada ímã (indicado pela fenda das células entre os ímãs). Em contraste, as células de hidrogel de controle (parte inferior) cobriram todo o micropoço.

[00119]Uma vez que o fago pode ser modificado para servir como um vetor de liberação de gene, a padronização do hidrogel pode conduzir à transfecção padronizada do material genético, conforme ilustrado na figura 24. Em algumas modalidades, o fago do vírus adeno-associado (AAVP)³⁸ pode ser usado para formar Au-MIO-AAVP para ferramentas de liberação de gene superiores. A combinação de AAVP com hidrogel de fago pode ser uma ferramenta útil para seguir o destino das nanopartículas. Adicionalmente, a combinação pode fornecer indicações de onde a tradução do gene é realizada e, para combinação de imageamento multimodal, diretriz magnética e liberação de gene/RNA. As células na região com alta concentração de hidrogel podem mostrar um nível mais alto de transfecção, produzindo uma expressão padronizada do gene. Esta abordagem pode também traduzir a liberação de RNA pequeno guiado na direção das ferramentas de silenciamento do gene. Esta capacidade de liberação do gene pode também ser incorporada a qualquer um dos métodos de padronização celular já discutidos.

[00120]A figura 24 ilustra transfecção de gene guiada magnética empregando Au-MIO-AAVP, de acordo com as modalidades da revelação. Aqui, células KS1767 são incubadas com Au-MIO AAVP-RGD-4C. O Au-MIO AAVP-RGD-4C (AAVP, fago de vírus adeno- associado)³⁸ pode integrar propriedades de alvejamento e

transdução de gene eficientes dos vetores à base de fago com diretriz magnética de hidrogéis como uma ferramenta de liberação de gene superior. O painel à esquerda é uma imagem de campo claro enquanto o da direita é uma imagem de fluorescência de células expressando GFP. Dentro do mesmo micropoço, a linha indica o limite dividindo uma região na qual um imã concentrou a nanopartícula magnética transportando Au-MIO AAVP-RGD-4C (imã permanente colocado sob o poço) e região na qual existe um campo magnético inferior e nenhuma concentração. As células na região com concentração maior de hidrogel podem mostrar níveis de transfecção que são significativos (~ 6x maiores).

[00121]Algumas modalidades podem prover resultados que se comparam favoravelmente aos métodos tradicionais. Por exemplo, o cultivo por levitação magnética pode fornecer resultados favoráveis quando comparados aos métodos de cultivo em 3D estabelecidos. Um produto de matriz de cultivo em 3D comum é Matrigel® comercialmente disponível na BD, Inc. A matrigel geralmente consiste na matriz de membrana de base purificada derivada de camundongos e é considerada o “padrão puro” para conjunto de célula em 3D7. As células dispersas na Matrigel podem formar estruturas multicelulares maiores com interações de célula-célula significativas apenas após decurso de tempo para migração e divisão celular suficientes. A matriz matrigel pode também produzir altos níveis de difração, difusão, opacidade e autofluorescência que são dificuldades conhecidas em muitos modelos de cultura de célula em 3D estabelecidos com base nas matrizes extracelulares e géis/arcaouço poliméricos^{2, 59}. A matrigel pode apresentar limitações adicionais incluindo a necessidade de condições isentas de soro que não são desejáveis para cultivo da maioria das células e suplementos de fator de crescimento caros. O tecido desenvolvido na Matrigel pode não ser introduzido em seres humanos uma vez que as proteínas dos camundongos podem promover uma resposta imune. Finalmente não existe potencial para manipulação espacial ou temporal das células empregando Matrigel, enquanto,

conforme mostrado a seguir, isto é óbvio com levitação magnética.

[00122]A presente revelação fornece, em determinadas modalidades, um sistema compreendendo células, várias nanopartículas dispostas dentro ou anexadas ou contidas nas células, pelo menos um tipo das quais é magnético e um campo magnético criado por fios de transporte de corrente e/ou ímãs permanentes que aplicam uma força a pelo menos uma das várias nanopartículas.

[00123]A presente revelação provê, em determinadas modalidades, um sistema compreendendo células, várias nanopartículas dispostas dentro ou anexadas ou contidas nas células, pelo menos um tipo das mesmas sendo magnético e um campo magnético criado por fios de transporte de corrente ou ímãs permanentes que aplicam uma força a pelo menos uma das várias nanopartículas, trazendo as células para fora da superfície, de modo a desenvolverem em suspensão no meio líquido ou em uma interface de gás-líquido. As células podem então se desenvolver enquanto estão suspensas.

[00124]A presente revelação fornece, em determinadas modalidades, um sistema compreendendo células, várias nanopartículas dispostas no interior, anexadas ou contidas nas células, pelo menos um tipo das mesmas sendo magnético e um campo magnético criado por fios que transportam corrente ou ímãs permanentes que aplicam uma força a pelo menos uma das várias nanopartículas e traz as células para fora da superfície, de modo a se desenvolverem em suspensão no meio líquido ou em uma interface de gás-líquido. As células então se desenvolvem enquanto suspensas e o campo magnético é alterado, de modo a trazer as células para um local específico na superfície, de modo que algumas células serão anexadas lá. O campo é então alterado para permitir que as células se anexem em outro local para formar um padrão.

[00125]A presente revelação fornece, em determinadas modalidades, um sistema compreendendo células, várias nanopartículas dispostas no interior, anexadas ou contidas nas células, pelo menos um tipo das mesmas sendo magnético e um

campo magnético criado por fios que transportam corrente ou imãs permanentes que aplicam uma força a pelo menos uma das várias nanopartículas e traz as células na direção da superfície, de modo a se desenvolverem em um padrão específico.

[00126]A presente revelação fornece, em determinadas modalidades, um sistema compreendendo fago, várias nanopartículas dispostas no interior do fago e um campo magnético criado por fios que transportam corrente ou imãs permanentes que aplicam uma força a pelo menos uma das várias nanopartículas.

[00127]A presente revelação fornece, em determinadas modalidades, um sistema compreendendo fago, várias nanopartículas dispostas no interior do fago, e um ou mais fios condutores, onde pelo menos uma porção de um ou mais fios condutores, onde pelo menos uma porção de um ou mais fios está em contato com o fago.

[00128]A presente revelação fornece, em determinadas modalidades, um método para fabricação de um material, o método compreendendo: provisão de um material compreendendo fago, várias nanopartículas e um ou mais fios condutores, onde pelo menos uma porção de um ou mais fios está em contato com o fago, escoando uma corrente elétrica através de um ou mais de um ou mais fios condutores, de modo a gerar um campo magnético e permitindo que o material seja alterado em resposta ao campo magnético.

[00129]A presente revelação fornece, em determinadas modalidades, um método para levitação de várias células. O método pode compreender provisão de um campo magnético. O método pode compreender também levitação de pelo menos algumas das várias células no campo magnético, onde as várias células compreendem nanopartículas magnéticas.

[00130]A presente revelação também provê, em algumas modalidades, um método de cultivo das células. O método pode compreender provisão de várias células. O método pode compreender também provisão de um campo magnético. O método pode compreender também levitação de pelo menos algumas das várias células

no campo magnético, onde as várias células compreendem nanopartículas magnéticas. O método pode compreender também manutenção da levitação por um tempo suficiente, de modo a permitir o desenvolvimento das células para formar um conjunto.

[00131]A presente revelação também provê, em outras modalidades, um método para manipulação de células. O método pode compreender provisão das primeiras várias células. O método pode compreender também provisão de um campo magnético. O método pode compreender também levitação de pelo menos algumas das primeiras várias células no campo magnético, onde as primeiras várias células compreendem nanopartículas magnéticas. O método pode compreender também variação do campo magnético com o passar do tempo, de modo a manipular pelo menos uma primeira porção das primeiras várias células.

[00132]A presente revelação também provê, nas modalidades específicas, um método para preparação de nanopartículas. O método pode compreender fornecimento de um hidrogel compreendendo nanopartículas magnéticas. O método pode compreender também provisão de um campo magnético. O método pode compreender também a sujeição do hidrogel ao campo magnético.

[00133]A presente revelação também provê, ainda em outras modalidades, um sistema para levitação de várias células. O sistema pode compreender um campo magnético. O sistema também pode compreender as várias células, onde as várias células estão dispostas no campo magnético e as várias células compreendem nanopartículas magnéticas.

[00134]De modo a facilitar um melhor entendimento da presente revelação são fornecidos a seguir exemplos de modalidades específicas. Os exemplos que se seguem não se destinam a limitar ou definir todo o escopo da revelação, de que forma for.

EXEMPLOS

[00135]Um conjunto de hidrogel contendo nanopartículas magnéticas foi

formado como se segue. Os hidrogéis foram gerados pelos procedimentos de nanofabricação descritos^{39, 40}, exceto para a inclusão de nanopartículas MIO. Uma solução de nanopartícula de ouro (diâmetro de 50 ± 8 nm) foi preparada seguindo-se o procedimento de redução de citrato comum⁷⁰ (razão molar de 0,8:1,0 de citrato de sódio: cloreto de Au(III); Sigma-Aldrich). Hidrogéis contendo MIO foram preparados por mistura da solução de nanopartícula de ouro (Absorvência óptica_{530 nm} = 1,2-1,5 unidades) com nanopó de MIO (especificado como magnetita, tamanho de partícula polidispersa < 50 nm; estabilizado com um agente tensoativo de PVP (polivinilpirrolidona); Sigma-Aldrich) a uma concentração de 0,3 mg/mL. Uma diluição de fago foi preparada com 10^9 unidades de transdução (TU)/ μ L em água com resina Picopure (H₂O). Finalmente, a solução de fago e a nanopartícula de ouro mais solução de óxido de ferro foram misturadas com volumes iguais e deixadas descansar por toda noite a 4°C para formação de hidrogel. Antes do uso experimental, cada sobrenadante mostrou não conter nanopartícula conforme evidenciado por medições de extinção de luz na região visível, os dados indicando que todas as nanopartículas metálicas foram incorporadas ao hidrogel resultante.

[00136]Células cultivadas em hidrogéis contendo MIO foram levitadas magneticamente como se segue. As células anexadas à superfície (crescimento a aproximadamente 80% de confluência) foram tratadas com 1 μ L de hidrogel por 1 cm² de área de superfície disponível para cultivo das células (tamanho do frasco de cultura) e incubadas por toda noite. As células tratadas foram destacadas por tripsina e EDTA. A tripsina foi removida por centrifugação. As células tratadas foram colocadas em uma placa de Petri de cultivo de tecido^{39, 40}. Um revestimento superior com um ímã de neodímio anexado foi imediatamente colocado no lugar. As linhagens de células e meios de cultura correspondentes usados foram LN-229 derivado de glioblastoma humano ou células U-251MG (transfectadas com GFP e mCherry) e astrócitos humanos normais (transfectados com mCherry) em meio de Eagle modificado Dulbecco

(DMEM) contendo soro bovino fetal a 10% (FBS) e DMEM glicose alta contendo FBS a 10% suplementado com piruvato de sódio 2 mM, glutamina, penicilina e estreptomicina. Células tronco neurais de murino C17.2 foram cultivadas em DMEM glicose alta contendo FBS a 10% e suplementado com piruvato de sódio 2 mM, glutamina, penicilina e estreptomicina⁷¹.

[00137]Conforme ilustrado na figura 12, a viabilidade das células e número de células usadas foram assegurados após as células serem destacadas. As células foram verificadas quanto à viabilidade com exclusão de azul-tripano e contadas com um hemocítmetro padrão. Neste experimento, metade da população das células ($\sim 3 \times 10^4$) foi transferida para semear uma amostra anexada à superfície em 2D e a outra metade foi semeada para formar um conjunto levitado em 3D. Finalmente, o número de células na estrutura multicelular levitada foi estimado por divisão do volume estimado da estrutura (de sua forma e tamanho) pelo volume médio de uma célula simples ($\sim 1,0$ nL).

[00138]A figura 1 ilustra Imagens de Ressonância Magnética que foram adquiridas com um instrumento MRI Bruker Biospec de 4,7 T, 40 cm. Os hidrogéis foram colocados em um tubo cônico, plástico de 12 mL para imageamento.

[00139]Conforme ilustrado nas figuras 4, 7, 8, 12, 13, 14,15, Bosc, NHA (astrócitos normais humanos) e as seguintes linhagens de células humanas HGBM: LN229 e U251 foram desenvolvidas em meio de Eagle modificado Dulbecco (DMEM) suplementado com soro bovino fetal a 10% (FCS). As transfecções e infecções retrovirais foram descritas. A m-cherry e a eGFP nos vetores retrovirais pCXb e pCXp, respectivamente, foram transfectadas no interior de células Bosc para produzir retrovírus contendo sobrenadantes que foram coletados 48 horas após a transfecção e usados para infecção das células NHA, NSC e GBM, conforme descrito anteriormente. As células foram tratadas e mantidas no meio de seleção 48 horas após infecção: blastidina (mCherry) ou puomicina (eGFP) e expressam a proteína fluorescente em

um modo estável.

[00140]Conjuntos multicelulares de células de glioblastoma humano foram fixados em 10 mM de PBS contendo glutaraldeído a 1% após 24 horas e 8 dias de levitação magnética. Estas estruturas foram então colocadas sobre redes de malha de níquel previamente revestidas com Formvar e evaporadas com carbono sendo então flutuadas sobre gotas de poli-L-lisina a 0,1% (Sigma Diagnostics) sobre “parafilm” (película flexível, semitransparente) por 5 minutos. A solução em excesso foi removida da rede por toque cuidadoso da borda da rede sobre filtro de papel. As redes não foram secas completamente em qualquer uma das etapas. As redes flutuaram sobre gotas da amostra sobre “parafilm” por 1 hora. Fluido em excesso foi removido e as redes foram então flutuadas sobre as gotas de BSA a 0,02% contendo molibdato de amônio a 1% em água destilada (pH 7,0) por 1 minuto. Fluido em excesso foi removido e as redes foram secas por toda noite. As imagens do microscópio eletrônico de transmissão foram capturadas por um microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1010, JEOL) ajustado com um sistema de câmera e dispositivo acoplado de carga digital AMT Advantage (Deben UK Limited, Suffolk, Reino Unido) .

[00141]Portanto, a presente revelação está bem adaptada para obtenção dos fins e vantagens mencionados, bem como aqueles que são inerentes a mesma. As modalidades específicas reveladas acima são apenas ilustrativas, uma vez que a presente revelação pode ser modificada e praticada de modos diferentes, porém equivalentes e claros aos versados na técnica com o benefício dos ensinamentos do presente documento. Adicionalmente, não é apresentada nenhuma limitação aos detalhes da construção ou projeto mostrados no presente documento, a não ser conforme descrito nas reivindicações a seguir. Portanto, fica claro que as modalidades ilustrativas específicas reveladas acima podem ser alteradas ou modificadas e todas tais variações são consideradas como estando dentro do espírito e escopo da presente revelação. Na prática, qualquer faixa de valores (da forma, “de cerca de a cerca de b”

ou equivalente, “aproximadamente de a para b” ou equivalência, “aproximadamente a partir de a-b”) revelada no presente documento deve ser entendida como se referindo ao conjunto de domínio (o conjunto de todos subconjuntos) da respectiva faixa de valores, e estabelecida cada faixa englobada dentro da faixa mais ampla de valores. Também, os termos nas reivindicações apresentam seu significado comum, a menos que de outra forma explícita e claramente definida pelo depositante da Patente.

REFERÊNCIAS

1. Polak, J. M.; Mantalaris, S., Stem Cells Bioprocessing: An Important Milestone to Move Regenerative Medicine Research Into the Clinical Arena. *Pediatr. Res.* 2008, 63, (5), 461-466.
2. Cukierman, E.; Pankov, R.; Stevens, D. R.; Yamada, K. M., Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* 2001, 294, (5547), 1708-1712.
3. Atala, A., Advances in Tissue and Organ Replacement. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2008, 3, (1), 21-31.
4. Abbott, A., Biology's new dimension. *Nature* 2003, 424, 870-872.
5. Kim, J. B.; Stein, R.; O'Hare, M. J., Three-dimensional *in vitro* tissue culture models of breast cancer – a review. *Breast Cancer Res. Treat.* 2004, 85, (3), 281-291.
6. Pampaloni, F.; Reynaud, E. G.; Stelzer, E. H. K., The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8, (10), 839-845.
7. Prestwich, G. D., Simplifying the extracellular matrix for 3-D cell culture and tissue engineering: A pragmatic approach. *J. Cell. Biochem.* 2007, 101, (6), 1370-1383.
8. Wang, R.; Xu, J.; Juliette, L.; Castilleja, A.; Love, J.; Sung, S. Y.; Zhau, H. E.; Goodwin, T. J.; Chung, L. W., Three-dimensional co-culture models to study prostate cancer growth, progression, and metastasis to bone. *Semin. Cancer Biol.* 2005, 15, (5), 353-364.

9. Boudreau, N.; Weaver, V., Forcing the Third Dimension. *Cell* 2006, 125, (3), 429-431.
10. Atala, A., Engineering tissues, organs and cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007, 1, (2), 83-96.
11. Griffith, L. G.; Swartz, M. A., Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7, (3), 211-224.
12. Friedrich, M. J., Studying Cancer in 3 Dimensions: 3-D Models Foster New Insights into Tumorigenesis. *JAMA* 2003, 290, (15), 1977-1979.
13. Souza, G.; Arap, W.; Pasqualini, R. Method and Compositions Related to Phage-Nanoparticle Assemblies. 2006.
14. Ito, A.; Takizawa, Y.; Honda, H.; Hata, K.; Kagami, H.; Ueda, M.; Kobayashi, T., Tissue engineering using magnetite nanopartículas and magnetic force: heterotypic layers of cocultured hepatocytes and endothelial cells. *Tissue Eng.* 2004, 10, (5-6), 833-40.
15. Ito, A.; Ino, K.; Hayashida, M.; Kobayashi, T.; Matsunuma, H.; Kagami, H.; Ueda, M.; Honda, H., Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanopartículas and magnetic force. *Tissue Eng.* 2005, 11, (9-10), 1553-61.
16. Ito, A.; Hayashida, M.; Honda, H.; Hata, K.; Kagami, H.; Ueda, M.; Kobayashi, T., Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanopartículas and magnetic force. *Tissue Eng.* 2004, 10, (5-6), 873-80.
17. Ito, A.; Hibino, E.; Kobayashi, C.; Terasaki, H.; Kagami, H.; Ueda, M.; Kobayashi, T.; Honda, H., Construction and delivery of tissue-engineered human retinal pigment epithelial cell sheets, using magnetite nanopartículas and magnetic force. *Tissue Eng.* 2005, 11, (3-4), 489-96.
18. Srouji, S.; Kizhner, T.; Livne, E., 3D scaffolds for bone marrow stem cell support in bone repair. *Regen. Med.* 2006, 1, (4), 519-28.

19. Even-Ram, S.; Yamada, K. M., Cell migration in 3D matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005, 17, (5), 524-32.
20. Ng, C. P.; Pun, S. H., A perfusable 3D cell-matrix tissue culture chamber for in situ evaluation of nanoparticle vehicle penetration and transport. *Biotechnol. Bioeng.* 2008, 99, (6), 1490-501.
21. Lin, A. Y.; Ai, Z.; Lee, S.-C.; Bajcsy, P.; Pe'er, J.; Leach, L.; Maniotis, A. J.; Folberg, R., Comparing Vasculogenic Mimicry With Endothelial Cell-lined Vessels: Techniques for 3D Reconstruction and Quantitative Analysis of Tissue Components from Archival Paraffin Blocks. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2007, 15, (1), 113-9.
22. Zhang, S.; Gelain, F.; Zhao, X., Designer self-assembling peptide nano-fiber scaffolds for 3D tissue cell cultures. *Semin. Cancer Biol.* 2005, 15, (5), 413-20.
23. Decaestecker, C.; Debeir, O.; Van Ham, P.; Kiss, R., Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. *Med. Res. Rev.* 2007, 27, (2), 149-76.
24. Schindler, M.; Nur-E-Kamal, A.; Ahmed, I.; Kamal, J.; Liu, H.-Y.; Amor, N.; Ponery, A. S.; Crockett, D. P.; Grafe, T. H.; Chung, H. Y.; Weik, T.; Jones, E.; Meiners, S., Living in three dimensions: 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine. *Cell Biochem. Biophys.* 2006, 45, (2), 215-227.
25. Pankhurst, Q.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J., Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003, 36, R167-R181.
26. Ino, K.; Ito, A.; Honda, H., Cell patterning using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 97, (5), 1309-1317.
27. Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T., Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 2005, 100, (1), 1-11.
28. Dobson, J., Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3, (3), 139-143.

29. Au, C.; Mutkus, L.; Dobson, A.; Riffle, J.; Lalli, J.; Aschner, M., Effects of Nanoparticles on the Adhesion and Cell Viability on Astrocytes. *Biol. Trace Elem. Res.* 2007, 120, (1-3), 248-256.

30. Dobson, J.; Cartmell, S. H.; Keramane, A.; El Haj, A. J., Principles and design of a novel magnetic force mechanical conditioning bioreactor for tissue engineering, stem cell conditioning, and dynamic in vitro screening. *IEEE Trans. Nanobiotechnology* 2006, 5, (3), 173-7.

31. Hautot, D.; Pankhurst, Q. A.; Morris, C. M.; Curtis, A.; Burn, J.; Dobson, J., Preliminary observation of elevated levels of nanocrystalline iron oxide in the basal ganglia of neuroferritinopathy patients. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1772, (1), 21-25.

32. Coleman, C. B.; Gonzalez-Villalobos, R. A.; Allen, P. L.; Johanson, K.; Guevorkian, K.; Valles, J. M.; Hammond, T. G., Diamagnetic levitation changes growth, cell cycle, and gene expression of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 98, (4), 854-863.

33. Winkleman, A.; Gudiksen, K. L.; Ryan, D.; Whitesides, G. M.; Greenfield, D.; Prentiss, M., A magnetic trap for living cells suspended in a paramagnetic buffer. *Appl. Phys. Lett.* 2004, 85, (12), 2411-2413.

34. Felder, R. A.; Gildea, J. J. Automated Cell Culture System and Process. 2003.

35. Becker, J. L.; Coffin, S. B. Magnetic Three-Dimensional Cell Culture Apparatus and Method. 2003.

36. Gillette, B. M.; Jensen, J. A.; Tang, B.; Yang, G. J.; Bazargan-Lari, A.; Zhong, M.; Sia, S. K., In situ collagen assembly for integrating microfabricated three-dimensional cell-seeded matrices. *Nat. Mater.* 2008, 7, (8), 636-40.

37. Lee, J.; Cuddihy, M. J.; Kotov, N. A., Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *Tissue Eng. Part B* 2008, 14, (1), 61-86.

38. Hajitou, A.; Trepel, M.; Lilley, C. E.; Soghomonyan, S.; Alauddin, M. M.;

Marini III, F. C.; Restel, B. H.; Ozawa, M. G.; Moya, C. A.; Rangel, R.; Sun, Y.; Zaoui, K.; Schmidt, M.; von Kalle, C.; Weitzman, M. D.; Gelovani, J. G.; Pasqualini, R.; Arap, W., A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging. *Cell* 2006, 125, (2), 385-98.

39. Souza, G. R.; Christianson, D. R.; Staquicini, F. I.; Ozawa, M. G.; Snyder, E. Y.; Sidman, R. L.; Miller, J. H.; Arap, W.; Pasqualini, R., Networks of Gold Nanoparticles and Bacteriophage as Biological Sensors and Cell-Targeting Agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103, (5), 1215-1220.

40. Souza, G. R.; Yonel-Gumruk, E.; Fan, D.; Easley, J.; Rangel, R.; Guzman-Rojas, L.; Miller, J. H.; Arap, W.; Pasqualini, R., Bottom-Up Assembly of Hydrogels from Bacteriophage and Au Nanoparticles: The Effect of Cis- and Trans-Acting Factors. *PLoS ONE* 2008, 3, (5), e2242.

41. Illés, E.; Tombácz, E., The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2006, 295, (1), 115-123.

42. Wan, X.; Li, Z.; Lubkin, S. R., Mechanics of mesenchymal contribution to clefting force in branching morphogenesis. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2008, 7, (5), 417-426.

43. Rosines, E.; Schmidt, H. J.; Nigam, S. K., The Effect of Hyaluronic Acid Size and Concentration on Branching Morphogenesis and Tubule Differentiation in Developing Kidney Culture Systems: Potential Applications to Engineering of Renal Tissues. *Biomaterials* 2007, 28, (32), 4806-4817.

44. Warheit, D. B.; Sayes, C. M.; Reed, K. L.; Swain, K. A., Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol. Ther.* 2008, 120, (1), 35-42.

45. Teeguarden, J. G.; Hinderliter, P. M.; Orr, G.; Thrall, B. D.; Pounds, J. G., Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity

assessments. *Toxicol. Sci.* 2007, 95, (2), 300-312.

46. Groneberg, D. A.; Giersig, M.; Welte, T.; Pison, U., Nanoparticle-Based Diagnosis and Therapy. *Curr. Drug Targets* 2006, 7, (6), 643-648.

47. Kolonin, M. G.; Saha, P. K.; Chan, L.; Pasqualini, R.; Arap, W., Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat. Med.* 2004, 10, (6), 625-632.

48. Barbas III, C. F.; Burton, D. R.; Scott, J. K.; Silverman, G. J., *Phage Display, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001.

49. Wang, X.-B.; Huang, Y.; Gascoyne, P. R. C.; Becker, F. F.; Hölzel, R.; Pethig, R., Changes in Friend murine erythroleukaemia cell membranes during induced differentiation determined by electrorotation. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1994, 1193, (2), 330-344.

50. Csikász-Nagy, A.; Battogtokh, D.; Chen, K. C.; Novák, B.; Tyson, J. J., Analysis of a generic model of eukaryotic cell-cycle regulation. *Biophys. J.* 2006, 90, (12), 4361-79.

51. Ofek, G.; Revell, C. M.; Hu, J. C.; Allison, D. D.; Grande-Allen, K. J.; Athanasiou, K. A., Matrix development in self-assembly of articular cartilage. *PLoS ONE* 2008, 3, (7), e2795.

52. Marx, U.; Sandig, V., *Drug Testing In Vitro: Breakthroughs and Trends in Cell Culture Technology*. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2007.

53. Chuang, Y.-Y.; Tran, N. L.; Rusk, N.; Nakada, M.; Berens, M. E.; Symons, M., Role of synaptojanin 2 in glioma cell migration and invasion. *Cancer Res.* 2004, 64, (22), 8271-8275.

54. Kenny, P. A.; Lee, G. Y.; Myers, C. A.; Neve, R. M.; Semeiks, J. R.; Spellman, P. T.; Lorenz, K.; Lee, E. H.; Barcellos-Hoff, M. H.; Petersen, O. W.; Gray, J. W.; Bissell, M. J., The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol. Oncol.* 2007, 1, (1), 84-96.

55. Bhowmick, D. A.; Zhuang, Z.; Wait, S. D.; Weil, R. J., A Functional

Polymorphism in the EGF Gene Is Found with Increased Frequency in Glioblastoma Multiforme Patients and Is Associated with More Aggressive Disease. *Cancer Res.* 2004, 64, (4), 1220-1223.

56. Nieder, C.; Astner, S. T.; Molls, M.; Grosu, A. L., Analysis of long-term survivors of glioblastoma multiforme in a single institution with aggressive local retreatment protocol. *Anticancer Res.* 2007, 27, (4C), 2993-2996.

57. Balakrishnan, A.; Bleeker, F. E.; Lamba, S.; Rodolfo, M.; Daniotti, M.; Scarpa, A.; van Tilborg, A. A.; Leenstra, S.; Zanon, C.; Bardelli, A., Novel Somatic and Germline Mutations in Cancer Candidate Genes in Glioblastoma, Melanoma, and Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.* 2007, 67, (8), 3545-3550.

58. Sanson, M.; Marcaud, V.; Robin, E.; Valéry, C.; Sturtz, F.; Zalc, B., Connexin 43-mediated bystander effect in two rat glioma cell models. *Cancer Gene Ther.* 2002, 9, (2), 149-155.

59. Yamada, K. M.; Cukierman, E., Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007, 130, (4), 601-10.

60. Heyneman, A.; Beele, H.; Vanderwee, K.; Defloor, T., A systematic review of the use of hydrocolloids in the treatment of pressure ulcers. *J. Clin. Nurs.* 2008, 17, (9), 1164-73.

61. Cui, F. Z.; Tian, W. M.; Hou, S. P.; Xu, Q. Y.; Lee, I. S., Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2006, 17, (12), 1393-401.

62. Burd, A., Evaluating the use of hydrogel sheet dressings in comprehensive burn wound care. *Ostomy Wound Manage* 2007, 53, (3), 52-62.

63. Park, H.; Temenoff, J. S.; Tabata, Y.; Caplan, A. I.; Mikos, A. G., Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2007, 28, (21), 3217-27.

64. Mikos, A. G.; Herring, S. W.; Ochareon, P.; Elisseeff, J.; Lu, H. H.; Kandel, R.; Schoen, F. J.; Toner, M.; Mooney, D.; Atala, A.; Van Dyke, M. E.; Kaplan, D.; Vunjak-Novakovic, G., Engineering Complex Tissues. *Tissue Eng.* 2006, 12, (12), 3307-3339.
65. Ferreira, L. S.; Gerecht, S.; Fuller, J.; Shieh, H. F.; Vunjak-Novakovic, G.; Langer, R., Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 2007, 28, (17), 2706-17.
66. Calvert, P., Materials science. Printing cells. *Science* 2007, 318, (5848), 208-9.
67. Prieve, D. C.; Alexander, B. M., Hydrodynamic Measurement of Double-Layer Repulsion Between Colloidal Particle and Flat Plate. *Science* 1986, 231, (4743), 1269-1270.
68. Ramachandran, N.; Hainsworth, E.; Bhullar, B.; Eisenstein, S.; Rosen, B.; Lau, A. Y.; Walter, J. C.; LaBaer, J., Self-assembling protein microarrays. *Science* 2004, 305, (5680), 86-90.
69. Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E., Chemotherapy targeted to tumor vasculature. *Curr. Opin. Oncol.* 1998, 10, (6), 560-5.
70. Handley, D. A., Methods for synthesis of colloidal gold. In *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*, Hayat, M. A., Ed. Academic Press: San Diego, 1989; Vol. 1, pp 23-27.
71. Snyder, E. Y.; Deitcher, D. L.; Walsh, C.; Arnold-Aldea, S.; Hartweig, E. A.; Cepko, C. L., Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 1992, 68, (1), 33-51.

REIVINDICAÇÕES

1. Método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:
fornecer um campo magnético;
fornecer uma primeira pluralidade de células que compreende uma ou mais nanopartículas magnéticas no interior das ditas células; e
levitar pelo menos alguma da primeira pluralidade de células no campo magnético por um tempo suficiente para permitir que pelo menos alguma da primeira pluralidade de células forme um conjunto de células 3D.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o campo magnético é pelo menos parcialmente formado por um ou mais ímãs em anel.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjunto de células 3D é formado através do crescimento da célula.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o campo magnético é pelo menos parcialmente formado por um ou mais eletroímãs, ímãs permanentes, ou ambos.
5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira pluralidade de células compreende mais que um tipo de célula.
6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda prover uma camada de alimentação, em que pelo menos alguma da primeira pluralidade de células é levitada próximo à camada de alimentação.
7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda introduzir as nanopartículas magnéticas na primeira pluralidade de células.
8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda variar o campo magnético com o passar do tempo para manipular pelo menos uma primeira porção da primeira pluralidade de células.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda trazer a primeira porção da primeira pluralidade de células na proximidade de uma superfície e, opcionalmente, manter a primeira pluralidade de células na proximidade da superfície por um tempo suficiente para permitir aderência de pelo menos uma segunda porção da primeira pluralidade de células à superfície, e opcionalmente ainda, em que a segunda porção da primeira pluralidade de células aderidas à superfície forma um padrão de células na superfície.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda fornecer uma segunda pluralidade de células que compreende uma ou mais nanopartículas magnéticas.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda variar o campo magnético com o passar do tempo para manipular a primeira pluralidade de células e a segunda pluralidade de células para fornecer uma interação entre pelo menos uma segunda porção da primeira pluralidade de células e pelo menos uma terceira porção da segunda pluralidade de células.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda:

variar o campo magnético com o passar do tempo para manipular a primeira pluralidade de células e a segunda pluralidade de células para trazer pelo menos uma segunda porção da primeira pluralidade de células e pelo menos uma terceira porção da segunda pluralidade de células em proximidade, e/ou contato físico.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma das nanopartículas magnéticas é ligada a uma célula da primeira pluralidade de células.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda introduzir as nanopartículas magnéticas à primeira pluralidade de células usando um hidrogel.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda introduzir as nanopartículas magnéticas à primeira pluralidade de células usando um Au-MIO-fago.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos alguma da primeira pluralidade de células é levitada no volume aparente de um líquido.

17. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos alguma da primeira pluralidade de células é levitada em uma interface de gás-líquido.

Figura 1

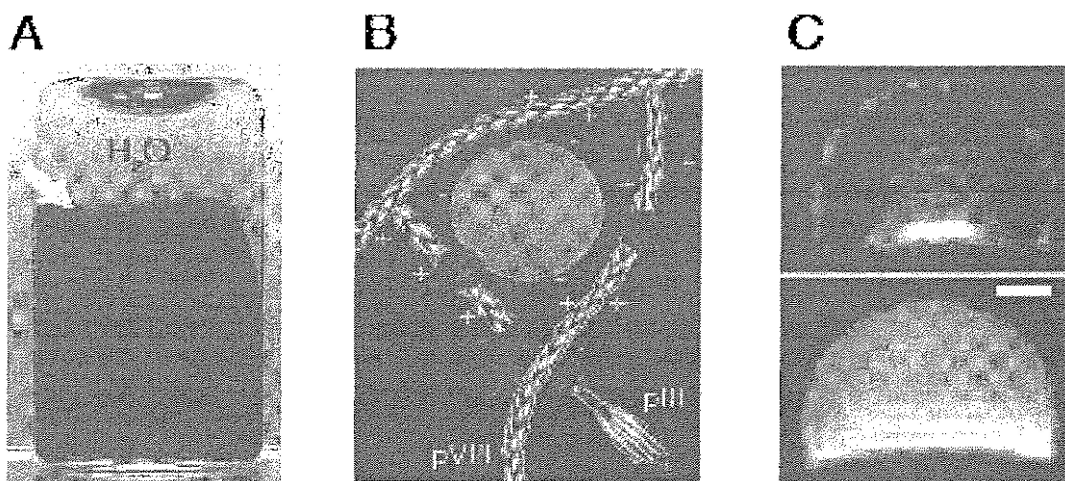


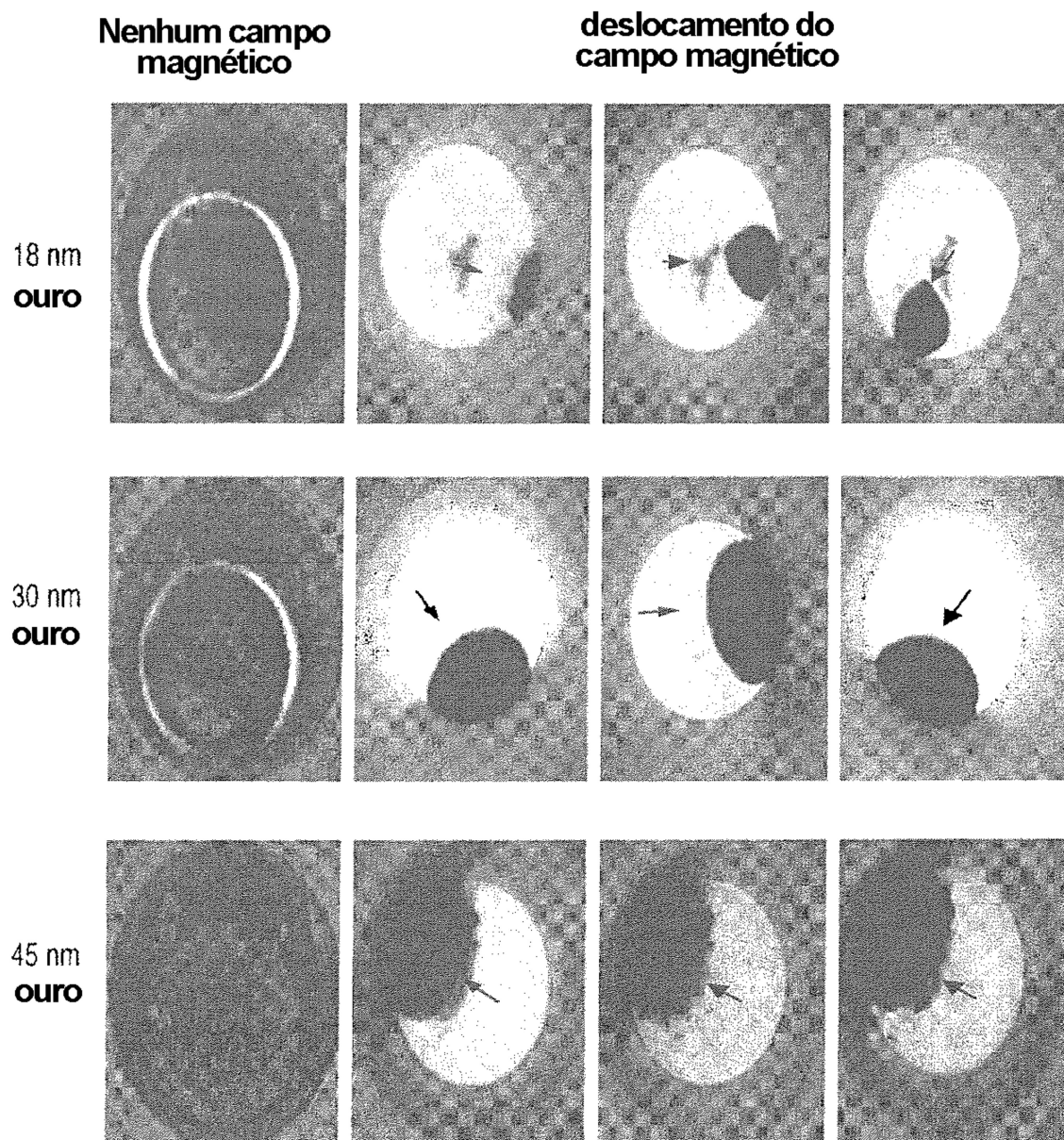
Figura 2

Figura 3

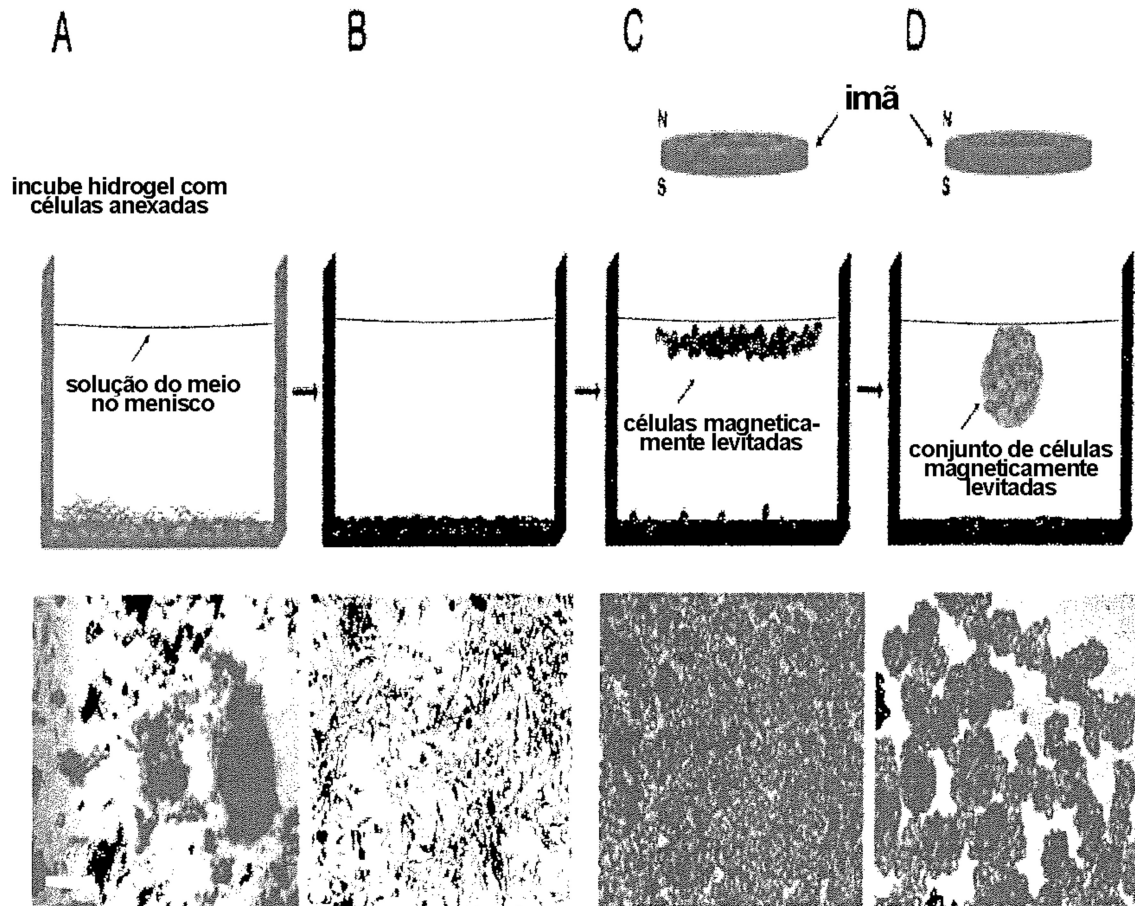


Figura 4

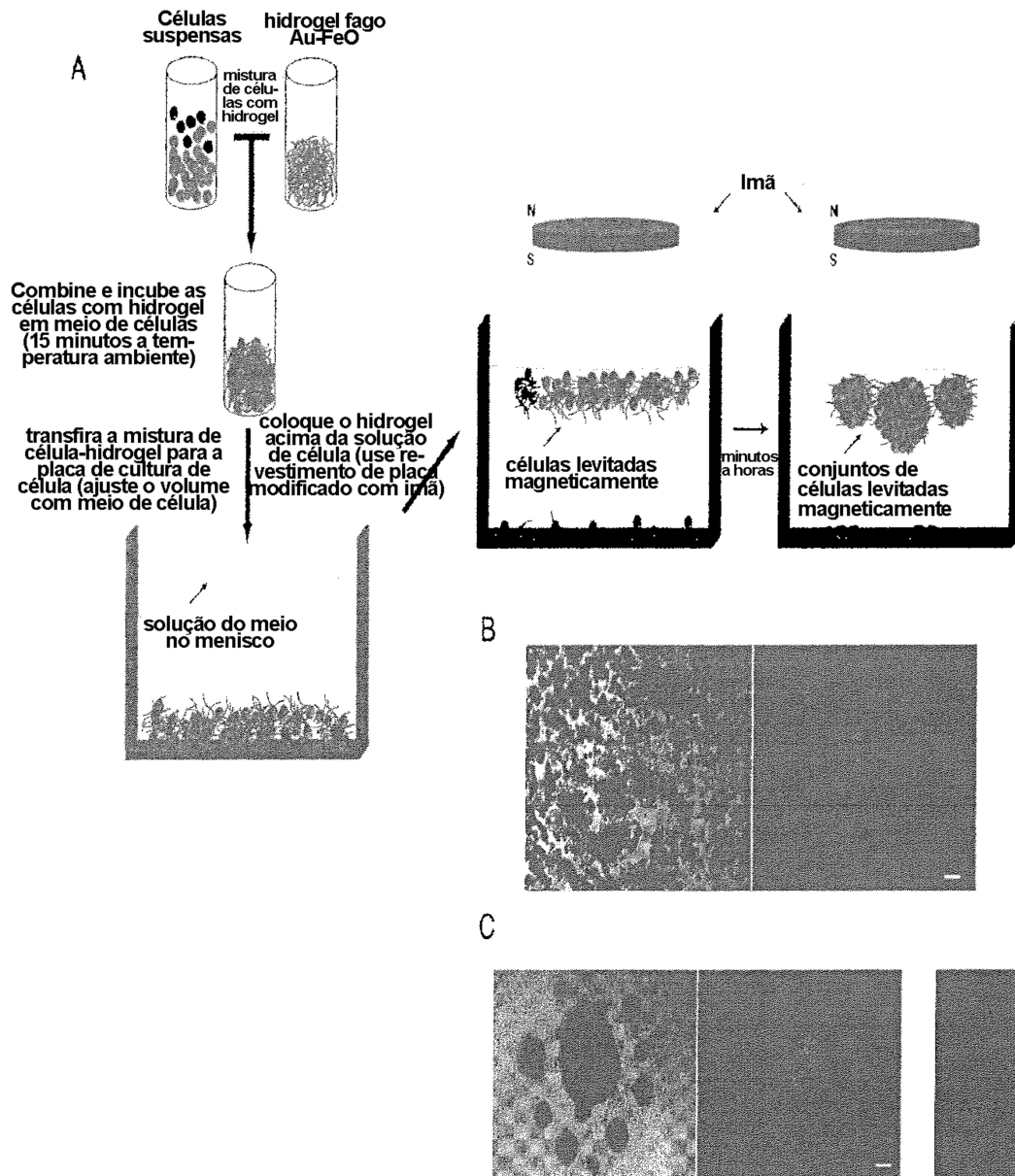


Figura 5

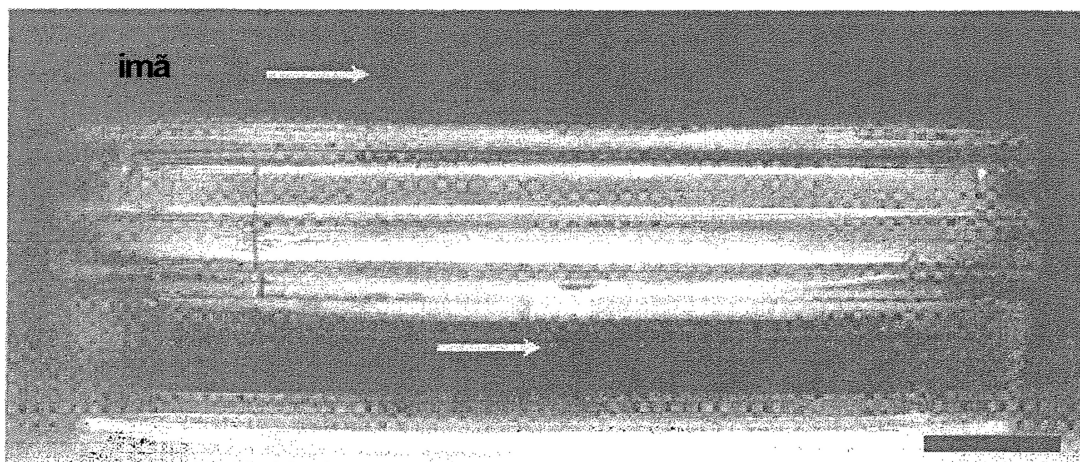


Figura 6

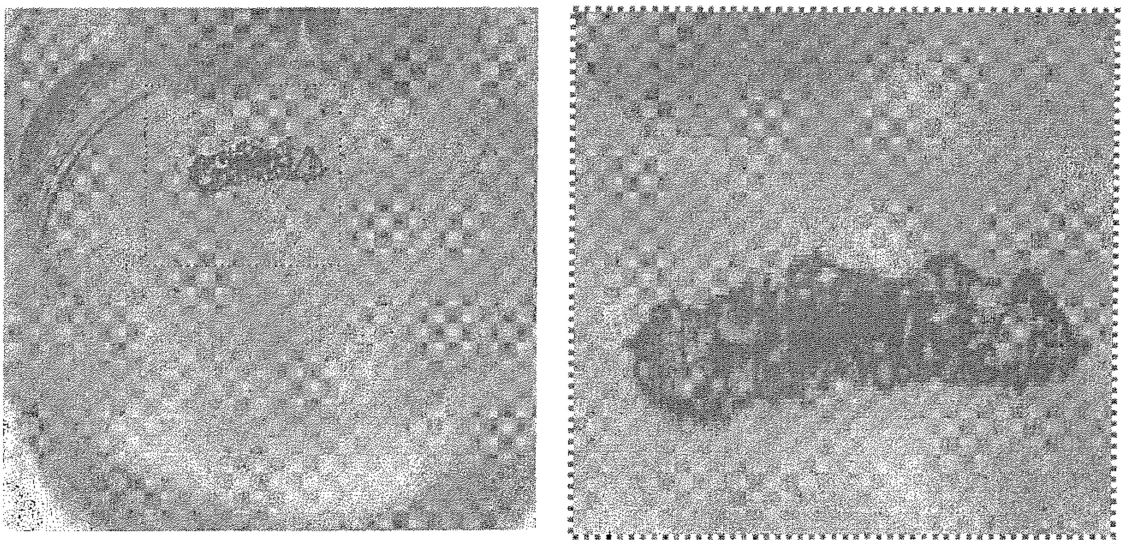
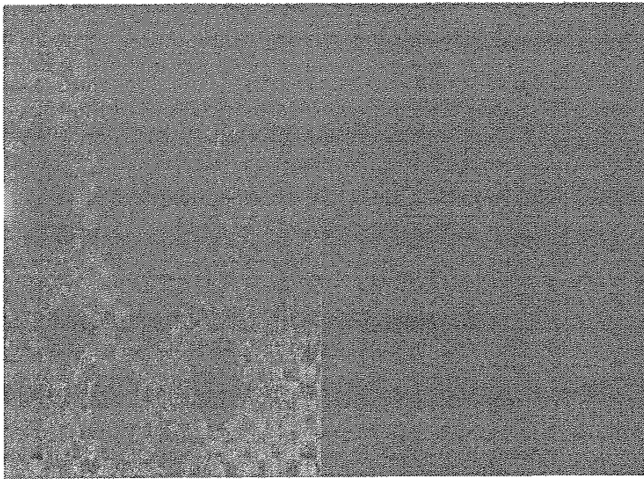
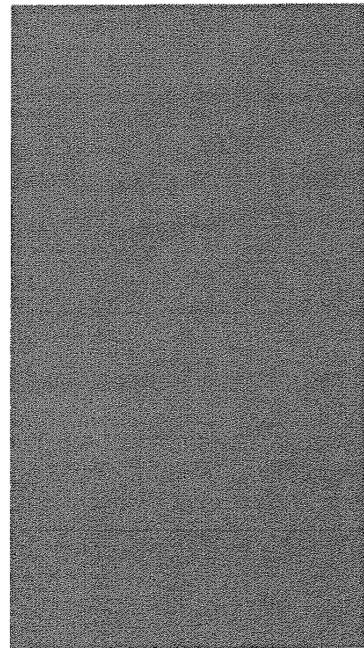


Figura 7

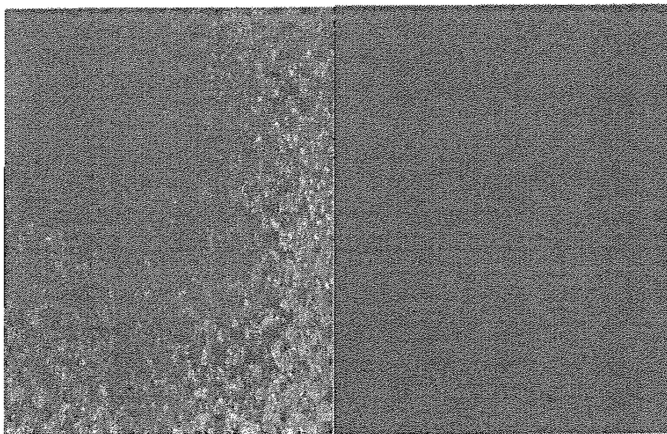
Esferóides de astrócito humano, $t = 36$ horas, esferóides levitando magneticamente



Esferóide de astrócito humano



Astrócitos humanos, $t = 0$ células levitadas magneticamente (não na parte inferior)



*Vermelho = mCherry

Figura 8

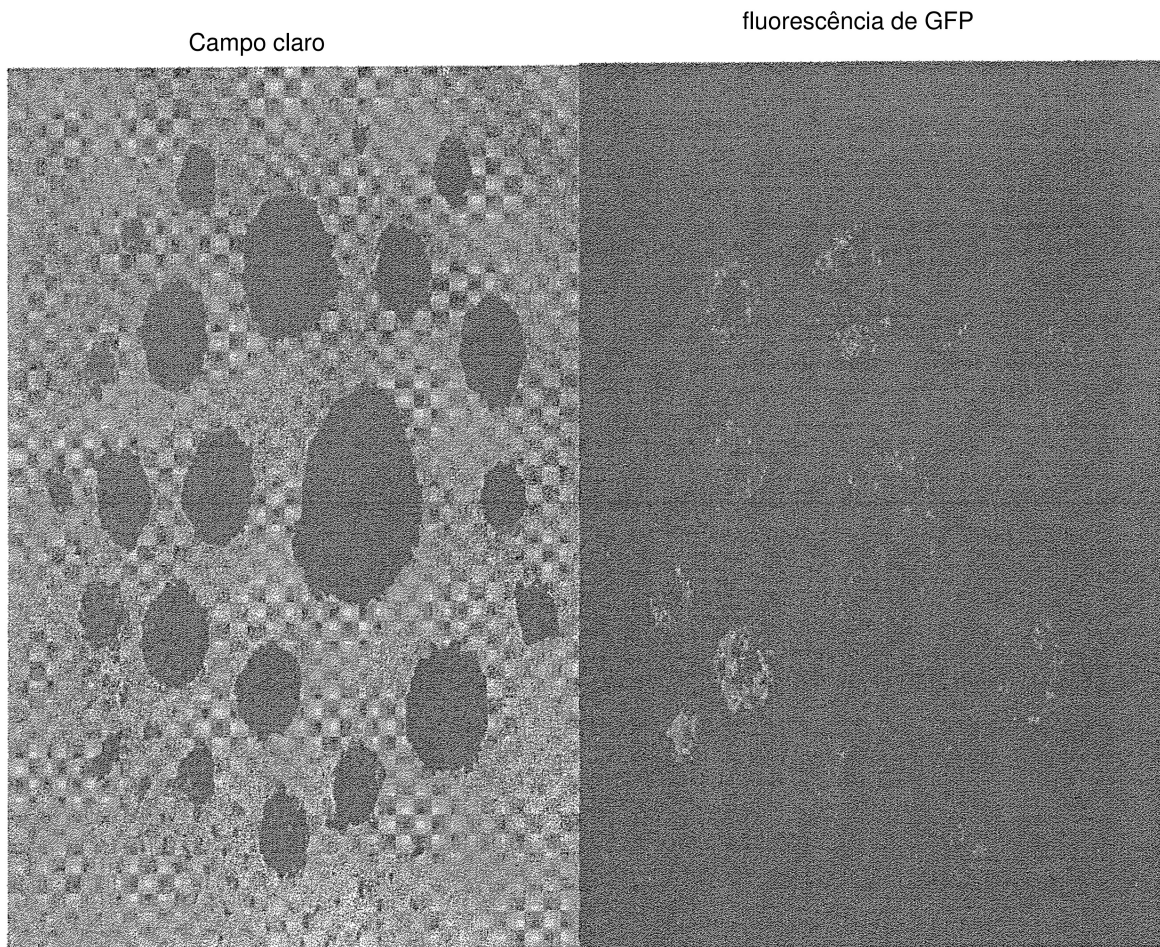


Figura 9

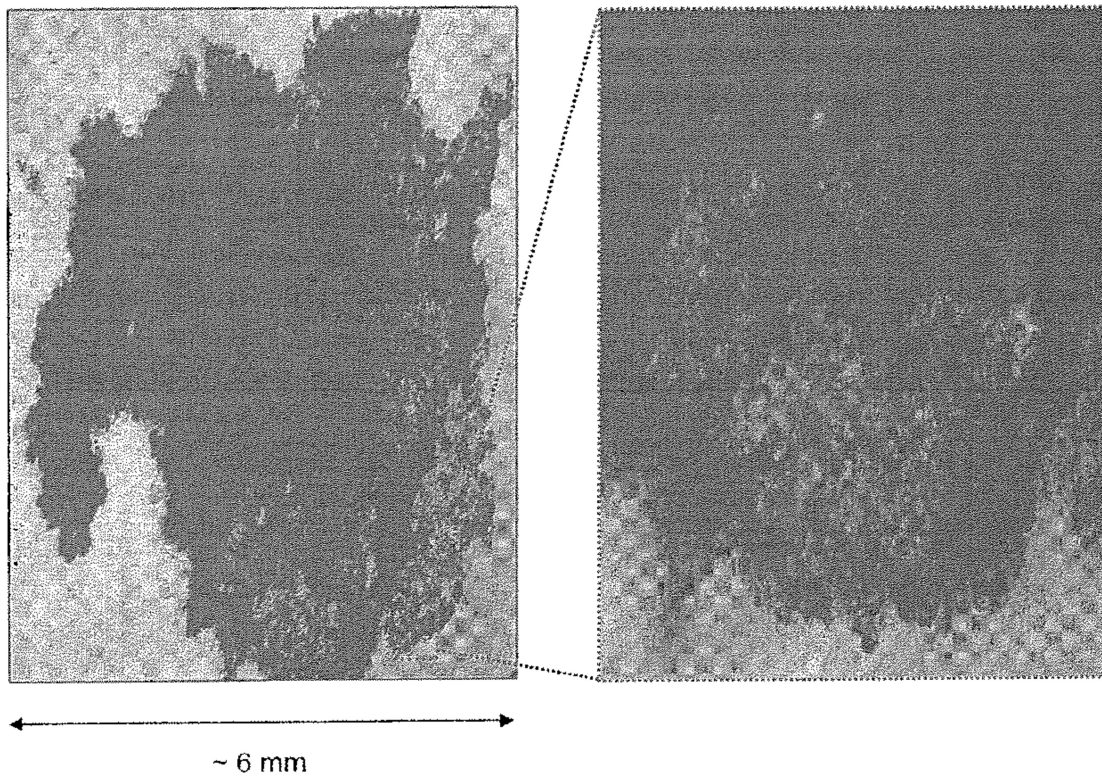


Figura 10

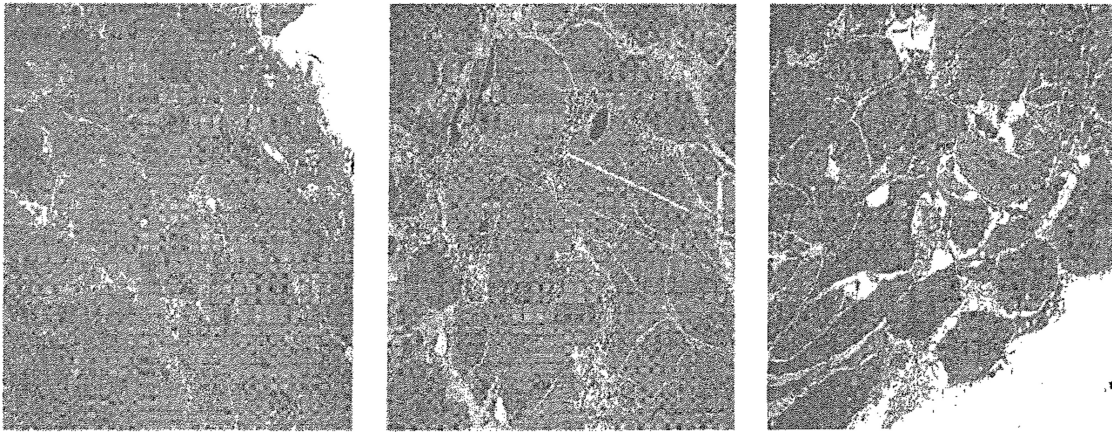


Figura 11

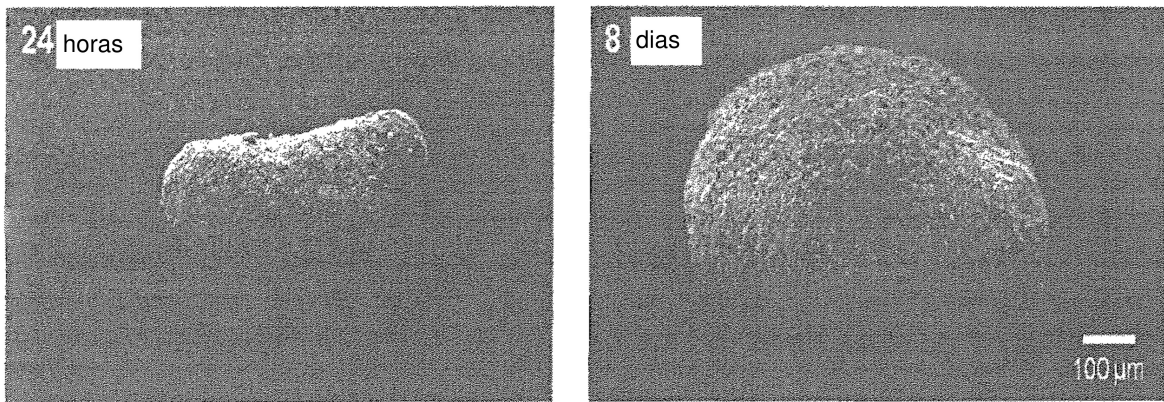


Figura 12

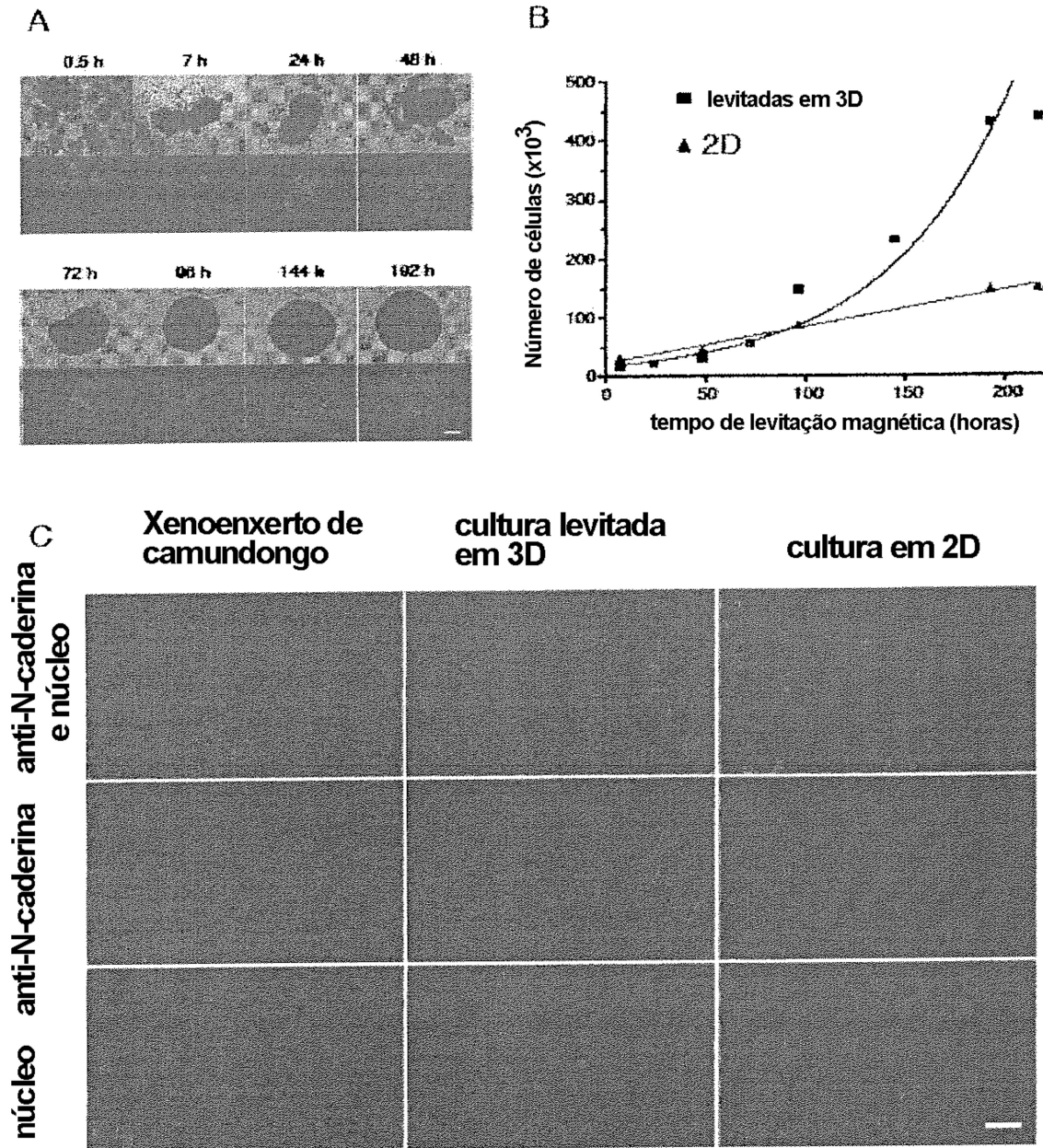


Figura 13

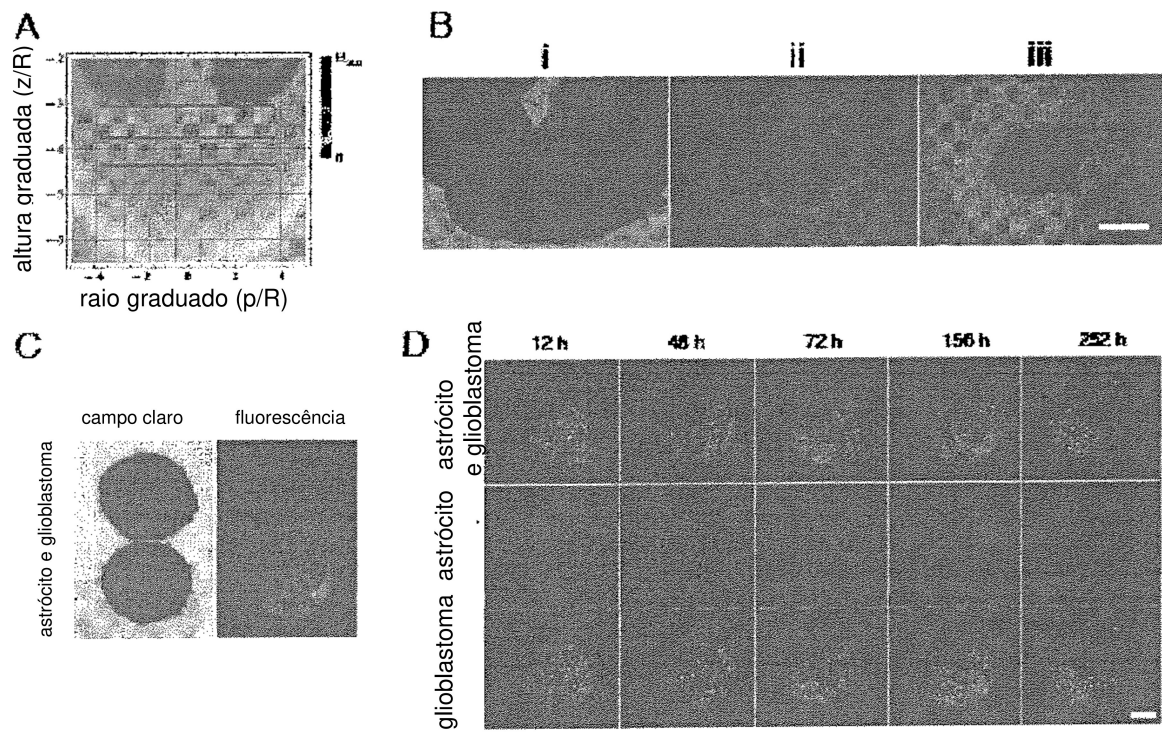


Figura 14

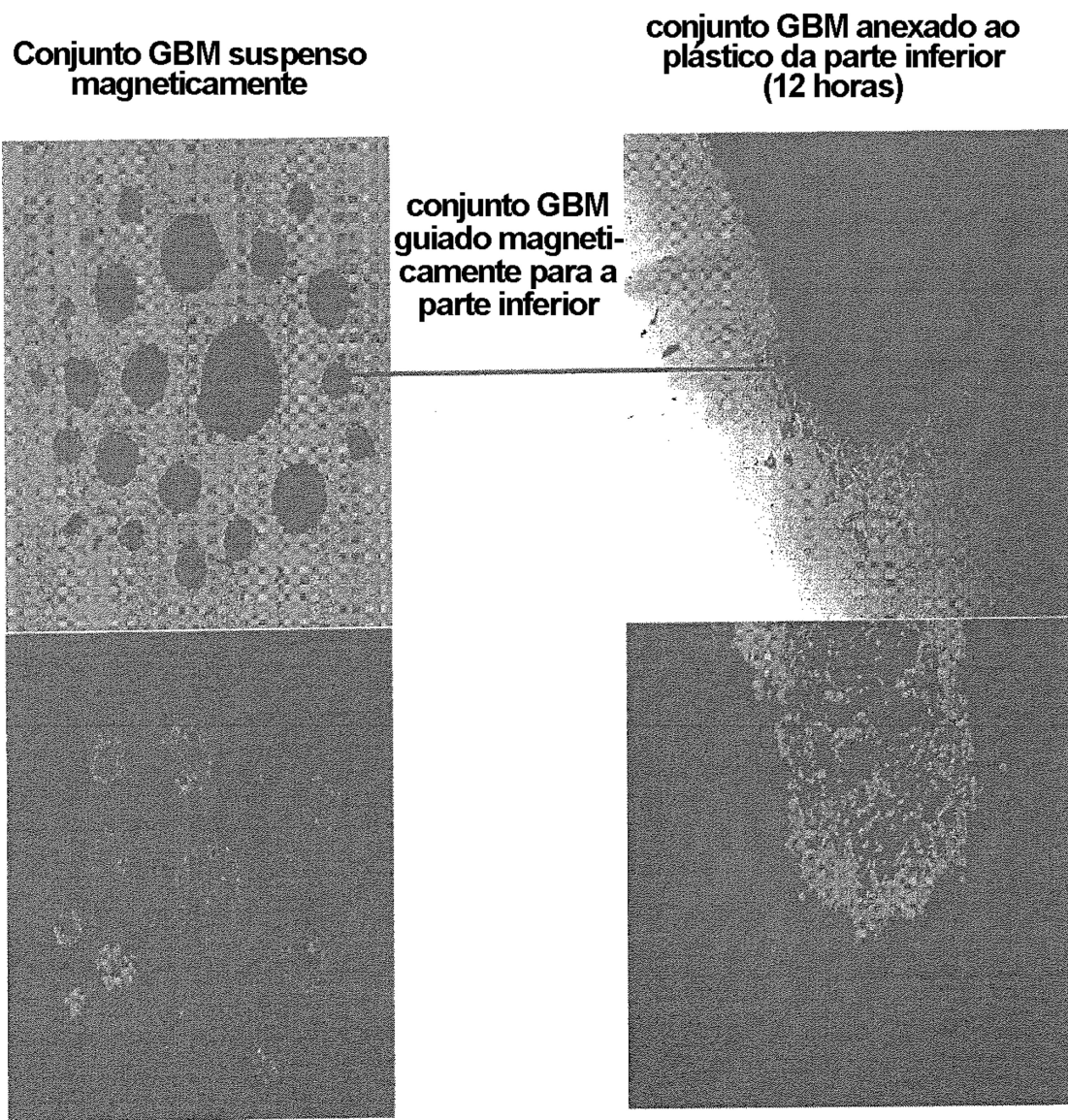


Figura 15

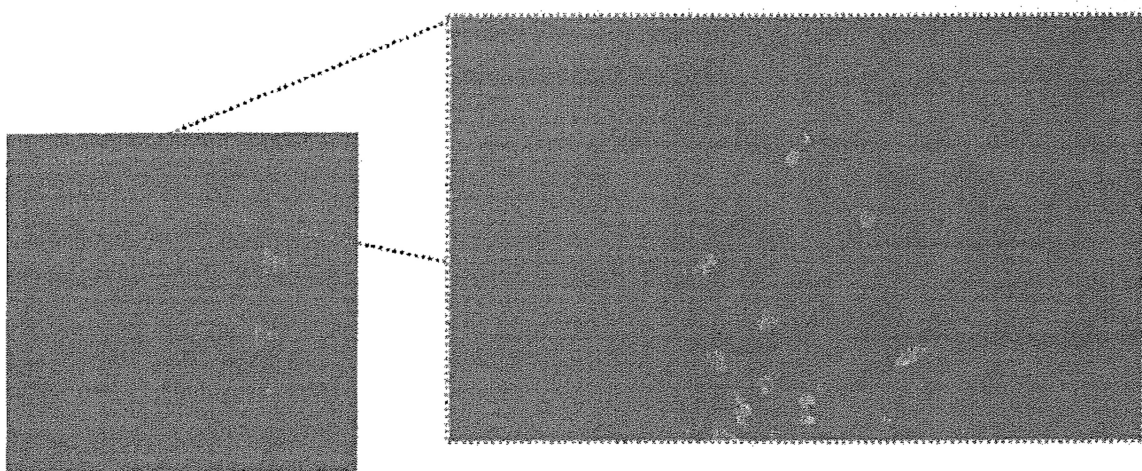


Figura 16

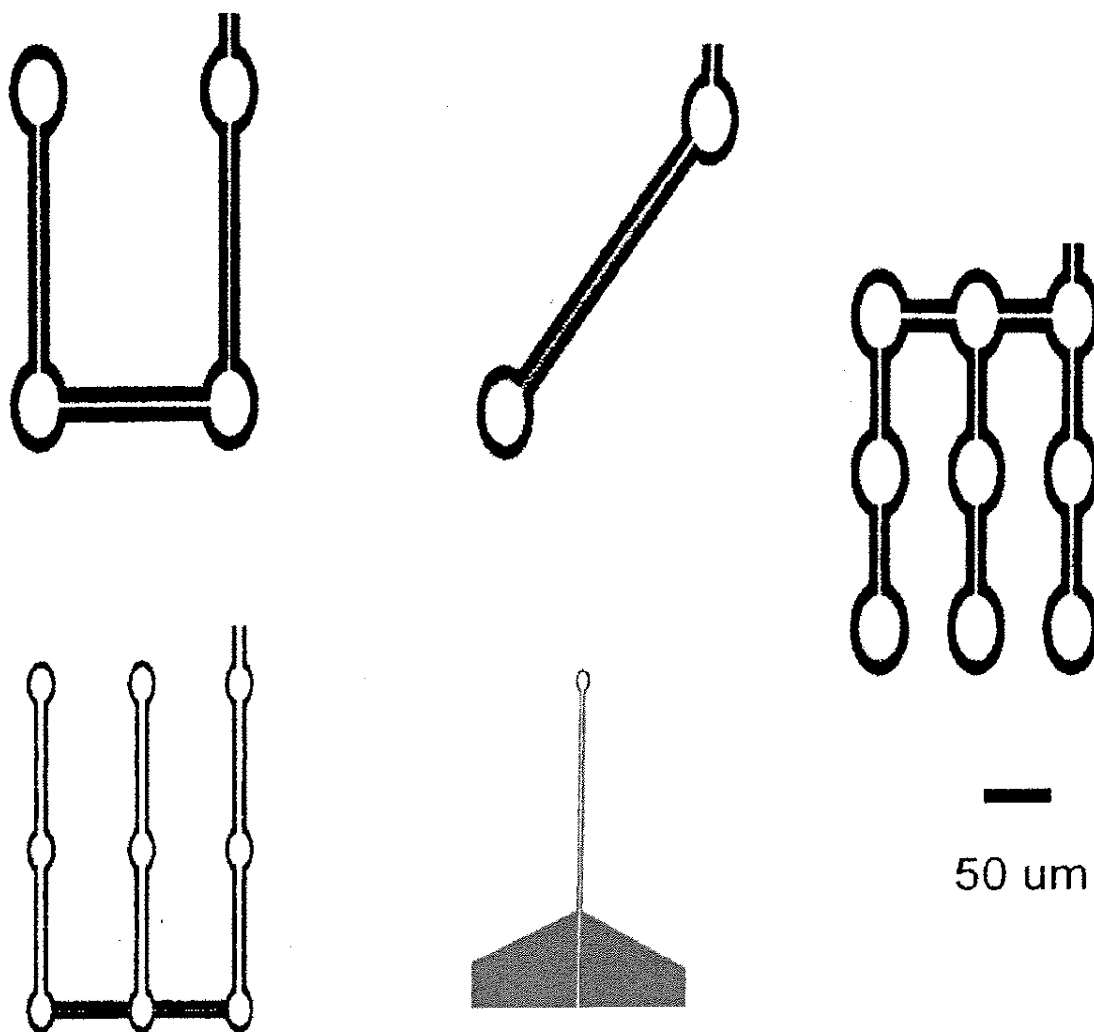


Figura 17

$F_{0,z}/(\mu I^2) \text{ [T}^2/(\text{m A}^2)]$ $F_{0,z}/(\mu I^2)$ at $z = 1 \text{ }\mu\text{m}$, $B = 0 \text{ T}$.

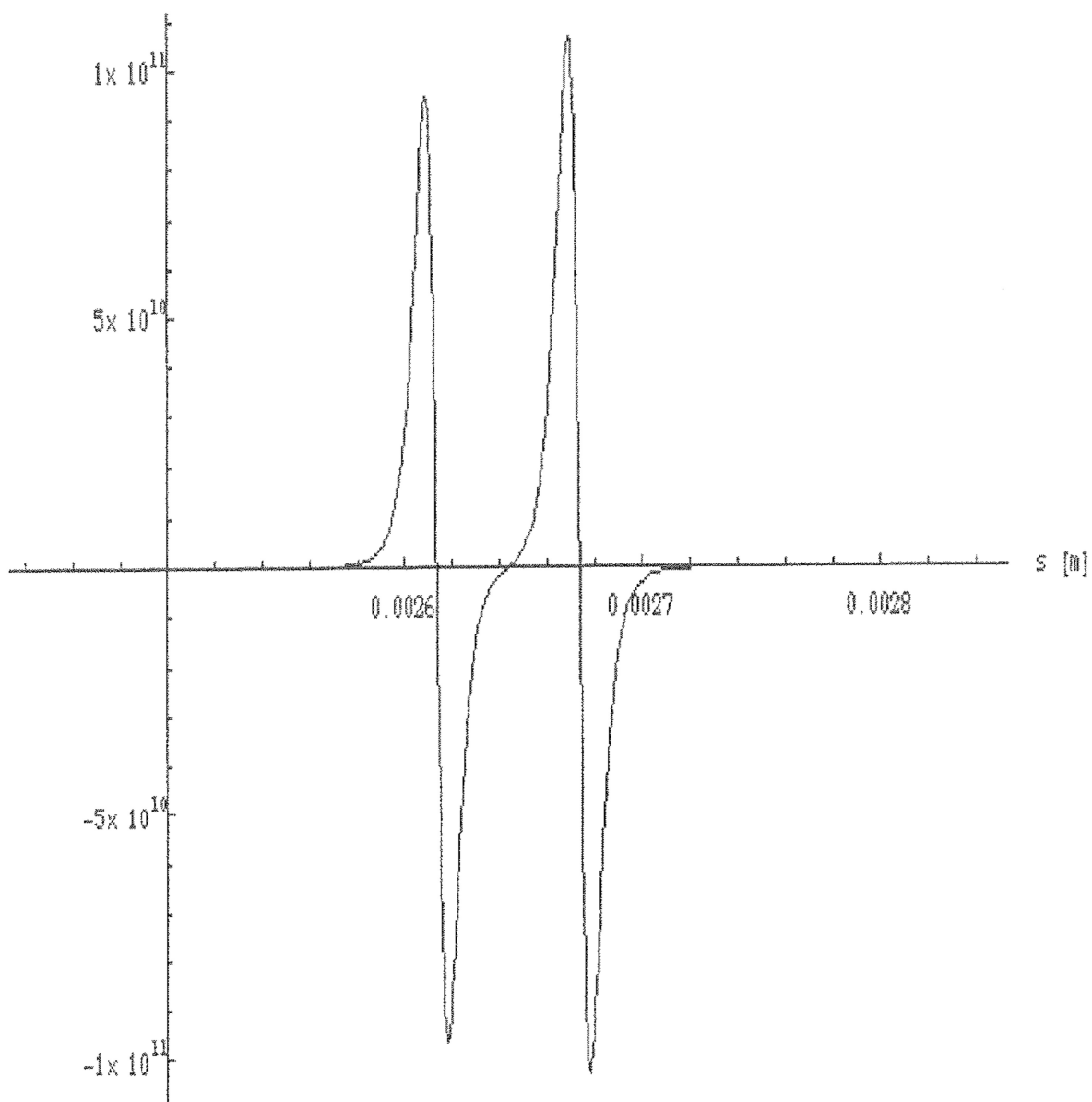
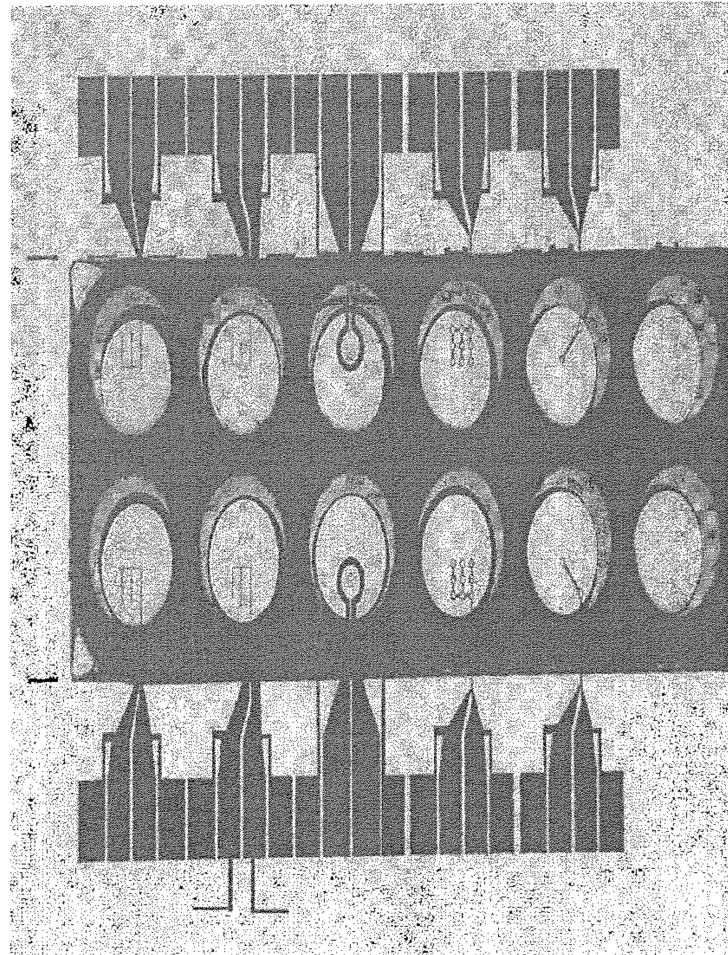
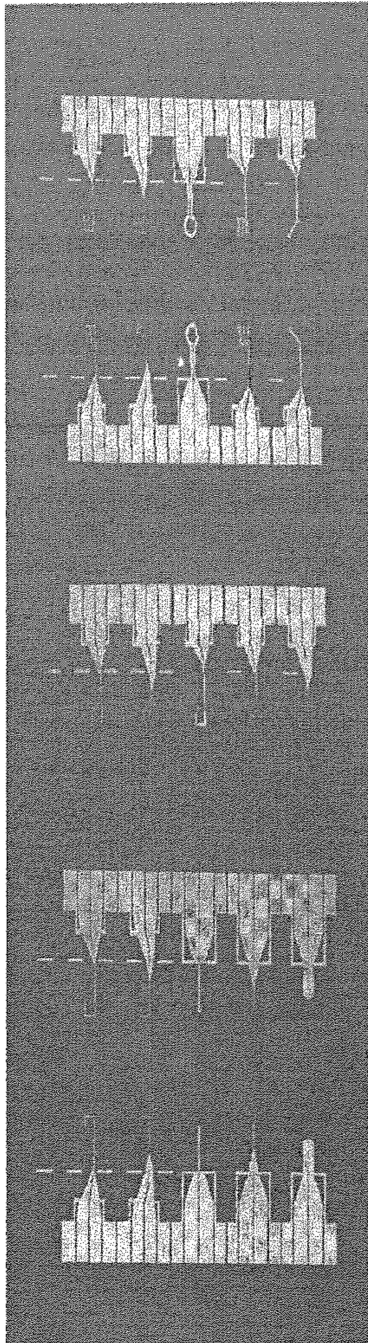


Figura 18



+

Figura 19

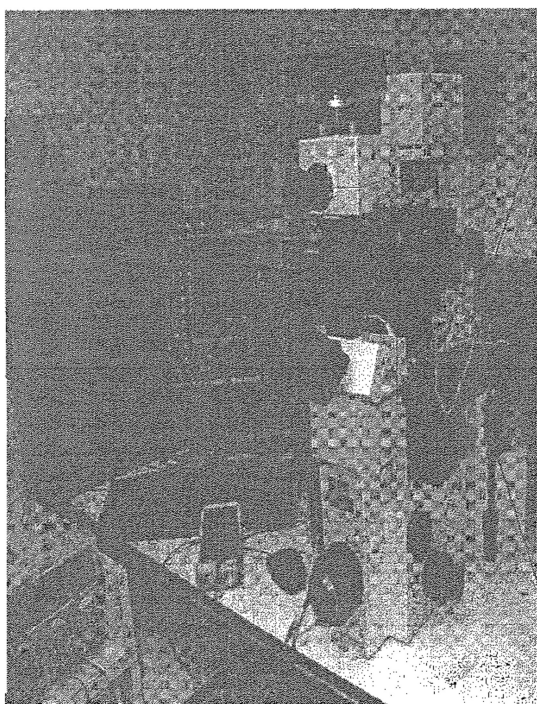


Figura 20

A

B

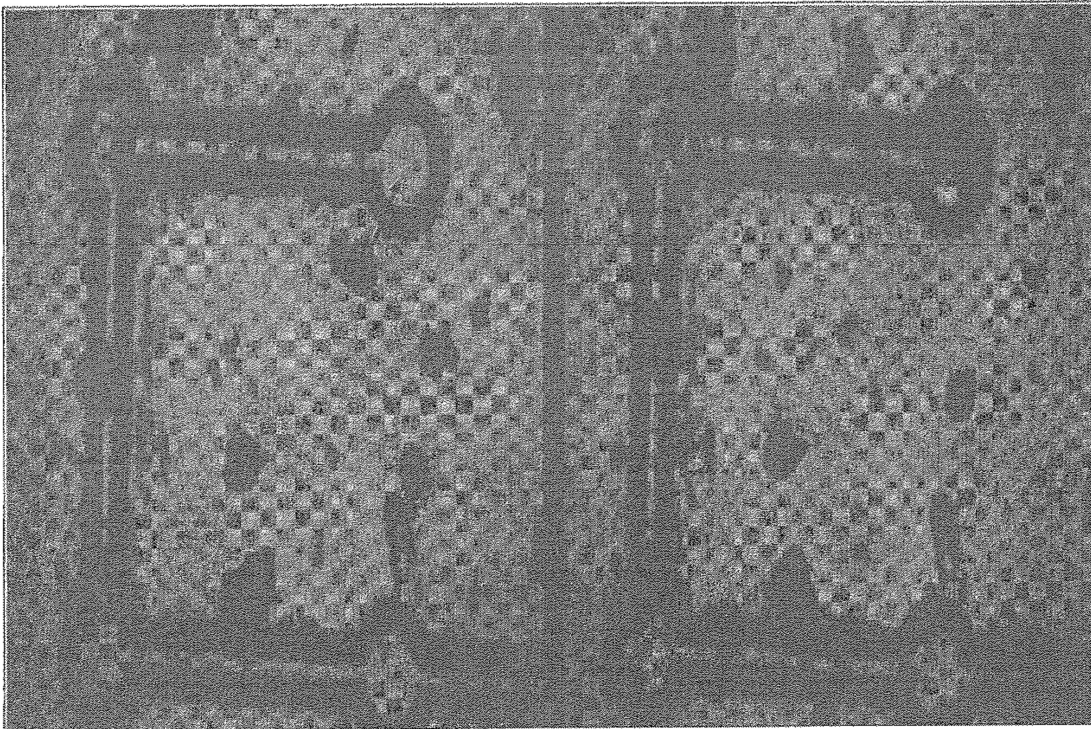


Figura 21

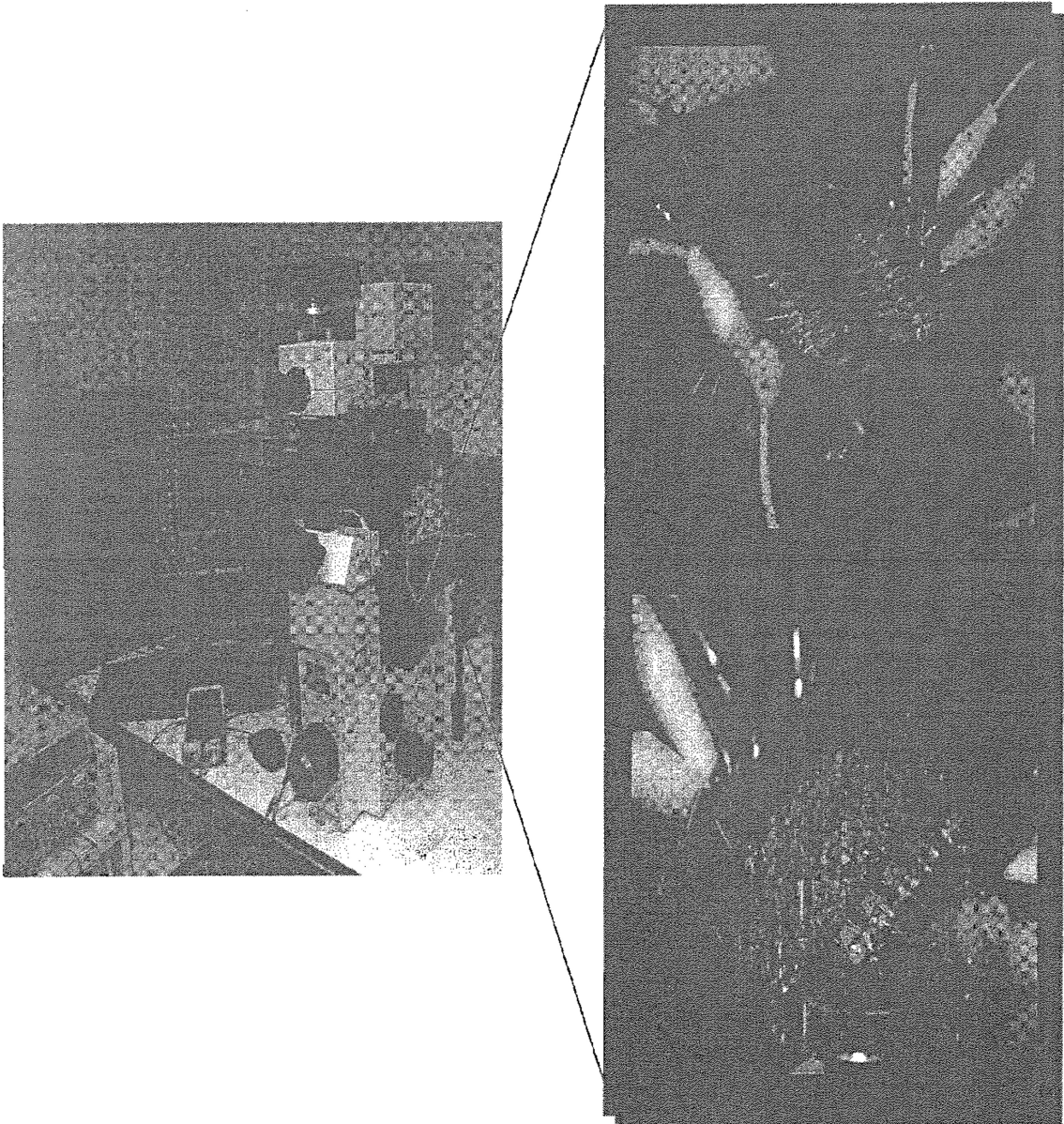
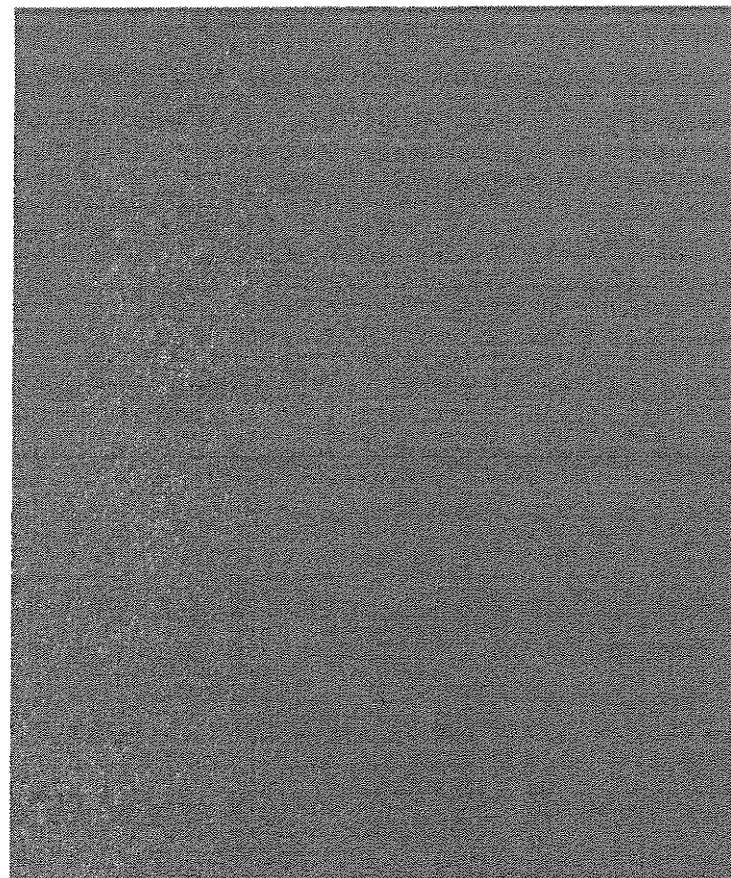


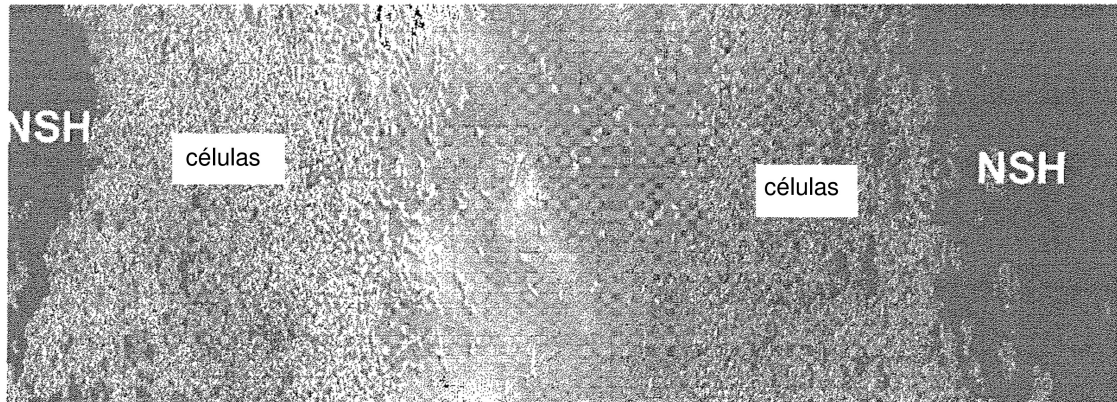
Figura 22



baixa $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ alta
Densidade do hidrogel

Figura 23

RGD-4C (alvejado)



Fd-tet (não alvejado)

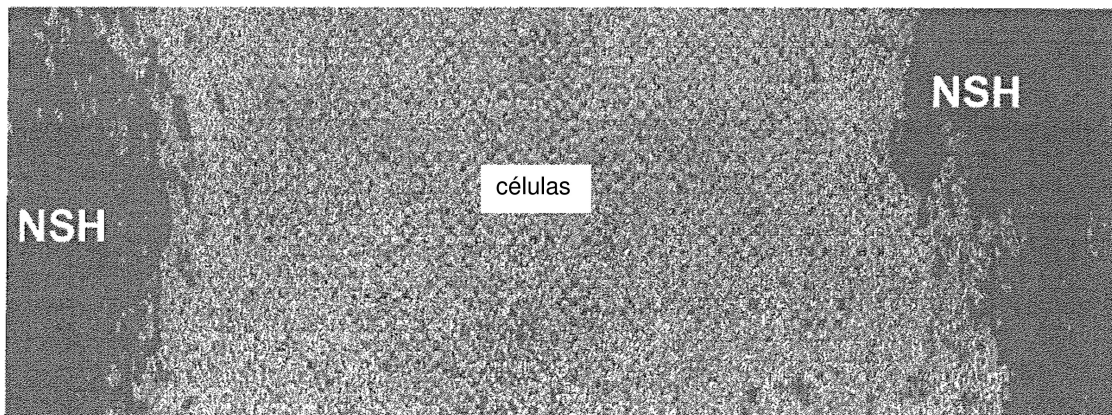
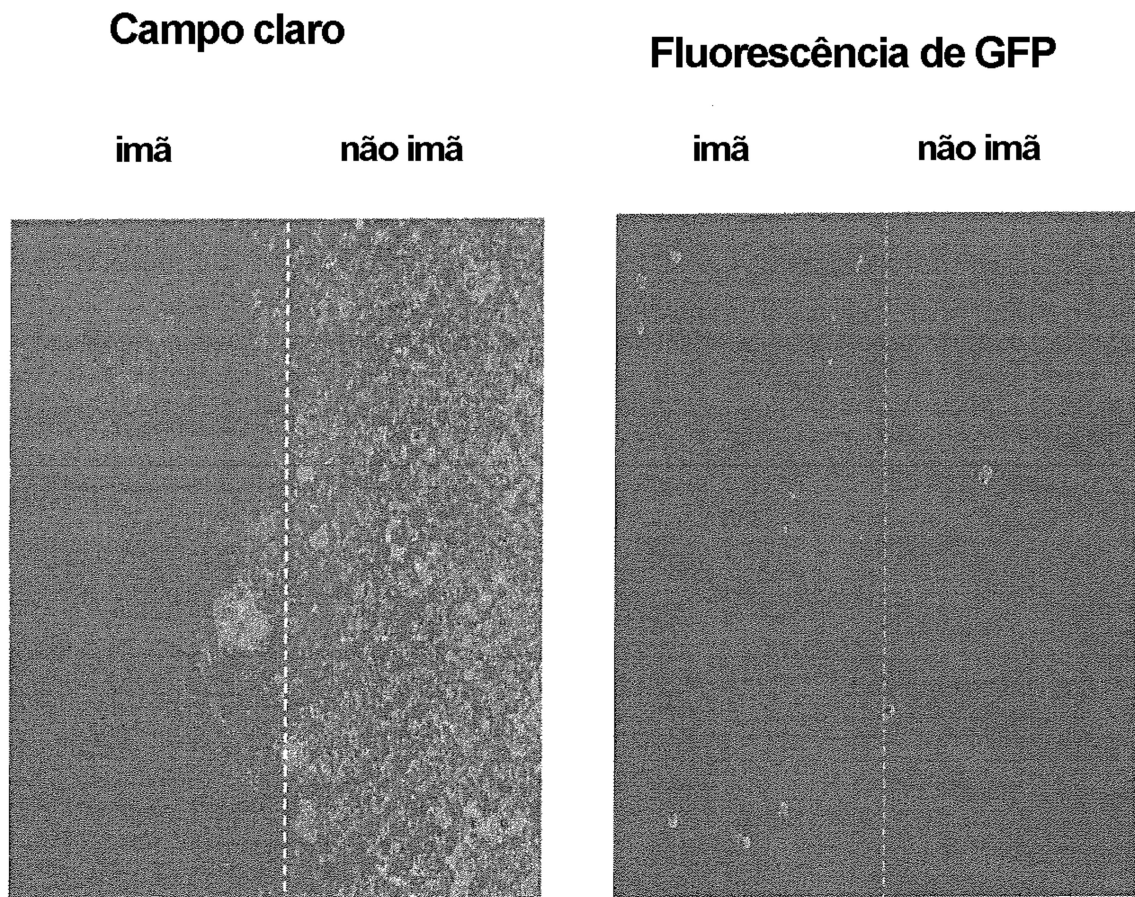


Figura 24



Ampliação de 5 vezes