

(11) Número de Publicação: **PT 1551954 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 5/00 (2007.10) **C12N 5/02** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.10.03	(73) Titular(es): PLASTICELL LIMITED	
(30) Prioridade(s): 2002.10.03 GB 0222846	10 SIDNEY STREET LONDON SW3 6PP	GB
(43) Data de publicação do pedido: 2005.07.13	(72) Inventor(es): YEN CHOO	GB
(45) Data e BPI da concessão: 2008.06.11 170/2008	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **CULTURA DE CÉLULAS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"CULTURA DE CÉLULAS"

Campo da Invenção

A invenção refere-se a cultura de células e, em particular, à cultura de células primárias, linhas celulares, células pluripotentes, células totipotentes e células estaminais e à regulação dos seus vários processos celulares, através da modulação das condições da cultura celular. A invenção refere-se à utilização de passos de cultura múltiplos numa pluralidade de condições para modular as vias celulares e proporcionar métodos para determinar o efeito de diversos regimes de passo de cultura múltiplos em processos celulares, tais como o crescimento, diferenciação e actividade metabólica.

Antecedentes da Invenção

Ao longo dos últimos anos, a cultura de células tornou-se uma tecnologia nuclear nas ciências da vida. A cultura celular é descrita em "Basic Cell Culture", Oxford University Press (2002) Ed. J.M. Davis; e "Animal Cell Culture", Oxford University Press (2000) Ed. John R.W. Masters. A cultura celular proporciona a base para estudar processos celulares, tais como a viabilidade, fenótipo, genótipo, proliferação e diferenciação de células e a formação de moléculas biológicas, intermediários e produtos. Também proporcionou o meio de estudar a regulação destes processos, a partir do nível genético - no isolamento ou em

animais transgênicos totais - até ao nível de moléculas de proteínas individuais - Não obstante a sua enorme contribuição para o presente estado da biologia, em muitos aspectos a cultura de células permanece uma disciplina em desenvolvimento, embora uma ciência anormalmente excitante, oferecendo, em última instância, a possibilidade de terapia genética e engenharia de tecidos.

Um objectivo importante da cultura de células é ser capaz de cultivar uma vasta variedade de células *in vitro*. A lista de diferentes tipos de células que podem ser cultivadas em cultura é extensa (ver American Type Culture Collection, <http://www.atcc.org>; European Collection of Cell Cultures, <http://www.ecacc.org.uk>; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, <http://www.dsmz.de>), e inclui amostras da maioria dos tipos de células e está continuamente a aumentar, à medida que são verificadas mais e mais condições de cultura. Apesar do progresso estável no campo, o método para determinar as condições de cultura adequadas para novos tipos de células permanece totalmente empírico: as condições de crescimento são quase sempre verificadas por tentativa e erro. A escolha do ponto de partida será, frequentemente, baseada no que foi previamente utilizado por outros para células semelhantes ou mesmo aquilo que está a ser normalmente utilizado no laboratório para células diferentes. Muitas vezes, isso será simplesmente inadequado, e um processo de tentativa e erro deve começar de novo. Mesmo quando as novas condições de cultura são bem sucedidas, vale a pena lembrar que as adaptações de protocolos anteriores terão introduzido um novo enfiamento à experiência. Por exemplo, muitas dessas experiências de cultura de tecidos anteriores fizeram uma extensa utilização de fibroblastos e, até à data, a maioria das condições de cultura de células

convencionais favorecem o crescimento das células derivadas da mesoderme (fibroblastos, endotélio, mioblastos). O desenvolvimento de meios de crescimento selectivos para tipos de células epiteliais e outros tipos, com base nestas condições, foi um desafio. Para alguns destes tipos de células, é agora conhecido que o soro - um componente normal de muitos meios de cultura para células da mesoderme - inibe, na verdade, o crescimento. Um aspecto da invenção aqui descrito é um método para desenvolver condições de cultura adequadas que permitem a viabilidade, proliferação ou crescimento e retenção do fenótipo de tipos de células particulares.

Além das condições que favorecem a proliferação celular, um passo particularmente importante na cultura de tecidos moderna é ser capaz de controlar ou dirigir a diferenciação das células em direcção a um fenótipo particular. Como a propagação das linhas celulares requer que o número de células aumente, a vasta maioria das condições de cultura foi desenvolvida para favorecer uma proliferação de células máxima. Não é surpreendente que estas condições não conduzam à diferenciação celular, em que o crescimento celular é, frequentemente, limitado ou mesmo abolido. As condições que favorecem a proliferação celular são geralmente baixa densidade celular, baixa concentração de Ca^{2+} e a presença de factores de crescimento, tais como factor de crescimento da epiderme (EGF), factor de crescimento de fibroblastos (FGF) e factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Por outro lado, a citostase e diferenciação são promovidas em condições de elevada densidade celular, elevada concentração de Ca^{2+} e a presença de indutores de diferenciação, tais como hormonas (e. g., hidrocortisona), factores de paracrina (e. g., IL-6, KGF, NGF), retinóides e mesmo compostos polares planares, tal como dimetilsulfóxido (DMSO). Por isso,

podem ser necessárias condições diferentes para propagação e para diferenciação de uma linha celular particular, e obviamente que estas condições respectivas podem diferir entre células de linhagens diferentes. Um segundo aspecto da invenção aqui descrito, é um método para descobrir condições de cultura adequadas que permitem a diferenciação selectiva de células.

Alguns problemas comuns que ainda se encontram na cultura de células são o tempo de vida limitado das linhas de células primárias, a alteração das características de linhas celulares com as passagens, e a sua transformação acompanhada pela perda de características celulares interessantes. Estes efeitos limitam severamente a utilidade das células cultivadas para utilização nas experiências ou ensaios, Por exemplo, os ensaios à base de células descritos abaixo. As células primárias, *i. e.* células isoladas de fresco a partir de tecidos, oferecem de longe os modelos de cultura de células mais rigorosos, na medida em que se comportam de um modo que se assemelha largamente ao seu tecido de origem. Surpreendentemente, um método fiável de cultura de células primárias ainda não foi desenvolvido e, conseqüentemente, estas células apresentam um tempo de vida limitado *in vitro*. Isto apresenta uma limitação técnica séria, Por exemplo, quando se tenta amplificar a cultura primária, ou quando se tenta realizar uma experiência a longo termo. Um outro problema associado com a utilização de culturas primárias é que uma vez que elas requerem isolamento fresco constante, pode ser difícil arranjar material primário, particularmente de humanos e é também difícil obter linhas que se comportem de um modo consistente. Um terceiro aspecto da invenção é, por isso, um método de cultura de células primárias para obter culturas viáveis com um tempo de vida prolongado.

Se as culturas primárias são mantidas *in vitro* durante um período extenso, estas sofrem normalmente uma crise em que a maioria das células morre, todavia as células sobreviventes vivem mais tempo e podem ser cultivadas indefinidamente. A maioria destas linhas celulares contínuas são, quase invariavelmente, representações pobres da célula como se encontra nos tecidos animais intactos. Uma razão para isto, baseia-se no facto de que o processo que permite que as células se tornem imortais também tem um impacto nas características da célula. Por exemplo, a maioria das culturas de células estabilizadas pararam de expressar genes específicos para tecidos e em vez disso, apenas expressam genes de manutenção necessários para o crescimento contínuo em cultura de células - como resultado, a maioria dessas linhas celulares são mais parecidas uma com a outra do que com o tecido a partir do qual tiveram origem. Por exemplo, a maioria das linhas celulares do fígado pararam de expressar as enzimas que metabolizam o fármaco que normalmente constituiriam ferramentas interessantes para testar a toxicidade do fármaco. Um outro aspecto da invenção aqui descrito é um método de cultivar células de modo a que proporcionem modelos de tecidos mais rigorosos. Isto, por sua vez, poderia melhorar a fiabilidade e o poder de previsão de experiências e ensaios baseados na célula.

Existe uma necessidade na técnica para técnicas melhoradas para cultivar células e métodos para verificar e implementar essas técnicas para a regulação de processos celulares, tais como crescimento, diferenciação, actividade metabólica, e expressão fenotípica.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona novas técnicas de cultura de células que se baseiam na percepção de que a cultura de células é melhor abordada como um processo dinâmico envolvendo passos de cultura em série realizados numa sequência definida para atingir um efeito desejado. A invenção reconhece que a exposição sequencial a agentes seleccionados pode ser explorada para modular processos celulares e, desse modo, alcançar um nível de controlo sobre estes que não foi atingido previamente através de técnicas convencionais.

A invenção debruça-se sobre o problema das técnicas de cultura de células que envolvem uma pluralidade de passos e agentes serem, na prática, difíceis, se não impossíveis, de determinar através de experimentação convencional, que na técnica anterior envolveu tentativa e erro. Devido à natureza complicada de cultura de células convencionais, a determinação empírica das condições de cultura de tecidos em processos complexos de multi-estádios, não é viável na prática, na medida em que envolve cargas de trabalho massivas.

É descrito um método para determinar o efeito de uma pluralidade de condições de cultura numa célula, compreendendo os passos de:

- (a) proporcionar um primeiro conjunto de grupos de unidades celulares compreendendo cada, uma ou mais células, e expondo os referidos grupos às condições de cultura desejadas;
- (b) subdividir um ou mais dos referidos grupos para criar

um outro conjunto de grupos de unidades celulares;

- (c) expor os outros referidos grupos a outras condições de cultura desejadas;
- (d) opcionalmente, repetir os passos (b) - (c) iterativamente, conforme a necessidade; e
- (e) avaliar o efeito numa dada unidade celular das condições de cultura às quais foi exposto.

Vantajosamente, os grupos de células são reunidos e subsequentemente assinalados. Assim, é também descrito um método para determinar o efeito de uma variedade de condições de cultura numa célula, compreendendo os passos de:

- (a) proporcionar um primeiro conjunto de grupos de unidades celulares compreendendo cada, uma ou mais células, e expondo os referidos grupos às condições de cultura desejadas;
- (b) reunir dois ou mais dos referidos grupos para formar,, pelo menos, uma mistura;
- (c) subdividir a mistura para criar um outro conjunto de grupos de unidades celulares;
- (d) expor os outros grupos referidos às condições de cultura desejadas;
- (e) opcionalmente, repetir os passos (b) - (c) iterativamente, conforme a necessidade; e

(f) avaliar o efeito numa dada unidade celular das condições de cultura às quais foi exposto.

A invenção aborda todos os processos celulares incluindo o fenótipo, genótipo, produção de moléculas, viabilidade, e a proliferação e diferenciação celular.

De um modo preferido, a invenção é utilizada para identificar condições que resulta em diferenciação celular. Por exemplo, as células podem ser induzidas para se diferenciarem ao longo de uma via de desenvolvimento desejada, submetendo as células a condições de cultura apropriadas. O momento de alterar as condições de cultura é, também, explorado para melhor definir o programa de desenvolvimento das células.

As condições de cultura incluem meios de crescimento, agentes químicos, moleculares, e macromoleculares presentes no meio de crescimento, regimes de temperatura, substratos, condições atmosféricas, manuseamento físico das células e semelhantes.

O método da invenção acima, conhecido como cultura celular combinatória ou cultura de separação de misturas, permite que as células sejam submetidas a uma série de condições de cultura, e expostas a séries de agentes nos meios de cultura, de um modo sistemático e altamente produtivo.

Embora os ciclos repetitivos de separação e reunião possam ser utilizados com elevada eficiência, de um modo semelhante aos protocolos de química combinatória, dados os necessários protocolos de processamento de energia envolvidos, podem ser utilizados,, pelo menos, dois passos de separação sequencial

(sem misturar novamente). A desvantagem desses protocolos é que eles podem rapidamente criar um número muito grande de amostras separadas que foram manuseadas diferentemente. A vantagem, contudo, é que cada amostra não necessita de desconvolução laboriosa, uma vez que essas unidades celulares apenas foram expostas a um conjunto de condições. Consequentemente, dadas as facilidades de manuseamento das amostras adequadas, uma abordagem de separação pode produzir resultados rápidos.

A invenção emprega unidades celulares. Essas unidades podem ser células únicas, mas são vantajosamente colônias de duas ou mais células que são arranjadas de forma a que sejam resistentes à rotura, mesmo durante os processos de cultura de mistura e separação. Por exemplo, as células podem ser cultivadas num substrato sólido, tal como esferas, como descrito em maior detalhe abaixo.

Vantajosamente, as unidades celulares são marcadas. A marcação permite o acompanhamento das condições de cultura às quais as células foram expostas ou o acompanhamento das unidades celulares quando são expostas a diferentes condições de cultura; assim, qualquer dada unidade celular pode ter a sua marcação lida, de modo a determinar como é que derivou da mistura ou cultura de células inicial. Os marcadores podem tomar qualquer de várias formas moleculares ou físicas, incluindo marcadores de ácidos nucleicos, etiquetas codificadas por radiofrequência, etiquetas fluorescentes ou ópticas, e codificação espacial de unidades celulares numa superfície ou matriz.

O método da invenção permite milhares ou milhões de condições de cultura de celular e reagentes a serem testados, num ensaio de elevado rendimento multiplexado, para determinar

as condições necessárias para alcançar o resultado desejado em relação a qualquer processo celular.

É também descrito um método para expor uma célula a uma variedade de condições de cultura de células, compreendendo os passos de:

- (a) proporcionar um primeiro conjunto de grupos de unidades celulares, compreendendo uma ou mais células e expondo os referidos grupos às condições de cultura desejadas;
- (b) subdividir um ou mais dos referidos grupos para criar um outro conjunto de grupos de unidades celulares;
- (c) expor os outros grupos referidos a outras condições de cultura desejadas; e
- (d) opcionalmente, repetir os passos (b) - (c) iterativamente, conforme a necessidade.

Numa forma de realização preferida, como referido acima, é empregue um processo de mistura. Consequentemente, num aspecto, a invenção proporciona um método para determinar o efeito de uma pluralidade de condições de cultura numa célula, compreendendo os passos de:

- a) proporcionar um primeiro conjunto de grupos de unidades celulares, compreendendo cada, uma ou mais células, e expor os referidos grupos a condições de cultura desejadas;
- (b) a mistura de dois ou mais desses grupos para formar,,

pelo menos, uma segunda mistura;

- (c) subdividir a segunda mistura para criar um outro conjunto de grupos de unidades celulares;
- (d) expor os outros grupos referidos às condições de cultura desejadas;
- (e) repetir os passos (b) - (d); e
- (f) avaliar o efeito, numa dada unidade celular, das condições de cultura à qual foi exposta, em que as unidades celulares são marcadas para acompanhar ou determinar as condições de cultura às quais a unidade celular foi exposta.

em que as unidades celulares estão marcadas para acompanhar ou determinar as condições de cultura às quais a unidade celular foi exposta.

Noutro aspecto, a invenção proporciona um método para expor uma célula a uma variedade de condições de cultura de células, compreendendo os passos de:

- a) proporcionar um primeiro conjunto de grupos de unidades celulares, compreendendo, cada, uma ou mais células, e expondo os referidos grupos às condições de cultura desejadas;
- (b) misturar dois ou mais dos referidos grupos para formar,, pelo menos, uma segunda mistura;

- (c) subdividir a segunda mistura para criar um outro conjunto de grupos de unidades celulares;
- (d) expor os outros grupos referidos às condições de cultura desejadas; e
- (e) repetir os passos (b) - (d), em que as unidades celulares são marcadas para acompanhar ou determinar as condições de cultura às quais a unidade celular foi exposta.

em que as unidades celulares estão marcadas para acompanhar ou determinar as condições de cultura às quais a unidade celular foi exposta.

Num outro aspecto, a invenção proporciona um método para identificar um gene que influencia um processo celular, compreendendo os passos de:

- a) determinar o efeito de uma ou mais condições de cultura numa unidade celular, de acordo com o aspecto anterior da invenção;
- b) analisar a expressão genética nas referidas unidades celulares quando expostas às referidas condições de cultura; e
- c) identificar os genes que são expressos diferenciadamente nas condições de cultura desejadas.

Vantajosamente, as condições de cultura utilizadas provocam uma alteração no processo celular; estas condições de cultura

são seleccionadas para a produção de células, em que a expressão genética é analisada. A expressão genética pode ser analisada convenientemente utilizando qualquer tecnologia de monitorização de expressão comparativa incluindo técnicas à base de PCR, Análise em Série de Expressão Genética (SAGE) ou tecnologia de *array*, tal como está vastamente disponível em fornecedores, tal como a Affymetrix.

É também descrito um método para produzir um ácido nucleico que codifica um produto genético que influencia um processo celular, compreendendo identificar um gene como acima e produzindo,, pelo menos, a região codificante do referido gene através de síntese de ácido nucleico ou replicação biológica.

É também descrito um método para induzir um processo celular numa célula, compreendendo os passos de:

- a) identificar um ou mais genes que são expressos diferenciadamente em associação com um processo celular, como aqui descrito; e
- b) modular a expressão do referido um ou mais genes na célula.

A expressão dos genes na célula podem ser modulados por, Por exemplo, transfectar ou, de outro modo, transferir o gene para dentro da célula, de modo a que seja sobre-expresso de um modo transiente ou permanente. Alternativamente, a expressão do gene endógeno pode ser alterado, tais como por inserção de intensificador direccionado ou a administração de agentes exógenos que provocam um aumento (e. g. indutores gratuitos) ou diminuição (e. g. anti-sentido, ARNi, factores de transcrição)

na expressão do gene. Além disso, o produto do gene pode ser, ele próprio, administrado ou introduzido na célula para alcançar um aumento na sua actividade. Além disso, os agentes que aumentam ou diminuem a actividade do produto genético (e. g., inibidores competitivos e não competitivos, fármacos, produtos farmacêuticos) podem ser administrados à célula.

É também descrito um método para identificar o estado de um processo celular numa célula, compreendendo os passos de:

- a) identificar um ou mais genes que são expressos diferenciadamente em associação com um processo celular como apresentado acima; e
- b) detectar a modulação de expressão do referido um ou mais genes numa célula, determinando desse modo o estado do processo celular na referida célula.

Vantajosamente, os genes empregues nesta análise codificam marcadores celulares que podem ser detectados, Por exemplo, por imunoensaio. Alternativamente, os produtos genéticos podem ser enzimas que podem ser ensaiadas para a actividade com metodologias fluorométricas, colorimétricas, radiométricas ou outras.

É descrito um método para regular um processo celular, compreendendo os passos de:

- a) determinar o efeito de uma ou mais condições de cultura numa unidade celular, de acordo com o aspecto anterior da invenção;

- b) expor uma célula a condições de cultura que exercem uma alteração no processo celular: e
- c) isolar a célula desejada.

Consequentemente, é descrito um método para produzir uma célula diferenciada de um progenitor bipotente, pluripotente ou totipotente. As células diferenciadas, particularmente células parcialmente diferenciadas, pluripotentes, ou envolvidas no desenvolvimento, mas as células progenitoras não diferenciadas são úteis em terapias celulares de verificação de fármacos e outros processos, em que são necessárias Células de uma linhagem definida.

Noutros aspectos a invenção também proporciona um método para identificar um agente que é capaz de induzir um processo celular, compreendendo os passos de:

- a) determinar o efeito de um ou mais agentes numa unidade celular, de acordo com o aspecto anterior da invenção; e
- b) identificar o(s) agente(s) que induzem o processo celular desejado nas unidades celulares.

Agentes identificados, de acordo com a invenção, podem ser sintetizados por técnicas convencionais químicas, bioquímicas ou outras e utilizados em métodos para regular processos celulares particulares em células, Por exemplo, como aqui descrito.

São descritos métodos de cultivar células aderentes a veículos sólidos, tais como microveículos ou esferas. Esses

veículos podem ser compostos ou macromoléculas, tais como celulose, dextrano, agarose ou acrilamida, ou materiais inorgânicos, tal como vidro. As superfícies dos veículos podem ser ainda modificadas por tratamentos físicos ou químicos, tais como adsorção ou ligação reticulada covalente de entidades moleculares com uma carga desejada ou outras características desejadas. Alternativamente, o veículo pode consistir numa célula ou células encapsuladas numa matriz que permite a perfusão de material de tamanho sub-celular. A cultura de microveículo tem vantagens significativas, incluindo o aumento de escala de culturas e, também permite que unidades celulares sejam convenientemente expostas a condições de cultura seleccionadas, como necessário de modo a provocar o processo celular desejado. Na forma de realização mais lata, por isso, a invenção proporciona um método para cultivar células *in vitro*, compreendendo crescer as referidas células aderidas a um microveículo ou esfera.

Vantajosamente, as células são submetidas a, pelo menos, uma alteração das condições de cultura. De um modo preferido, elas são sujeitas a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 ou mais condições de cultura diferentes. De um modo preferido, a referida alteração de condições de cultura compreende uma troca do meio.

Também são descritos métodos para cultivar células, em que as misturas de células são criadas e subdivididas. Assim, é descrito um método para cultivar células *in vitro*, compreendendo os passos de:

- a) combinar uma ou mais culturas de células crescidas em condições diferentes; e

b) cultivar as células em condições comuns.

Também é descrito um método para cultivar células *in vitro*, compreendendo os passos de:

- a) incubar uma cultura de células; e
- b) separar a referida cultura em dois ou mais grupos de células, e cultivar o referido grupo de células em dois ou mais conjuntos diferentes de condições de cultura.

De um modo preferido, as células are expostas a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais condições de cultura diferentes. As condições de cultura utilizadas vantajosamente compreendem uma substituição de meio. Também são descritos métodos de cultura de células estaminais, e células diferenciadas derivadas de células estaminais *in vitro*, aderentes a microveículos, tais como esferas. A cultura de microveículos tem vantagens significativas, incluindo o aumento de escala das culturas, e também permite que unidades de células estaminais sejam expostas a condições de cultura seleccionadas conforme necessário de modo a obter as condições de crescimento e/ou diferenciação desejadas. Por isso, é também descrito um método para cultivar células estaminais e diferenciadas derivadas das células estaminais *in vitro*, compreendendo fazer crescer as referidas misturas aderidas a um microveículo ou esfera.

Vantajosamente, a cultura é submetida a,, pelo menos, uma alteração de condições de cultura. De um modo preferido, elas são sujeitas a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 ou mais condições de cultura diferentes. De um modo preferido, a referida alteração das condições de cultura compreende uma substituição

do meio.

Também são descritos métodos para cultivar células estaminais, em que as misturas de células estaminais, são criadas e subdivididas. Assim, também é descrito um método para cultivar células estaminais e células diferenciadas derivadas de células estaminais *in vitro*, compreendendo os passos de:

- a) combinar um ou mais culturas de células cultivadas em condições diferentes; e
- b) Cultivar as células em condições comuns.

Também é descrito um método para cultivar células estaminais e células diferenciadas derivadas de células estaminais *in vitro*, compreendendo os passos de:

- a) incubar uma cultura de células estaminais; e
- b) separar a referida cultura em dois ou mais grupos de células estaminais e cultivar o referido grupo de células estaminais em dois ou mais conjuntos diferentes de condições de cultura.

De um modo preferido, as células são expostas a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais condições de cultura diferentes. As condições de cultura utilizadas, vantajosamente, compreendem uma substituição de meio.

Vantajosamente, as células ou células estaminais são cultivadas em unidades celulares, compreendendo cada unidade celular uma ou mais dessas células. Por exemplo, as unidades

celulares podem ser células únicas.

Todavia, cada unidade celular pode compreender uma ou mais células ou células estaminais aderentes ou ligadas por, um substrato sólido, tais como um microveículo ou esfera. Outros substratos sólidos incluem uma barreira bem ou mediantemente permeável.

Métodos para cultivar células ou células estaminais podem ser aumentados em escala em biorreactores adequados. Por exemplo, o método da invenção pode ser praticado utilizando mais do que 50 g de peso seco de microveículo.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 apresenta um exemplo de cultura de células de separação-mistura realizado durante mais de três rondas. É obtido um grupo de unidades celulares cultivando numa dada condição. As unidades celulares são apresentadas como esferas e os grupos de unidades celulares são apresentados em frascos. As unidades celulares são separadas em três fracções que são cultivadas durante dois dias em condições de crescimento diferentes, denominadas A, B, C. As unidades celulares são subsequentemente misturadas e separadas uma vez em três fracções que são cultivadas nas condições D, E ou F. Após duas rondas deste protocolo, pode ser observado que os vários grupos de células foram expostos a todas as combinações possíveis de condições de cultura de células.

A Figura 2 apresenta um outro exemplo de cultura de células de separação-mistura. Neste caso a experiência inicia-se com

três grupos A, B e C. As amostras são misturadas no primeiro passo e, subsequentemente, dividida nos grupos D, E e F.

A Figura 3 apresenta uma variação do método da mistura dividida em que as amostras dos grupos A, B e C são directamente partilhadas nos grupos D, E e F sem mistura anterior. O fraccionamento de grupos de células individuais pode ser aleatório ou pode ser predeterminado.

A Figura 4 apresenta uma outra variação do método de separação-mistura em que os grupos de células A, B e C são partilhados nos grupos de células D, E e F sem mistura anterior, enquanto que num segundo passo os grupos de células D, E e F são misturados e, subsequentemente, partilhados nos grupos de células G, H e I.

A Figura 5 apresenta um protocolo de separação-separação compreendendo um primeiro passo em que o grupo de células A é separado para formar os grupos de células B, C e D, e um segundo passo em que os grupos de células B, C e D são separados para formar os grupos de células E - M.

A Figura 6 apresenta um protocolo de separação-mistura que contém um passo de separação-separação. Após duas rondas de separação e mistura, os grupos de células A, B e C são separados sem mistura anterior, resultando em três grupos de linhagens de células derivadas de forma variável dos grupos de células A, B ou C. Note-se que pode ser utilizada a inclusão de um passo de separação-separação para deduzir o papel das condições de cultura de células na produção de um efeito celular. Por exemplo, se é observado um efeito celular nas unidades celulares derivadas apenas da linhagem

A, e assumindo que as condições de cultura de células ensaiadas nos vários agrupamentos de células subsequente à divergência das linhagens A, B e C são idênticas, então as condições de cultura do grupo de células A no ponto de ramificação deve ser essencial para o efeito celular. Note-se também que os métodos ilustrados nas Figuras 1-6 podem ser utilizados em várias combinações.

A Figura 7 apresenta unidades celulares compreendendo células estaminais embrionárias pluripotentes, expressando uma Proteína quimérica Tau-Verde Fluorescente, ligada a microveículos porosos (Cytopore 2, Amersham Biosciences).

Os Painéis A-H da Figura 8 apresentam unidades celulares compreendendo células ES expressando uma proteína de fusão, Proteína Tau-Verde Fluorescente (GFP) e o microveículo poroso Cultispher G sofrendo diferenciação como determinado por coloração de anticorpo para expressão do marcador da glia GFAP. Os Painéis A-D apresentam uma unidade celular observada utilizando uma objectiva de 40x sob microscopia de fase (A), e sob fluorescência, em que os núcleos das células são corados de azul utilizando DAPI (B), e os marcadores (vermelhos) GFAP (C) e (verdes) GFP (D) são óbvios. Os painéis C e D apresentam o que parece ser um *array* linear de células (setas brancas) reminiscentes de embrulho da glia, um processo neuronal. Os painéis E-H apresenta, uma unidade celular de controlo, em que o anticorpo primário anti-GFAP foi omitido.

O Pannel I apresenta uma imagem composta obtida por microscopia de fluorescência apresentando células estaminais embrionárias diferenciadas cultivando num microveículo não

poroso (Cytodex 3, Amersham Biosciences). As células expressam uma Tau-GFP e são coradas imunoquimicamente de vermelho com um anticorpo fluorescente criado contra a proteína específica para o neurónio beta-tubulina III. A coloração de amarelo indica coloração coincidente vermelha e verde.

A Figura 9 apresenta microfotografias de fase (Painéis A, C, E) e fluorescentes (Painéis B, D, F) de unidades celulares compreendendo células HepG2 ligadas a microveículos não porosos (Cytodex 3, Amersham Biosciences). Os painéis A/B: unidade celular controlo positivo apresentando a conversão de etoxirresorufina num produto vermelho fluorescente; Os painéis C/D: unidade celular controlo negativo cultivada da mesma maneira mas em que não foi adicionada etoxirresorufina; os painéis E/F: unidades celulares após uma experiência de separação e mistura, mostrando que algumas unidades celulares tratadas com uma beta-naftoflavona indutora de P450 possuem elevados níveis de P450 e são capazes de rapidamente converter etoxirresorufina num produto fluorescente (Painel F) enquanto outras unidades celulares sujeitas a cultura de separação-mistura são populadas por um grande número de células que não expressam níveis elevados de P450 (e. g., Unidade celular evidente em baixo à direita no Painel E,).

A Figura 10 apresenta a marcação de unidades celulares utilizando RFID. O painel A: transponder de radiofrequência encapsulado em vidro ID100-A (Trovan); O painel B: células estaminais embrionárias de murganho que expressam a proteína de fusão Tau-GFP cultivadas na aresta estreita de um transponder de radiofrequência encapsulado em vidro (microscopia óptica, em cima; microscopia de fluorescência, em baixo; imagem fundida, centro); (C) apresenta células estaminais embrionárias que

expressam GFP cultivadas na extremidade arredondada de um transponder de radiofrequência encapsulado em vidro (microscopia óptica, em cima; microscopia de fluorescência, em baixo; imagem fundida, centro).

A Figura 11 ilustra a expressão genética diferencial após cultura de separação-mistura de células ES de murganho. As células ES foram cultivadas em microveículos Cytopore 2 em meio ES (A), CDM (B), ou DMEM (C) sem adições (linhas 1,4,7,10), ou com 1 μ M de LiCl (2,5,8,11) ou 1 μ M de Ácido Retinóico (3,6,9,12). O ADNc foi preparado a partir das células e quantidades equivalentes foram submetidos a PCR com oligonucleótidos iniciadores para o gene controlo gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (G3PDH) e marcadores de células ES indiferenciadas (Oct4), precursores neuronais (Nestina), e células endodérmicas (HNF3b). As fotografias são de géis de agarose corados com brometo de etídeo dos produtos de PCR, que são indicados por parênteses abertos. "PD" indica os produtos iniciador-dímero.

A Figura 12 apresenta a marcação de microveículos. Os painéis A-D: microveículos Cytodex 3 incubados sem (A, B) ou com (C,D) um anticorpo anti-colagénio biotinilado, corado com estreptavidina-FITC e visualizados sob microscopia de fase (A, C) e de fluorescência (B, D). Os painéis E-H: microveículos Cultispher G sem (E, F) ou com (G, H) em ligação cruzada com unidades de biotina, corados com esferas vermelhas fluorescentes de 1 μ m diâmetro revestidas com estreptavidina (E, G) e microscopia de fluorescência (F, H).

A Figura 13 apresenta a marcação de unidades celulares. As esferas Cytodex 3 semeadas com células ES que expressam uma

proteína de fusão tau-GFP foram marcadas com esferas de látex vermelho fluorescentes e examinadas após 30 minutos (A-C) ou 24 horas (D-F). Os microveículos foram visualizados utilizando microscopia de fase (A, D) e com filtros para detectar fluorescência verde (B, E) ou vermelha (C,F).

A Figura 14 apresenta a marcação de duas populações de microveículos com duas marcações fluorescentes diferentes. Os microveículos Cytodex 3 foram incubados separadamente com esferas de látex e estreptavidina vermelha ou verde, depois misturadas numa proporção 1:1. Estes foram visualizados utilizando microscopia de fase (A) e com filtros para detectar fluorescência verde (C) ou vermelha (D). B é uma fotografia inserida de C+D. Ambas as marcas são rapidamente detectadas e não foi detectada transferência significativa de marcas.

A Figura 15 ilustra a marcação dupla de microveículos com duas marcações fluorescentes diferentes. Os microveículos Cytodex 3 foram incubados com uma mistura 1:1 de esferas de látex com estreptavidina vermelhas e verdes. Estes foram visualizados sob microscopia de fase (A) e com filtros para detectar fluorescência verde (C) ou vermelha (D). B é uma fotografia fundida de C+D. Cada microveículo está duplamente marcado.

A Figura 16 apresenta a detecção de uma unidade celular exibindo um processo celular utilizando microscopia de fase (Painel A) ou de fluorescência (Painel B). As unidades celulares que expressam a proteína de fusão Tau-GFP podem ser rapidamente discriminados do ruído de fundo utilizando microscopia de fluorescência (B) e podem ser manualmente isolados a partir da mistura.

A Figura 17 apresenta os dados da análise automatizada de microveículos e unidades celulares utilizando um instrumento COPAS Select (Union Biometrica Inc., Somerville, MA). Painéis A e B: microveículos Cytodex 3 suspensos em PBS foram passados pelo separador e monitorizados para o tamanho (Tempo de Voo; TOF) versus varrimento óptico (Extinção; Ext) [A] e para fluorescência verde (FLU1) versus fluorescência vermelha (FLU2) [B]. Painéis C e D: Análise de microveículos Cytodex 3 marcados com esferas de látex vermelho fluorescentes apresentando um gráfico da Ext vs TOF [C] e fluorescência [D]; a comparação dos painéis B e D ilustra que a marcação dos microveículos resulta num aumento no seu sinal de fluorescência vermelha. Painéis E e F: Análise de um grupo de unidades celulares compreendendo Cytodex 3 e células ES que expressam um transgene Tau-GFP. O aumento no varrimento no gráfico apresentando Ext vs TOF [E] e o largo espectro da fluorescência verde (FLU1) [F] revelam unidades celulares que podem ser separadas com base no número de células.

A Figura 18 apresenta a identificação de uma etiqueta utilizada para marcar uma unidade celular. Os painéis A-D: Estreptavidina-FITC marcação de microveículos Cultispher modificados com biotina (A, B) ou no seu estado nativo não tratado (C, D). Painéis E-G: Unidades celulares compreendendo células ES que expressam a proteína de fusão Tau-GFP e 1 μ m de microveículos Cultispher G biotinilados marcados com esferas de látex vermelhas fluorescentes revestidas com estreptavidina (Sigma), observados sob microscopia de fase (E) e sob luz de epifluorescência verde (F) e vermelha (G) para visualizar células marcadas com GFP e etiquetas vermelhas fluorescentes, respectivamente. Painéis H-K: Calibração de FACS utilizando uma

amostra controlo de 1 μm de esferas de látex vermelhas fluorescentes (Sigma) apresentando os parâmetros característicos de varrimento paralelo e lateral (H; área em caixa) e a intensidade de fluorescência característica no canal de fluorescência FL3 (I). A análise FACS de uma única unidade celular proteoliticamente digerida marcadas com 1 μm de esferas de látex vermelhas fluorescentes (Sigma), podem ser efectuadas controlando os parâmetros de tamanho previamente determinado para as etiquetas (J; área em caixa), seguido pela detecção da característica intensidade de canal FL3 característica das etiquetas (K).

A Figura 19 apresenta a identificação de uma multiplicidade de etiquetas utilizada para marcar microveículos. Painel A: conjunto de parâmetros de varrimento directo/lateral com etiquetas de controlo foi utilizado para definir os tamanhos das aberturas para esferas de 4,4 μm (Abertura R1), 5,5 μm (Abertura R2) e 1 μm (Abertura R3). Painéis B-D: Análise FACS de um digerido proteolítico de microveículos marcados revela a presença de etiquetas correspondendo às esferas verde fluorescentes de 4,4 μm conjunto nº 5 de Bangs Labs (Painel B); esfera verde-fluorescente de 5,5 μm conjunto nº 1 de Bangs Labs (Painel C), e 1 μm de esferas vermelhas fluorescentes de Sigma (Painel D).

Descrição Detalhada da Invenção

Definições

Condições de cultura Como aqui utilizado, o termo “condições de cultura” refere-se ao ambiente em que as células são

colocadas ou a que são expostas de modo a promover o crescimento ou diferenciação das referidas células. Deste modo, o termo refere-se ao meio, temperatura, condições atmosféricas, substrato, condições de agitação e semelhantes que podem afectar o crescimento e/ou diferenciação de células. Mais particularmente, o termo refere-se a agentes específicos que podem ser incorporados no meio de cultura e que podem influenciar o crescimento e/ou diferenciação das células.

Célula Uma célula, como referido daqui em diante, é definida como a mais pequena unidade estrutural de um organismo que é capaz de funcionamento independente ou um organismo de célula única, consistindo num ou mais núcleos, citoplasma, e vários organelos, todos rodeados por uma membrana celular semi-permeável ou parede celular. A célula pode ser procariótica, eucariótica ou archaeabacteria.

Por exemplo, a célula pode ser uma célula eucariótica. São preferidas as células de mamíferos, especialmente células humanas. As células podem ser naturais ou modificadas, tais como por manipulação genética ou passagem em cultura, para alcançar as propriedades desejadas. Uma célula estaminal é definida em maior detalhe abaixo e é uma célula totipotente, pluripotente ou multipotente capaz de dar origem a mais do que um tipo de células diferenciado. As células estaminais podem ser diferenciadas *in vitro* para dar origem a células diferenciadas que podem ser elas próprias multipotentes ou podem ser diferenciadas terminalmente. As células diferenciadas *in vitro* são células que foram criadas artificialmente, expondo as células estaminais a um ou mais agentes que promovem a diferenciação celular.

Processo celular Um processo celular é qualquer característica, função, processo, evento, causa ou efeito, intracelular ou extracelular que ocorre ou é observado ou que pode ser atribuído a uma célula. Exemplos de processos celulares incluem, mas não estão limitados a, viabilidade, senescência, morte, pluripotência, morfologia, sinalização, ligação, reconhecimento, produção de moléculas ou destruição (degradação), mutação, dobragem de proteína, transcrição, tradução, catálise, transmissão sináptica, transporte vesicular, função do organito, ciclo celular, metabolismo, proliferação, divisão, diferenciação, fenótipo, genótipo, expressão genética, ou o controle destes processos.

Unidade celular Um grupo de células que pode ser um grupo de uma. As misturas de unidades celulares podem ser separadas por tamanho, subdivididas e manuseadas sem dissociação substancial das próprias unidades celulares, de modo a que a unidade celular se comporte como uma colônia de células e cada célula na unidade celular é exposta às mesmas condições de cultura. Por exemplo, uma unidade celular pode compreender uma esfera a que é aderido um grupo de células.

Totipotente Uma célula totipotente é uma célula com o potencial para se diferenciar em qualquer tipo de célula somática ou germinal encontrada no organismo. Deste modo, qualquer célula desejada pode ser derivada, por algum meio, de uma célula totipotente.

Pluripotente Uma célula pluripotente é uma célula que pode diferenciar-se em mais do que um, mas não todos, os tipos de células.

Marcador. Um marcador ou **etiqueta**, como aqui utilizado, é um meio para identificar uma unidade celular e/ou determinar uma condição de cultura, ou uma sequência de condições de cultura, às quais a unidade celular foi exposta. Deste modo, um marcador pode ser um grupo de marcadores, cada adicionado a um passo de cultura específico; ou um marcador adicionado no princípio ou uma experiência que é modificada de acordo com ou rastreada durante os passos de cultura aos quais a unidade celular é exposta; ou simplesmente uma referência posicional, que permite que os passos de cultura utilizados possam ser deduzidos. Um marcador ou etiqueta podem também ser um dispositivo que reporta ou regista a localização ou a identidade de uma unidade celular em qualquer momento ou atribui um único identificador à unidade celular. Exemplos de marcadores ou etiquetas são moléculas de sequência, estrutura ou massa única; ou moléculas fluorescentes ou objectos tal como esferas; ou radiofrequência e outros transponders; ou objectos com marcas ou formas únicas.

Exposição a condições de cultura A célula é exposta a condições de cultura quando é colocada em contacto com um meio, ou cultivada em condições que afectam um ou mais processo(s) celular(es), tais como o crescimento, diferenciação ou estado metabólico da célula. Deste modo, se as condições de cultura compreendem cultivar a célula num meio, a célula é colocada no meio durante um período de tempo suficiente para que tenha um efeito. De igual modo, se as condições são condições de temperatura, as células são cultivadas à temperatura desejada.

Mistura A mistura de um ou mais grupos de unidades celulares envolve a mistura dos grupos para criar um único grupo ou mistura que compreende unidades celulares de mais do que um fundo, isto é, que foi exposto a mais do que um conjunto

diferente de condições de cultura. Uma mistura pode ser, ainda subdividida em grupos, aleatoriamente ou não aleatoriamente; esses grupos não são eles próprios “misturas” para os presentes objectivos, mas podem ser eles próprios misturados por combinação, Por exemplo, após exposição a diferentes conjuntos de condições de cultura.

Proliferação Crescimento celular e proliferação celular são aqui utilizados indistintamente para designar multiplicação do número de células sem diferenciação em diferentes tipos ou linhagens de células. Por outras palavras, os termos designam aumento do número de células viáveis. De um modo preferido, a proliferação não é acompanhada por alterações apreciáveis no fenótipo ou genótipo.

Diferenciação A diferenciação celular é o desenvolvimento, a partir de um tipo de célula, de um tipo de célula diferente. Por exemplo, uma célula bipotente, pluripotente ou totipotente pode diferenciar-se numa célula neuronal. A diferenciação pode ser acompanhada por proliferação ou pode ser independente desta. O termo “diferenciação” refere-se geralmente à aquisição de um fenótipo de um tipo de célula madura de um tipo de célula menos definido em termos de desenvolvimento, e. g. um neurónio ou um linfócito, mas não exclui transdiferenciação, pela qual um tipo de célula madura pode converter-se noutro tipo de célula madura e. g., um neurónio num linfócito.

Estado de diferenciação O estado de diferenciação da célula é o nível em que uma célula se diferenciou ao longo de uma via ou linhagem particular.

Estado de um processo celular O estado de um processo

celular refere-se a se um processo celular ocorre ou não e em processos celulares complexos, pode designar um passo ou estágio particular nesse processo celular. Por exemplo, uma via de diferenciação celular numa célula pode estar inactiva ou pode ter sido induzida e pode compreender vários passos discretos ou componentes, tal como eventos de sinalização caracterizados pela presença de um conjunto de características das enzimas ou intermediários.

Gene Um gene é um ácido nucleico que codifica um produto genético, seja um polipéptido ou um produto genético de ARN. Como aqui utilizado, um gene inclui, pelo menos, a sequência codificante que codifica o produto genético; pode, opcionalmente, incluir uma ou mais regiões reguladoras necessárias para a transcrição e/ou tradução da sequência codificante.

Produto Genético Um produto genético é tipicamente uma proteína codificada por um gene no modo convencional. Contudo, o termo também compreende produtos genéticos não polipéptido, tais como ácidos ribonucleicos que são codificados pelo gene.

Síntese de ácido nucleico Os ácidos nucleicos podem ser sintetizados de acordo com qualquer técnica disponível. De um modo preferido, a síntese do ácido nucleico é automatizada. Além disso, os ácidos nucleicos podem ser produzidos por replicação biológica, tal como por clonagem e replicação em células bacterianas ou eucarióticas, de acordo com processos conhecidos na técnica.

Expressão Diferencial Os genes que são expressos a níveis diferentes em resposta a condições de cultura de células podem

ser identificados por análise da expressão genética, tal como num *array* de genes, através de métodos conhecidos na técnica. Os genes que são expressos diferenciadamente apresentam uma quantidade maior ou menor de ARNm ou produto genético na célula nas condições de teste do que em condições alternativas, em relação aos níveis globais de expressão genética.

Transfecção Os genes podem ser transfectados para as células através de qualquer meio apropriado. O termo é aqui utilizado para significar transfecção convencional, por exemplo, utilizando fosfato de cálcio, mas também incluir outras técnicas para transferir ácidos nucleicos numa célula, incluindo transformação, transdução viral, electroporação e semelhantes.

Modulação O termo modulação é utilizado para significar um aumento e/ou diminuição no parâmetro a ser modulado. Deste modo, modulação da expressão genética inclui tanto o aumento da expressão genética como a diminuição da expressão genética.

Ensaaios à base de células

Os ensaios à base de células são uma parte importante das ciências biomédicas modernas e compreendem qualquer ensaio que envolve um passo em que a célula é utilizada. Os ensaios à base de células podem ser utilizados ao longo de quase todos os estádios do processo de verificação e desenvolvimento de verificação de fármacos e são valiosos ao proporcionar informação acerca de como é provável que um composto interactue num sistema biológico, não apenas acerca de como interactua com um alvo de fármaco potencial no isolamento.

Por exemplo, os ensaios à base de células podem ser utilizados para identificar e validar os potenciais alvos de fármaco. Foram desenvolvidos ensaios à base de células que podem ser utilizados para identificar genes ou vias celulares envolvidas em processos de doença, para determinar as funções dos genes alvo ou para medir as alterações fenotípicas que podem ser induzidas após activação de determinados genes ou os seus produtos.

Também podem ser utilizados ensaios à base de células na descoberta de fármacos para verificação, selecção e optimização de compostos líder. Ao contrário dos ensaios bioquímicos que são, frequentemente, utilizados em ensaios de rastreio tradicionais de elevado rendimento, os ensaios à base de células podem proporcionar informação em relação a propriedades de fármaco, tais como absorção, permeabilidade, selectividade, especificidade e metabolismo. Como um resultado, os compostos líder que são seleccionados após o rastreio à base de células são melhor caracterizados, mais prováveis de proporcionar líderes valiosos e menos prováveis de serem eliminados em fases subsequentes do processo de verificação de fármaco.

Uma aplicação principal de ensaios à base de células é no rastreio de toxicidade. Uma parte crucial da descoberta e desenvolvimento de fármaco é o rastreio de candidatos a fármaco para eliminar os compostos que irão provocar efeitos colaterais. Todavia, as presentes metodologias são largamente inadequadas, e em particular, a utilização de modelos animais para o rastreio de toxicidade é dispendiosa e demorada. Adicionalmente, os modelos animais podem não ser fiáveis, porque os resultados nestes modelos não prevêm sempre, de um modo preciso, como um composto irá comportar-se em humanos. Este rastreio à base de

células humanas é preferido.

Células Estaminais

As células estaminais são descritas em detalhe em *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. Department of Health and Human Services. Junho de 2001. <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>.

As células estaminais são células que são capazes de se diferenciarem para formar, pelo menos, um e, por vezes muitos tipos de células especializadas. O repertório das células diferentes que podem ser formadas a partir de células estaminais pensa-se que seja exaustivo; o que é dizer que inclui todos os tipos de células diferentes que produzem o organismo. As células estaminais que estão presentes ao longo do período de vida de um organismo, desde o embrião precoce, em que são, relativamente, abundantes, até ao estado adulto em que são relativamente raras. As células estaminais presentes em muitos tecidos de animais adultos são importantes na reparação de tecido normal e homeostasia.

A existência destas células aumentou a possibilidade de que possam proporcionar um meio de criar células funcionais especializadas que podem ser transplantadas em humanos e substituir células mortas ou que não funcionem em tecidos doentes. A lista de doenças para as quais este pode proporcionar terapias, inclui doença de Parkinson, diabetes, lesão da espinal medula, trombose, doença crónica do coração, doença de rim de estágio final, falha do fígado e cancro. De modo a que a terapia de substituição de células se torne praticável, são necessários,

pelo menos, duas verificações principais na investigação das células estaminais. Primeiro, condições para cultivar células estaminais até um número suficiente necessário para serem desenvolvidas, de modo a que possam ser fabricadas doses de células terapeuticamente relevantes. Idealmente, seriam possíveis culturas em larga escala, proporcionando material para tratar vários doentes. Em Segundo lugar, como as células estaminais indiferenciadas transplantadas para os animais frequentemente dão origem a tumores, está contemplado que a diferenciação das células estaminais em células mais especializadas será um pré-requisito para terapia de substituição de células e será por isso necessário descobrir condições para diferenciar células estaminais nos tipos de células especializadas particulares, necessárias para diferentes doenças.

É claro que a chave para ultrapassar estes obstáculos está em conceber métodos adequados de cultura de células para as células estaminais e seus derivados. Contudo, devido às razões explicadas acima - nomeadamente o processo trabalhoso de tentativa e erro envolvido na evolução das técnicas de cultura de células - a tarefa é particularmente difícil. Assim, uma das aplicações da invenção aqui descrita, é na elucidação das técnicas para o crescimento e diferenciação de células estaminais.

Tipos de célula estaminal

Ainda há uma discussão considerável acerca de o que constitui uma célula estaminal, contudo para os objectivos desta discussão, uma característica chave é a capacidade para

diferenciar-se num tipo de célula diferente. Exemplos de células estaminais são apresentados abaixo.

Células estaminais diferentes possuem diferente potencial para formar vários tipos de célula: as células estaminais espermatogoniais são unipotentes, na medida em que produzem naturalmente apenas espermatozóides, enquanto que as células estaminais hematopoiéticas são multipotentes e as células estaminais embrionárias, pensa-se que sejam capazes de dar origem a todos os tipos de célula e são referidas como sendo totipotentes ou pluripotentes.

Até à data foram isolados três tipos de células estaminais pluripotentes de mamífero. Estas células podem dar origem a tipos de célula que são, normalmente, derivadas de todas as três camadas germinais do embrião (endoderme, mesoderme e ectoderme). Os três tipos de célula estaminal são: células de carcinoma embrionário (EC), derivadas de tumores testiculares; células estaminais embrionárias (ES), derivadas do embrião pré-implantação (normalmente o blastocisto); e células germinais embrionárias (EG) derivadas do embrião pós-implantação (normalmente células do feto destinadas a fazer parte das gónadas). Estas células estão a receber particular atenção no esforço para dirigir a diferenciação, precisamente, porque são pluripotentes.

As células estaminais também estão presentes no organismo adulto. Uma célula estaminal adulta é uma célula indiferenciada que ocorre num tecido diferenciado (especializado), renova-se a si própria e pode diferenciar-se para produzir células mais especializadas. Recentemente, foi demonstrado que células estaminais adultas são capazes de plasticidade, o que é dizer

que podem diferenciar-se para produzir tipos de células que não são características do tecido em que estas residem, nem na verdade da camada germinal da qual o tecido originou. Por exemplo, foi demonstrado que as células estaminais do sangue (derivadas da mesoderme) se podem diferenciar em neurónios (normalmente derivados da ectoderme). Toma *et al.* (2001, *Nature Cell Biol.* 3, p778-784) descreveram recentemente a identificação e isolamento de um novo tipo de célula estaminal que foi derivada da derme da pele. Estas células estaminais foram denominadas células precursoras derivadas da pele (SKP). As células SKP podem ser induzidas para se diferenciarem por cultura em poli-lisina e variando a concentração de soro num meio de cultura. Na ausência de soro, estas diferenciam-se em neurónios e células da glia; com a adição de 3% de soro estas diferenciam-se em células do músculo liso; e aumentando o soro para 10% provoca a diferenciação das células SKP em adipócitos. Células estaminais adultas foram até agora relatadas em tecidos tão diversos como o sistema nervoso, medula óssea e sangue, o fígado, músculo esquelético, pele e sistema digestivo.

Adicionalmente às células estaminais adultas, há numerosos tipos de células progenitoras ou precursoras. Estas são células que são parcialmente restritas nos seu potencial de diferenciação e ocorrem em, provavelmente, todos os tecidos do corpo - são capazes de diferenciação, mas diferem das células estaminais na medida em que o seu repertório não é tão vasto e por definição, não são capazes de se auto-renovar.

Evidências recentes sugerem mesmo que tipos de células diferenciadas são capazes de alterar o fenótipo. Este fenómeno, denominado transdiferenciação, é a conversão de um tipo de célula diferenciada noutra, com ou sem uma intervenção de

divisão celular. Foi geralmente aceite anteriormente que o estado diferenciado terminal está fixo, mas é agora claro que a diferenciação pode, por vezes, ser revertida ou alterada. Estão agora disponíveis protocolos *in vitro* em que as linhas celulares podem ser induzidas para se transdiferenciarem (ver Shen, Slack & Tosh, 2000, *Nature Cell Biol.* vol 2, p. 879-887; Horb et al, 2003, *Current Biol.* Vol 13, p105-115). Finalmente, têm surgido relatos de tipos de células especializadas que podem desdiferenciar-se para produzir células do tipo estaminal com o potencial para se diferenciarem noutros tipos de célula.

Crescimento e diferenciação de células estaminais

Uma propriedade importante das células estaminais é a sua capacidade para se dividirem simetricamente em cultura, dando origem a duas células filhas que são cópias exactas da célula estaminal da qual foram derivadas. Isto permite que as células estaminais sejam expandidas em cultura no seu estado indiferenciado, produzindo material suficiente para estudos biológicos ou mesmo terapia celular. O meio pelo qual as células estaminais são capazes de fazer isto é compreensivelmente o objecto de investigação intensiva, no entanto poucos dos factores que promovem a renovação da célula estaminal são conhecidos. Tipicamente, as linhas de células estaminais pluripotentes são mantidas em camadas de alimentação de fibroblastos mitoticamente inactivos ou meio condicionado por estas células. É assumido que as células de alimentação removem/neutralizam algum factor desconhecido de um meio de cultura, e/ou proporcionam um factor que suprime a diferenciação e promove a auto-renovação de células estaminais. Um desses factores é o factor de inibição da leucemia (LIF), um membro da

família das citocinas relacionado com IL-6 que é capaz de promover a auto-renovação de células ES de murganho na ausência de células de alimentação. As células estaminais cultivadas na ausência de células de alimentação (e/ou LIF), frequentemente, diferenciam-se espontaneamente e ao acaso, produzindo uma mistura de tipos de células diferenciadas.

Os factores que influenciam a auto-renovação de células estaminais podem ser estimuladores ou inibidores e podem funcionar extracelularmente ou intracelularmente. No caso do factor LIF secretado, é conhecido que o seu receptor extracelular é gp 130 e que a activação desta proteína é suficiente para inibir a diferenciação de células ES de murino. Numa célula, um efector crucial a jusante de gp130 é o transdutor de sinal e activador de transcrição-3 (STAT-3). Outra molécula que é particularmente importante na manutenção da pluripotência da célula estaminal é o factor de transcrição Oct-4, que quando regulado negativamente artificialmente conduz à perda do estado pluripotente nas células ES ou de murganho. Outras moléculas de sinalização que naturalmente inibem a auto-renovação das células ES, tais como as cinases de proteína activadas pelo mitogénio, também foram elucidadas. Um objectivo principal da investigação em células estaminais, será a verificação de factores naturais e sintéticos, fármacos, polipéptidos, genes, oligonucleótidos, meios e condições para cultura de tecidos, meios condicionados específicos, células de alimentação e outros estímulos que possuem o efeito de promover a expansão e retenção do potencial de diferenciação de vários tipos de células estaminais. Isto inclui células estaminais adultas que, no presente, não foram expandidas de forma apreciável em cultura de células.

O segundo grande desafio da investigação em células estaminais é dirigir a diferenciação das células estaminais para tipos de células particulares que são funcionais, possam substituir células perdidas em vários estados de doença e resultem num resultado clínico positivo. Para que as células estaminais coaxiais se comecem a diferenciar é, na verdade, um processo razoavelmente linear. Por exemplo, as células ES removidas das culturas de alimentação e cultivadas até à confluência num substrato aderente irão começar a diferenciar-se espontaneamente. De um modo semelhante, as células ES removidas das culturas de alimentação e cultivadas num substrato não aderente irão formar corpos embrionários - aglomerados de células indiferenciadas e parcialmente diferenciadas de todas as três camadas germinais. Estas células podem ser, subsequentemente, dissociadas e plaqueadas em cultura de monocamada, e expostas aos factores que promovem a diferenciação dirigida. As culturas expostas a estes factores são mais provavelmente populadas por menos tipos de células diferenciadas, em comparação com corpos embrionários ou culturas não tratadas de células em diferenciação que compreendem misturas de muitos tipos de células diferentes. Todavia, menos ou nenhuma destas condições foram descobertas até ao presente até ao ponto de produzir culturas substancialmente puras de células diferenciadas. Adicionalmente não é claro se qualquer dos protocolos concebidos para diferenciação de células estaminais produz células que são adequadas para a terapia de substituição de células - pode ser que as células não se tenham diferenciado de forma terminal no fenótipo preciso necessário, ou que as células diferenciadas já não sejam viáveis *in vivo*.

Os factores que foram utilizados para induzir a diferenciação dirigida de células estaminais incluem: ácido

retinóico, factor de crescimento da epiderme (EGF), proteínas morfogénicas do osso (BMP), factor de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), activina-A, factor beta-1 de crescimento de transformação (TFG b-1), factor de crescimento do hepatócito, factor de crescimento do nervo, “sonic hedgehog” (SHH.), interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), factor de estimulação de colónias de macrófagos granulócitos (GM-CSF), eritropoietina, vitamina D3, dexametasona, b-mercaptoetanol, hidroxianisole butilado, 5-azacitidina, DMSO, insulina, hormona da tiróide (T3), LIF, soro de vitela fetal, factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), factor de aço, variações na concentração de oxigénio, ácido ascórbico, β -glicerofosfato, nicotinamida, factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), CAMP, várias moléculas e substratos de adesão celular, e outros. Adicionalmente a estes factores definidos, é provável que os extractos indefinidos, tais como meio condicionado, homogenatos de tecido humano e animal ou extractos de plantas podem ser utilizados para dirigir a diferenciação de células estaminais. O fraccionamento progressivo destes extractos indefinidos podem produzir fracções activas ou mesmo componentes puros com potência elevada. Estes factores podem ser adicionados ao meio de crescimento utilizado numa experiência particular, seja isoladamente, ou em combinação ou numa ordem definida que é crucial para um resultado experimental.

Muitos sistemas que foram concebidos para a diferenciação de células estaminais *in vitro* são processos complexos de multi-estádios, em que a natureza precisa dos vários passos, assim como a cronologia dos vários passos, são importantes. Por exemplo, Lee et al. (2000, *Nature Biotechnology*, vol. 18, p 675-679) utilizaram um protocolo de cinco passos para derivar neurónios dopaminérgicos de células ES de murganho: 1) células

ES indiferenciadas foram expandidas na superfície de cultura de tecido revestido com gelatina em meio de células ES na presença de LIF; 2) corpos embrionários foram criados em culturas em suspensão durante 4 dias em meio de células ES; 3) células positivas para nestina foram seleccionadas de corpos embrionários em meio ITSFn, durante 8 dias após plaqueamento na superfície de cultura de tecido; 4) células positivas para nestina foram expandidas durante 6 dias, em meio N2 contendo bFGF/laminina; 5) finalmente, as células precursoras neuronais expandidas foram induzidas para se diferenciarem por remoção de bFGF do meio N2 contendo laminina.

Num segundo exemplo de cultura de células em série, Bonner-Weir *et al.* [*Proc. Natl. Acad. Sci.* (2000) 97: 7999-8004] derivaram células produtoras de insulina de células do ducto pancreático humano por: 1) selecção de células do ducto a partir de células de ilhéus por adesão selectiva numa superfície sólida na presença de soro durante 2-4 dias; 2) subsequentemente remover o soro e adicionar factor crescimento de queratinócito para seleccionar as células epiteliais do ducto de fibroblastos durante 5-10 dias; e 3) cobrir as células com a preparação de matriz extracelular "Matrigel" durante 3-6 semanas.

Num outro exemplo de cultura de células em série, Lumelsky *et al.* [*Science* (2001) 292: 1389-1394] derivaram células que segregam insulina por diferenciação dirigida de células estaminais embrionárias de murganho (ES) por: 1) expansão de células ES na presença de LIF durante 2-3 dias; 2) criar corpos embrionários na ausência de LIF durante 4 dias; 3) seleccionar células positivas para nestina utilizando meio ITSFn durante 6-7 dias; 4) expandir os precursores endócrinos pancreáticos em meio N2 contendo suplemento de meio B27 e bFGF durante 6 dias; e 5)

induzir a diferenciação em células que segregam insulina por remoção de bFGF e adição de nicotinamida.

Contudo, não é apenas a sequência e a duração dos vários passos ou a série de adição de diferentes factores que é importante na determinação da diferenciação celular. Como o desenvolvimento embrionário é regulado pela acção de gradientes de factores de sinalização que influenciam a informação posicional é de esperar que a concentração de um único factor de sinalização e, também, a concentração relativa de dois ou mais factores, seja importante na especificação do destino de uma população celular *in vitro* e *in vivo*. As concentrações dos factores podem variar durante o desenvolvimento e as células estaminais responderam diferentemente a diferentes concentrações da mesma molécula. Por exemplo, células estaminais isolados a partir do CNS de embriões em ultimo estágio respondem diferentemente a diferentes concentrações de EGF: baixas concentrações de EGF resultam na proliferação de um sinal, enquanto que concentrações mais elevadas de EGF resultam na proliferação e diferenciação em astrócitos.

Muitos dos factores que se verificaram influenciam a auto-renovação e diferenciação de células estaminais *in vitro* são moléculas que ocorrem naturalmente. Isto é esperado, na medida em que a diferenciação é induzida e controlada por moléculas de sinalização e receptores que actuam juntamente com vias de transdução de sinal. Contudo, pelo mesmo modo, é provável que muitos compostos sintéticos possuem um efeito na diferenciação das células estaminais. Esses compostos sintéticos que possuem elevada probabilidade de interacção com alvos celulares nas vias de sinalização e transdução de sinal (denominados alvos drogáveis) são sintetizados de rotina, por exemplo, para

rastreio de fármacos por empresas farmacêuticas. Uma vez conhecidos, esses compostos podem ser utilizados para dirigir a diferenciação de células estaminais *ex vivo* ou podem ser administrados *in vivo*, cujo caso iriam actuar nas células estaminais residentes no órgão alvo de um doente.

Variáveis comuns em cultura de tecidos

No desenvolvimento de condições para a cultura com sucesso de um tipo de células particular, ou de modo a alcançar ou modular um processo celular, é frequentemente importante considerar uma variedade de factores.

Um factor importante é a decisão de propagar as células em suspensão ou como uma monocamada ligada a um substrato. A maioria das células prefere aderir a um substrato, embora algumas, incluindo as células transformadas, células hematopoiéticas, e células de ascites, possam ser propagadas em suspensão.

Assumindo que a cultura é de células aderentes, um factor importante é a escolha do substrato de adesão. A maioria dos laboratórios utiliza plásticos descartáveis como substratos para a cultura de tecidos. Os plásticos que foram utilizados incluem poliestereno (o tipo mais comum), polietileno, policarbonato, Perspex, PVC, Teflon, celofane e acetato de celulose. É provável que possam ser utilizados quaisquer plásticos, mas muitos destes necessitarão de ser tratados para os tornar humedecíveis e adequados para ligação à célula. Além disso, é muito provável que qualquer substrato sólido preparado adequadamente pode ser utilizado para proporcionar um suporte para células, e os

substratos que foram utilizados até à data incluem vidro (e. g. vidros de alúmen-borossilicato e soda-óxido de cálcio), borracha, fibras sintéticas, dextranos polimerizados, metais (e. g. aço inoxidável e titânio) e semelhantes.

Alguns tipos de células, tais como epitélio dos brônquios, endotélio vascular, músculo esquelético e neurónios requerem que o substrato de crescimento seja revestido com produtos biológicos, normalmente materiais de matriz extracelular, tais como fibronectina, colagénio, laminina, polilisina ou outros. O substrato de crescimento e o método de aplicação (revestimento húmido ou seco ou congelação) podem ter um efeito nos processos celulares, tais como o crescimento e diferenciação característicos das células e estes devem ser determinados empiricamente, como discutido acima.

Provavelmente, a mais obviamente importante das variáveis na cultura de células é a escolha do meio de cultura e dos suplementos, tal como o soro. Estes proporcionam um compartimento aquoso para o crescimento celular, completo com nutrientes e vários factores, alguns dos quais foram listados acima, outros que são fracamente definidos. Alguns destes factores são essenciais para a adesão, outros para transportar a informação (e. g. hormonas, mitogénios, citocinas) e semelhantes como destoxificantes. Meios normalmente utilizados incluem RPMI 1640, MEM/sais de Hank, MEM/sais de Earle, F12, DMEM/F12, L15, MCDB 153, e outros. Os vários meios podem diferir vastamente nos seus constituintes - algumas das diferenças comuns incluem concentração com bicarbonato de sódio, concentração de iões divalentes, tais como Ca e Mg, composição do tampão, antibióticos, elementos vestigiais, nucleósidos, polipéptidos, compostos sintéticos, fármacos, etc. É bem conhecido que meios

diferentes são selectivos, significando que promovem o crescimento de apenas alguns tipos de células. Suplementos de meios, tais como soro, pituitária cerebral e outros extractos, são frequentemente essenciais para o crescimento de células em cultura e, adicionalmente, são frequentemente responsáveis pela determinação do fenótipo de células em cultura, *i. e.*, são capazes de determinar a sobrevivência das células ou dirigir a diferenciação. O papel dos suplementos em processos celulares tais como a diferenciação é complexo e depende da sua concentração, o instante em que são adicionados à cultura, o tipo de célula e o meio utilizados. A natureza indefinida destes suplementos e o seu potencial para afectar o fenótipo de célula, motivaram o desenvolvimento de meios sem soro. Como com todos os meios, o seu desenvolvimento tem sido realizado grandemente através de tentativa e erro, como foi discutido acima.

A fase de gás da cultura de tecidos é também importante e a sua composição e volume que devem ser utilizados pode depender do tipo de meio utilizado, da quantidade de tamponamento necessário, se um frasco de cultura é aberto ou selado, e se um processo celular particular necessita de ser modulado. Variáveis comuns incluem a concentração de dióxido de carbono e oxigénio.

Outras condições importantes para a cultura de tecidos incluem a escolha do frasco de cultura, quantidade de espaço útil, densidade de inoculação, temperatura, frequência de substituições de meio, tratamento com enzimas, taxa e modo de agitação ou mistura.

Variar as condições de cultura de células é por isso um método de alcançar um processo celular desejado. Um aspecto da invenção reconhece que a variação das condições de cultura de

células, de um modo em série, pode ser um método altamente eficaz para alcançar um efeito celular. Em várias aplicações, por exemplo, em estudos de diferenciação de células, será frequentemente o caso em que uma série específica de diferentes condições de cultura de tecidos são necessárias para realizar um processo celular. As diferentes condições podem incluir adições ou remoções a/de os meios ou a alteração de meios em pontos de tempo específicos. Um tal conjunto de condições, exemplos dos quais são apresentados abaixo, são normalmente desenvolvidas por tentativa e erro, como foi discutido acima.

Formação de unidades celulares

Um aspecto importante da presente invenção é que grupos de células (colónias de células) podem ser cultivados em cultura de células em várias condições e que a colónia por manter largamente a sua integridade em várias condições, quando perturbada e quando misturada com outras colónias. Esses grupos ou colónias são aqui referidos como unidades celulares. A formação de unidades celulares pode ser alcançada, a título ilustrativo, cultivando células como culturas aderentes a substratos sólidos, tal como veículos. Se a proliferação celular ocorre após sementeira nos veículos, as células filhas irão ligar-se ao mesmo veículo e formar parte da mesma colónia. Em geral, as células aderentes não se dissociam rapidamente do seu substrato de crescimento e assim, a integridade da colónia de células persiste apesar de qualquer manipulação mecânica do veículo, agitação de um meio de cultura ou transferência para outro sistema de cultura de tecidos. De um modo semelhante, se em qualquer momento são colocados múltiplos veículos no mesmo frasco (e. g., as esferas são misturadas) depois não haverá

transferência substancial de células de uma esfera para outra.

Uma vantagem de cultivar células em unidades ou colónias é que se uma unidade é colocada em série num conjunto de diferentes meios de cultura de tecidos, depois, todas as células compreendendo a colónia terão sido expostas à mesma série de condições de cultura, na mesma ordem e durante o mesmo período de tempo. Cultivar células em unidades que não são necessariamente elas próprias aderentes ao frasco de cultura de tecidos tem a vantagem de que colónias individuais podem ser removidas à vontade e transferidas para um frasco de cultura diferente. Uma das vantagens deste método é que a cultura de tecidos pode ser miniaturizada: relativamente poucas células são necessárias para colonizar uma esfera de microveículo esfera (ver abaixo) comparado com mesmo o frasco de cultura de tecidos mais pequeno. Uma outra vantagem de cultivar unidades celulares formadas em veículos é que a cultura de células pode sofrer aumento de escala. O crescimento de células estaminais em veículos oferece um modo de aumentar a escala da produção para proporcionar material suficiente para terapia de células estaminais. Igualmente, a diferenciação de células estaminais nos veículos oferece uma forma de aumentar a escala da produção à medida que a diferenciação prossegue, eventualmente proporcionando material suficiente para terapias de substituição de células. O aumento de escala dessas culturas de células requer, pelo menos, 50 g (peso seco) de microveículo, de um modo preferido, 100 g, 500 g, 1 kg, 10 kg ou mais.

Outra vantagem importante de formar unidades celulares em substratos sólidos é que o substrato - e, conseqüentemente, as células ligadas por razão de associação - podem ser marcadas por vários meios.

Foram largamente utilizadas esferas de vidro de 3 mm e 5 mm como substratos de adesão das células, particularmente em biorreactores de esferas de vidro (e. g., tal como fabricado por Meredos GmbH) utilizados para o aumento de escala de culturas de células. Estas esferas são tipicamente utilizadas em esferas empacotadas mais do que em cultura descontínua, para evitar a lesão mecânica das células aderentes.

Em contraste, quando as células são cultivadas em veículos mais pequenos, podem ser tratadas como uma cultura em suspensão. Um método comum de cultivar células em veículos pequenos é referido como uma cultura de células de microveículo (ver "Microcarrier cell culture, Principles and Methods", Edition AA, disponível em Amersham Biosciences (18-1140-62). As culturas de microveículo são utilizadas comercialmente para a produção de anticorpo e interferão em fermentadores até 4000 litros. Está disponível uma variedade de microveículos, variando em forma e tamanho e produzida de diferentes materiais. Estão disponíveis comercialmente esferas de microveículo fabricadas de poliestireno (Biosilon, Nunc), vidro (Bioglass, Solohill Eng), colagénio (Biospheres, Solohill Eng), DEAE sephadex (Cytodex-1, Pharmacia), dextrano (Dormacell, Pfeifer & Langen), celulose (DE-53, Whatman), gelatina (Gelibead, Hazelton Lab), e DEAE dextrano (Microdex, Dextran Prod.) entre outros. Estes veículos estão bem caracterizados em termos da gravidade específica das esferas, do diâmetro e da área de superfície disponível para o crescimento celular. Adicionalmente um número de (micro)veículos porosos estão disponíveis com área de superfície muito aumentada para o crescimento de células. Uma outra característica destes veículos porosos é que eles são adequados para o crescimento tanto de células dependentes de ancoramento, como para células

em suspensão que são transportadas por captura na rede de poros abertos, interligados. Os veículos porosos estão disponíveis em materiais tais como gelatina (Cultispher G, HyClone), celulose (Cytoccell, Pharmacia), polietileno (Cytoline 1 e 2, Pharmacia), borracha de silicone (Immobasil, Ashby Scientific), colagénio (Microsphere, Cellex Biosciences), e vidro (Siran, Schott Glassware). Estes veículos são variadamente adequados para sistemas de cultura em cama agitada, fluidizada ou fixa.

Como as propriedades físicas dos veículos são bem conhecidos é fácil calcular o número de veículos utilizados numa experiência. Alguns dos veículos descritos e muitos além destes estão disponíveis como produtos secos que podem ser pesados rigorosamente, e subsequentemente preparados por intumescência em meio líquido. Adicionalmente, o número de células utilizadas para inocular uma cultura de microveículo pode ser calculado e variado. Por exemplo, uma cultura de Cytodex 3 (2 g/litro) inoculada em 6 células por esfera dará uma cultura contendo 8 milhões de microveículos, em que 48 milhões de células/litro são cultivadas a uma densidade de 5×10^4 células/cm².

A recolha das células cultivadas em microveículos, ou a libertação de marcadores de microveículos (ver abaixo), podem ser alcançados por deslocação enzimática das células, e/ou por digestão do veículo quando aplicável: podem ser solubilizados veículos de gelatina por tripsina e/ou EDTA, veículos de colagénio utilizando collagenase e veículos de dextrano utilizando dextranase.

Adicionalmente, a microveículos sólidos ou porosos, as células podem ser agrupadas por encarceração, i. e. confinadas numa barreira permeável a meio. Foram desenvolvidos sistemas de

cultura de membrana em que uma membrana de diálise permeável retém um grupo de células, mas permite que um meio de cultura e os seus constituintes se troquem livremente com os compartimentos interno e externo. A cultura de células em cartuchos de fibra oca também foi desenvolvida, e uma variedade de fibras e mesmo sistemas "tum-key" estão disponíveis comercialmente (e. g. de Amicon, Cellex Biosciences). A encapsulação de células em matrizes semi-sólidas também foi desenvolvida, na qual as células são imobilizadas por adsorção, ligação covalente, ligação reticulada ou captura numa matriz polimérica. Os materiais que foram utilizados incluem gelatina, polilisina, alginato e agarose. Um protocolo típico, é misturar agarose a 5% a 40 °C com uma suspensão de células no seu meio de crescimento normal, emulsificar a mistura utilizando um volume igual de óleo de parafina e arrefecer num banho de gelo, produzindo esferas de 80-200 µm de diâmetro. Estas esferas podem ser separadas do óleo e transferidas para o meio num frasco de cultura de tecidos.

A captura de células é um método simples para a imobilização de grupos de células, semelhante para a utilização de microveículos ou substratos porosos. Uma técnica simples é emalhar as células em fibras de celulose, tais como DEAE, TLC, QAE, TEAE (todas disponíveis da Sigma). Outros dispositivos mais sofisticados são cartuchos de cerâmica que são adequados para células em suspensão, como no sistema de cultura Opticel (Cellex Biosciences).

Um especialista na técnica irá contemplar, adicionalmente aos métodos acima de criação de unidades celulares, outros métodos de criar agrupamentos de células incluindo formar culturas de células 3D, tais como esferas neurais ou corpos

embrionários ou utilizando tecidos e na verdade organismos completos, tais como *Drosophila* ou *C. elegans*.

Unidades celulares ou os substratos dos quais são compreendidos, podem ser associados a um factor particular incluindo, mas sem limitação, proteínas, ácidos nucleicos ou outros produtos químicos, tais como fármacos. Os substratos de pré-condicionamento podem ser alcançados de muitas formas, por exemplo, simplesmente incubando o substrato com o factor de interesse ou ligando o factor covalentemente ou não covalentemente ao substrato. Os factores solúveis podem ser incorporados em materiais secos por impregnação. Esta técnica baseia-se no ingresso rápido de factores solúveis de transporte, líquidos, em material poroso seco que concomitantemente fica intumescido e pronto a ser utilizado. Os factores sólidos podem ser incorporados, Por exemplo, misturando o factor em fibrinogénio com solução de trombina, no ponto em que um coágulo de fibrina contendo o factor é formado. Podem ser contempladas muitas outras formas de associar factor(es) com um grupo de células, adicionalmente a impregnar, capturar ou encapsular o factor juntamente com células.

Um método para associar um grupo de células com um número de diferentes factores é pré-formar misturas de factores que são, subsequentemente, associados com um grupo de células particulares. Um segundo método seria condicionar serialmente grupos de células num número de factores. Utilizando formulações secas de grupo de substratos de crescimento de células como um exemplo, este método envolveria primeiramente, parcialmente inchando o substrato numa solução contendo um primeiro factor e subsequentemente, intumescer ainda o mesmo numa solução contendo um segundo factor, resultando num substrato para o qual ambos os

factores se tornaram associados. Concebendo um protocolo sistemático de associação de grupos de células com diferentes combinações de factores diferentes, será possível amostrar o efeito no grupo de células de qualquer combinação de um conjunto de factores.

Independentemente do método utilizado para condicionar unidades celulares com factores, os factores são incorporados pelas células que compreendem essa unidade celular. Os factores que saem para o meio de crescimento são diluídos até ao ponto em que a sua concentração desce abaixo de limites fisiologicamente relevantes e estes não têm efeito em qualquer grupo adicional de células às quais são expostos. A difusão do factor para fora de, e. g. a parte da unidade celular que forma o substrato é governada por parâmetros, tais como a natureza e dimensões do material, o diâmetro médio do poro e o peso molecular e concentração do factor. Para calibrar o processo, se necessário, a libertação do factor pode ser medida por ensaios físicos, tais como análise de HPLC ou libertação de factor marcado para o meio ou por ensaios biológicos, tal como o bioensaio de sobrecrecimento de gânglio da raiz dorsal para factores neurotróficos.

Cultura de células em série combinatória

Cultura de células de separação-mistura

A formação de unidades celulares (particularmente unidades celulares microscópicas) é, além disso, útil para amostrar condições de cultura de tecidos múltiplas na medida em que cada unidade celular constitui uma unidade facilmente manuseável que

pode ser exposta a uma variedade de condições de cultura de células. Para simplicidade, nesta discussão será assumido que os agrupamentos de células são produzidos cultivando células em cultura de microveículo e os termos unidade celular, grupo de células, colónia e esfera são utilizados indistintamente. Contudo, os métodos descritos são igualmente aplicáveis a qualquer unidade de célula, por exemplo, aqueles descritos acima. Um método particularmente eficiente para amostrar um grande número de condições de cultura de células é referido como Cultura de células combinatória ou cultura de células de separação-mistura (Fig 1 e 2) e numa forma de realização envolve a subdivisão em série e combinação de grupos de unidades celulares de modo a amostrar combinações múltiplas de condições de cultura de células. Num aspecto da invenção, o método opera tomando uma cultura de partida inicial (ou diferentes culturas de partida) de unidades celulares dividido um número X_1 de fracções, cada uma contendo múltiplas esferas (grupos/colónias/veículos) que são cultivados separadamente em diferentes condições de cultura. Após a cultura de células durante um dado tempo, as unidades celulares podem ser misturadas combinando e misturando as esferas das diferentes fracções. Esta mistura pode ser separada novamente num número X_2 de fracções, cada das quais é cultivada em diferentes condições durante um período de tempo e, subsequentemente, também misturadas. Este processo iterativo de separar, cultivar e misturar (ou misturar, separar e cultivar; dependendo de quando é que se entra no ciclo) unidades celulares permite a amostragem sistemática de muitas diferentes combinações de condições de cultura de células. A complexidade de uma experiência ou por outras palavras o número de diferentes combinações de condições de cultura de células testadas, é igual ao produto do número de diferentes condições ($X_1 \times X_2 \times \dots X_n$) amostradas em cada ronda.

Note-se que o passo de misturar todas as unidades celulares antes de uma separação subsequente pode ser opcional - um passo em que um número limitado de unidades celulares são misturadas pode ter o mesmo efeito, como é ilustrado nas Figuras 3 e 4. A invenção, por isso, incorpora um número de métodos relacionados de amostrar sistematicamente combinações múltiplas de condições de cultura de células em que os grupos de unidades celulares são manuseados em grosso.

Independentemente do modo preciso em que a diversidade das condições de cultura de células é amostrada por este meio, o processo é eficiente porque múltiplas unidades celulares podem partilhar um único frasco, em que estas são cultivadas em condições idênticas e, podem ser realizadas, utilizando apenas alguns frascos de cultura em qualquer altura (o número de frascos de cultura em utilização é igual ao número de amostras de separação). Em muitos aspectos, o princípio deste processo assemelha-se ao da síntese de separação de grandes bibliotecas químicas (conhecido como química combinatória) que amostra todas as combinações possíveis de ligação entre grupos de bloco de ligação química (ver, por exemplo: *Combinatorial Chemistry*, Oxford University Press (2000), Hicham Fenniri (Editor)). A cultura de células de separação-mistura pode ser repetida ao longo de qualquer número de rondas e qualquer número de condições pode ser amostrado em cada ronda. Desde que o número de unidades celulares (ou esferas colonizadas neste exemplo) é maior do que ou igual ao número de condições diferentes amostradas em todas as rondas, e assumindo que a separação das unidades celulares ocorre totalmente ao acaso, é expectável que haverá, pelo menos, uma unidade celular que foi cultivada de acordo com cada uma de várias combinações de condições de cultura amostras por uma experiência. Este processo pode ser

utilizado para amostrar condições de crescimento ou diferenciação para qualquer tipo de célula ou a eficiência da produção de biomoléculas (e. g., produção de eritropoietina ou interferão) através de qualquer tipo de célula. Devido ao processo ser iterativo é, idealmente, adequado para testar protocolos de cultura de tecidos de multipasso - por exemplo, aqueles descritos acima em ligação com a diferenciação de célula estaminais. A variáveis que podem ser amostradas utilizando esta técnica incluem tipo de célula, agrupamento de células (e. g. cultura de microveículo, encapsulação de células, organismo completo), substrato de crescimento (e. g., fibronectina em microveículo), duração da ronda de cultura de células, temperatura, diferentes meios de cultura (incluindo diferentes concentrações de constituintes), factores de crescimento, meios condicionados, co-cultura com vários tipos de célula (e. g. células de alimentação), animal ou extractos de plantas, fármacos, outros produtos químicos sintéticos, infecção com vírus (incl. vírus transgénicos), adição de transgenes, adição de moléculas anti-sentido ou anti-gene (e. g. ARNi, tripla hélice), incorporação de sensores (no caso de organismos), estímulos eléctricos, luminosos, ou redox e outros.

Cultura de células separação-separação

O objectivo de realizar processos de separação-mistura e, unidades celulares é expor, sistematicamente, estes a uma combinação de condições pré-definida. O especialista na técnica conceberá muitos meios diferentes de alcançar este resultado. Adicionalmente aos processos de separação-mistura e suas variações, é oportuno discutir brevemente os processos de separação-separação. Um processo de separação-separação envolve

subdividir um grupo de unidades celulares, pelo menos, duas vezes, sem intervir na mistura de unidades celulares (Fig. 5). Se os processos separação-separação são utilizados num grande número de rondas, o número de amostras separadas que são criadas aumenta exponencialmente. Neste caso, é importante utilizar algum nível de automatização, por exemplo, a utilização de uma plataforma robótica e sistemas sofisticados de monitorização das amostras. A vantagem dos passos separação-separação é que (uma vez que as unidades celulares não são combinadas) é possível segregar as linhagens das várias unidades celulares com base na sua história de cultura de células. Consequentemente, os passos de separação-separação podem ser utilizados para deduzir se uma condição de cultura de células particular é responsável por qualquer dado processo celular e, assim, utilizados para deduzir uma história de cultura de unidades celulares (ilustrado na Fig. 6 e explicado em detalhe em “Determinação da história da cultura de uma unidade celular”).

Protocolos predeterminados

A separação e/ou mistura de unidades celulares pode ser realizada de um modo totalmente aleatório ou pode seguir um protocolo predeterminado. Quando as unidades celulares são separadas e/ou misturadas aleatoriamente, a segregação de uma dada unidade celular em qualquer grupo não é predeterminada ou prejudicada de forma alguma. De modo a resultar numa probabilidade elevada de que, pelo menos, uma unidade celular tenha sido exposta a cada uma das combinações possíveis de condições de cultura de células, é vantajoso utilizar um número maior de unidades celulares do que o número total de combinações de condições de cultura de células que estão a ser testadas. Em

determinadas circunstâncias é, assim, vantajoso separar e/ou misturar unidades celulares de acordo com um protocolo predeterminado, sendo o efeito global que duplicações ou omissões adventícias de combinações são prevenidas. O manuseamento predeterminado de unidades celulares pode ser, opcionalmente, planeado antecipadamente e colocado numa folha de cálculo ou programa de computador e as operações de separação e/ou mistura executadas utilizando protocolos automatizados, por exemplo, robótica. A marcação de unidades celulares (ver abaixo) pode ser realizada por qualquer um de vários meios, por exemplo, marcação por RFID, etiquetagem óptica ou codificação espacial. Os dispositivos de robótica capazes de determinar a identidade de uma amostra, e por isso dividir as amostras de acordo com um protocolo predeterminado, foi descrita (ver "Combinatorial Chemistry, A practical Approach", Oxford University Press (2000), Ed H. Fenniri). Alternativamente, o manuseamento de líquidos de laboratório convencionais e/ou robótica de cultura de tecidos (Por exemplo, tal como os fabricados por: Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA; The Automation Partnership, Royston, Reino Unido) é capaz de codificar espacialmente a identidade das amostras múltiplas e de adicionar, remover ou translocar estes de acordo com protocolos pré-programados.

Análise e/ou separação de unidades celulares

No seguimento de cada ronda de cultura de células ou após um número definido de rondas, as unidades celulares podem ser estudadas para observar um qualquer dado processo celular que pode ter sido afectado pelas condições de cultura do tecido. Os exemplos abaixo são ilustrativos e não pretendem limitar o âmbito de uma invenção.

No seguimento de cada ronda de cultura de células ou após um número definido de rondas, as unidades celulares podem ser ensaiadas para determinar se existem membros que apresentam proliferação celular aumentada. Isto pode ser alcançado por uma variedade de técnicas, por exemplo, por inspecção visual das unidades celulares sob um microscópio ou por quantificação de um produto marcador característico da célula. Isto pode ser um marcador endógeno, tal como uma sequência de ADN particular ou uma proteína celular que pode ser detectada por um ligando ou anticorpo. Alternativamente um marcador exógeno, tal como proteína verde fluorescente (GFP), pode ser introduzido nas unidades celulares a serem ensaiadas para proporcionar uma leitura específica de células (vivas). As células vivas podem ser visualizadas utilizando uma variedade de estirpes vitais ou, contrariamente, as células mortas podem ser marcadas utilizando uma variedade de métodos, por exemplo, utilizando iodeto de propídio. Além disso, as unidades celulares marcadas podem ser separadas das não marcadas através de uma variedade de técnicas, tanto manual como automatizadas, incluindo purificação de afinidade ("biosselecção"), ou por selecção por tamanho de células activadas por fluorescência (FACS) ou técnicas largamente semelhantes (Fig. 17). Dependendo da aplicação, pode ser possível utilizar equipamento de laboratório convencional, ou pode ser vantajoso utilizar instrumentação especializada. Por exemplo, determinados instrumentos de análise e de selecção por tamanho (e. g. ver Union Biometrica Inc., Somerville MA, EUA) possuem diâmetros de fluxo de célula até um milímetro que permite a selecção por fluxo de esferas com diâmetros até 500 microns. Estes instrumentos proporcionam uma leitura do tamanho da esfera e densidade óptica, bem como dois comprimentos de onda de emissão fluorescente a partir de etiquetas, tais como

GFP, YFP ou DS-vermelho. As velocidades de biosselecção de 180000 esferas por hora e dispensando em placas de multi-poços ou num receptor em grosso são possíveis.

No seguimento de cada ronda de cultura de células ou após um número definido de rondas, as unidades celulares podem ser ensaiadas para determinar se são membros que apresentam um genótipo ou fenótipo particular. A determinação do genótipo pode ser realizada utilizando técnicas bem conhecidas, tais como a reacção da polimerase em cadeia (PCR), hibridação de fluorescência *in situ* (FISH), sequenciação de ADN, e outros. A determinação do fenótipo pode ser realizada por uma variedade de técnicas, por exemplo, por inspecção visual das unidades celulares sob um microscópio ou por detecção de um produto marcador característico da célula. Isto pode ser um marcador endógeno, tais como uma sequência de ADN ou ARN particular, ou uma proteína celular que pode ser detectada por um ligando, conversão de um substrato enzimático ou anticorpo que reconhece um marcador fenotípico particular (Por exemplo, ver Apêndice E de *Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. Departamento de Saúde e Serviços Humanos. Junho de 2001). Um marcador genético pode também ser exógeno, *i. e.* um que tenha sido introduzido na população celular, por exemplo, por transfecção ou transdução viral. Exemplos de marcadores exógenos são as proteínas fluorescentes (*e. g.* GFP) ou antigénios de superfície de célula que não são normalmente expressos numa linha de células particular ou que são modificados no epitopo, ou a partir de uma espécie diferente. Um marcador genético de transgene ou exógeno com elementos de controlo de transcrição associados pode ser expresso de um modo que reflecte um padrão representativo de um gene(s) endógeno(s). Isto pode ser alcançado por associação do gene com um promotor

mínimo específico para o tipo de célula ou por integração do transgene num locus particular (e. g. ver Patente Europeia nº EP 0695351). As unidades celulares marcadas podem ser separadas das não marcadas através de uma variedade de técnicas, manuais ou automatizadas, incluindo purificação de afinidade ("biosselecção") ou por selecção, por tamanho das células activada, por fluorescência (FACS). Nishikawa et al (1998, *Development* vol 125, p1747-1757) utilizando marcadores de superfície da célula reconhecidos por anticorpos para acompanhar a diferenciação de células ES de murino totipotentes. Utilizando FACS estas foram capazes de identificar e purificar células da linhagem hematopoiética em vários estádios na sua diferenciação.

Uma técnica alternativa ou complementar para enriquecer unidades celulares de um genótipo ou fenótipo particular é seleccionar geneticamente os grupos desejados. Isto pode ser alcançado, por exemplo, introduzindo um marcador seleccionável nas unidades celulares e ensaiando a viabilidade sob condições selectivas, por exemplo, ver Soria et al. (2000, *Diabetes* vol 49, p1-6) que utilizaram um tal sistema para seleccionar células que segregam insulina a partir de células ES diferenciadas. Li et al (1998, *Curr Biol* vol 8, p 971-974) identificaram progenitores neurais integrando a selecção bifuncional marcador/repórter β geo (que proporciona a actividade de β -galactosidase e resistência a G418) no locus Sox2, por recombinação homóloga em células ES de murino. Uma vez que uma das características dos progenitores neurais é a expressão de Sox2 e, assim dos genes marcadores integrados, essas células podem ser seleccionadas a partir de linhagens não neuronais, por adição de G418 após induzir diferenciação utilizando ácido retinóico. A viabilidade celular pode ser determinada por inspecção sob um microscópio, ou monitorizando a

actividade de β -gal. Ao contrário das abordagens de selecção à base de fenótipo que podem ser limitadas pela disponibilidade de um ligando ou anticorpo apropriado, a selecção genética pode ser aplicada a qualquer gene expresso diferenciadamente.

Determinação da identidade ou história da cultura de células de uma unidade celular

Quando se manuseia um grande número de unidades celulares, a sua identidade e/ou história da cultura de células (Por exemplo, a cronologia e a natureza exacta de uma série de condições de cultura a que qualquer um dos grupos ou unidades possa ter sido exposta) pode tornar-se confusa. Por exemplo, o protocolo de separação-mistura da cultura de células envolve necessariamente a mistura de unidades celulares em cada ronda, tornando difícil seguir as unidades individuais. Determinar a história da cultura de células de uma unidade celular numa mistura de unidades celulares que foram submetidas a múltiplas condições de cultura é por vezes, referida como “desconvolução” de uma história de cultura de células. Um método para fazer isto é marcar as unidades celulares e é, deste modo, vantajoso marcar as unidades celulares. A marcação pode ser efectuada no início de uma experiência, ou durante cada ronda de uma experiência e pode envolver uma única marcação (que pode ou não ser modificada no decurso de uma experiência) ou uma série de marcações que compreendem um único agregado. Do mesmo modo, a leitura da(s) marca(s) pode ocorrer durante cada ronda ou simplesmente no final da experiência. De um modo preferido, as marcas únicas tal como as marcas RFID são lidas durante cada ronda, enquanto as marcas adicionadas em série em cada ronda são lidas no final e uma experiência.

A marcação de unidades celulares pode ser conseguida por uma variedade de meios, Por exemplo, marcação das próprias células, ou qualquer material a que as células são ligadas ou de outro modo associadas. Qualquer dos métodos químicos e não químicos utilizados para codificar bibliotecas combinatórias sintéticas podem ser adaptados para este propósito e alguns destes são descritos em *Methods in Enzymology* Vol 267 (1996), "Combinatorial Chemistry", John N. Abelson (Editor); *Combinatorial Chemistry*, Oxford University Press (2000), Hicham Fenniri (Editor); K. Braeckmans et al., "Scanning the code", *Modem Drug Discovery* (Feb. 2003); K. Braeckmans et al "Encoding microcarriers: Present and Future Technologies"; *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 1, p. 447-456 (2002). Seguem-se alguns exemplos de métodos de marcação.

Um método de marcação de unidades celulares envolve a associação de unidades celulares com uma etiqueta que se torna sequencialmente modificada à medida que é colocada em diferentes condições de cultura. Isto pode envolver, Por exemplo, a adição ou subtracção de outras unidades à etiqueta de modo que a sua estereoquímica, sequência ou massa é alterada; ou a alteração da memória electrónica como nos transponders RF de ler-escrever (ver a abaixo).

Outro método de marcação de unidades celulares envolve sequencialmente a associação de etiquetas únicas com as unidades celulares sempre que são cultivadas sob diferentes condições, de modo que a subsequente detecção e identificação das etiquetas, proporciona um registo não ambíguo da cronologia e identidade das condições de cultura celular a que a unidade celular esteve exposta. As etiquetas podem ser incorporadas pelas células ou

ligadas a uma superfície da célula por adsorção ou a um ligando ou anticorpo adequados ou conjugadas com uma matriz associada a células tal como um veículo, por adsorção, forças coloidais ou uma variedade de ligações, tais como a ligação covalente ou ligação não covalente, e. g., ligação biotina-estreptavidina. Por exemplo, uma etiqueta simples que possa ser introduzida nas células ou ligada a uma matriz associada com células é um oligonucleótido de comprimento definido e/ou sequência. Os oligonucleótidos podem compreender qualquer classe de ácido nucleico (e. g. ARN, ADN, PNA, linear, circular ou viral) e pode conter sequências específicas para amplificação (e. g. sequências de iniciador para PCR) ou marcas para a detecção (e. g. fluoróforos ou interruptores, ou etiquetas isotópicas). A detecção destes pode ser directa, Por exemplo, por sequenciação dos oligos ou pela sua hibridação com sequências complementares (e. g., numa matriz ou chip) ou indirecta, como pela monitorização de um produto de um gene codificado por um oligonucleótido ou a interferência do nucleótido com uma actividade celular (e. g., inibição anti-sentido de um gene particular). Um método vantajoso de amplificar ácidos nucleicos é pela amplificação em círculo rolante (RCA; 2002, V. Demidov, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2 (6), p.89-95) em que as etiquetas de ácido nucleico podem compreender moldes de RCA, iniciadores de elongação ou suportes que auxiliam a circularização de moldes minicírculo).

Qualquer etiqueta molecular ou macromolecular pode ser utilizada desde que possa ser detectada, incluindo etiquetas de péptidos, compostos coloridos ou fluorescentes, aminas secundárias, halocarbonetos, misturas de isótopos estáveis, etc., as etiquetas podem ligar-se a unidades celulares directamente ou através de um intermediário, Por exemplo, um

anticorpo produzido contra um componente de uma unidade celular ou através de um par de interacção tal como biotina-estreptavidina. Adicionalmente, as etiquetas podem ser protegidas contra a degradação através de componentes de uma cultura de células, por exemplo, por modificação química ou outra ou por encapsulação. A encapsulação de etiquetas pode acontecer em muitos meios diferentes, Por exemplo, em esferas, das quais existem disponíveis muitos tipos a partir de fornecedores tal como Bangs Laboratories Inc. (Fishers IN, USA), e a encapsulação pode ser utilizada para padronizar a dosagem de etiqueta em adição para proporcionar componentes para a amplificação da etiqueta e/ou detecção (Por exemplo, proporcionar iniciadores de PCR para utilização com uma etiqueta de ADN). Um método preferido da marcação de unidades celulares emprega esferas fluorescentes tal como as preparadas por Lumindex Corporation (Austin, TX, USA). O sistema Lumindex compreende esferas de poliestireno que podem ou não ser externamente derivadas (e. g. com avidina ou anticorpo) e são internamente coradas com diferentes proporções de dois fluoróforos espectralmente distintos e um leitor que é capaz de caracterizar a assinatura espectral de cada esfera. Um outro método preferido emprega esferas tal como as preparadas por Bangs Laboratories Inc. (Fishers IN, USA). O sistema Bangs compreende conjuntos de esferas que podem ser distinguidas com base em diferentes tamanhos (e. g. conjuntos de esferas de 4,4 μm e 5,5 μm de diâmetro). As esferas em cada conjunto podem ser, além disso, distinguidas umas das outras com base nas diferentes intensidades de fluorescência permitindo a aplicação diferencial com um único corante fluorescente. É possível utilizar muitos corantes diferentes com diferentes características de absorção ou emissão que podem ser internamente aplicados ou ligados externamente a veículos através de uma multiplicidade de meios.

É possível, para além disso, utilizar “pontos quânticos” para obter um número muito elevado de diferentes marcas fluorescente que podem ser lidas convenientemente.

Os substratos do crescimento celular tal como os descritos em ligação com unidades celulares em formação podem ser derivados ou revestidos com substâncias que facilitam a etiquetagem e não interferem com o crescimento celular. Um método preferido de derivar veículos é modificá-los covalentemente ou não-covalentemente com biotina, de modo que possam ser ligados através de estreptavidina ou avidina. Em geral, será importante utilizar uma etiqueta que não induz por si só um efeito celular (*i. e.* uma etiqueta inerte) e que podem ser distinguidas a partir de moléculas presentes em unidades celulares ou no meio de cultura e que podem ser ligados a este alvo e subsequentemente detectados no ruído destas moléculas. Para facilitar a detecção, pode ser vantajoso eluir selectivamente etiquetas a partir de unidades celulares ou excluir as células de unidades celulares utilizando condições selectivas. Estratégias moleculares mais complicadas de etiquetagem podem também ser visadas, incluindo a estratégia de “codificação binária” em que a informação é registada por um conjunto de códigos binários atribuídos a um conjunto de etiquetas moleculares e as suas misturas.

A detecção de etiquetas pode ser conseguida através de uma variedade de métodos familiar para os especialistas da técnica. Os métodos incluem espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear, sequenciação, hibridação, detecção de antígenos, electroforese, espectroscopia, microscopia, análise de imagem, detecção de fluorescência, etc.

De particular interesse são as estratégias de marcação ou codificação em que a marcação é efectuada apenas uma vez ou em que a marcação e/ou detecção são não físicas e deste modo, não-invasivos. A Identificação por radiofrequência (RFID) é um exemplo de um sistema que exhibe estas propriedades. A RFID emprega transponders (etiquetas RF), antenas e leitores. Uma etiqueta RF é um pequeno circuito electrónico, normalmente num invólucro de vidro ou plástico que na sua forma mais simples proporciona o acesso a um código de identificação único que pode ser “lida”, sem contacto ou linhas de visão, através de electrónica adequada. As etiquetas podem também armazenar informação produzida pelo utilizador, de novo sem contacto ou linha de visão. Um “leitor” é uma unidade electrónica que transfere a informação para e de uma ou mais etiquetas (deve ser notado que o termo leitor é utilizado de forma indiferente para significar uma única leitura e uma unidade de leitura/escrita). O tamanho e características de um leitor podem variar consideravelmente, e pode operar em isolamento, ou estar ligado a um sistema remoto de computador. É utilizada uma antena para transmitir informação a partir de um leitor para uma etiqueta, e para receber informação enviada por uma etiqueta RF. O tamanho e o formato de uma antena reflectirão a aplicação específica, e podem variar entre uma pequena serpentina circular e grandes estruturas planares. Um sistema de RFID pode operar em isolamento, ou pode estar ligado a um computador remoto para uma interpretação mais fácil e manipulação da identificação e dados associados derivados de uma etiqueta. Uma estratégia de RFID utilizada em química combinatória é descrita em Nicolaou et al. (1995, *Angew Chem Intl Ed Engl*, vol. 34, p. 2289) e compreende: (i) um invólucro poroso contendo um substrato da síntese e a etiqueta semi-condutora; (ii) a resina de síntese em fase sólida; (iii) uma unidade semicondutora “Single ou Multiple

Addressable Radiofrequency Tag" com invólucro de vidro capaz de receber, armazenar e emitir sinais de radiofrequência. Um dispositivo semelhante pode ser adaptado ao crescimento e monitorização de unidades celulares simplesmente através da substituição da resina de síntese em fase sólida com microveículos de cultura de tecidos ou com unidades celulares adequadas. Mais variações destas podem ser previstas incluindo, mas não se limitando a etiquetas RF (revestidas ou não revestidas) em que as células são directamente cultivadas ou etiquetas RF implantadas em unidades celulares ou organismos.

Deste modo, as etiquetas não têm de ser necessariamente distinguíveis pela sua estrutura química ou molecular numa primeira fase. As variações múltiplas da estratégia de etiquetagem não química podem ser concebidas para determinar a identidade de uma determinada unidade celular numa mistura ou para deduzir a identidade das diferentes unidades celulares que compreendem uma mistura. Por exemplo, foram descritos métodos ópticos ou visuais de etiquetagem em que objectos de diferentes formas, objectos graficamente codificados ou diferentes cores denotam a identidade de uma amostra (por exemplo, ver 1998, Guiles *et al*, *Angew. Chem. Intl Ed Engl*, vol. 37, p926; Luminex Corp, Austin TX, USA; BD Biosciences; Memobead Technologies, Ghent, Belgium), ou em que o perfil ou código de barras é impresso num substrato tal como uma barra cerâmica e reconhecidas utilizando tecnologia de reconhecimento de perfil (por exemplo, ver 1997, Xiao *et al.*, *Angew. Chem. Intl Ed Engl*, vol 36, p780; Smartbead Technologies, Babraham, UK). Um outro método de seguir ou marcar unidades celulares é codificar a sua identidade espacialmente, *i. e.*, pela sua posição no espaço. Neste método as diferentes unidades celulares são segregadas em posições relativas definidas, e estas posições denotam ou

codificam a identidade das unidades. Por exemplo, as unidades celulares podem ser cultivadas numa matriz, em que a identidade e/ou história da cultura de cada unidade é conhecida e é associada para uma posição particular na matriz. Nas suas formas mais simples, tal como as matrizes, podem compreender colecções de frascos de cultura de tecidos, poços de uma placa multi-poço, ou localizações numa lâmina de vidro ou outra superfície. Os exemplos de estratégias de codificação posicional podem ser encontradas em Geysen *et al.* (1984, *Proc Natl Acad Sci USA* vol. 81, p. 3998-4002), Fodor *et al.* (1991, *Science* vol. 251, p. 767-773), Ziauddin e Sabatini (2001, *Nature*, Vol. 411, p. 107-110), e Wu *et al.* (2002, *Trends Cell Biol.* Vol. 12(10), p.485-8).

As unidades celulares são marcadas. A marcação de uma unidade celular permite a derivação de informação útil a partir da experiência com vista ao resultado das condições particulares amostradas pela unidade celular marcada, em oposição a todas as outras unidades celulares. Alternativamente, é por vezes vantajoso marcar um ou alguns dos grupo(s) das unidades celulares que foram todas expostas a um certo protocolo de cultura, Por exemplo, um grupo de unidades celulares que foram segregadas para o mesmo meio durante um passo particular de separação ou mistura. Deve também ser evidente que a marcação de certas unidades celulares permite inferir a identidade de outras (talvez não marcadas) unidades celulares.

Do um modo semelhante, deve ser evidente que a realização de experiências de cultura de células em que são omitidas várias condições podem dar informação em relação à utilidade destas condições com respeito a um resultado experimental particular. Deve, deste modo, ser possível para avaliar cada das condições amostradas de uma maneira de acordo com a invenção repetindo a

experiência um número de vezes, omitindo de cada vez um diferente conjunto de condições.

Os passos da cultura de células de separação-separação podem também ser utilizadas para determinar o efeito de um conjunto particular de condições no resultado da experiência. Com efeito, os passos de separação-separação resultam na formação de linhagens particulares de unidades celulares que tinham sido, cada uma, expostas a condições de cultura de célula única na altura da ramificação. Através das diferentes linhagens, é possível determinar a utilidade das condições de cultura dos tecidos estudados no ponto de ramificação (Fig. 6), em relação a um resultado experimental particular.

A invenção é a seguir descrita nos seguintes exemplos.

Exemplos

Exemplo 1 - Diferenciação de unidades celulares ES utilizando a cultura de células de separação-mistura

A experiência de cultura de separação-mistura foi efectuada de modo a ensaiar as condições de cultura que podiam dar origem a neurónios de um fenótipo dopaminérgico utilizando uma cultura inicial de células ES não diferenciadas de murganho.

As células ES não diferenciadas foram cultivadas em placas de cultura de tecidos revestidas com gelatina na presença de 1400 U mL^{-1} do factor inibidor de leucemia (LIF; Chemicon) em meio de células ES consistindo num meio mínimo essencial de inactivação de Dulbecco (DMEM; GIBCO/BRL) suplementado com 15%

de FCS, 100 mM de aminoácidos não essenciais de MEM, 0,55 mM de 2-mercaptoetanol, L-glutamina, e antibióticos (todos de GIBCOIBRL). Para induzir a formação de corpos embrionários (EB) as células foram dissociadas numa suspensão de célula única através de 0,05% de tripsina e 0,04% de EDTA em PBS e plaqueada em placas de cultura bacteriana não aderentes a uma densidade de $2-2,5 \times 10^4$ células cm^{-2} no meio acima descrito. As EB foram formadas durante quatro dias e então plaqueadas numa superfície adesiva de cultura de tecidos no meio de células ES. Após 24 h de cultura, a selecção de células positivas para nestina foi conseguida por substituição do meio das células ES por meio isento de soro de Insulina/Transferrina/Selénio/Fibronectina (ITSFn) e incubando, durante 10 dias.

Estas células positivas para nestina foram utilizadas como o material de partida para uma experiência de cultura de separação-mistura. Especificamente, as células foram dissociadas por 0,05% de tripsina/0,04% de EDTA, e semeados em >10000 de bioesferas de vidro (Whatman, UK) a aproximadamente $1,5-2 \times 10^5$ células cm^{-2} . As placas de cultura de tecidos utilizadas daqui em diante foram preparadas em material não aderente.

As esferas de vidro foram pré-revestidas utilizando poliornitina (15 mg mL^{-1}) e laminina ($1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, ambos de Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). As esferas foram divididas aleatoriamente em quatro conjuntos, cada um dos quais foi incubados em um de quatro meios de cultura de tecidos (denotados A1, A2, A3 ou A4) cuja composição é dada na Tabela 1 a seguir. Estas são baseadas no meio N2 modificado de acordo com Johe *et al.* (1996, *Genes Dev*, vol 10, p 3129-3140) e que é daqui em diante referido, simplesmente, como meio N2.

Tabela 1

A1	Meio N2 suplementado com 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de laminina.
A2	Meio N2 suplementado com 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de laminina, 10 ng mL^{-1} de bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN).
A3	Meio N2 suplementado com 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de laminina, 10 ng mL^{-1} de bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN), fragmento N-terminal de SHH de murino (500 ng mL^{-1} , de R&D Systems).
A4	Meio N2 suplementado com 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de laminina, 10 ng mL^{-1} de bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN), fragmento N-terminal de SHH de murino (500 ng mL^{-1} , R&D Systems) e isoforma b de FGF8 de murino (100 ng mL^{-1} , R&D Systems).

Os quatro conjuntos de esferas foram expostos ao meio de cultura de tecidos respectivos durante dois dias e depois as esferas de todas as quatro culturas foram misturadas, lavadas brevemente em meio N2, e de novo, a separação em quatro conjuntos, cada dos quais foi incubado em um dos meios A1-A4. Após dois dias este procedimento foi repetido de novo, de modo a amostrar a cultura de células em várias combinações de meios A1-A4 durante um período de seis dias. Após este tempo, as esferas de todas as quatro culturas foram misturadas, lavadas brevemente em meio N2, e aleatoriamente separados em quatro conjuntos, cada dos quais foi incubado em um de quatro meios novos (denotados B1, B2, B3 ou B4) cuja composição é dada na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2

B1	Meio N2 suplementado com 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de laminina, 10 ng mL^{-1} de bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN), fragmento N-terminal de SHH de murino (500 ng mL^{-1} , R&D Systems) e isoforma b de FGF8 de murino (100 ng mL^{-1} , R&D Systems).
B2	Meio N3FL: DMEM/F12 (1:1) meio contendo insulina (25 $\mu\text{g/mL}$), transferrina (50 $\mu\text{g/mL}$), progesterona (20 nM), putrescina (100 μM), cloreto de selênio (30 nM), bFGF (5 ng/mL) e laminina (1 $\mu\text{g/mL}$),
B3	Meio N2 suplementado com 25 mM de HEPES (pH 7,4), laminina (1 mg mL^{-1}), cAMP (1 μM , Sigma, St. Louis, MO) e ácido ascórbico (200 μM , Sigma, St. Louis, MO).
B4	Meio N2 suplementado com laminina (1 mg mL^{-1}), cAMP (1 μM , Sigma, St. Louis, MO) e ácido ascórbico (200 μM , Sigma, St. Louis, MO).

Cada ronda de cultura teve a duração de cinco dias, depois as esferas de todas as quatro culturas foram misturadas, lavadas brevemente em meio N2 e separadas em quatro conjuntos cada dos quais foi de novo incubado em um dos meios B1-B4. Este procedimento foi efectuado num total de três vezes, de modo a que as esferas estivessem presentes no meio B num total de 15 dias.

Incluída na composição dos diferentes meios de cultura estava uma marca única de oligonucleótido que adere aos microveículos de vidro (ou células) em pequenas quantidades e foi, subsequentemente, amplificada e analisada de modo a deduzir

os paradeiros de uma esfera microveículo em qualquer altura no regime da cultura de separação mistura. A sequência de ADN de cada marca difere de modo a distinguir entre os meios diferentes (*i. e.* meio A1 vs meio A2) e também exposição ao mesmo meio em duas diferentes rondas da cultura de separação mistura (*i. e.* meio A1 utilizadas no dia 0 vs no dia 4). Um sumário do regime de cultura de separação mistura nos vários meios durante um total de 21 dias é dada na Tabela 3 abaixo. Cada entrada na tabela também apresenta (em parêntesis) a identidade de uma marcação inclui no frasco de cultura de tecidos. A sequência de ADN de uma marcação é apresentada na Tabela 4.

Tabela 3

Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 11	Dia 16
A1 (L1)	A1 (L5)	A1 (L9)	B1 (L13)	B1 (L17)	B1 (L21)
A2 (L2)	A2 (L6)	A2 (L10)	B2 (L14)	B2 (L18)	B2 (L22)
A3 (L3)	A3 (L7)	A3 (L11)	B3 (L15)	B3 (L19)	B3 (L23)
A4 (L4)	A4 (L8)	A4 (L12)	B4 (L16)	B4 (L20)	B4 (L24)

Tabela 4

L1	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTaACGTGAAGcCACGTCGCCgCCGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L2	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTgACGTGAAGtCACGTCGCCaCCGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L3	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTcACGTGAAGaCACGTCGCCtCCGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L4	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTtACGTGAAGgCACGTCGCCcCCGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L5	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAaCGTGAAGAcACGTCGCCAgCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L6	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAgCGTGAAGAtACGTCGCCAaCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L7	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAcCGTGAAGAAcACGTCGCCAtCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L8	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAtCGTGAAGAgACGTCGCCAcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L9	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAaGTGAAGAcCGTCGCCAcgGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L10	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAgGTGAAGActCGTCGCCAcgGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L11	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACaCGTCGCCActGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L12	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAtGTGAAGAcgCGTCGCCAcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L13	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAACaTGAAGACaCGTCGCCACCgCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L14	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACAtGTGCCACCcCGGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L15	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACaGTGCCACCtCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L16	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACgGTGCCACCcCGGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L17	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACaGTGCCACCgCGGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L18	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACtGTGCCACCgCGGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L19	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACaGTGCCACCtCGGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L20	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACgGTGCCACCgCGGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L21	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACCGCGGCCACCgCGGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L22	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACGTGTGCCACCgCGGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L23	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACCGCGGCCACCgCGGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>
L24	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCTAAcGTGAAGACCGCGGCCACCgCGGCCGACCCGGCCGAATTCCTG</u>

Por cultura de separação-mistura as células estaminais três vezes em diferentes meios A seguido por três vezes em diferentes meios B foi possível amostrar 4096 diferentes protocolos de cultura de tecidos - sendo este o número total de diferentes combinações dos tampões acima a que as diferentes esferas foram expostas.

Depois da ronda final da cultura de separação mistura as esferas foram misturadas, lavadas brevemente em meio N2 e analisadas por FACS utilizando protocolos convencionais. Resumidamente, as células foram fixas em 4% de

paraformaldeído/0,15% de ácido pícrico em PBS. De modo a detectar neurónios dopaminérgicos, as células foram coradas utilizando um monoclonal anti-hidroxilase da tirosina (Sigma) seguida por um anticorpo secundário marcado com fluorescentes (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) ambos de acordo com as instruções do fabricante.

As cinco esferas com a intensidade de fluorescência mais elevada foram separadas em poços separados de uma placa de PCR e as marcações dos oligonucleótidos foram amplificadas por trinta ciclos de PCR utilizando Taq polimerase (Stratagene, La Jolla, CA) e os iniciadores apresentados na Tabela 5 a seguir.

Tabela5

PRF1	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGC</u>
PRR2	<u>CAGGAATTCGGCCGGGTCGG</u>

Os produtos de PCR foram purificados por extracção de fenol/clorofórmio seguido por precipitação com etanol, digeridos utilizando a enzima de restrição *EcoRI* (New England Biolabs, Beverley, MA) e clonados num vector pBluescript II KS+ preparado do mesmo modo (Stratagene, La Jolla, CA). O vector recombinante foi electroporado em *E. coli* DH5α competentes e plaqueadas em meio contendo o antibiótico ampicilina. Duzentas colónias foram picadas para cada esfera analisada e o ADN plasmídico preparado e sequenciado na região do poliligante.

A análise por sequenciação revelou que a maior parte das esferas portadoras de células com um fenótipo dopaminérgico foram marcadas por oligos (L4, L8, L12, L16, L20 e L24). A correlação destas marcas com as respectivas condições de cultura

de células sugere que estas esferas foram partilhadas no meio A1 durante um total de seis dias (no Dia 0, Dia 2 e Dia 4) seguido por meio B4 durante mais quinze dias (no Dia 6, Dia 11 e Dia 16). Foi deduzido que este protocolo de cultura foi um dos apropriados para a produção de neurónios dopaminérgicos processando células ES de murganho como descrito acima.

Uma vez estabelecidas estas condições, as células ES não diferenciadas foram de novo cultivadas de acordo com o protocolo acima (*i. e.*, expansão, formação de EB, selecção de nestina, etc.) mas sem sofrer o processo de cultura de separação mistura. As células foram cultivadas em placas adesivas de cultura de tecidos em vez de esferas, não foram adicionados os oligonucleótido marcadores aos diferentes meios de cultura, e apenas as condições de cultura bem sucedidas foram ensaiadas. Por esta forma, pode ser produzido um grande número de células dopaminérgicas e testadas para perfis de expressão de genes. O ARN total foi removido de células obtidas a partir de quatro estádios do protocolo de cultura: (1) população de células ES pluripotentes; (2) corpos embrionários; (3) células dissociadas e plaqueadas que sofreram selecção para nestina; e (4) células positivas para nestina cultivadas em tampão A4. O ADNc foi preparado utilizando transcriptase reversa e iniciação com hexâmeros aleatórios e a quantidade de transcritos de actina normalizada entre as várias amostras. Os ADNc neurais foram preparados utilizando os iniciadores apresentados na Tabela 6:

Tabela 6

GENE	INICIADOR DIRECTO	INICIADOR REVERSO	ESTÁDIO +vo
Otx2	CCATGACCTATACTCAGGCTTCAGG	GAAGCTCCATATCCCTGGGTGGAAAG	1, (2, 3), 4
Pax2	CCAAAGTGGTGGACAAGATTGCC	GGGATAGGAAGGACGCTCAAAGAC	3, 4
Pax5	CAGATGTAGTCCGCCAAAGGATAG	ATGCCACTGATGGAGTATGAGGAGCC	3, 4
En1	TCAAGACTGACTCACAGCAACCCC	CTTTGTCCTGAACCGTGGTGGTAG	4
Wnt1	ACCTGTTGACGGATTCCAAG	TCATGAGGAAGCGTAGGTCC	3, 4
Nurr1	TGAAGAGAGCGGAGAAGGAGATC	TCTGGAGTTAAGAAATCGGAGCTG	3, 4
nestina	GGAGTGTGCTTAGAGGTGC	TCCAGAAAGCCAAGAGAAGC	(1), 3, 4

A Tabela 6 também apresenta os estádios em que os transcritos dos vários genes foram detectados por RT-PCR (parêntesis indicam a detecção de vestígios). A partir destes resultados foi deduzido que a expressão de En1, Pax2, Pax5, Wnt1 e Nurr1 seria um marcador adequado para as células destinadas a um destino dopaminérgico. Pelo contrário, a transfecção de células estaminais pluripotentes com estes genes, por exemplo, Nurr1, pode resultar num compromisso do fenótipo dopaminérgico *in vitro* (Wagner *et al*, 1999, *Nature Biotechnology*, vol. 17, p 653-659).

Exemplo 2 - Cultura de células de separação-mistura de unidades celulares HepG2

A experiência de cultura de separação-mistura foi efectuada de modo a ensaiar as condições de cultura do tecido que podem afectar um processo celular particular, nomeadamente a expressão e/ou actividade das enzimas metabólicas do citocromo P450 (CyP450). Os membros desta classe da enzima, tais como 1A1 e 1A2, podem ser ensaiados com a utilização de um substrato, etoxirresorufina que é enzimaticamente hidrolisada para produzir um produto, resorufina que possui características de fluorescência distintas que podem ser utilizadas para medir a

actividade da enzima CyP450. A expressão das enzimas CyP450 pode ser regulada por moléculas indutoras, tais como β -naftoflavona, e inibidores, tais como α -naftoflavona, quinidina ou aminotriazole. É também possível para algumas moléculas induzir a expressão de gene(s) CyP450, mas inibir a actividade do produto da enzima desse gene. Deste modo, podem dar origem a perfis complicados da expressão e actividade de acordo com o perfil da exposição em série de células a compostos de regulação.

A linha de células de hepatoma humano HepG2 foi cultivada em Cytodex 3 (Amersham Biosciences) em meio DME suplementado com L-glutamina, penicilina+estreptomicina, e 10% de soro fetal de vitela inactivado pelo calor. Um dia após a sementeira as unidades celulares foram separadas em 5 grupos e cultivadas em poços separados de uma placa de cultura multipoço em meio contendo 5 μ M de uma α -naftoflavona, β -naftoflavona, quinidina, aminotriazole, ou dimetilsulfóxido (DMSO; o veículo solvente para os compostos de teste). Após 24 horas de cultura (37°, 5% de CO₂), as unidades celulares nos poços individuais foram lavadas duas vezes com PBS, misturadas em conjunto com o meio de crescimento, e separação em cinco grupos que foram cultivadas nos cinco diferentes meios utilizados na primeira ronda. Após mais 24 horas de cultura as unidades celulares foram tratadas numa terceira ronda de cultura de separação-mistura como antes. Após mais 24 horas de cultura, as amostras de esferas foram tomadas a partir dos cinco grupos de células finais, e a partir de um grupo controlo que fosse cultivado em meio convencional com DMSO durante a duração da experiência de separação-mistura.

Para o ensaio de CyP450, fracções de esferas em meio de crescimento foram removidas e o substrato da enzima

etoxrriresorufina foi adicionado a uma concentração final de 10 μ M. As amostras de esferas foram colocadas numa lâmina de microscópio com uma lamela, e observadas imediatamente com um microscópio epifluorescente utilizando conjunto de filtros convencionais para a fluorescência de vermelho do Texas/rodamina (ver Figura 9). As células de controlo exibiram fluorescência de resorufina cerca de 15-20 minutos após a adição do substrato, e não foi detectada fluorescência na ausência de etoxrriresorufina. Quando as unidades celulares foram tratadas com β -naftoflavona numa experiência de controlo, a actividade da enzima é evidente sem 5-10 minutos (dados não apresentados). As unidades celulares tomadas a partir do grupo que sofreu o procedimento da cultura de separação-mistura apresentou vários graus da actividade da enzima (em 10 min) indicando que encontravam uma variedade de condições que induziam ou inibiam a actividade das enzimas CyP450 capazes de metabolizar etoxrriresorufina.

Exemplo 3 - Crescimento de unidades celulares compreendendo células estaminais pluripotentes

As células ES de murganho pluripotentes que expressam uma proteína de fusão Tau-GFP foram mantidas numa camada nutritiva de células SNL tratadas com mitomicina C (uma linha de células derivada de ST0) em meio de células ES consistindo em meio de Iscove suplementado com 15% de FCS, 0,55 mM de 2-mercaptoetanol, L-glutamina, antibióticos (todos de GIBCO/BRL) e 1400 U mL^{-1} de factor inibidor de leucemia (Chemicon) e separação 1:5 todos os outros dias. As células ES e células nutritivas utilizadas para a formação de unidades celulares foram transferidas para um frasco revestido com gelatina e cultivadas durante um dia em

meio ES para reduzir o número de células na cultura. As células ES foram tripsinizadas a partir de placas de gelatina e lavadas com meio contendo FCS, depois incubados com microveículos Cytopore 2 ou Cytodex 3 (Amersham Biosciences) que tinham sido hidratados em PBS, esterilizados por autoclavagem ou tratamento com 70% de etanol, depois foram lavadas com meio ES. As células ES foram semeadas a uma densidade de cerca de 10 células/microveículo numa placa de plástico não aderente. A cultura de células ES foi mantida sob condições convencionais (5% CO₂, 37°), com substituição de metade do meio todos os outros dias com meio ES fresco (ver Figura 7). O crescimento de células pluripotentes foi observado durante cinco dias nestas condições, após o que as células foram transferidas do meio das células ES para iniciar a diferenciação.

Exemplo 4 - Diferenciação de unidades celulares estaminais por cultura de separação-separação

As unidades celulares ES de murganho pluripotentes foram cultivadas durante cinco dias em meio de células ES (ver exemplo 3), o meio ES foi decantado e as unidades celulares lavadas duas vezes com PBS para remover traços de meio ES. A população de esferas foi separada em três grupos e o PBS foi decantado e substituído por um de (i) meio das células ES; (ii) meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal de vitela; ou (iii) Meio Quimicamente Definido (CDM; Wiles MV, Johansson BM, 1999, *Exp. Cell Res.*, vol 247, p. 241-8). Após uma hora de cultura sob condições convencionais, cada dos três grupos foram separados em três outros grupos, cada dos quais foi incubado em um de: (i) o meio em que os grupos de células foram cultivados; o meio em que os grupos de células foram cultivados

incluindo 1 μ M de LiCl; ou (iii) o meio em que os grupos de células foram cultivados incluindo 1 μ m de ácido retinóico (RA). Em cada dos outros dias o meio foi substituído com o respectivo meio fresco.

Exemplo 5 - Detecção de processos celulares compreendendo a diferenciação celular em unidades celulares utilizando um marcador fenotípico

Os microveículos Cultispher G (Percell Biolytica) foram semeados com células ES de murganho que expressam uma proteína de fusão Tau-GFP e cultivadas durante quatro semanas num meio isento de soro (15% de Gibco KO substituinte de soro, DMEM modificado de Iscove com Glutamax (Gibco), suplementado com penicilina/estreptomicina e 1400 U/mL de LIF). O meio foi mudado quando o pH se tornou ácido, como apresentado pelo indicador de cor no meio. Uma fracção de esferas foi removida e lavada com PBS antes da fixação com 4% paraformaldeído em PBS a 4° C, durante 20 minutos. As esferas foram lavadas várias vezes com PBS, ressuspensas em PBS/2,5% de FCS, 0,1% de Triton X-100, e separadas em duas amostras. Uma amostra foi preparada 1:200 com um anticorpo monoclonal de murino anti-proteína Acídica Fibrilhar da Glia (GFAP), e a outra foi deixada como um controlo. Após uma incubação durante a noite a 4° C, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS, depois foram ambas incubadas com um anticorpo de macaco anti-murganho marcado com Cy3 (Jackson ImmunoResearch) durante 2 horas à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas 3 vezes com PBS, depois colocadas em lâminas de microscópio com meio de montagem contendo DAPI (Vector). A maioria das células nos microveículos exibia coloração específica para GFAP (ver Figura 8 A-H).

Numa experiência separada, as unidades celulares compreendendo as células ES de murganho que expressam uma proteína de fusão Tau-GFP e microveículos Cytodex 3 (ver Exemplo 3), foram transferidas a partir do meio ES para CDM e cultivadas durante 4 dias, sob condições convencionais, após o que as unidades celulares foram lavadas uma vez com PBS e deixadas assentar por gravidade. O PBS foi removido e as unidades celulares fixadas em paraformaldeído a 2%, durante 15 minutos a 4 °C, após o que a solução foi removida e as unidades celulares lavadas três vezes com PBS. As unidades celulares foram ressuspensas em PBS contendo 2,5% de soro fetal de vitela e 0,1% de Triton X100 (Sigma) e separadas em três tubos de microcentrífuga separados. Uma imunoglobulina de murganho específica para beta III Tubulina (Sigma) foi adicionada a uma amostra a uma diluição de 1:200 e a coloração com anticorpo foi deixada prosseguir durante 2 horas à temperatura ambiente com ressuspensão ocasional. Todas as três amostras foram então lavadas três vezes com um grande excesso de PBS. A amostra incubada com os anticorpos anti-tubulina e uma outra amostra foram então incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente com uma diluição 1:200 de uma imunoglobulina de macaco anti-murganho conjugada com Cy3 (Jackson ImmunoResearch) em PBS/FCSITriton X100. Todas as três amostras foram, então, lavadas três vezes com um grande excesso de PBS, depois as unidades celulares foram ressuspensas em meio de montagem contendo DAPI (Sigma), colocadas em lâminas de microscópio com lamela e visualizadas por microscopia epifluorescente ou confocal (ver Figura 8, Painel I).

Exemplo 6 - Detecção da expressão diferencial de genes participantes num processo celular

As unidades celulares de células ES de murganho induzidas para diferenciar através de cultura de separação-separação (ver exemplo 4) foram lavadas com PBS e o ARN foi preparado a partir das unidades celulares utilizando reagentes Rneasy de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen). As amostras de ARN foram então utilizadas para preparar a primeira cadeia de ADNc com iniciação oligo-dT utilizando transcriptase reversa de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). Para normalizar as concentrações das amostras, foi preparada uma série de diluições de 10 vezes para cada amostra de ADNc e foi submetida a 25, 30 e 35 ciclos de reacção de polimerase em cadeia (PCR) com oligonucleótidos iniciadores para um gene de “manutenção”, a gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase. A coloração com brometo de etídeo dos produtos resultantes separados num gel de agarose a 1,5% foi utilizada para estimar a quantidade relativa de ADNc em cada amostra. Quantidades equivalentes de ADNc de cada amostra foram então utilizadas numa reacção de PCR com iniciadores de ADN para Oct4 (prevista ocorrer em células ES não diferenciadas); Nestina (prevista ocorrer na progenia neuronal diferenciada); ou HNF3b (prevista ocorrer na progenia endodérmica diferenciada). As sequências de iniciador foram como se segue:

HNF3b	ggacaagggaaatgagagg; ataacacctcactccactacc
Nestina	agtcagagcaagtgaatgg; agaaacaagatctcagcagg
Oct4	cgcgttctctttggaaaggtgttc; ctcgaaccacatccttctct
G3PDH	accacagtccatgccatcac; tccaccaccctgttgctgta

As quantidades relativas destes marcadores distinguíveis diferiram dependendo das condições de cultura a que as unidades celulares foram expostas. Por exemplo, RA no meio de ES induziu a expressão do marcador endodérmico HNF3b; enquanto DMEM com RA, e numa menor extensão, LiCl, levou à expressão de Nestina, um marcador de precursores neuronais. O decréscimo em Oct4 foi, particularmente marcado em DMEM, embora LiCl inibisse a redução (ver Figura 11).

Exemplo 7 - Marcação das unidades celulares utilizando RFID

Os transponders inseridos em vidro ID 100-A (Trovan) foram tratados durante 2 horas com 1 N de ácido clorídrico, lavadas extensivamente com água desionizada, depois incubados durante 2 horas com aminopropiltriethoxissilano (Sigma) num recipiente de vidro. O reagente de silano foi decantado e as etiquetas lavadas em série com água, 70% de etanol, água desionizada estéril, e depois salino tamponado com fosfato. As etiquetas foram colocadas individualmente em poços de placas multi-poço não aderentes a bactérias (Sterilin). Uma linha pluripotente de células ES que expressam um transgene de fusão Tau-GFP mantidas em meio de células ES com LIF (Chemicon) em placas revestidas com gelatina foram dissociadas numa suspensão de célula única através de tratamento com tripsina. As células foram lavadas uma vez com meio de células ES, ressuspensas em meio ES a 10^6 células/mL e 250 μ L de suspensão foram aplicados em cada etiqueta. Após incubação de uma hora sob condições de cultura convencionais (37°, 5% CO₂), foi adicionado 1,5 mL de meio ES adicional e as placas voltaram para a incubadora.

Os transponders foram também semeados com a linha de células de hepatoma humano HepG2 e uma linha de células STO de murganho derivada, SNL. O pré-tratamento e processo de sementeira foi efectuado como descrito para as células ES, mas as células foram mantidas em DMEM com 10% de FCS.

As culturas aderentes foram observadas com um microscópio de dissecção e células com etiqueta fluorescente visualizada utilizando epifluorescência (ver Figura 10). Os vários tipos de células aderentes apresentaram uma morfologia de espalhamento normal e proliferaram nos transponders. As unidades celulares marcadas podem ser mantidas durante semanas sem deterioração evidente das unidades celulares ou das marcações. A identidade única das unidades celulares pode ser registada com um leitor Trovan de bolso, sem perturbar as condições de cultura celular ou a manutenção das unidades celulares.

Exemplo 8 - Marcação de unidades celulares através de etiquetas fluorescentes, moleculares ou ópticas

Os microveículos Cytodex 3 (Amersham Biosciences) são compostos de dextrano com uma camada de superfície de colagénio desnaturado (gelatina). As esferas de Cytodex 3 (50 µL de volume de deposição após hidratação em PBS) foram incubadas 90 minutos, à temperatura ambiente, com um anticorpo anti-colagénio conjugado com biotina (Abcam, Cambridge, UK), a uma diluição de 1:50 em PBS com 2,5% de soro de vitela fetal, num volume total de 200 µL. As esferas foram então lavadas três vezes num grande excesso de PBS por ressuspensão e, depois, por deposição por gravidade. Uma amostra controlo foi tratada da mesma forma, mas sem a adição do anticorpo anti-colagénio. As amostras de

controle e tratadas foram, cada uma, divididas em duas e uma amostra de cada foi incubada 30 minutos à temperatura ambiente com um conjugado de estreptavidina-FITC a uma concentração de 2.5 µg/mL num volume de 250 µL de PBS/FCS. As duas amostras restantes foram incubadas nas mesmas condições, mas sem estreptavidina-FITC. As esferas pré-tratadas com o anticorpo biotinilado anti-colagénio, seguido pelo conjugado de estreptavidina-FITC mostrou níveis superiores de fluorescência (ver Figura 12). O revestimento de esferas microveículo com um anticorpo biotinilada é um meio de proporcionar unidades de biotina que, por sua vez, podem rapidamente ligar conjugados de estreptavidina detectáveis. Uma vez que a estreptavidina pode ser conjugada com um número bastante grande de entidades moleculares e macromoleculares, é deste modo possível derivar as esferas microveículo de modo que estas podem ligar-se com afinidade elevada a um grande número de etiquetas.

Numa experiência separada, os microveículos Cultispher G (Percell Biolytica) foram marcados com esferas de látex que proporcionam etiquetas convenientes. Os microveículos foram hidratados em PBS, esterilizados com etanol a 70%, lavados com PBS, depois covalentemente ligados a unidades de biotina. A biotinilação foi efectuada utilizando 10 mg de éster de ácido biotinamido-hexanoil-6-amino-hexanóico e N-hidroxissuccinimida (Sigma), dissolvida em 400 µL de dimetilformamida que foi adicionada a 1 mL de volume de deposição de microveículos em PBS. A reacção foi deixada prosseguir durante a noite, à temperatura ambiente, e os microveículos foram lavados 3 vezes com um grande excesso de PBS. Uma fracção de esferas tratadas e uma amostra de controle não modificada foram incubados com 1×10^5 esferas vermelhas fluorescentes de 1 µm de diâmetro, revestidas com estreptavidina (Sigma) ou com 2,5 µg/mL de estreptavidina-

FITC (Sigma) em PBS com 2,5% de soro fetal de vitela. O nível de marcação com as etiquetas das esferas (Fig.12 E-H) ou com FITC (Fig. 18 A-D) foi comparado utilizando microscopia de fluorescência.

Numa outra experiência, os microveículos Cytodex 3 foram marcados com esferas vermelho ou verde fluorescentes de 1 μ m de diâmetro, revestidas com estreptavidina (Sigma). Os microveículos Cytodex 3 (Amersham Biosciences) foram incubados com suspensões de esferas de látex vermelhas, verdes, ou numa mistura 1:1 de vermelhas e verdes, durante 30 minutos, à temperatura ambiente, em PBS com 2,5% de FCS. As amostras foram lavadas três vezes num grande excesso de PBS por ressuspensão e depois deposição por gravidade. Uma fracção das esferas marcadas pelas etiquetas vermelhas foi depois misturada com uma fracção do mesmo volume da amostra contendo esferas marcadas pelas etiquetas verdes, para determinar se a ligação cruzada teria ocorrido. As amostras foram, então, visualizadas sob um microscópio de epifluorescência, utilizando conjuntos de filtros convencionais para a detecção de FITC e vermelho do Texas/rodamina (ver Figuras 14 e 15). Os microveículos podem ser robustamente marcados utilizando as etiquetas das esferas de látex, resultando em populações diferentemente marcadas. A mistura das duas populações não resultou numa transferência significativa de marcas entre microveículos, significando que as populações permaneceram distinguíveis. Os microveículos incubados com uma combinação das duas etiquetas foram estavelmente marcadas por ambas, indicando que um único microveículo pode ser marcado com uma multiplicidade de etiquetas. Uma vez que etiquetas tal como as utilizadas nesta experiência podem ser conjugadas com um número muito grande de repórteres (e. g. diferentes fluoróforos, corantes, enzimas), é

possível utilizar estes para marcar microveículos com uma grande variedade de etiquetas distinguíveis. Adicionalmente, é possível acoplar anticorpos com as etiquetas das esferas de látex de modo a direccioná-los para microveículos ou unidades celulares.

Exemplo 9 - Marcação de unidades celulares através de etiquetas fluorescentes, moleculares ou ópticas

Os microveículos Cytodex 3 (Amersham) foram semeados com células ES que expressam um transgene Tau-GFP. Um dia depois, os microveículos foram lavados com PBS, depois incubados durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com uma suspensão de esferas de látex vermelhas, de 1 μm de diâmetro que foram covalentemente ligadas a estreptavidina (Sigma); e analisadas imediatamente ou 24 horas após cultura, sob condições padrão. A análise envolveu a lavagem três vezes num largo excesso de PBS por ressuspensão, depois deposição por gravidade, e as amostras foram visualizadas sob epifluorescência utilizando conjuntos de filtros padrão para a detecção de FITC e vermelho do Texas/rodamina. As unidades celulares compreendendo as células ES (verdes) e que tinham sido marcadas por interacção coloidal com etiquetas de esferas de látex (vermelhas) foram evidentes em cada caso (ver Figura 13).

Uma vez que as esferas compostas de látex e outros polímeros podem ser conjugados com um número bastante grande de repórteres moleculares e supermoleculares, é deste modo possível marcar unidades celulares com um grande intervalo de marcações distinguíveis.

Exemplo 10 - Análise manual e isolamento de unidades celulares com base num processo celular.

As unidades celulares compreendendo células ES de murganho que expressam uma proteína de fusão Tau-GFP e Microveículos Cytodex 3 foram misturados com microveículos Cytodex 3 nus a uma proporção de 1:100. A mistura foi observada sob um microscópio utilizando as opções de fase e fluorescência. As unidades celulares que expressam GFP foram rapidamente evidentes quando se utilizar a microscopia de fluorescência, mesmo num grande excesso de veículos não fluorescentes (ver Fig. 16). As unidades celulares individuais podem ser manualmente separadas utilizando uma pipeta montada em posição para aspirar pequenos volumes de cultura contendo as unidades celulares.

Exemplo 11 - Análise automática e separação de microveículos marcados e unidades celulares.

É desejável ser capaz de analisar e separar unidades celulares estão marcadas com várias etiquetas ou apresentam processos celulares particulares, numa forma automática ou de elevado processamento. Foi utilizado um instrumento COPAS Select (Union Biometrica Inc., Somerville, MA) capaz de separar organismos multicelulares e esferas com diâmetro até 0,5 mm para analisar unidades celulares, microveículos e microveículos marcados. Os Cytodex 3 (Amersham Bioosciences) foram analisados pelo instrumento de acordo com o seu tamanho e características ópticas (Tempo de Voo, TOF; Extinção, Ext) e exibiram uma suave variação no tamanho mas não uma significativa auto-fluorescência sob as condições utilizadas (ver Fig. 17 A/B). A marcação de microveículos Cytodex 3 com esferas de látex vermelhas

conjugadas com estreptavidina (Sigma) (ver Exemplo 9) levou a um deslocamento detectável na fluorescência vermelha (Fig. 17 C/D).

As unidades celulares compreendendo microveículos Cytodex 3 semeados com células ES que expressam um transgene Tau-GFP, foram utilizadas numa experiência para separar unidades celulares com base no número de células. Os grupos de unidades celulares compreendendo unidades celulares que suportam várias densidades de células foram passados através do instrumento sem fixação, e demonstraram uma vasta gama de intensidade de fluorescência verde (Fig. 17 E/F). O instrumento foi utilizado para separar unidades celulares altamente fluorescentes de unidades celulares de baixa fluorescência. As amostras subsequentemente analisadas utilizando microscopia de epifluorescência revelaram que as unidades celulares separadas com base na elevada fluorescência comportavam um grande número de células vivas enquanto as unidades celulares de baixa fluorescência eram fracamente populadas. Deste modo a análise automatizada, a identificação, e o isolamento de unidades celulares podem ser efectuados de acordo com múltiplos parâmetros, incluindo o número de células, o fenótipo, e a marcação com etiquetas de identificação.

Exemplo 12 -Identificação de etiquetas a partir de um única unidade celular

Os microveículos Cultispher G (Percell Biolytica) foram ligados de forma cruzada a unidades de biotina (ver Exemplo 8) e a biotinilação foi confirmada por comparação do nível de coloração com estreptavidina-FITC, utilizando microscopia de fluorescência (Figura 18 A-D).

As unidades celulares foram formadas pela incubação de uma suspensão de célula única de 10^6 de células ES TGFP com 250 μ L de volume de deposição de microveículos Cultispher G biotinilados em meio de crescimento de células ES durante 24 horas. Uma amostra de 50 μ L de unidades celulares foi etiquetada com esferas de látex vermelhas fluorescentes de 1 μ m, revestidas com estreptavidina (Sigma) por incubação com aproximadamente 5×10^5 etiquetas, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. As unidades celulares foram lavadas para retirar o excesso de esferas de látex através de várias rondas de ressuspensão e deposição em grandes volumes de PBS. Foi utilizada microscopia de epifluorescência para confirmar que as unidades celulares foram marcadas pelas etiquetas das esferas de látex (Fig. 18 E-G).

As unidades celulares foram colocadas numa placa de petri montada sob um microscópio de dissecação, e as unidades individuais foram isoladas utilizando uma pipeta e colocadas em 5 mL de tubos FACS (Becton Dickinson Falcon). Foi adicionada uma fracção de 200 μ L de uma solução 1x de protease neutral de *Bacillus polymyxa* (Dispase II, Roche) a cada tubo, e a matriz do microveículo foi digerida durante a noite à temperatura ambiente. O digerido foi aplicado a um citofluorímetro (Becton Dickinson FACScalibur) que tinha sido calibrado para detectar eventos no intervalo de tamanho de 1 μ m e no vermelho longínquo (FL3) do espectro de emissão (Fig. 18 H, I). A identidade das etiquetas isoladas a partir de uma única unidade celular pode ser confirmada pela detecção de eventos que estão de acordo com os critérios apropriados de tamanho e fluorescência (Fig. 18 J, K).

Exemplo 13 - Identificação de uma multiplicidade de etiquetas utilizadas para marcar unidades celulares

A disponibilidade de uma grande variedade de esferas de látex de tamanhos precisos e características de fluorescência que permitem a marcação em multiplexo de microveículos. Os microveículos Cultispher G biotinilados (ver Exemplo 12) foram marcados através de incubação em série e meios contendo três tipos diferentes de etiquetas de esferas revestidas com estreptavidina, diferindo em tamanho, espectro de emissão de fluorescência e intensidade de fluorescência. Os tipos de esfera utilizados como etiquetas foram: 1) 1 μm de esferas de látex verdes fluorescentes preparado por Sigma; 2) esfera nº 1 na série de esferas de 5,5 μm esferas de látex vermelhas fluorescentes (QuantumPlex) preparadas por Bangs Laboratories; e 3) esferas nº 5 na série de esferas de látex vermelhas fluorescentes de 4,4 μm preparadas por Bangs Laboratories.

Os microveículos etiquetados foram, então, proteoliticamente digeridos, e as etiquetas libertadas foram submetidas a análise de FACS como anteriormente (ver Exemplo 12). O citofluorímetro (Becton Dickinson FACScalibur) foi calibrado com amostras de etiquetas para estabelecer o tamanho das aberturas (Fig. 19 A), e as assinaturas de fluorescência das três etiquetas diferentes foram detectadas ao analisar eventos nos canais de fluorescência (verde ou vermelha) apropriados (Fig. 19 B-D).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Choo, Yen

<120> cultura de células

<130> P015366wo ATM

<140> PCT/GB2003/004287

<141> 2003-10-13

<150> GB0222846.8

<151> 2002-10-03

<160> 48

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L1

<400> 1

tgcaggaatt cgcgctatgc taacgtgaag ccacgtcgcc gccgccgccg acccggccga	60
attcctg	67

<210> 2
<211> 67
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Marcador L2

<400> 2
tgcaggaatt cgcgctatgc tgacgtgaag tcacgtcgcc accgccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 3
<211> 67
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Marcador L3

<400> 3
tgcaggaatt cgcgctatgc tcacgtgaag acacgtcgcc tccgccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 4
<211> 67
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L4

<400> 4

tgcaggaatt cgcgctatgc ttacgtgaag gcacgtcgcc cccgccgccg acccggccga	60
attcctg	67

<210> 5

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L5

<400> 5

tgcaggaatt cgcgctatgc taacgtgaag acacgtcgcc agcgccgccg acccggccga	60
attcctg	67

<210> 6

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L6

<400> 6

tgcaggaatt cgcgctatgc tagcgtgaag atacgtcgcc aacgccgccg acccggccga	60
attcctg	67

<210> 7

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L7

<400> 7

tgcaggaatt cgcgctatgc taccgtgaag aaacgtcgcc atcgccgccg acccggccga	60
attcctg	67

<210> 8

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L8

<400> 8

tgcaggaatt cgcgctatgc tatcgtgaag agacgtcgcc accgccgccg acccggccga	60
attcctg	67

<210> 9

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L9

<400> 9

tcgaggaatt cgcgctatgc taaagtgaag acccgtcgcc acggccgccg acccggccga	60
attcctg	67

<210> 10

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L10

<400> 10

tcgaggaatt cgcgctatgc taaggtgaag actcgtcgcc acagccgccg acccggccga	60
attcctg	67

<210> 11

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L11

<400> 11

tgccaggaatt cgcgctatgc taacgtgaag acacgtcgcc actgccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 12

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L12

<400> 12

tgccaggaatt cgcgctatgc taatgtgaag acgctcgcc accgccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 13

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L13

<400> 13

tgccaggaatt cgcgctatgc taacatgaag acacgtcgcc accgccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 14

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L14

<400> 14

tcgaggaatt cgcgctatgc taacgtgaag acatgtcgcc accaccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 15

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L15

<400> 15

tcgaggaatt cgcgctatgc taacctgaag acaagtcgcc acctccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 16

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L16

<400> 16

tcgaggaatt cgcgctatgc taacttgaag acaggtcgcc acccccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 17

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador 17

<400> 17

tgcaggaatt cgcgctatgc taacgagaag acacctcgcc accggcgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 18

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L18

<400> 18

tgcaggaatt cgcgctatgc taacgggaag acacttcgcc accgacgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 19

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L19

<400> 19

tcgaggaatt cgcgctatgc taacgcgaag acacatcgcc accgtcgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 20

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L20

<400> 20

tcgaggaatt cgcgctatgc taacgtgaag acacgtcgcc accgccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 21

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador 21

<400> 21

tcgaggaatt cgcgctatgc taacgttaaag acacgccgcc accgcggccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 22

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador 22

<400> 22

tg caggaatt cg cgctatgc ta acgtgaag ac acgtcgcc acc gcagccg accc ggccga	60
att cctg	67

<210> 23

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L23

<400> 23

tg caggaatt cg cgctatgc ta acgtcaag ac acgacgcc acc gctgccg accc ggccga	60
att cctg	67

<210> 24

<211> 67

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Marcador L24

<400> 24

tgcaggaatt cgcgctatgc taacgttaag acacggcgcc accgccgccg acccggccga 60
attcctg 67

<210> 25

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 25

tgcaggaatt cgcgctatgc 20

<210> 26

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 26

caggaattcg gccgggtcgg 20

<210> 27

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 27

ccatgaccta tactcaggct tcagg 25

<210> 28

<211> 26

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 28

gaagctccat atccctgggt ggaaag 26

<210> 29

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 29

ccaaagtggg ggacaagatt gcc 23

<210> 30
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial
<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 30
gggataggaa ggacgctcaa agac 24

<210> 31
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 31
cagatgtagt ccgccaaagg atag 24

<210> 32
<211> 26
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 32

atgccactga tggagtatga ggagcc 26

<210> 33

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 33

tcaagactga ctcacagcaa cccc 24

<210> 34

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 34

ctttgtcctg aaccgtggtg gtag 24

<210> 35

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 35

acctgttgac,ggattccaag 20

<210> 36

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 36

tcatgaggaa gcgtaggtcc 20

<210> 37

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 37

tgaagagagc ggagaaggag atc 23

<210> 38
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 38
tctggagtta agaaatcgga gctg 24

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 39
ggagtgtcgc ttagaggtgc 20

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 40

tccagaaagc caagagaagc 20

<210> 41

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 41

ggacaagggga aatgagagg 19

<210> 42

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 42

ataacacctc actccactac c 21

<210> 43
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 43
agtcagagca agtgaatgg 19

<210> 44
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> iniciador de PCR

<400> 44
agaaacaaga tctcagcagg 20

<210> 45
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 45

cgcggtctct ttggaaaggt gttc 24

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 46

ctcgaaccac atccttctct 20

<210> 47

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 47

accacagtcc atgccatcac 20

<210> 48

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador de PCR

<400> 48

tccaccaccc tgttgctgta 20

Lisboa, 20 de Agosto de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar o efeito de uma pluralidade de condições de cultura numa célula, compreendendo os passos de:

a) proporcionar um primeiro conjunto de grupos de unidades celulares cada uma compreendendo uma ou mais células, e expor os referidos grupos às condições de cultura desejadas;

(b) misturar dois ou mais dos referidos grupos para formar, pelo menos, uma segunda mistura;

(c) subdividir a segunda mistura para criar um segundo conjunto de grupos de unidades celulares;

(d) expor os referidos outros grupos às condições de cultura desejadas;

(e) repetir os passos (b) - (d); e

(f) avaliar o efeito numa determinada unidade celular das condições de cultura a que foram expostas,

em que unidades celulares estão marcadas para seguir ou determinar as condições de cultura a que a unidade celular esteve exposta com a condição de que a célula não é uma célula estaminal embrionária humana.

2. Método para expor uma célula a uma variedade de condições de cultura celular, compreendendo os passos de:

a) proporcionar um primeiro conjunto de grupos de unidades celulares, cada uma compreendendo uma ou mais células, e expor os referidos grupos às condições de cultura desejadas;

(b) misturar dois ou mais dos referidos grupos para formar, pelo menos, uma segunda mistura;

(c) subdividir a segunda mistura para criar um segundo conjunto de grupos de unidades celulares;

(d) expor os referidos outros grupos às condições de cultura desejadas; e

(e) repetir os passos (b) - (d),

em que unidades celulares estão marcadas para seguir ou determinar as condições de cultura a que a unidade celular esteve exposta.

3. Método de acordo com reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que a marcação é espacialmente codificada.

4. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1-3, em que a marcação é seleccionada do grupo consistindo num oligonucleótido, péptido, composto fluorescente, amina secundária, halocarboneto, mistura de isótopos estáveis, código de barras, marca óptica, conta, marca codificando uma radiofrequência e um ponto quântico.

5. Método de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que as células são cultivadas em unidades celulares, compreendendo cada unidade celular uma ou mais células.
6. Método de acordo com reivindicação 5, em que as unidades celulares são células únicas.
7. Método de acordo com reivindicação 5, em que cada unidade celular compreende uma ou mais células aderentes ou ligadas através de um substrato sólido.
8. Método de acordo com reivindicação 7, em que o substrato sólido é um microveículo ou conta.
9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o microveículo é composto por celulose, dextrano, agarose, acrilamida, materiais inorgânicos, poliestireno, vidro, colagénio, DEAE sephadex, gelatina ou DEAE dextrano.
10. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o microveículo é um microveículo poroso ou não poroso.
11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o microveículo poroso é um microveículo Cultispher G ou um microveículo Cytopore 2.
12. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o substrato sólido é uma barreira bastante ou medianamente permeável.

13. Método de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que as condições de cultura são os meios a que as células estão expostas.
14. Método de acordo com reivindicação 13, em que os meios contêm um ou mais agentes específicos que influenciam um processo celular.
15. Método de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que as condições de cultura celular compreendem a cultura a uma ou mais temperaturas específicas.
16. Método de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que as condições de cultura celular compreendem a cultura a um ou mais substratos específicos.
17. Método para identificar um gene que influencia um processo celular, compreendendo os passos de:
 - a) determinar o efeito de uma ou mais condições de cultura numa unidade celular, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores;
 - b) analisar a expressão de genes nas referidas unidades celulares quando expostas às referidas condições de cultura; e
 - c) identificar genes que são diferenciadamente expressos sob condições de cultura desejadas.
18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que condições de cultura desejadas influenciam um processo celular.

19. Método de acordo com a reivindicação 17 ou reivindicação 18, compreendendo o passo adicional de produzir,, pelo menos, a região codificante do referido gene através da síntese de ácidos nucleicos ou replicação biológica.
20. Método para identificar um agente que é capaz de induzir um processo celular, compreendendo os passos de:
- a) determinar o efeito de um ou mais agentes numa unidade celular, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16; e
 - b) identificar o(s) agente(s) que induzem o processo celular nas unidades celulares.
21. Método de acordo com a reivindicação 20, compreendendo o passo adicional de
- c) sintetizar ou isolar o(s) agente(s).
22. Método de acordo com qualquer das reivindicações 17-21, em que o processo celular é a proliferação celular ou diferenciação.
23. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1-22, em que a célula é uma célula estaminal ou uma célula que foi derivada de uma célula estaminal *in vitro*.
24. Método de acordo com reivindicação 23, em que as células são cultivadas em unidades celulares, compreendendo cada unidade celular uma ou mais células.

25. Método de acordo com reivindicação 24, em que as unidades celulares são células únicas.
26. Método de acordo com reivindicação 24 ou reivindicação 25, em que cada unidade celular compreende uma ou mais células aderentes ou ligadas através de um substrato sólido.
27. Método de acordo com a reivindicação 26, em que o substrato sólido é um microveículo ou conta.
28. Método de acordo com a reivindicação 27, em que o substrato sólido é uma barreira bastante ou medianamente permeável.
29. Método de acordo com a reivindicação 27, em que as células diferenciadas são isoladas por descolagem enzimática do microveículo.
30. Método de acordo com a reivindicação 27, em que as células diferenciadas são isoladas por digestão do microveículo.

Lisboa, 20 de Agosto de 2008

Figura 1

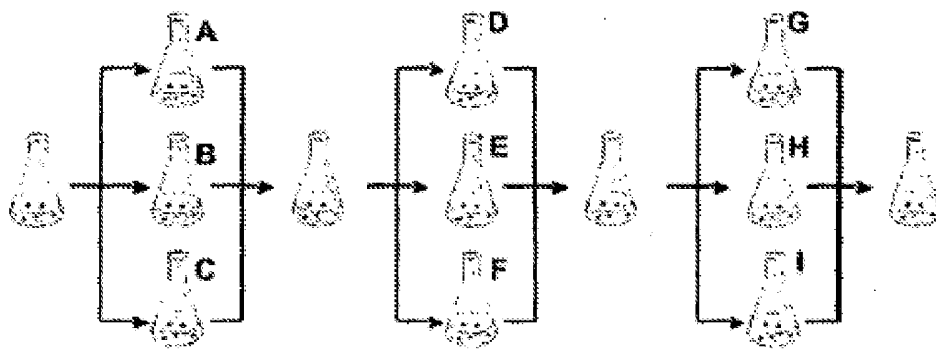


Figura 2

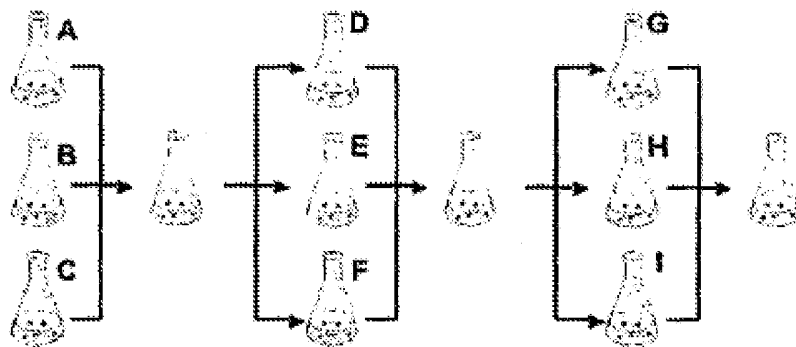


Figura 3

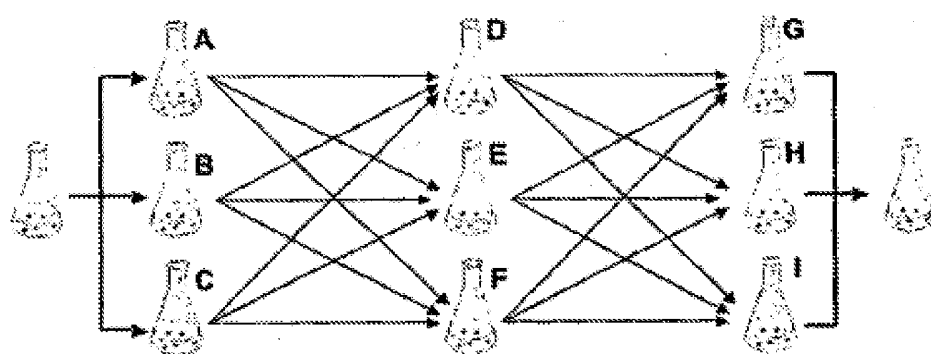


Figura 4

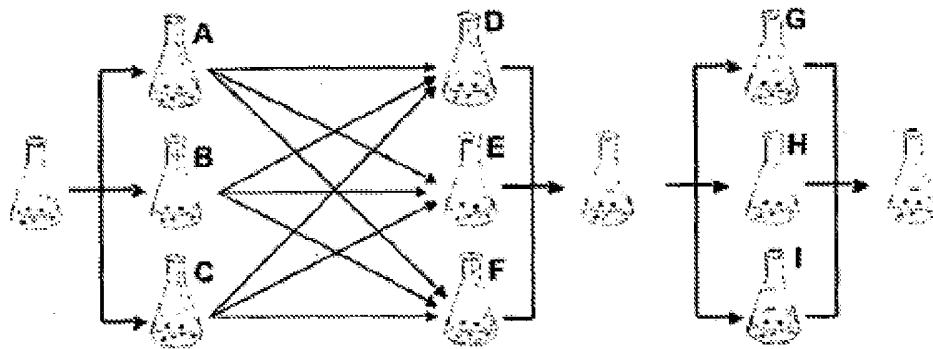


Figura 5

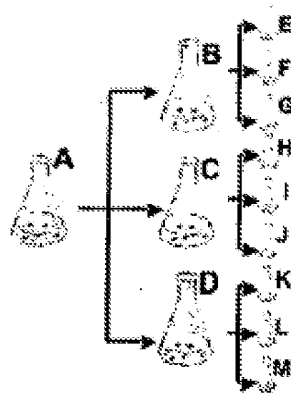


Figura 6

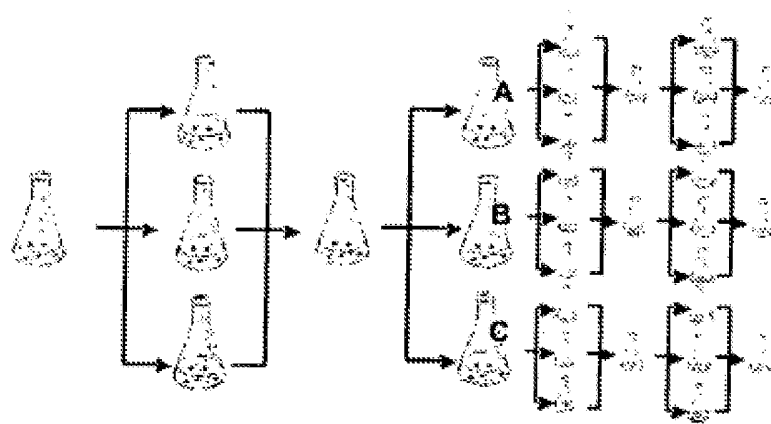


Figura 7

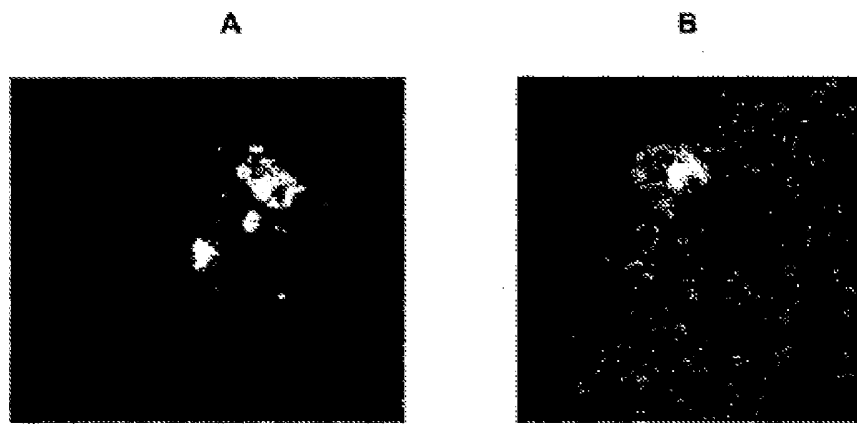


Figura 8

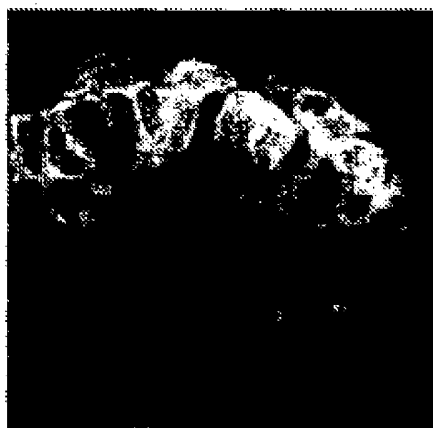
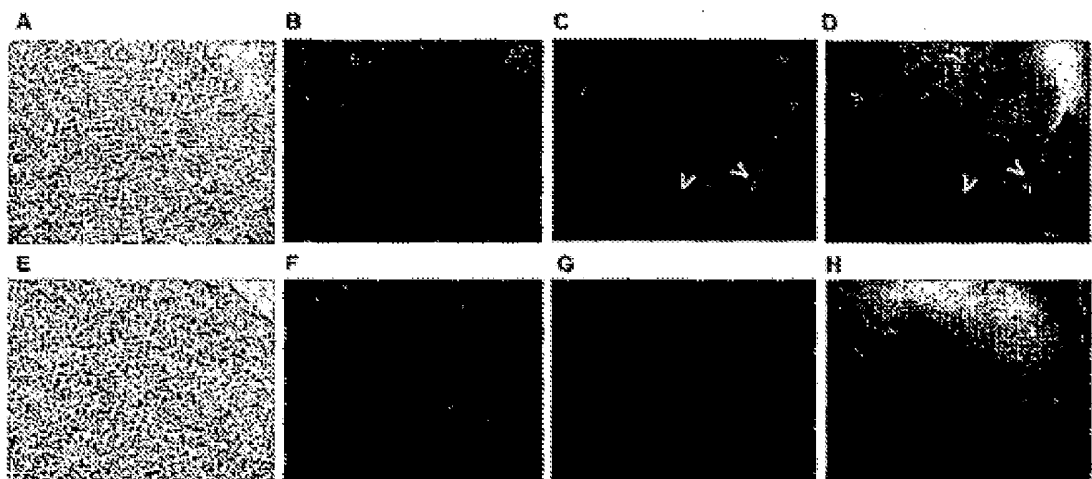


Figura 9

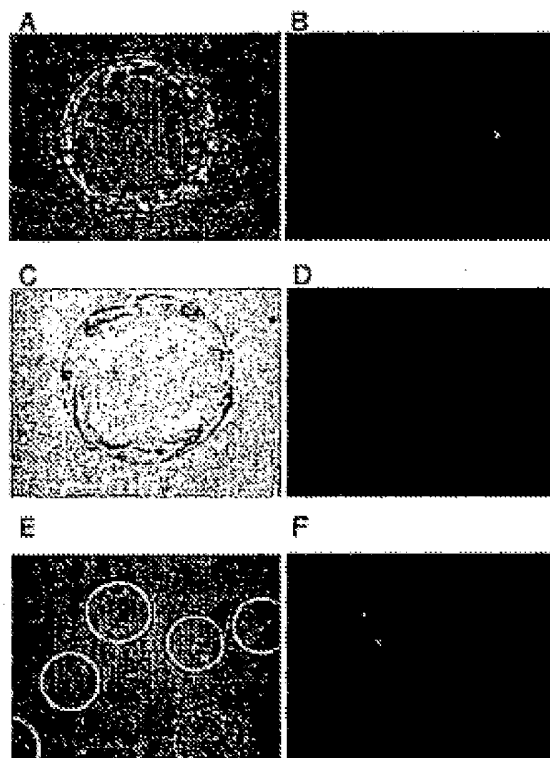


Figura 10

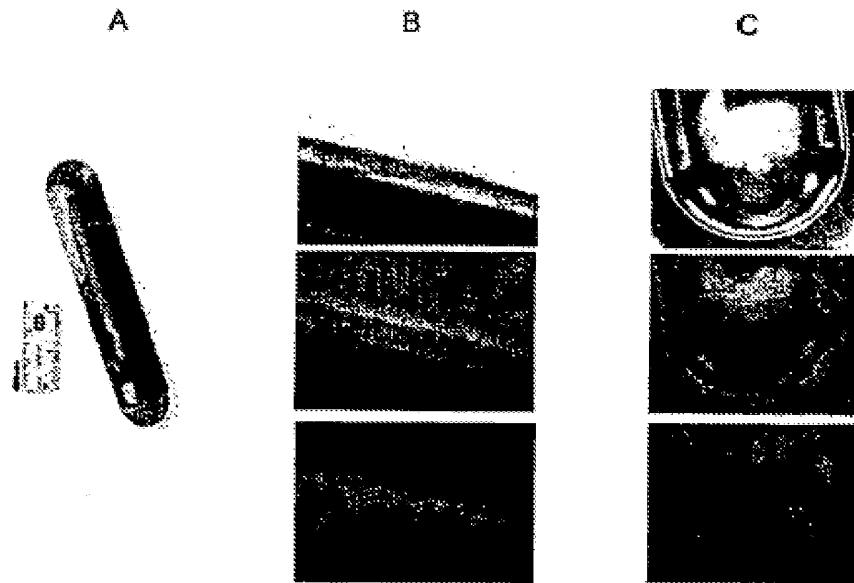


Figura 11

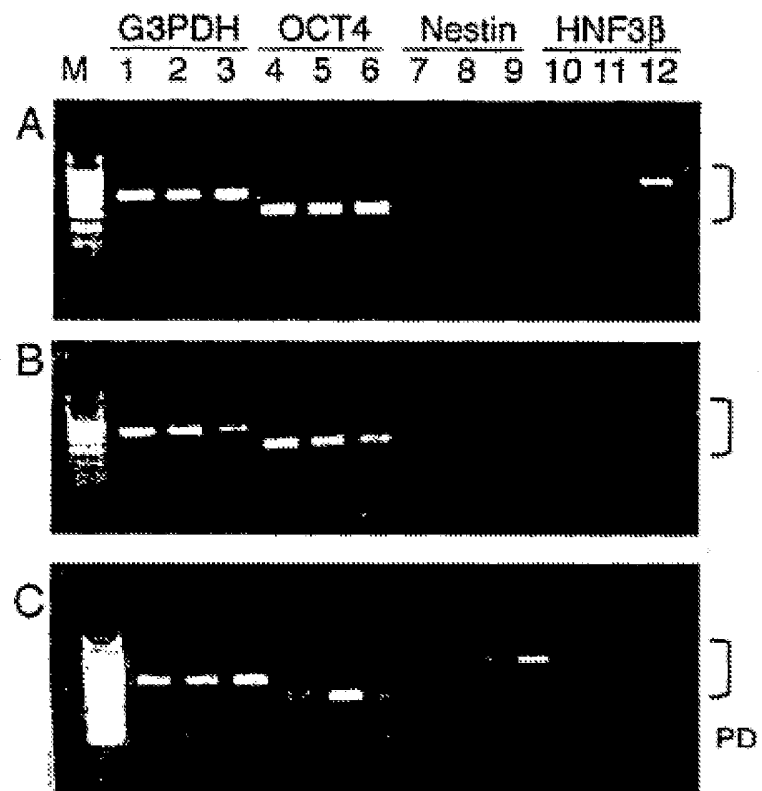
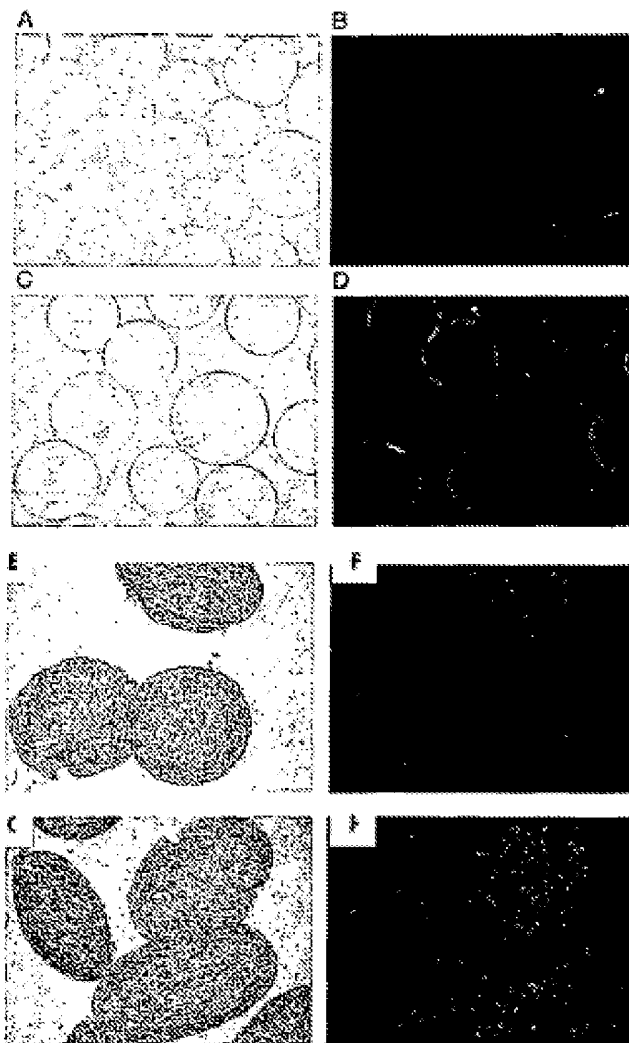
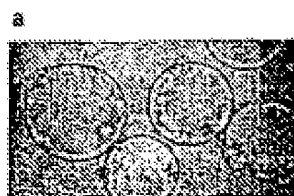


Figura 12



Figura



A

B

C

Figura 13

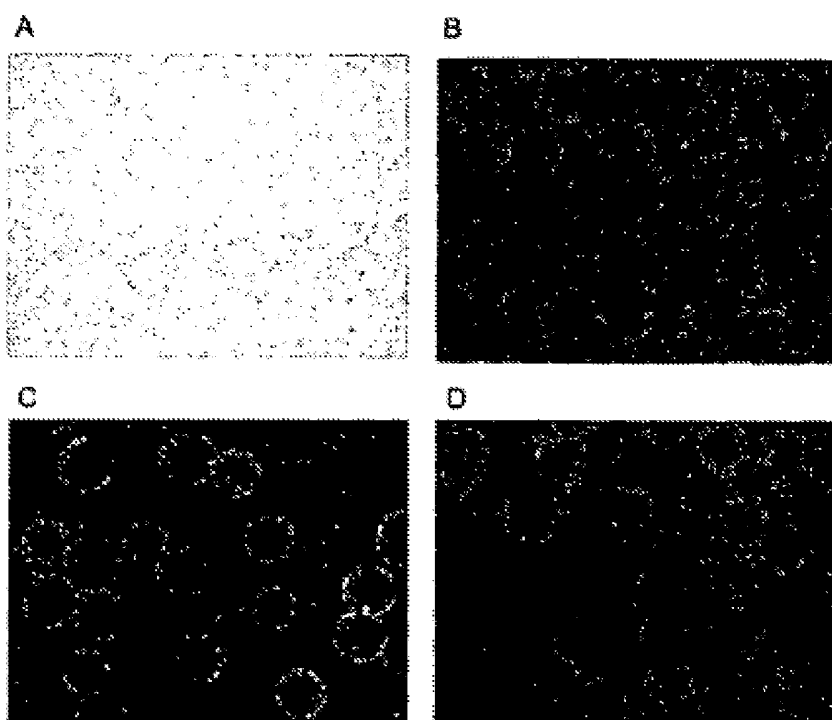


Figura 14

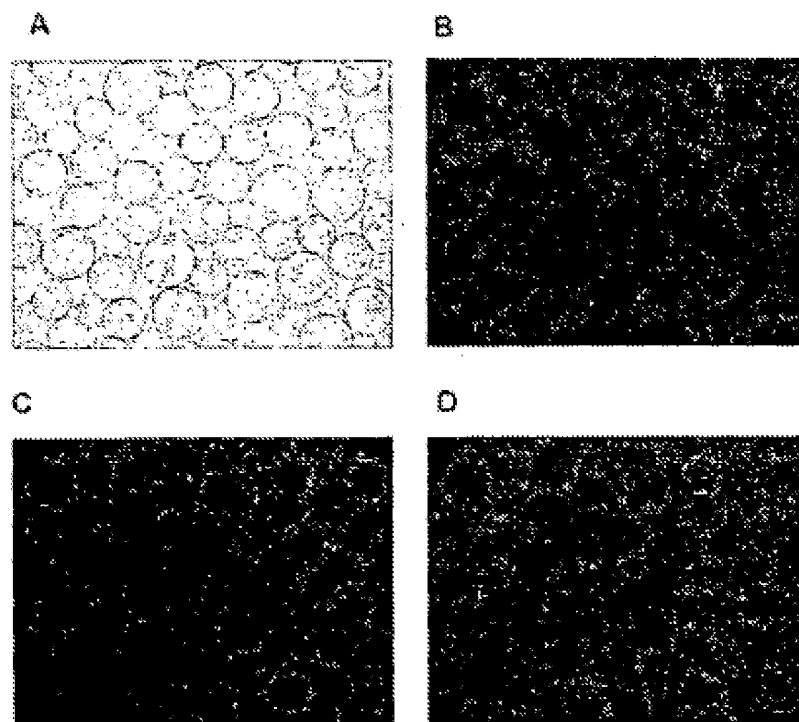
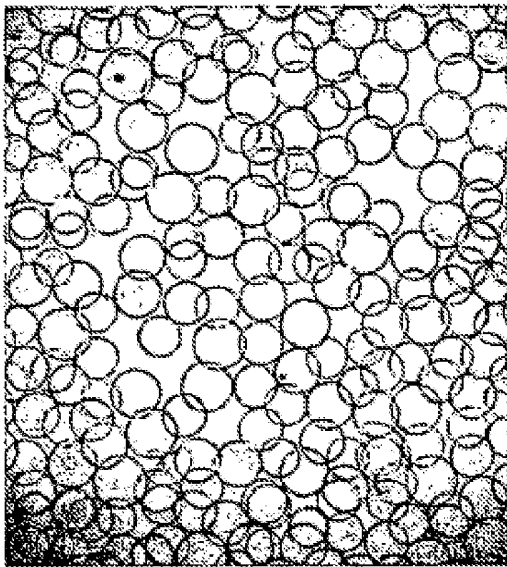


Figura 15

A



B

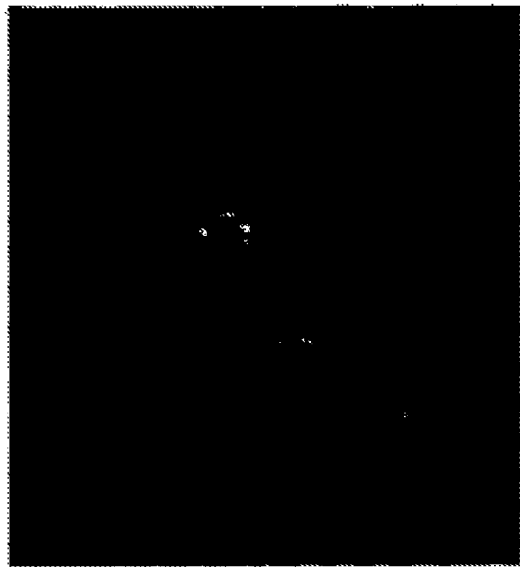


Figura 16

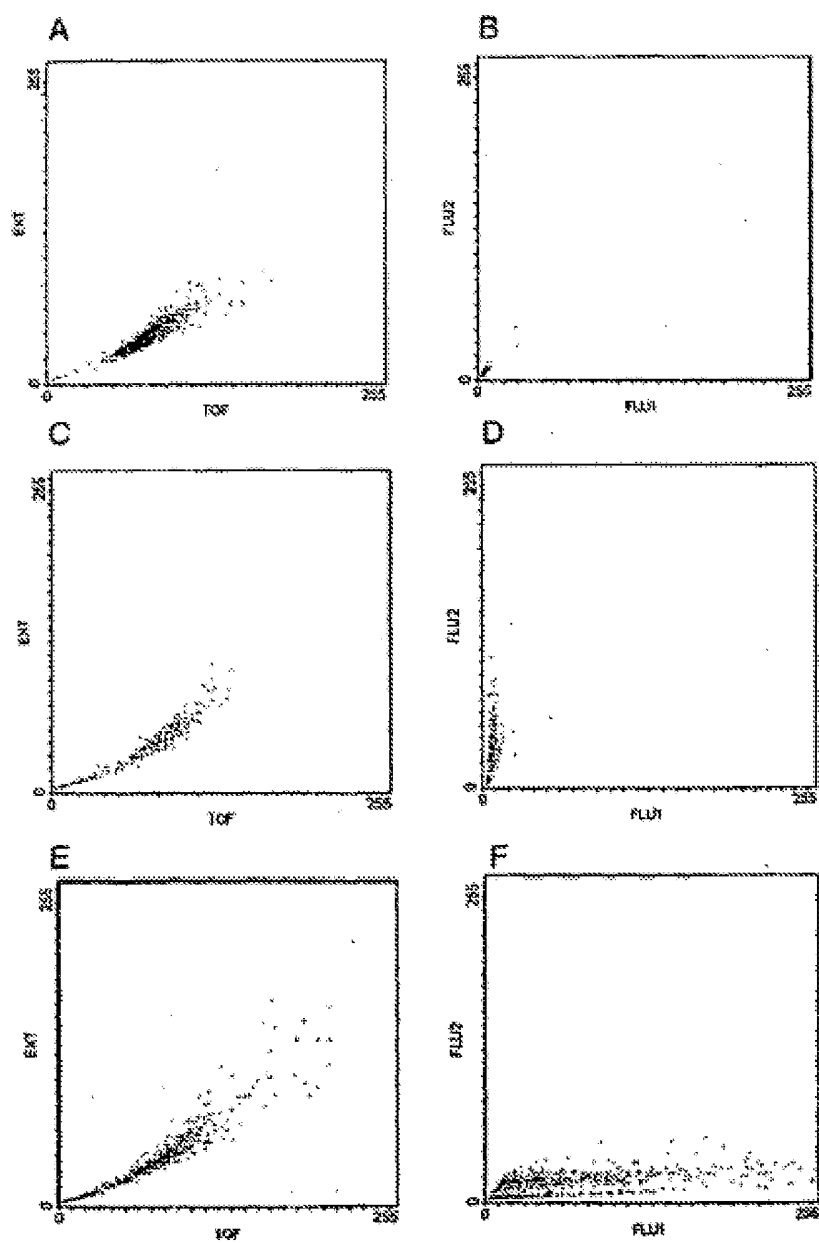


Figura 17

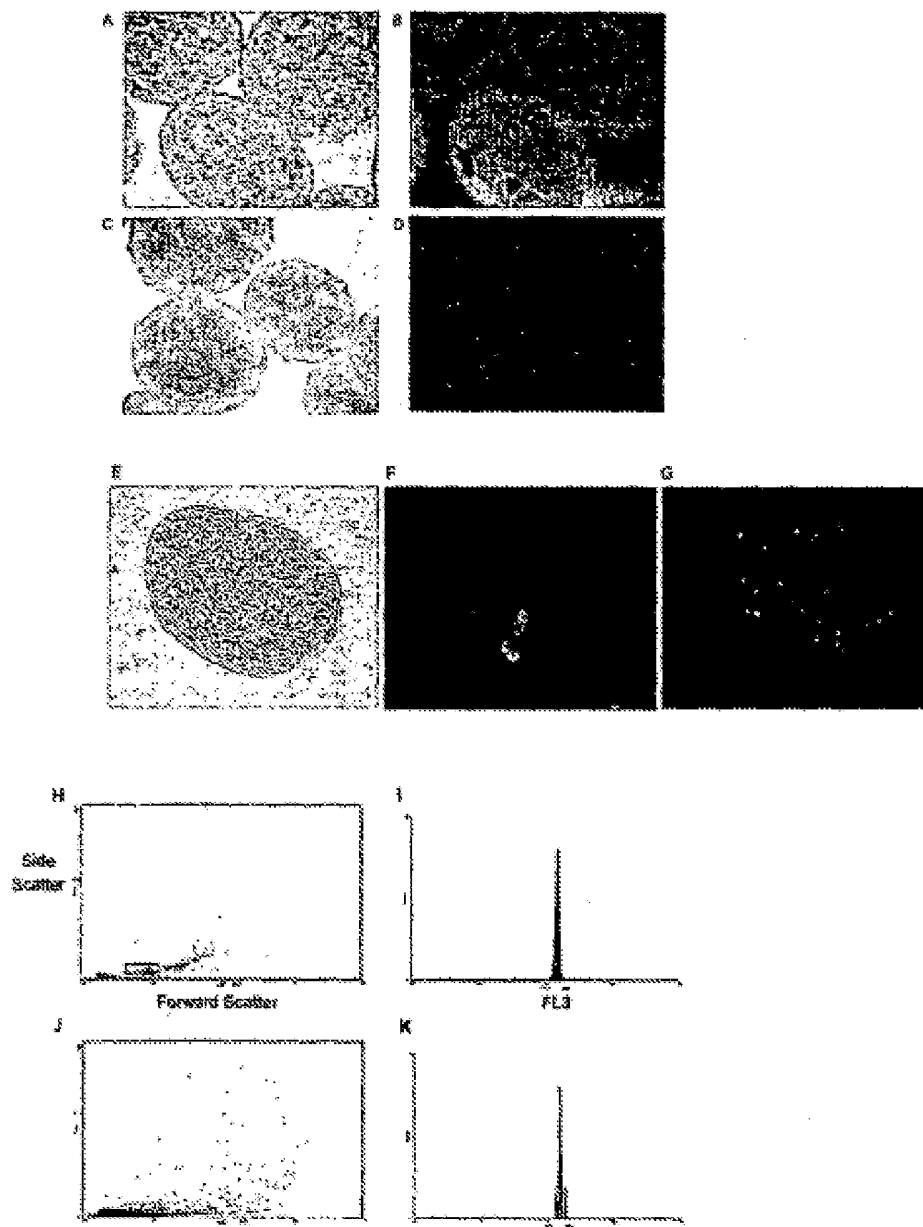
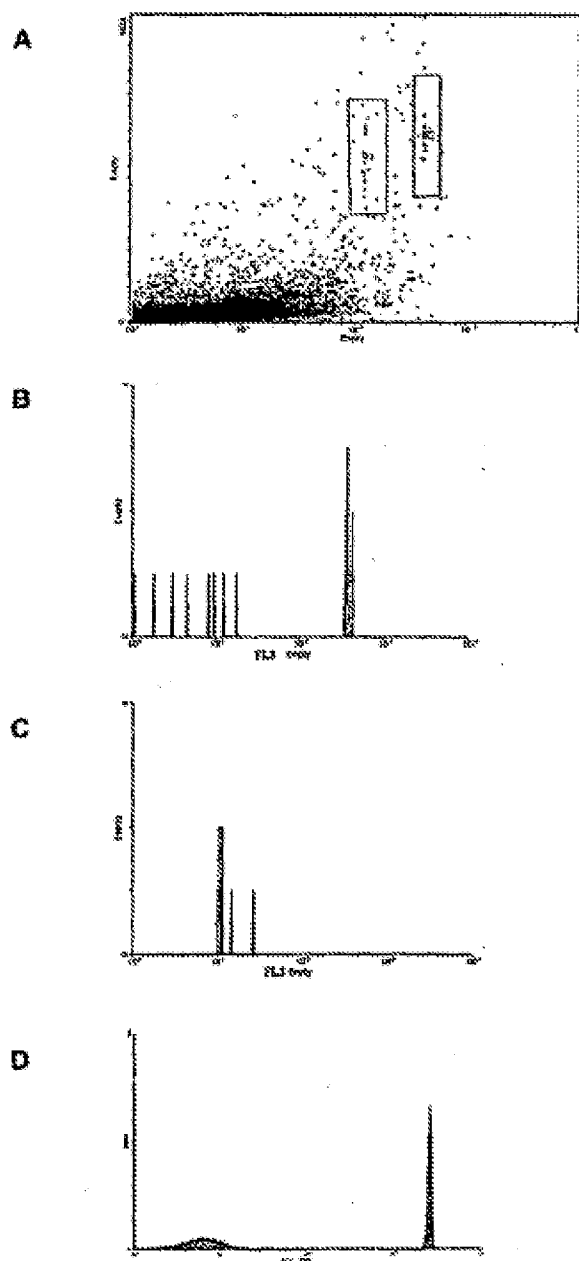


Figura 18



RESUMO

"CULTURA DE CÉLULAS"

Um método para determinar o efeito de uma pluralidade de condições numa célula compreendendo os passos de: a) proporcionar um primeiro conjunto de unidades celulares compreendendo uma ou mais células e expondo os referidos grupos às condições de cultura desejadas; (b) misturar dois ou mais dos referidos grupos para formar, pelo menos, uma segunda mistura; (c) subdividir a segunda mistura para criar outro conjunto de grupos de unidades celulares; (d) expor os outros grupos referidos às condições de cultura desejadas; (e) opcionalmente, repetir os passos (b) - (d) iterativamente, conforme a necessidade; e (f) opcionalmente, avaliar o efeito numa dada unidade celular das condições de cultura às quais foi exposta.