

"Método para a determinação da ve
locidade de crescimento celular"

para que

SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION,
pretende obter privilégio de in-
venção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao método para deter^{minação} da velocidade de crescimento de células crescen^{do} in vivo e in vitro. As células são marcadas com coran^{tes} de cianina e as alterações nos níveis de corante de cianina na membrana plasmática são usadas para determi^{nar} a velocidade de crescimento. As determinações da ve^{locidade} de crescimento celular são utilizadas para moni^{torizar} enxertos de células de medula óssea transplanta^{das} e o crescimento de células epiteliais da córnea após cirurgia. O método descrito é também usado para determi^{nar} a sensibilidade de células tumorais a agentes de te^{rapêutica} do cancro, a sensibilidade de leveduras a agen^{tes} antifúngicos, e a sensibilidade de bactérias a agen^{tes} antibacterianos.

-2-

MEMÓRIA DESCRITIVAAntecedentes do InventoCampo do Invento

Este invento refere-se a novos métodos para medir a velocidade de crescimento celular in vivo e in vitro.

Informação Anterior

Actualmente, há dois métodos usuais para medir o crescimento celular. Um processo consiste em contar o número de células no início de um período de examinação e depois contar o número de células no final desse período para medir o aumento no número de células. A contagem celular pode ser conseguida usando métodos microscópicos com um hemocítmetro ou por métodos auxiliados por instrumentos, usando um Contador Coulter ou outro citómetro de fluxo. Outra metodologia para medir o crescimento celular consiste em determinar o consumo de timidina tritiada usando processos de contagem beta. Nesta metodologia, o número de células é determinado no início da experiência e depois a timidina tritiada é colocada junto das células. A intervalos periódicos, porções da cultura são removidas, contadas, e lavadas para ficarem isentas de timidina tritiada não ligada. Estas porções lavadas são então submetidas a precipitação com Ácido Tricloroacético (TCA) seguido de contagem por cintilação do precipitado sólido radioactivamente marcado para medir a incorporação da timidina tritiada no ADN. Esta metodologia mede sómente a velocidade de síntese do ADN e não mede o crescimento celular per se. Devido à relativa facilidade desta metodologia, é geralmente a metodologia de escolha quando se observa a estimulação celular. Outro processo usado para determinar a actividade da proliferação celular consiste em observar o número de mitoses por centena de células em qualquer tecido sob observação. Esta metodologia não é extremamente precisa por

-3-

que o processo de preparação leva à perda de células. Em geral, estes ensaios funcionam bem in vitro mas são difíceis de aplicar a medições de crescimento celular in vivo.

A velocidade de crescimento dos tecidos pode ser avaliada removendo o tecido e monitorizando os impulsos in vitro da incorporação da timidina tritiada. O tecido é seccionado em secções de 30 micra e é exposto a timidina tritiada durante trinta (30) minutos. A timidina tritiada não incorporada é lavada e uma emulsão nuclear é colocada sobre a secção onde desintegrações de radioisótopo expõem a película. A emulsão é revelada e fixada; o tecido é corado com corante Hematoxilina e Eosina; depois a secção é examinada microscopicamente para determinar a fracção marcada. Esta técnica é trabalhosa e demorada.

Os corantes cianina têm sido usados em diversas aplicações biológicas. Os corantes de dioxacarbocianina têm sido utilizados para efectuar contagens diferenciais de glóbulos brancos. Gunter Valet, Max Planck Ges Wissensch; Número de entrada da Patente 84-102307/17, Determinação Quantitativa Simultânea das Células do Sangue por Coloração Selectiva e Medição do Volume e da Fluorescência. Os corantes utilizados nestes estudos, contudo, são corantes de carbocianina de cadeia curta (com menos de dez carbonos) e respondem a alterações nos potenciais da membrana. Além disso, os corantes de carbocianina de cadeia curta entram para dentro das mitocôndrias das células, são citotóxicos, e, quando as células são lavadas, estes corantes escoam-se facilmente para fora da célula quer o potencial da membrana seja alterado ou não. Outros corantes de cianina alifáticos de cadeia curta são usados em muitos outros ensaios biológicos. As moléculas de cadeia curta, contudo, respondem a potenciais de membrana e atravessam a membrana celular, penetrando dentro da mitocôndria. H. M. Shapiro, Patente U.S.A. Número

-4-

4.343.782, de 10 de Agosto de 1982. Os corantes de cadeia curta são também tóxicos para as células e não podem ser usados para determinar a velocidade do crescimento celular.

Os corantes de tricarbocianina (Fox, R. J. e col., Proc. Mayo Clinic, 32:478-484, 1957) e o corante Azul de Evans (Schad, H., et al., Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol., 370(2):139-144, 1977) têm sido usados in vivo para avaliar o débito cardíaco através de um método de diluição. Dow (Dow, P., Physiol. Rev., 36:77-102, 1956) descreve o processo como injeção de uma quantidade conhecida de um indicador intravascular no lado venoso dos pulmões, e medição no curso de tempo, de concentração arterial do indicador para determinar o volume entre os pontos de injeção e de amostra. Estes corantes não são usados para corar células.

Sumário do Invento

O invento consiste em novos métodos para medir a velocidade de crescimento celular. De acordo com o presente invento, as células viáveis são em primeiro lugar marcadas com corantes cianina. A velocidade de crescimento celular é determinada medindo as alterações nos níveis de corante cianina nas membranas plasmáticas das células filhas derivadas de células mãe marcadas com corante cianina. Os métodos inventados para medir o crescimento são usados, por exemplo, in vivo para monitorizar a cura do epitélio corneano, e o enxerto de células de medula óssea transplantadas. As aplicações in vitro dos processos inventados incluem a determinação da sensibilidade de células tumorais e diversos agentes quimioterapêuticos.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 é um gráfico mostrando as diminuições de intensidade da fluorescência celular como uma função

-5-

do tempo.

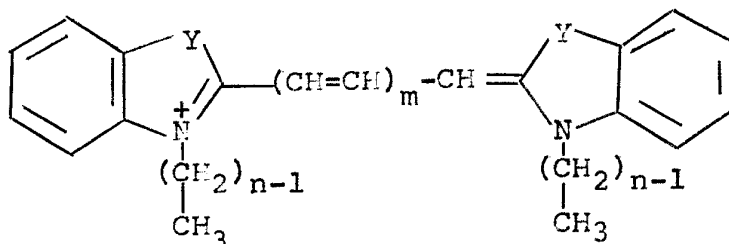
A Figura 2 é um gráfico mostrando as curvas de células coradas e não coradas.

A Figura 3 é um gráfico mostrando a falta de transferência de corante de células coradas para não-coradas.

A Figura 4 é um gráfico comparando a cinética das células e da fluorescência.

Descrição Detalhada do Invento

No método do invento para a determinação da velocidade do crescimento celular, as células são marcadas com corantes cianina. Os compostos possuindo a seguinte estrutura são referidos aqui como corantes cianina:



na qual:

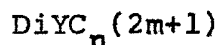
Y é oxigênio, enxofre, metileno ou metileno substituído por alquilo;

m é 0-3; e

n é 12-22.

Como aqui usado, metileno substituído por alquilo refere-se a metileno mono ou di-substituído possuindo qualquer combinação de substituintes metilo, etilo, ou propilo.

Os compostos de estrutura acima são referidos pela fórmula empírica geralmente aceita:



Sims, P. J., et al., Biochem, 13:3315 (1974). Assim, por

-6-

exemplo, o composto no qual Y é enxofre e possuindo três átomos de carbono fazendo ponte entre os anéis e duas cadeias alifáticas de catorze átomos de carbono é referida por DiSC₁₄(3). De forma semelhante, DiIC₁₄(5) indica o composto no qual Y é isopropilo, e possuindo cinco átomos de carbono fazendo ponte entre os anéis e duas cadeias alifáticas de catorze átomos de carbono.

Incluídos nos compostos aqui referidos como corantes cianina estão os compostos da estrutura acima possuindo uma ou mais substituições desde que tais compostos substituídos sejam solúveis num meio marcador de células durante o tempo necessário para que a marcação seja feita e tenham um coeficiente de divisão de membrana suficientemente elevado para se manterem associados a membranas celulares marcadas. Tais compostos, não podem, além disso, afectar significativamente a viabilidade celular nas concentrações necessárias para a marcação. A solubilidade no meio de marcação das células é determinado, como se mostra abaixo, dispersando um corante cianina no meio de marcação e, através de técnicas espectrofluorométricas padrão, medindo a intensidade da fluorescência ao longo do tempo. A diminuição da intensidade da fluorescência indica precipitação do corante e aderência às paredes dos vasos. Para determinar se os corantes se mantêm associados às membranas celulares usam-se, por exemplo, processos citométricos de fluxo conhecidos para monitorizar a intensidade de fluorescência dos glóbulos vermelhos reinjectados no animal dador após a marcação. Intensidades de fluorescência essencialmente constantes das células marcadas após reinjecção determina a estabilidade do corante nas membranas celulares.

Os corantes cianina usados no presente invento podem ser adquiridos de diversas fontes tais como Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, e podem ser preparados a partir de materiais de partida disponíveis usando métodos sintéticos conhecidos. Hamer, F. M., Os Corantes Cia-

-7-

nina e Compostos Relacionados, Editores Interscience (1964).

Usando os métodos descritos, qualquer célula viável pode ser marcada com corantes cianina. Como aqui usado, o termo célula inclui células nucleadas tais como glóbulos brancos, diversas células tumorais, outras células de mamíferos (por exemplo, células de cultura de tecidos), leveduras e bactérias. Uma célula é viável se for capaz de crescer ou funcionar essencialmente da forma prevista para células do seu tipo.

A marcação celular é efectuada num meio que é não-letal para as células e que proporciona reprodutibilidade da marcação celular. Para dar ao meio as características necessárias usam-se agentes reguladores da osmolaridade nos quais os corantes cianina formam soluções estáveis durante o tempo necessário para a marcação. Agentes reguladores da osmolaridade aceitáveis incluem agentes tais como açúcares, por exemplo monossacáridos tais como glucose, frutose, sorbose, xilose, ribose, e dissacáridos tais como sacarose, álcoois de açúcar, tais como manitol, glicerol, inositol, xilitol, e adonitol, aminoácidos tais como glicina e arginina, e certos tampões de Good tais como ácido-N-tris(hidroximetil)-metil-3-aminopropanossulfónico, e aqueles indicados no Quadro II abaixo. Good, N. E., e col., Biochem. 15, 467-477 (1966), Good, N. E. e S. Izawa, Methods Enzymol., 24 Parte B, 53 (1968), Feguson, W. J., e col., Anal. Biochem. 104: 301-310 (1980). Algumas linhas celulares, contudo, podem ser sensíveis a um ou mais dos agentes reguladores da osmolaridade, especialmente álcoois de açúcar. Assim, antes da marcação, são efectuados testes padrão para assegurar que as células são viáveis no agente regulador da osmolaridade pretendido. Adicionalmente, podem-se adicionar pequenas quantidades de agentes tamponantes ao meio de marcação para regular a concentração do ião hidrogénio.

-8-

O efeito sobre a viabilidade celular de exposição a uma variedade de agentes reguladores da osmolaridade foi determinada medindo o tempo de duplicação de células Yac após as células serem expostas durante trinta minutos a uma variedade de agentes reguladores de osmolaridade. As células Yac são uma linha celular de cultura de tecido de linfoma de rato publicamente disponível através do American Type Culture Collection e está descrita por Kiessling, R., European J. Immunology 5:112-117 (1975). Como os dados indicados no quadro 1 demonstram, em comparação com fosfato tamponado salino, que a exposição a sacarose, glucose e aos tampões de Good: TAPS, CAPS, EPPS, HEPPSO, e DIPSO, resultaram em efeitos insignificantes sobre o tempo de duplicação das células o que indica a ausência de toxicidade celular relacionada com a exposição.

Quadro 1

<u>Agente Regulador da Osmolaridade</u>	<u>Tempo de Duplicação (Horas)</u>
Fosfato Tamponado Salino	31,0
Sacarose	41,0
Glucose	34,5
TAPS	32,7
CAPS	45,8
EPPS	32,2
HEPPSO	23,4
DIPSO	36,7
Acido 3-amino-1-propanossulfônico	99,6

Quadro 1 (Continuação)

<u>Agente Regulador da Osmolaridade</u>	<u>Tempo de Duplicação (Horas)</u>
Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico de sódio	A
2-Amino-2-metil-1,3-propanodiol	B
2-Amino-2-metil-1-propanol	B
Ácido N-tris(hidroximetil)metilaminoetanossulfônico (TES)	B
Ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanossulfônico (BES)	A
Ácido 3-(ciclo-hexilamino)-2-hidroxil-1-propanossulfônico (CAPSO)	A
Trietanolamina	B
Tris(hidroximetil)aminometanol (TRIZMA)	B
Bis-Tris-propano	B
Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico (MES)	B
Ácido 3-[dimetil(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxiopropanossulfônico (AMPSO)	A
N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (BICINE)	57,7

A - Nenhum crescimento ou parcialmente citotóxico.

B - Altamente citotóxico

-10-

Quadro 1 (Continuação)

<u>Agente Regulador da Osmolaridade</u>	<u>Tempo de Duplicação (Horas)</u>
3-/[3-Colamidopropil)dimetilamino]-1-propanossulfonato (CHAPS)	B
Ácido 3-[N-tris(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxi-propanossulfônico (TAPSO)	63,6
Ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxi-propanossulfônico (MOPSO)	178,4
Ácido 2-[(2-Amino-2-oxoetil)amino]etanossulfônico (ACES)	1038,4
Bis(2-hidroxietil)imino-tris-(hidroximetil)metano (BIS-TRIS)	A
Ácido 2-(N-ciclo-hexilamino)etanossulfônico (CHES)	51,5
N-tris-(hidroximetil)metilglicina (TRICINE)	A
Glucosamina	288,4
Imidazol	B
Glicilglicina	66,9

A - Nenhum crescimento ou parcialmente citotóxico.

B - Altamente citotóxico.



-11-

O Quadro II mostra diversos agentes reguladores da osmolaridade que foram examinados em relação à solubilidade do corante cianina. Todas as medições da concentração foram efectuadas após remoção dos precipitados por centrifugação e dissolvendo pequenas porções de agentes reguladores da osmolaridade contendo corantes cianina em etanol para análise espectrofluorométrica. Os corantes usados foram $\text{DiSC}_{14}(5)$ e $\text{DiOC}_{14}(3)$, e os agentes reguladores da osmolaridade estavam a concentrações iso-ósmóticas em relação às células de mamífero. As reduções na intensidade da fluorescência a partir de solução de etanol padrão estão directamente relacionadas com as reduções na solubilidade do corante cianina.

-12-

Quadro II

<u>Agente Regulador da Osmolaridade</u>	<u>Intensidade de Fluores- cência Relativa (CONC)</u>	
	<u>DiSC₁₄(5)</u>	<u>DiOC₁₄(3)</u>
Etanol	100	100
Glucose	31	100
Frutose	35	100
Sorbose	40	100
Sacarose	41	100
Xilose	36	19-52
Ribose	24	100
Lixose	0,12	1,8
Glicina	31	93
Arginina	17	17,2
Glicerol	39	99,5
Inositol	42	92
Xilitol	34	76,4
Manitol	29	*
Adonitol	34	ND
Ácido Tris(hidroximetil)-meti- laminopropanossulfônico (TAPS)	18	ND
Ácido 3-(ciclo-hexilamino)-1- -propanossulfônico (CAPS)	40	ND
Ácido N-(2-hidroxietil)pipera- zina-N'-3-propanossulfônico (EPPS)	18	ND

* Precipitado em etanol, nenhum dado obtido

** Artefacto devido a grandes cristais que não formaram
pelota.

*** Precipitado em etanol (dado duvidoso)

ND não determinado

-13-

Quadro II (Continuação)

<u>Agente Regulador da Osmolaridade</u>	<u>Intensidade de Fluores- cência Relativa (CONC)</u>	
	<u>DiSC₁₄(5)</u>	<u>DiOC₁₄(3)</u>
Ácido N-2-hidroxietilpiperazi- na-N'-2-hidroxiopropanossulfó- nico (HEPPSO)	20	ND
Ácido 3- $\sqrt{N}$,N-bis(2-hidroxietil) amino $\sqrt{-}$ 2-hidroxiopropanossulfó- nico (DIPSO)	43***	ND
NaCl	6	1,7
Fosfato Tamponado Salino	2,1	6,5
Na ₂ SO ₄	7,4	1,6
NaI	1,1	0,14
Cloreto de Colina	11**	6,3
Iodeto de Colina	0,16	2,3

* Precipitado em etanol, nenhum dado obtido.

** Artefacto devido a grandes cristais que não formaram
pelota.

*** Precipitado em etanol (dado duvidoso).

ND não determinado.

Como se pode ver a partir do Quadro II, os coran-
tes cianina são muito menos solúveis na presença de sais
clássicos que na presença de açúcares, excepto lixose,
álcoois do açúcar, aminoácidos, e os tampões de Good,

-14-

TAPS, HEPPSO, DiPSO, CAPS, e EPPS. Adicionalmente, determinou-se a estabilidade de solução DiSC₁₄(5) em açúcares tais como glicose, frutose, ribose, sorbose, sacarose, e xilose, álcoois de açúcar tais como glicerol, inositol, xilitol, e adonitol, e aminoácidos tais como glicina, e arginina. O corante cianina era estável nas soluções testadas durante pelo menos vinte minutos, o que é tempo suficiente para a marcação ser reprodutível, e em muitos dos agentes a quantidade de corante cianina na solução não tinha diminuído significativamente aos sessenta minutos.

Além disso, avaliou-se a solubilidade dos corantes cianina num meio contendo sais clássicos e reguladores da osmolaridade nos quais os corantes eram solúveis. A solubilidade de DiSC₁₄(5) em solução iso-osmótica de glucose não foi significativamente afectada pela diluição com água destilada. A solubilidade de DiSC₁₄(5) em solução iso-osmótica de glucose foi, contudo, reduzida significativamente pela diluição com apenas cerca de 20% de solução de cloreto de sódio também iso-osmótica. Assim, a marcação celular reprodutível com corantes cianina pode ser afectada em meios contendo não mais que pequenas quantidades de sais clássicos, tais como cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, acetato de sódio, acetato de potássio, sulfato de sódio, iodeto de sódio, cloreto de colina, ou iodeto de colina, e é efectuada, de preferência num meio no qual não sejam usados quaisquer sais clássicos para regular a osmolaridade.

Células marcadas com corante cianina usando o método aqui descrito foram analisadas para determinar o efeito da marcação sobre a viabilidade celular. As células V79, que estão disponíveis a partir do American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, e que estão descritas no Prescott, D. M., Ann. New York Acad. Sci., 397: 101-109 (1982), foram marcadas com uma solução contendo DiOC₁₄(3) a uma concentração de 10^{-5} ou 4×10^{-5} M, e as cinéticas de crescimento das células marcadas foram compa-

-15-

radas com células não coradas e com uma mistura igual de células coradas e não coradas. O tempo de duplicação celular não foi afectado pela marcação com corante cianina. Assim, a marcação não teve qualquer efeito sobre o crescimento celular. Além disso, diversos outros testes padrão sobre a viabilidade celular tais como exclusão com Azul Tripán e exclusão com Iodeto de Propidium confirmaram a ausência de efeito sobre a viabilidade celular da marcação com corante cianina de acordo com os processos descritos.

Para testar in vivo a estabilidade de células marcadas com corante cianina de acordo com o presente invento, foram retirados glóbulos vermelhos de coelho, marcados com DiSC₁₄(5), e reinjectados. Depois, retiraram-se periodicamente amostras de sangue e foram analisadas em relação à percentagem de células marcadas e em relação à intensidade da fluorescência das células marcadas. O número de glóbulos vermelhos circulantes diminuiu linearmente em função do tempo e os 52 dias de tempo de vida medidos para as células marcadas estavam estreitamente relacionados com a média de 40 a 60 dias de vida registados para os glóbulos vermelhos de coelho. Assim, a marcação com corante cianina não afectou a velocidade de depuração dos glóbulos vermelhos.

Em todos excepto num dos cinco coelhos testados, a intensidade da fluorescência das células coradas manteve-se essencialmente inalterada 60 dias após a marcação e reinjecção. No quinto animal, não mais de 20% do corante cianina tinha migrado das células marcadas após 60 dias na circulação do coelho. Estes dados combinados com dados de cultura de tecido não apresentando qualquer transferência de corante de células coradas para não coradas demonstra que as células estão estavelmente marcadas com os corantes.

Células viáveis marcadas com corante cianina são usadas no método do invento para determinar a velocidade

-16-

do crescimento celular. A velocidade de crescimento é de terminada medindo alterações nos níveis de corante ciani na nas membranas plasmáticas das células. Cada vez que a célula se divide, o corante cianina associado à membrana plasmática é distribuído igualmente entre as células fi-lhas. Assim, medições seriadas dos níveis de corante cia-nina nas membranas plasmáticas de células em crescimento marcadas são usadas para calcular a velocidade de cresci-mento.

São preferidos os métodos citométricos de fluxo usando técnicas padrão para medir os níveis de corante cianina da membrana plasmática de células não aderentes ou de células que podem ser removidas a partir do seu su-brato de crescimento e suspensas como células isoladas. É preferido um citômetro de célula aderente (Meridian ACAS 470) para casos em que a remoção a partir do substra-to de crescimento é difícil ou impossível.

As determinações da velocidade do crescimento celu-lar são usadas numa variedade de aplicações. Por exemplo, a velocidade de crescimento de células de cultura de teci-do é medida para otimizar as condições de crescimento. A sensibilidade das células tumorais em relação a agentes quimioterapêuticos é determinada medindo a velocidade do crescimento celular em meio contendo estes agentes. De forma semelhante, a sensibilidade de células de levedura a diversos agentes antifúngicos é determinada medindo a velocidade de crescimento das células de levedura em meio contendo agentes antifúngicos.

A metodologia aqui descrita é também usada para mo-nitorizar a velocidade de crescimento de células de teci-do in vivo. Por exemplo, o enxerto de transplante de medu-la óssea é determinado medindo a velocidade de crescimen-to das células de medula óssea após o transplante. A velo-cidade de crescimento de outras células in vivo, tais co-mo células do epitélio da córnea, é medido para determi-nar a cura pós-traumática ou pós-cirúrgica.

-17-

Os exemplos seguintes ilustram o presente invento e não limitam o alcance do invento acima definido e abaixo reivindicado.

EXEMPLO 1

Método para Corar Células de Cultura de Tecido

I. Preparação das Células

As células de cultura de tecidos em fase logarítmica são usadas para obter os melhores resultados. As culturas em suspensão são removidas do recipiente de cultura e colocadas em tubos de centrifugação de polipropileno.

Quando se usam culturas em monocamadas, os sobrenadantes têm de ser removidos e as células aderentes são lavadas com solução de fosfato tamponado salino isenta de cálcio e de magnésio para remover as proteínas séricas do frasco. Uma solução de Tripsina-EDTA (Gibco Laboratories, Grand Island, Nova Iorque, #610-5300) é adicionada para cobrir o fundo do frasco e é deixada incubar à temperatura ambiente até que a monocamada de células seja desalojada e desagregada. A suspensão de células resultante é transferida para um tubo de centrifugação de polipropileno e um volume igual de meio de cultura contendo Soro Fetal Bovino a 10% (FBS) (Hazelton) é adicionado para parar a acção enzimática da tripsina.

As células são centrifugadas a 400xg durante dez minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes são aspirados e um volume igual de manitol iso-osmótico é substituído para re-suspensão da pelota celular. Esta lavagem com manitol é para remover as proteínas plasmáticas da suspensão celular e para preparar as células para coloração. As células são uma vez mais centrifugadas a 400xg durante dez minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes são aspirados e a pelota celular resultante é re-sus-

-18-

pensa numa solução de manitol a uma concentração de 2×10^6 células/ml para coloração. Algumas linhas celulares, contudo, são sensíveis ao uso de um álcool do açúcar (manitol); em tais casos pode-se usar uma solução de glucose iso-osmótica (PM 180,16, 54,05 g/l).

II. Preparação de Soluções Concentradas de Corante

Soluções concentradas a $2 \times 10^{-3} M$ são preparadas da seguinte forma em etanol absoluto:

DiO-C ₁₄ (3)	PM 800 (1,600 mg/ml)
DiS-C ₁₄ (5)	PM 814 (1,628 mg/ml)
DiO-C ₁₈ (3)	PM 936 (1,872 mg/ml)
DiI-C ₁₄ (5)	PM 850 (1,700 mg/ml)

Todos os corantes são obtidos de Molecular Probes, Eugene, Oregon.

Os corantes concentrados são sonicados para assegurar a solubilidade completa do corante e para minimizar a aderência aos tubos. Os tubos de polistireno são usados para a preparação de soluções concentradas de forma que a solubilidade do corante possa ser observada. Os tubos de polipropileno são usados, contudo, para corar as células porque os corantes cianina num meio aquoso são muito menos aderentes ao polipropileno em comparação com polistireno.

III. Coloração das Células

As células são ajustadas para uma concentração de 2×10^6 células/ml em manitol iso-osmótico. Para corar as células, adiciona-se uma solução concentrada de corante $2 \times 10^{-3} M$ às soluções corantes a $5 \mu l$ de corante por 1 ml de suspensão de células dando uma concentração final de $10 \mu M$. A amostra para corar foi pipetada ou colocada em turbilhão para misturar bem a amostra. As células são in-

-19-

cubadas com o corante durante dez minutos, após os quais uma pequena porção é removida para ser examinada sob um microscópio de fluorescência para assegurar que ocorreu uma coloração intensa e uniforme. As séries de corante DiO usam filtros de microscópio selectivos para luz de excitação de 488 nm, enquanto as séries de corante DiS e DiI requerem uma excitação perto de 575 nm para observação de fluorescência.

Após o período de incubação, um volume igual de PBS é adicionado à suspensão de células e corante. As células são centrifugadas a 400 xg durante dez minutos a 20°C. O sobrenadante é aspirado e a pelota é re-suspensa em PBS. O processo de centrifugação é repetido e o sobrenadante resultante é observado para detectar a presença de corante. Se o corante é evidente no sobrenadante, a lavagem é repetida até os sobrenadantes estarem destituídos de corante livre, como medido por espectrofluorometria. Após a lavagem final, o sobrenadante é removido e a pelota é re-suspensa para a concentração desejada num meio de cultura adequado. Todos os processos são efectuados em condições estéreis.

EXEMPLO 2

Medição da Velocidade de Crescimento de Células de Cultura de Tecido

Células V79 foram coradas com DiOC₁₄(3) como descrito no Exemplo 1. A intensidade da fluorescência foi medida usando um Citómetro de Fluxo EPICS 753 (Coulter Electronics, Inc.). Imediatamente após a coloração, foi medida a intensidade de fluorescência de uma porção das células coradas. As células restantes foram cultivadas numa incubadora com ar humidificado-CO₂ (7,5% de CO₂) a 37°C num meio de crescimento completo padrão. Nos dias um, dois e três após serem coradas, porções das células foram removidas para determinações da intensidade de fluorescência.

-20-

cia.

A Figura 1 mostra o perfil do logaritmo da intensidade de fluorescência das células V79 em crescimento. O valor numérico acima de cada pico corresponde à média do logaritmo da intensidade de fluorescência em cada dia. Como mostra a Figura 1, a média do logaritmo da intensidade de fluorescência diminui diariamente à medida que as células crescem na cultura.

A partir das medições da fluorescência, a velocidade de crescimento é determinada a partir da inclinação do ajustamento da linha de regressão em relação à porção linear de um registo gráfico do logaritmo da intensidade de fluorescência versus tempo.

Para assegurar que corar as células não afectou a velocidade de crescimento foram comparadas as velocidades de crescimento de células V79 coradas e não coradas. Os resultados apresentados na Figura 2 demonstram que as células não coradas cresceram a uma velocidade equivalente às células coradas com 10^{-5} M de corante ou com 4×10^{-5} M de corante, ou uma mistura igual de células coradas e não coradas.

Como a transferência de corante de células coradas para não coradas resultaria em determinações erróneas da velocidade de crescimento, as células coradas e não coradas foram cultivadas juntas no meio de cultura. Uma linha de células/^{do}carcinoma do cólon humano, HT29, que está disponível do American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, e está descrita no J. Fogh e G. Tremp, Human Tumor Cells In Vitro, pp. 115-159, Plenum Press, Nova Iorque (1975), coradas com DiOC₁₄(3), e células de leucemia promielocítica humana não marcadas, HL60, disponíveis do American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, e descritas no Collins, S. J., et col., Nature, 270:347-349 (1977), foram cultivadas juntas numa proporção de 1:1 de células coradas para não coradas. Estes dados estão apre-

-21-

sentados na Figura 3.

Na Figura 3, a intensidade de fluorescência das células HT29 coradas cultivadas isoladamente (losangos) demonstrou a redução característica na intensidade de fluorescência como uma função do tempo de cultura. As células HL60 não-marcadas tinham muito pouca fluorescência durante quatro (4) dias, após os quais apareceu um modesto aumento na intensidade de fluorescência. Além disso, as células HT29 coradas que estavam em co-cultura com as células HL60 (quadrados) perderam intensidade de fluorescência exactamente como as células HT29 não misturadas até aproximadamente ao dia cinco, altura em que apareceu alguma, mas mínima, perda adicional da intensidade de fluorescência. A partir destes dados torna-se claro que talvez as células HL60 estejam a captar alguma fluorescência após estarem em cultura durante quatro (4) dias com as células HT29. Note-se, contudo, que as células HL60 são promielocíticas e possuem alguma capacidade de fagocitar células e fragmentos. O aumento na intensidade de fluorescência experimentada após o dia 4 na subpopulação não corada da cultura de mistura pode de facto ser um resultado da fagocitose de fragmentos fluorescentes. De significado mais importante é o facto de durante quatro dias em cultura não ter havido qualquer aumento na intensidade de fluorescência das células HL60 não coradas. Além disso, as células HT29 coradas na mesma mistura parecem ter a mesma cinética de fluorescência que as células HT29 que não estavam misturadas. Assim, a transferência de corante célula-a-célula não leva a determinações incorrectas da velocidade de crescimento.

EXEMPLO 3

Medição da Velocidade de Crescimento de Células Tumerais

Se as células tumorais a serem estudadas são uma

-22-

linha de cultura de tecido adaptada a condições de cultura in vitro, então as células são coradas e avaliadas como descrito nos Exemplos 1 e 2. Se as células tumorais a serem estudadas são de um tecido tumoral excisado, então são desagregadas em células isoladas por técnicas padrão e colocadas em placa sobre placas de câmara de cultura de tecido Lab-Tech. As células são coradas usando os corantes cianina como descrito no Exemplo 1. São então colocadas numa incubadora de ar humidificado- CO_2 a 37°C e deixadas equilibrar. A intervalos periódicos as placas são colocadas sobre a fase de microscópio de um citômetro de células aderentes (i.e., Meridian ACAS 470) e as medições da intensidade de fluorescência são efectuadas. As localizações das células em relação a uma marcação são determinadas pelo computador de forma que se possam fazer as medições seriadas da intensidade de fluorescência. A placa é devolvida à incubadora para permitir que as células continuem a crescer. A placa do microscópio deve conter um padrão de fluorescência, tal como microesferas de polistireno brilhantes de Coulter (Coulter Electronics, Hialeah, Florida) que não alteram a intensidade de fluorescência com o tempo em cultura. Este padrão é usado para fazer medições de comparação da intensidade de fluorescência.

As células tumorais são identificadas das células de estroma normal com base nos parâmetros morfológicos usando óptica de fase no microscópio ou anticorpos monoclonais específicos fluorescentes para as células tumorais. A medição do crescimento celular é feito monitorizando diluição da fluorescência da cianina nas células tumorais à medida que cada célula se divide e aplicando as equações do Exemplo 9.

A medição da intensidade de fluorescência pode também ser feita usando um citômetro de fluxo. As células, contudo, são removidas da placa do microscópio antes de ser efectuada a análise citométrica de fluxo. Es-

-23-

te processo não permite a quantificação seriada da diluição do corante nas mesmas células dia após dia. Nalguns casos, contudo, tal como com células de leucemias, esta abordagem é preferida.

Este método de medição do crescimento celular in vitro é conseguido com células que foram cultivadas em meios de crescimento ótimo ou na presença de diversos níveis de agentes usados para tratar tumores. A capacidade do agente terapêutico para inibir o crescimento de células tumorais como medido pela inibição da redução da intensidade de fluorescência, é uma medida da eficácia daquele agente para matar células tumorais.

EXEMPLO 4

Medição da Velocidade de Crescimento de Glóbulos Brancos

Os linfócitos são removidos por punção venosa ou por dissecação esplênica usando técnicas padrão. As células são marcadas com um corante cianina usando o protocolo descrito no Exemplo 1, mas substituindo por glucose ou sacarose o manitol como meio de suporte osmótico. As células coradas são então repartidas em placas de microtitulação ao nível de 5×10^5 células por depósito (Mazumder, A., Grimm, E.A., Zhang, H.Z., e Rosenberg, S.A., Cancer Res. 42, 918 (1982) e incubadas com o mitogénio adequado tal como Interleuquina-2, per-iodato de sódio (IO_4^-), fito-hemaglutinina, concanavalina A, mitogénio "pokeweed" e Factor de Crescimento de Célula B (BCGF). As células são colocadas numa incubadora com ar humedificado- CO_2 a 37°C e deixadas crescer. A intervalos periódicos células são removidas do recipiente de cultura e examinadas por processos citométricos de fluxo. Os dados obtidos são semelhantes aos obtidos pelo processo do Exemplo 2 e são analisados usando as equações do Exemplo 9.

-24-

EXEMPLO 5Medição da Velocidade de Crescimento de Bactérias

As células são marcadas com um corante cianina usando o protocolo descrito no Exemplo 1 mas substituindo por glucose ou sacarose o manitol como meio de suporte osmótico. As células coradas são então repartidas em placas de microtitulação a um nível de 5×10^5 células por depósito num caldo nutriente. As células são colocadas numa incubadora humidificada a 37°C e deixadas crescer. A intervalos periódicos as células são removidas do frasco de cultura e examinadas por processos citométricos de fluxo. Os dados obtidos são semelhantes aos obtidos no processo do Exemplo 2 e são analisados usando as equações do Exemplo 9.

O método de medição do crescimento celular in vitro é conseguido com células que foram cultivadas em meio de crescimento ótimo ou na presença de diversos níveis de antibióticos que estão a ser testados como agentes antibacterianos. A capacidade do agente bactericida para inibir o crescimento celular bacteriano como medido por inibição da redução da intensidade da fluorescência celular, é uma medida da eficácia desse agente para matar bactérias.

EXEMPLO 6Medição da Velocidade de Crescimento da Levedura

As células são marcadas com o corante cianina usando o protocolo descrito no Exemplo 1 mas substituindo por glucose ou por sacarose o manitol como meio de suporte osmótico. As células coradas são então repartidas por placas de microtitulação a um nível de 5×10^5 células por depósito num caldo nutriente. As células são colocadas numa incubadora e deixadas crescer. A intervalos periódicos as células são removidas do frasco de cultura e examinadas por processos citométricos de fluxo ou por

-25-

processos citométricos de células aderentes (Meridian ACAS 470). Os dados obtidos são semelhantes aos obtidos pelo processo do Exemplo 2 e são analisados usando as equações do Exemplo 9.

O método de medição do crescimento celular in vitro é conseguido em células que foram cultivadas em meio de crescimento ótimo ou na presença de níveis seleccionados de compostos que estão a ser testados como agentes antifúngicos. A capacidade do agente antifúngico para inibir o crescimento celular fúngico como medido por inibição da redução da intensidade de fluorescência celular, é uma medida da eficácia desse agente para matar fungos.

EXEMPLO 7

Medição da Velocidade de Crescimento de Célula da Medula Óssea

As células da medula óssea são removidas por aspiração (agulha Illinois) ou por biópsia de medula (agulha Jamshiti) do esterno ou da crista ilíaca. As células são marcadas com um corante cianina usando o protocolo descrito no Exemplo 1 mas substituindo por glucose ou sacarose o manitol como meio de suporte osmótico. As células são submetidas a análise citométrica de fluxo para determinar o nível da intensidade de fluorescência antes da infusão das células de medula óssea no recipiente. As células marcadas são injectadas por via endovenosa e deixa-se passar um intervalo de tempo adequado antes de se recolher uma amostra de sangue periférico e de medula óssea. O sangue e a medula são tirados do recipiente misturados com anticoagulantes, e preparados de acordo com técnicas padrão para análise citométrica de fluxo. Estas amostras contêm células que estão em crescimento e células que estão num ciclo de repouso celular. Os histogramas serão complexos mas são analisados em relação ao crescimento celular de forma semelhante aos dados obtidos no processo



-26-

do Exemplo 2 aplicando as equações do Exemplo 9.

Como os corantes indicadores têm fluorescência verde, usa-se outro corante ligado aos anticorpos monoclonais para identificar as células de cada uma das linhagens celulares encontradas na medula. Usando um anticorpo monoclonal que cora os glóbulos vermelhos e seus percursores, usa-se fluorescência vermelha para identificar esta linhagem e depois monitorizar a redução em fluorescência verde (e portanto o crescimento celular) das células na linhagem dos glóbulos vermelhos.

Abordagens de duas cores semelhantes são usadas para avaliar o crescimento celular linfóide, mielóide e monocítico.

EXEMPLO 8

Medição da Velocidade de Crescimento do Epitélio Corneano

Esta metodologia é usada para monitorizar o crescimento das células epiteliais corneanas após transplante e usa tecnologia que não é prejudicial ao crescimento celular ou dolorosa para o olho quando se faz a monitorização do crescimento celular. Imediatamente após o transplante, o olho é banhado numa formulação oftálmica do corante cianina que absorve a luz a comprimentos de onda superiores a 680 nm. O processo é efectuado também usando corante que absorveu luz a comprimentos de onda inferiores a 680nm, contudo, o de excitação provoca fortes dores de cabeça quando o tecido é observado.

No momento zero, são tiradas fotografias/^{de}infravermelhos (com comprimentos de onda superiores à máxima absorvância do corante) enquanto se excita o corante cianina ligado à cornea. O nível da intensidade de fluorescência é uma medida de coloração celular no momento zero. Em alturas subsequentes o olho é fotografado e a imagem é comparada à fotografia do momento zero. Nas áreas em que há

-27-

crescimento celular, a intensidade de fluorescência das células diminui. A avaliação quantitativa da intensidade de fluorescência é usada para determinar o número de duplicações celulares.

Exemplo 9

Cálculo da Velocidade do Crescimento Celular

A seguinte fórmula matemática é usada para calcular o tempo de duplicação celular:

$$T_D = \frac{0,693(t_2 - t_1)}{\ln F(t_1) - \ln F(t_2)}$$

na qual:

T_D é o tempo de duplicação celular,

t_2 e t_1 são quaisquer alturas durante a fase logarítmica do crescimento celular, e

$F(t_2)$ e $F(t_1)$ são a intensidade de fluorescência celular média respectivamente nas alturas t_2 e t_1 ,

$\ln$ significa o logaritmo natural (base e).

O número de duplicações celulares que ocorrem durante um período de crescimento é determinado pela fórmula:

$$N = \frac{\ln F_0 - \ln F(t)}{\ln 2}$$

na qual:

N é o número de duplicações celulares,

F_0 é a intensidade de fluorescência inicial, e

$F(t)$ é a intensidade de fluorescência a qualquer altura após um período de crescimento celular. Para a determinação do número de duplicações celulares, as medi-

-28-

ções de fluorescência não têm de ser efectuadas durante a fase logarítmica do crescimento celular.

A seguinte derivação demonstra que as fórmulas acima determinam rigorosamente o tempo de duplicação celular e o número de duplicações celulares, e que o comportamento dos níveis de corante cianina na membrana plasmática nas células em crescimento previsto por modulação matemática é paralelo ao actualmente medido.

A derivação é baseada nas seguintes suposições:

1. As células são colocadas em cultura a baixa densidade com um número de células inicial (N_0), uma intensidade de fluorescência inicial média (F_0) e um tempo de ciclo celular (T_2).
2. O corante distribui-se de forma uniforme para as células filhas aquando da divisão celular.
3. Não há nenhum tempo de retardação na cultura.
4. A morte celular é insignificante.
5. A coloração é permanente; não há qualquer transferência de corante de célula para célula.

Com base na segunda suposição acima, a fluorescência média da população deveria ser inversamente proporcional ao número de células na população em qualquer altura t . Esta relação está definida na equação 1,

$$F(t) N(t) = K \quad (1)$$

na qual $F(t)$ e $N(t)$ são a fluorescência média da população e o número de células na altura t , respectivamente. K é uma constante, a ser definida. Se avaliarmos esta equação na altura zero, então segue-se que $K = F_0 N_0$. Substituindo isto na equação 1 e resolvendo-a para $F(t)$, dá,

$$F(t) = F_0 N_0 (1/N(t)). \quad (2)$$

F_0 e N_0 foram definidos na suposição 1.

É óbvio a partir da equação 2 que a cinética da fluorescência

-29-

cia tem de estar directamente relacionada com a cinética do crescimento, se o corante a ser usado actua de uma forma ideal. A forma da relação definindo a cinética da fluorescência será agora determinada. O número de células da equação 2 segue a cinética de crescimento usual definida abaixo,

$$dN(t)/dt = A N(t) \quad (3)$$

na qual A é a constante que relaciona proporcionalmente a velocidade do crescimento da população e o número de células na população. As equações 4 a 7 mostram a solução simples da equação 3.

$$dN(t)/dN(t) = d \ln N(t) = A dt \quad (4)$$

$$N(t) = \exp(At + C) \quad (5)$$

$$N(t) = N_0 \exp(At) \quad (6)$$

$$N(t) = N_0 \exp(0,693t/T_2) \quad (7)$$

O resultado da equação 7 pode ser substituído na equação 2 para resolver para F(t).

$$F(t) = \frac{F_0 N_0}{N_0 \exp(0,693t/T_2)} \quad (8)$$

Este reduz directamente para,

$$F(t) = F_0 \exp(-0,693t/T_2) \quad (9)$$

A interpretação desta equação requer uma observação cuidadosa. Em primeiro lugar, porque tem-se considerado desprezível a morte celular, e T_2 representa o tempo do ciclo celular e não o tempo de duplicação celular. Este ponto será ponderado mais cuidadosamente abaixo. Se há morte celular, esta equação é ainda válida, desde que o corante ligado às células mortas não seja reabsorvido pelas células vivas. O caso em que ocorre reabsorção será tratado abaixo. No caso em que uma fracção da população não es-

-30-

tá em crescimento, a equação 9 só é válida para a fracção em crescimento. Consequentemente F_0 e N_0 aplicam-se somente à fracção em crescimento.

Efeito da Morte Celular sobre a Cinética da
Fluorescência

Consideremos agora o caso em que a morte celular é apreciável e a transferência de corante para as células vivas ocorre rapidamente. A cinética da morte celular está representada na equação 10.

$$(dN(t)/dt)_1 = B N(t) \quad (10)$$

Acima, B é a constante de proporcionalidade que relaciona a velocidade de perda de células da população em relação ao tamanho da população. A derivada tem um sub-índice; o 1 corresponde ao processo de morte celular. Re-escrevendo a equação 3 de uma forma semelhante.

$$(dN(t)/dt)_2 = A N(t) \quad (3)$$

Aqui, o 2 corresponde ao processo de crescimento celular. Combinando os processos de crescimento e morte, temos,

$$dN(t)/dt = (dN(t)/dt)_1 + (dN(t)/dt)_2 \quad (11)$$

Esta equação é simplesmente o resultado da sobreposição de dois processos independentes. Por substituição, segue-se que,

$$dN(t)/dt = (A + B) N(t) \quad (12)$$

Por analogia com as equações 4 a 6, esta equação reduz-se para,

$$N(t) = N_0 \exp((A + B)t) \quad (13)$$

A foi determinado na equação 7 como sendo $0,693/T_2$. De forma semelhante B pode ser considerado igual a $-0,693/T_{1/2}$. O sinal negativo corresponde ao facto da mor

-31-

te celular ser um processo ^{de} degeneração. De forma idêntica $T_{1/2}$ representa agora uma degeneração constante que chamaremos a semi-vida média das células na população. Por substituição, a equação 13 torna-se,

$$N(t) = N_0 \exp ((0,693/T_2 - 0,693/T_{1/2})t) \quad (14)$$

Combinando as sequências 3 e 14, podemos resolver em relação à cinética de fluorescência.

$$F(t) = F_0 \exp ((0,693/T_{1/2} - 0,693/T_2)t) \quad (15)$$

Na equação acima podemos combinar as constantes T_2 e $T_{1/2}$ como se mostra abaixo.

$$1/T_D = 1/T_2 - 1/T_{1/2} \quad (16)$$

Incorporando a relação da equação 16 nas equações 14 e 15 dá a equação da cinética celular e da fluorescência abaixo descrita.

$$N(t) = N_0 \exp(0,693t/T_D) \quad (17a)$$

$$F(t) = F_0 \exp(-0,693t/T_D) \quad (17b)$$

Nas equações 17a e 17b, o parâmetro, T_D , tem as unidades de tempo e representa o tempo de duplicação celular real em vez do tempo de ciclo celular. A equação 17b definirá a distribuição da fluorescência numa cultura em que a morte celular é significativa e a reabsorção do corante é rápida. Se qualquer uma destas condições não for conseguida, então a equação 9 aplica-se. Uma comparação das equações 17a e 17b mostra que as cinéticas das células e da fluorescência estão inversamente relacionadas, de tal forma que o traçado da curva de crescimento celular e o inverso da curva de cinética da fluorescência podem ser sobrepostas. Este facto foi claramente demonstrado na Figura 4.

-32-

Incorporação de um Tempo de Retardação de Crescimento Celular

Consideremos que há um tempo de retardação quando as células são colocadas em cultura. Simplifiquemos também o tratamento considerando ainda que a população irá de uma velocidade de crescimento de zero até à sua velocidade máxima numa só etapa. Sob estas condições, pode ser prontamente mostrado que a relação que define o crescimento celular é.

$$N(t) = N_0 \quad t \geq t_L \quad (18a)$$

$$N(t) = N_0 \exp(0,693(t - t_L)/T_D) \quad t < t_L \quad (18b)$$

Aqui, t_L é definido como o tempo de retardação. Combinando a equação 3 com as relações acima temos,

$$F(t) = F_0 \quad t \geq t_L \quad (19a)$$

$$F(t) = F_0 \exp(-0,693(t - t_L)/T_D) \quad t < t_L \quad (19b)$$

Usando estas equações, podem-se determinar o tempo de duplicação e o tempo de retardação sabendo F_0 e determinando $F(t)$ três ou quatro vezes durante o crescimento exponencial.

Determinação da Fração de Crescimento

Consideremos o caso em que uma fracção da população não está em crescimento. Inicialmente, consideremos que não há qualquer tempo de retardação. Adicionaremos mais tarde o tempo de retardação. Para a finalidade desta derivação é necessária uma definição. Na equação 21,

$$N_0 = (N_0)_g + (N_0)_n \quad (20)$$

Os sub-índices g e n referem-se às fracções em crescimento e às que não estão em crescimento, respectivamente. Em qualquer altura, t , o número de células na população será



-33-

a soma das populações em crescimento e das que não estão em crescimento.

$$N(t) = (N_o)_n + (N_o)_g \exp(0,693t/T_D) \quad (21)$$

Contudo, esta equação não pode ser substituída na equação 3 como fizemos previamente. Neste caso as fracções em crescimento e as que não estão em crescimento têm de ser manipulados separadamente. Com esta finalidade, a equação 3 tem de ser escrita de novo, da seguinte forma:

$$F(t) = (F_o)_n (N_o)_n (1/N(t))_n + (F_o)_g (N_o)_g (1/N(t))_g \quad (22)$$

Na equação 22, $(1/N(t))_n$ é igual a $(1/(N_o)_n)$. Portanto, a equação reduz-se da seguinte forma:

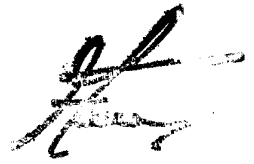
$$F(t) = (F_o)_n + (F_o)_g (N_o)_g (1/N(t))_g \quad (23)$$

$$F(t) = (F_o)_n + (F_o)_g \exp(-0,693t/T_D) \quad (24)$$

Podemos também introduzir um tempo de retardação por analogia à equação 19b.

$$F(t) = (F_o)_n + (F_o)_g \exp(-0,693(t-t_L)/T_D) \quad (25)$$

A fracção de células em crescimento na população pode ser determinada usando a equação 25. A determinação é mais complexa que em casos anteriores porque estão envolvidas subpopulações. Para determinar a fracção em crescimento, é preciso esperar até que as subpopulações sejam distinguíveis. Neste ponto a intensidade de fluorescência da fracção que não está em crescimento pode ser determinada directamente. Uma extrapolação da alteração na intensidade de fluorescência ao longo do tempo da fracção em crescimento para o tempo zero, permite que se calcule a intensidade de fluorescência da fracção em crescimento no tempo zero. A fracção em crescimento é então simplesmente a razão entre a intensidade de fluorescência da fracção em



-34-

crescimento no tempo zero e a intensidade de fluorescência da população total.

As concretizações preferidas do invento são ilustradas pelo acima dito, contudo, o invento não está limitado às ilustrações aqui reveladas, e todos os direitos a todas as modificações abrangidas pelo objecto das reivindicações abaixo estão reservados.

-35-

REIVINDICAÇÕES

1 - Método para determinar a velocidade de crescimento celular caracterizado por compreender a medição das alterações nos níveis de corante de cianina nas membranas plasmáticas de células filhas derivadas de células mãe marcadas com um corante de cianina.

2 - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se usar fluorescência para medir as alterações nos níveis de corante de cianina.

3 - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as células serem células de tecido de cultura.

4 - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por as células serem células tumorais humanas.

5 - Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por as células tumorais humanas serem cultivadas em meio contendo agentes terapêuticos do cancro de forma que seja determinada a sensibilidade das células tumorais a estes agentes.

6 - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por as células serem glóbulos brancos.

7 - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o corante de cianina ser DiSC₁₄(5) ou DiOC₁₄(3).

8 - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as células serem bactérias.

9 - Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por as bactérias serem cultivadas em meio contendo agentes antibacterianos de forma a determinar a

-36-

sensibilidade bacteriana a estes agentes.

10 - Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o corante de cianina ser DiSC₁₄(5) ou DiOC₁₄(3).

11 - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as células serem leveduras.

12 - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as leveduras serem cultivadas em meio contendo agentes antifúngicos de forma a determinar a sensibilidade a estes agentes.

13 - Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por o corante de cianina ser DiSC₁₄(5) ou DiOC₁₄(3).

14 - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as células serem células de tecido in vivo.

15 - Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por as células de tecido in vivo serem células transplantadas.

16 - Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por as células transplantadas serem células de medula óssea.

17 - Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por as células de tecido in vivo serem células epiteliais da córnea.

18 - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o corante de cianina ser DiSC₁₄(5) ou DiOC₁₄(3).

-37-

19 - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o corante de cianina absorver a luz com um comprimento de onda superior a 680 nm.

20 - Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o corante de cianina absorver a luz com um comprimento de onda superior a 680 nm.

Lisboa, 29.06.77

Por SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION

AV - O AGENTE OFICIAL -

António Vissani Salas

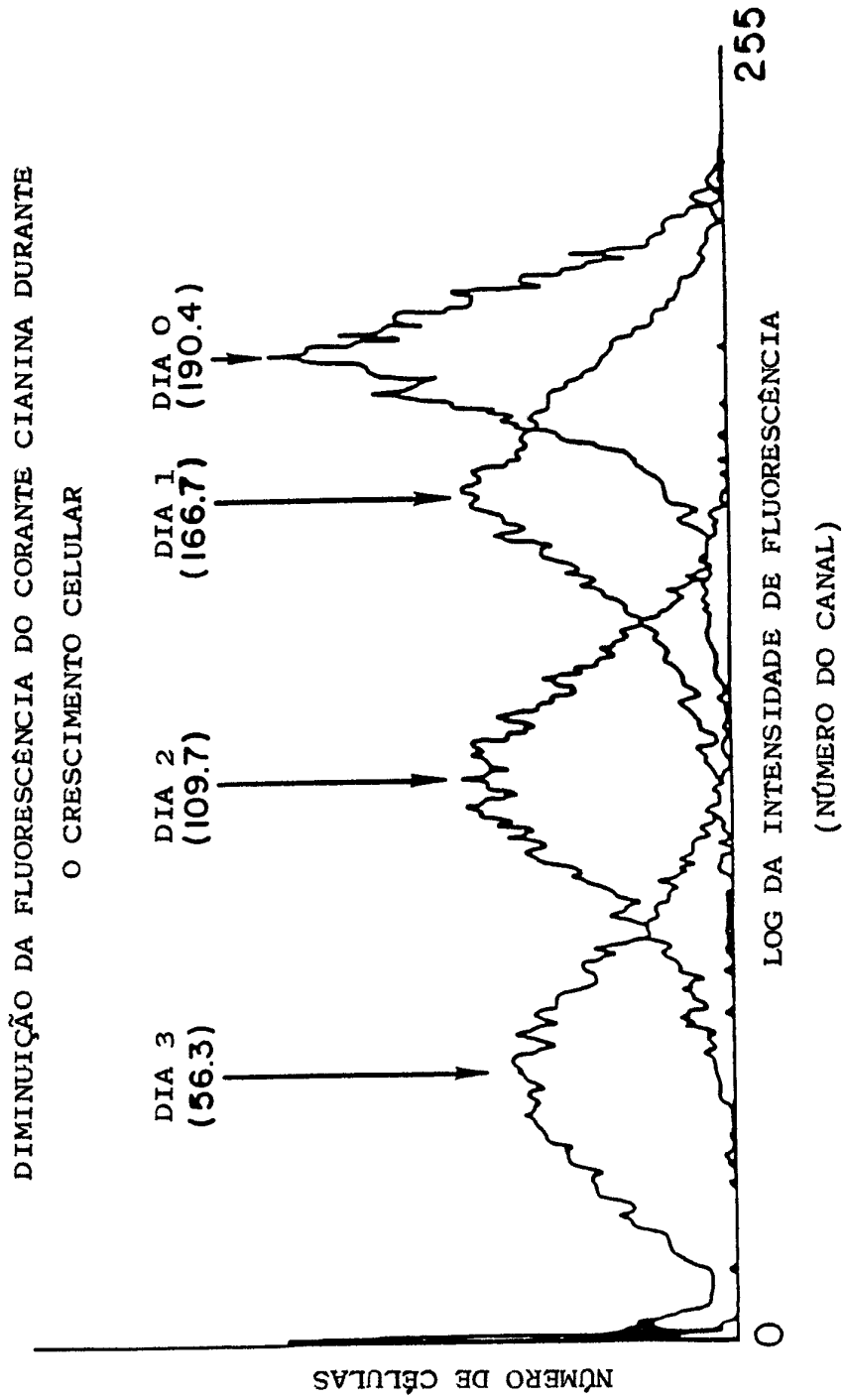
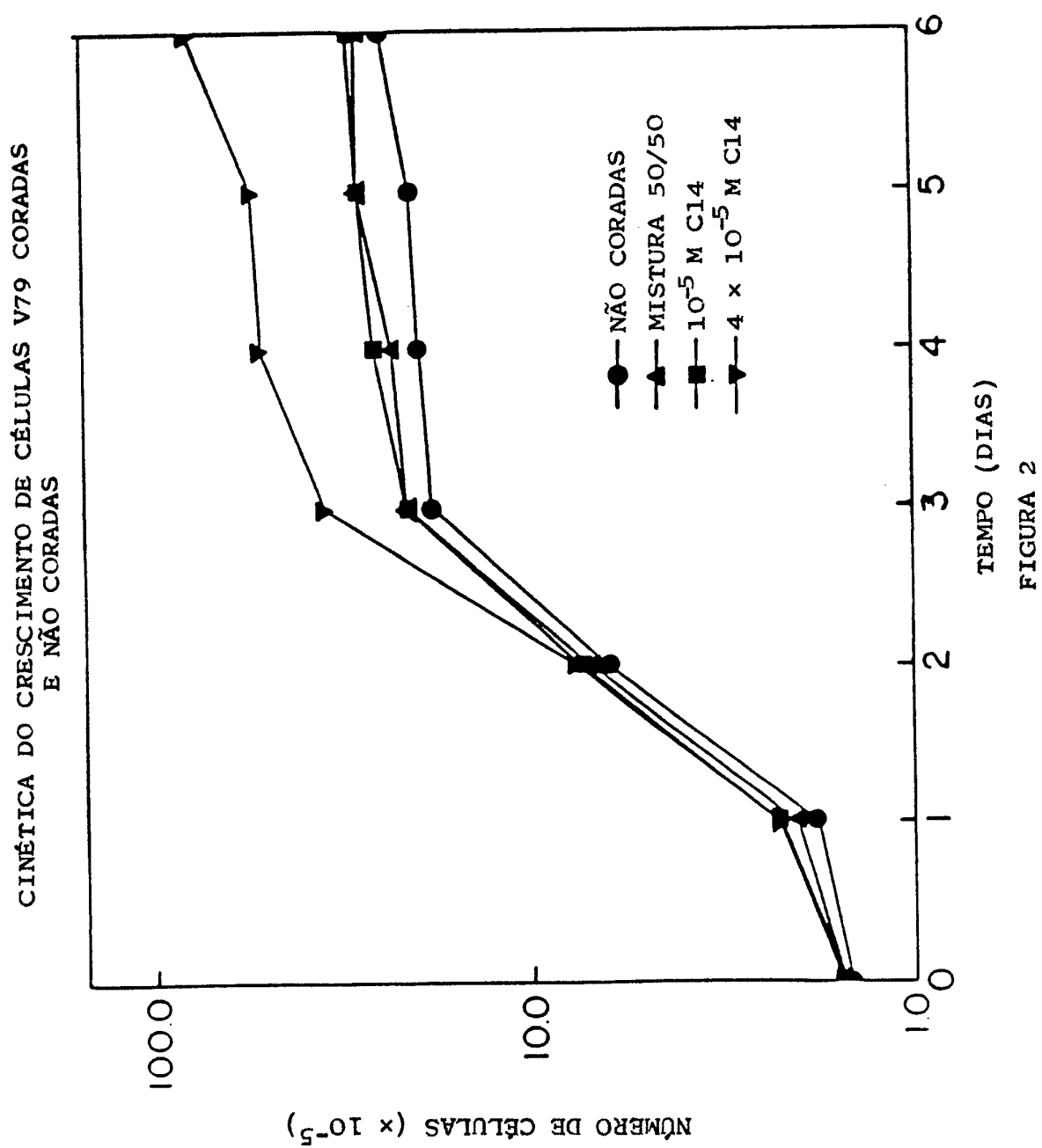


FIGURA 1



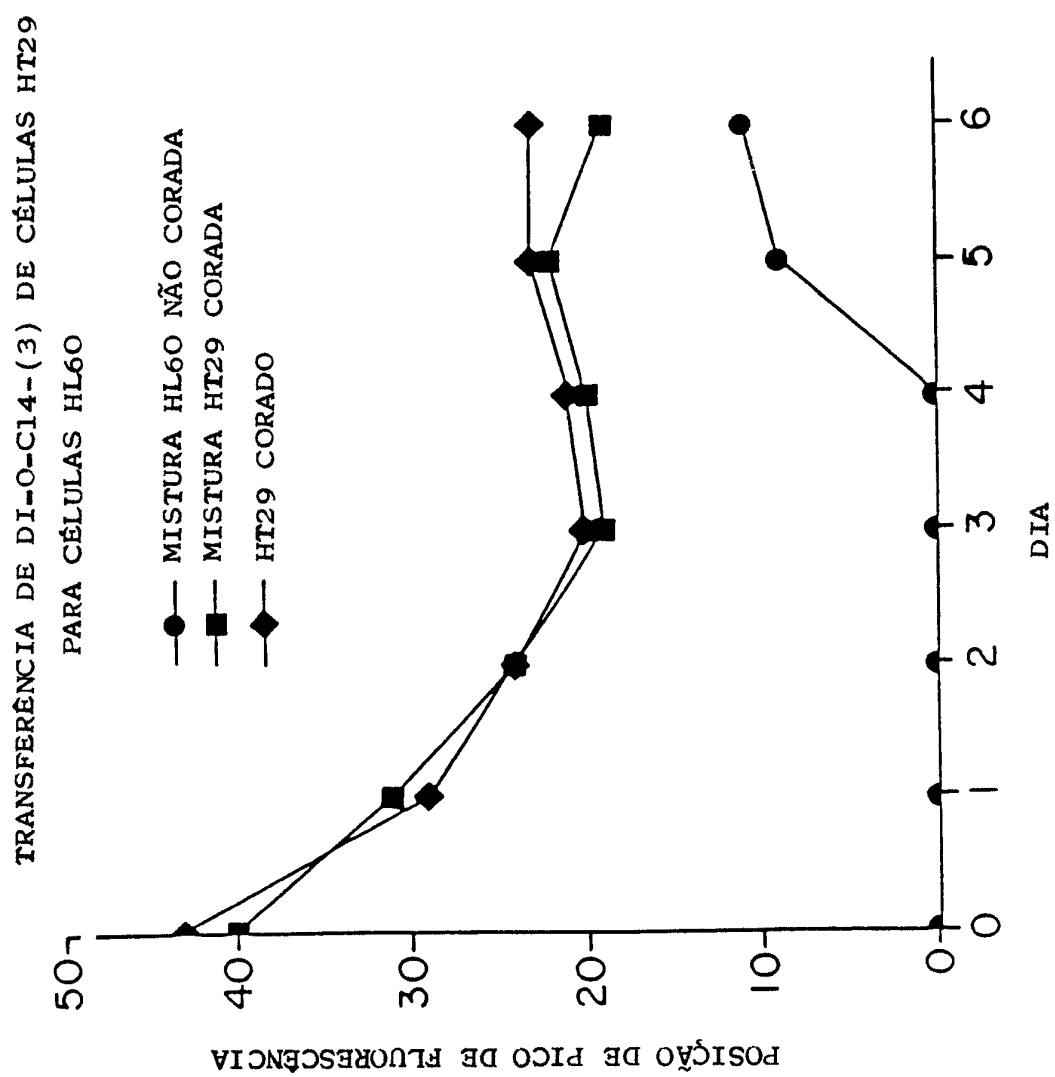


FIGURA 3

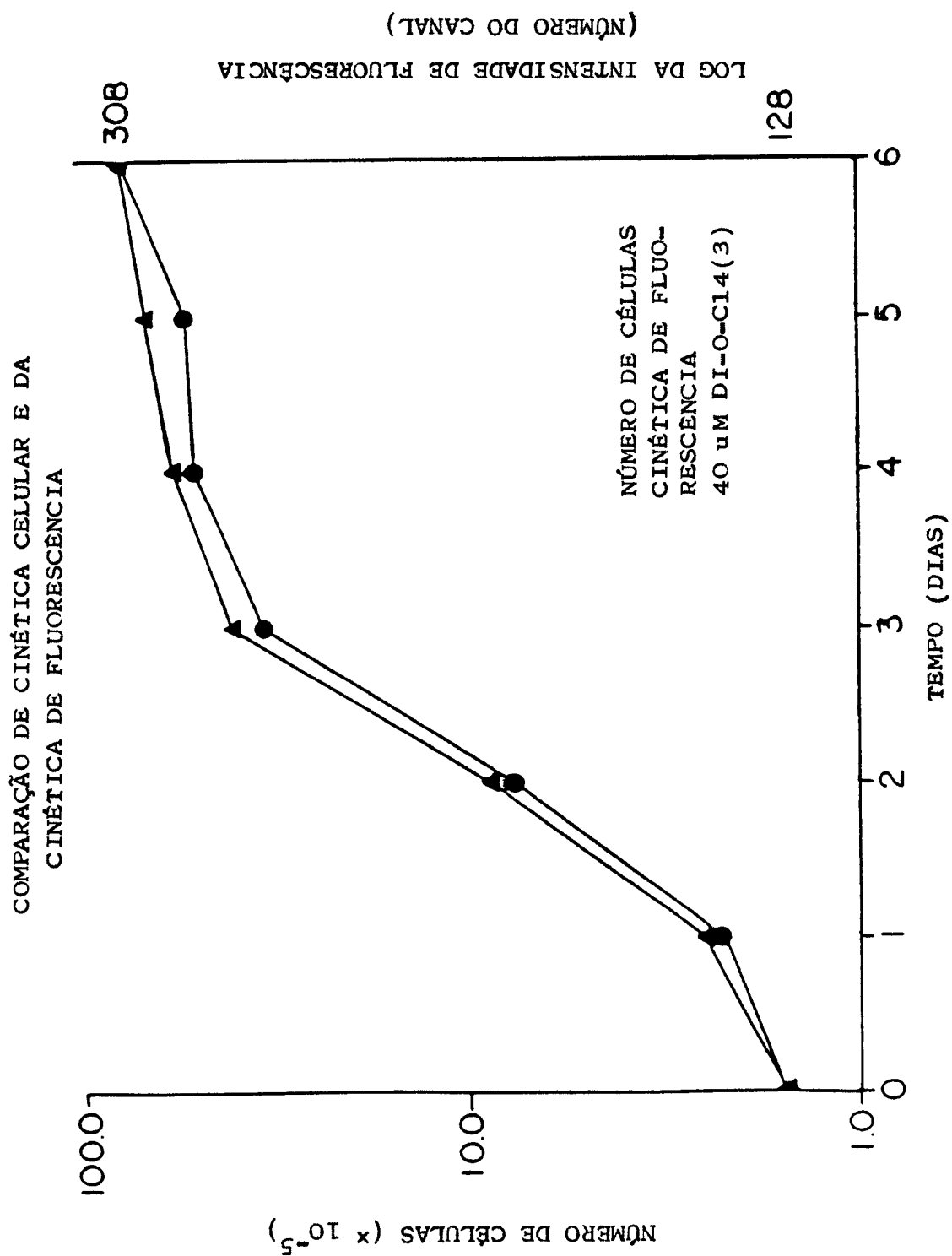


FIGURA 4