

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

(21) PI 0914116-2 A2



(22) Data do Depósito: 30/06/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 07/01/2010

(54) Título: DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES

(51) Int. Cl.: C12N 5/07.

(30) Prioridade Unionista: 30/06/2008 US 61/076,908; 30/06/2008 US 61/076,900; 30/06/2008 US 61/076,915.

(71) Depositante(es): CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC..

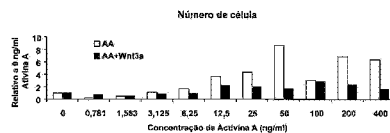
(72) Inventor(es): JIAJIAN LIU; JANET DAVIS; CHRISTINE PARMENTER; PASCAL GHISLAIN ANDRE BONNET.

(86) Pedido PCT: PCT US2009049183 de 30/06/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/002846 de 07/01/2010

(85) Data da Fase Nacional: 29/12/2010

(57) Resumo: DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES A presente invenção refere-se a métodos para diferenciar células-tronco pluripotentes. Em particular, a presente invenção refere-se a métodos e composições para diferenciar células-tronco pluripotentes em células que expressam marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo que compreendem o cultivo das células-tronco pluripotentes em meio que compreende uma quantidade suficiente de GDF-8 para ocasionar a diferenciação das células-tronco pluripotentes em células que expressam marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo .



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES**".

A presente invenção reivindica a prioridade ao pedido de número de série 61/076.900, depositado em 30 de junho de 2008, pedido de número
5 de série 61/076.908, depositado em 30 de junho de 2008, e pedido de número de série 61/076.915, depositado em 30 de junho de 2008.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos para diferenciar células-tronco pluripotentes. Em particular, a presente invenção refere-se a
10 métodos e composições para diferenciar células-tronco pluripotentes em células que expressam marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo que compreendem o cultivo das células-tronco pluripotentes em meio que compreende uma quantidade suficiente de GDF-8 para ocasionar a diferenciação das células-tronco pluripotentes em células que
15 expressam marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo.

ANTECEDENTES

Os avanços na terapia de reposição celular para a diabetes melito tipo I e a escassez de ilhotas de Langerhans transplantáveis concentraram interesses no desenvolvimento de fontes de células produtoras de
20 insulina, ou células β , adequadas para enxerto. Uma abordagem trata da geração de células β funcionais a partir de células-tronco pluripotentes, como, por exemplo, células-tronco embrionárias.

No desenvolvimento embrionário de vertebrados, uma célula pluripotente dá origem a um grupo de células compreendendo três camadas
25 germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme), em um processo conhecido como gastrulação. Tecidos como tireoide, timo, pâncreas, intestinos e fígado se desenvolvem a partir da endoderme, por meio de um estágio intermediário. O estágio intermediário nesse processo consiste na formação da endoderme definitiva. As células de endoderme definitiva expressam
30 inúmeros marcadores, como HNF-3beta, GATA4, MIXL1, CXCR4 e SOX17.

A formação do pâncreas tem origem na diferenciação da endoderme definitiva em endoderme pancreática. As células da endoderme

pancreática expressam o gene homeobox pancreático-duodenal, Pdx1. Na ausência de Pdx1, o pâncreas não desenvolve além da formação dos ramos ventral e dorsal. Portanto, a expressão do Pdx1 marca uma etapa de importância crítica na organogênese pancreática. O pâncreas maduro contém, entre outros tipos de célula, tecido exócrino e tecido endócrino. Os tecidos exócrino e endócrino têm origem na diferenciação da endoderme pancreática.

Há relatos de que células dotadas de características das células-ilhota tenham sido obtidas a partir de células embrionárias de camundongo. Por exemplo, Lumelsky *et al.* (Science 292:1389, 2001) relataram a diferenciação de células-tronco embrionárias de camundongo em estruturas secretoras de insulina similares a ilhotas pancreáticas. Soria *et al.* (Diabetes 49:157, 2000) relatam que células secretoras de insulina derivadas de células-tronco embrionárias de camundongo normalizam a glicemia em camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina.

Em um exemplo, Hori *et al.* (PNAS 99: 16105, 2002) descreve que o tratamento de células-tronco embrionárias de camundongo com inibidores de fosfoinositídeo 3-quinase (LY294002) produziu células que se assemelhavam às células β .

Em outro exemplo, Blyszczuk *et al.* (PNAS 100:998, 2003) relatam a geração de células produtoras de insulina a partir de células-tronco embrionárias de camundongo expressando constitutivamente Pax4.

Micallef *et al.*, dizem que o ácido retinoico pode regular as células-tronco embrionárias comprometidas com a formação do endoderma pancreático positivo Pdx1. O ácido retinoico é mais eficaz para induzir a expressão de Pdx1 quando adicionado a culturas no dia 4 da diferenciação da célula-tronco embrionária durante um período correspondente ao final da gastrulação no embrião (Diabetes 54:301, 2005).

Miyazaki *et al.* relatam uma linhagem de célula-tronco embrionária de camundongo que superexpressa Pdx1. Seus resultados mostram que a expressão exógena do Pdx1 intensificou claramente a expressão dos genes de insulina, somatostatina, glicocinase, neurogenina3, P48, Pax6 e

HNF6 nas células diferenciadas resultantes (Diabetes 53: 1030, 2004).

Skoudy *et al.* relatam que a ativina A (um membro da superfamília TGF- β) regula para cima a expressão de genes pancreáticos exócrinos (p48 e amilase) e endócrinos (Pdx1, insulina e glucagon) em células-tronco embrionárias de camundongo.

O efeito máximo foi observado com o uso de 1 nM de ativina A. Observou-se também que o nível de expressão de mRNA de insulina e Pdx1 não foi afetado pelo ácido retinoico; entretanto, o tratamento com 3 nM de FGF7 resultou em um nível aumentado da transcrição para Pdx1 (Biochem. J. 379: 749, 2004).

Shiraki *et al.* estudaram os efeitos de fatores de crescimento que acentuam especificamente a diferenciação das células-tronco embrionárias nas células positivas para Pdx1. Observou-se que o TGF β 2 rendeu, reprodutivelmente, uma maior proporção de células positivas para Pdx1 (Genes Cells., junho de 2005, 10(6): 503 a 16).

Gordon *et al.* demonstraram a indução de células de endoderma braquiúria [positivo]/ HNF-3beta [positivo] a partir de células-tronco embrionárias de camundongo, na ausência de soro e na presença de ativina juntamente com um inibidor de sinalização Wnt (US 2006/0003446A 1).

Gordon *et al.* (PNAS, Volume 103, página 16806, 2006) declaram que "foi necessária a sinalização simultânea de Wnt e TGF-beta/nodal/ativina para a geração da linha primitiva anterior".

Entretanto, o modelo de camundongo para desenvolvimento de célula-tronco embrionária pode não imitar exatamente o programa de desenvolvimento em mamíferos superiores, como seres humanos.

Thomson *et al.* isolou células-tronco embrionárias de blastocistos humanos (Science 282:114, 1998). Ao mesmo tempo, Gearhart e seus colaboradores derivaram linhagens de células germinativas embrionárias humanas (hEG) a partir do tecido gonadal de feto (Shamblott *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998). Ao contrário das células-tronco embrionárias de camundongo, cuja diferenciação pode ser impedida simplesmente por realizar-se cultura com o Fator Inibitório de Leucemia

(LIF), as células-tronco embrionárias de seres humanos têm que ser mantidas sob condições muito especiais (patente U.S. nº 6.200.806; WO 99/20741; WO 01/51616).

5 D'Amour *et al.* descreve a produção de culturas enriquecidas de endoderma definitivo derivado de células-tronco embrionárias humanas na presença de uma alta concentração de ativina e baixo teor de soro (D'Amour K A *et al.* 2005). O transplante dessas células sob a cápsula renal de camundongos resultou na diferenciação em células mais maduras com características de alguns órgãos endodérmicos. As células de endoderma
10 definitivo derivadas de células-tronco embrionárias humanas podem ser ainda diferenciadas em células positivas para Pdx1, após a adição de FGF-10 (US 2005/0266554A1).

D'Amour *et al.*, (Nature Biotechnology - 24, 1392 a 1401 (2006)) declaram: "desenvolvemos um processo de diferenciação que converte
15 células-tronco embrionárias de ser humano (hES) em células endócrinas capazes de sintetizarem a insulina dos hormônios pancreáticos, glucagon, somatostatina, polipeptídeo pancreático e grelina. Este processo imita a organogênese pancreática *in vivo*, mediante o direcionamento das células através de estágios que se assemelham ao endoderma definitivo, ao
20 endoderma do tubo gastrointestinal, ao endoderma pancreático e ao precursor endócrino, em rota para células que expressam hormônios endócrinos".

Em outro exemplo, Fisk *et al.* relata um sistema para a produção de células de ilhota pancreática a partir de células-tronco embrionárias
25 humanas (US2006/0040387A1). Nesse caso, a via de diferenciação foi dividida em três estágios. As células-tronco embrionárias humanas foram primeiro diferenciadas em endoderme com o uso de uma combinação de n-butirato e ativina A. As células foram então cultivadas com antagonistas de TGF- β como noguina em combinação com EGF ou betacelulina para gerar
30 células positivas para Pdx1. A diferenciação terminal foi induzida por nicotinamida.

Em um exemplo, Benvenistry *et al.* declaram: "concluimos que a

superexpressão de PDX1 acentuou a expressão de genes pancreáticos enriquecidos, a indução da expressão de insulina pode requerer sinais adicionais que só estão presentes *in vivo*" (Benvenistry *et al.*, Stem Cells 2006; 24:1923-1930).

5 A ativina A é um membro da família TGF-beta que exibe uma ampla gama de atividades biológicas, inclusive regulação de proliferação e diferenciação celular, bem como promoção da sobrevivência neuronal. O isolamento e a purificação da ativina A são frequentemente complexos e podem, frequentemente, resultar em um rendimento insatisfatório. Por
10 exemplo, Pangas, S.A. e Woodruff, T.K. declaram: "a inibina e a ativina são hormônios proteicos com papéis fisiológicos diversos, inclusive a regulação da secreção de FSH pela hipófise. Como outros membros da família do gene para fator de transformação do crescimento β , sofrem processamento a partir de moléculas precursoras maiores, bem como montagem em dímeros
15 funcionais. O isolamento de inibina e ativina a partir de fontes naturais só pode produzir quantidades limitadas de proteína bioativa". (J. Endocrinol. 172 (2002) 199-210).

 Em outro exemplo, Arai, K. Y. *et al.* declaram: "as ativinas são fatores de crescimento multifuncionais que pertencem à superfamília do fator
20 de transformação do crescimento β . O isolamento de ativinas a partir de fontes naturais requer muitas etapas e só produz quantidades limitadas. Embora preparações recombinantes venham sendo usadas em estudos recentes, a purificação de ativinas ainda exige múltiplas etapas". (Protein Expression and Purification 49 (2006) 78-82).

25 Portanto, ainda permanece uma necessidade significativa por alternativas à ativina A para facilitar a diferenciação de células-tronco pluripotentes.

SUMÁRIO

30 Em uma modalidade, a presente invenção apresenta um método para diferenciar células-tronco pluripotentes em células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo, compreendendo o cultivo das células-tronco pluripotentes em um meio que

compreende uma quantidade suficiente de GDF-8 para ocasionar a diferenciação das células-tronco pluripotentes em células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo.

5 Em uma modalidade, o meio que compreende uma quantidade suficiente de GDF-8 também contém pelo menos um outro composto. Em uma modalidade, esse pelo menos um outro composto é uma anilina-piridinotriazina. Em uma modalidade alternativa, esse pelo menos um outro composto é uma anilina-piridinotriazina cíclica.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

10 A **figura 1** mostra a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas H1 em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo. A diferenciação foi determinada mediante a medição do número de células (Painel A) e da intensidade de SOX17 (Painel B) com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer
15 1000 (GE Healthcare). As células-tronco embrionárias humanas foram tratadas durante um total de quatro dias com um meio contendo 20 ng/mL de Wnt3a, mais ativina A, nas concentrações indicadas (barras pretas), ou com um meio desprovido de Wnt3a mas com ativina A nas concentrações indicadas (barras brancas).

20 A **figura 2** mostra a relação entre dose e resposta de ativina A e GDF8 usados para diferenciar células da linhagem H1 de células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo. As células foram tratadas por um total de três dias com ativina A ou GDF8 nas concentrações
25 mostradas, em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a no primeiro dia de teste. A diferenciação foi determinada mediante a medição da intensidade de SOX17, com o uso de uma sonda de anticorpo fluorescente e análise de alto conteúdo em um equipamento de análise celular GE Healthcare IN Cell Analyzer.

30 A **figura 3** mostra a expressão de CXCR4 nas células, em seguida à primeira etapa de diferenciação, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 12. As células H1 foram tratadas com 100 ng/mL de

ativina A ou 200 ng/mL de GDF-8 durante um total de três dias, em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a durante o primeiro dia, ou 2,5 μ M de Composto 34, ou 2,5 μ M do Composto 56, durante todos os três dias. A expressão de CXCR4 foi medida com o uso de uma sonda de anticorpo fluorescente e citometria de fluxo, produzindo as porcentagens mostradas de células positivas.

A **figura 4** mostra a expressão de SOX17 em células após três dias de diferenciação para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 12. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias com 100 ng/mL de ativina A ou 200 ng/mL de GDF-8 em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a durante o primeiro dia, ou 2,5 μ M de Composto 34, ou 2,5 μ M do Composto 56, durante todos os três dias. A diferenciação foi determinada mediante a medição da intensidade de SOX17 (barras pretas) e o número de células resultante (barras brancas) com sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo em um equipamento de análise celular GE Healthcare IN Cell Analyzer.

A **figura 5** mostra a expressão de proteína PDX1 e CDX2 nas células, em seguida à terceira etapa de diferenciação, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 12. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias com 100 ng/mL de ativina A ou 200 ng/mL de GDF-8 em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a durante o primeiro dia, ou 2,5 μ M de Composto 34, ou 2,5 μ M do Composto 56, durante todos os três dias, seguido de subsequente diferenciação por meio das segunda e terceira etapas de diferenciação. A expressão de proteína e os números de células, conforme determinado com sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo, são representados para cada grupo de tratamento. Para propósitos de comparação, os valores são normalizados em relação ao tratamento com ativina A/Wnt3a.

A **figura 6** mostra a expressão de proteína PDX1 (barras brancas) e o número de células (barras pretas) para células em seguida à quarta etapa de diferenciação, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 12. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias com

100 ng/mL de ativina A ou 200 ng/mL de GDF-8 em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a durante o primeiro dia, ou 2,5 μ M de Composto 34, ou 2,5 μ M de Composto 56, durante todos os três dias, seguido de subsequente diferenciação por meio das segunda, terceira e quarta etapas de diferenciação. A expressão de proteína e os números de células, conforme determinado com sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo, são representados para cada grupo de tratamento. Para propósitos de comparação, os valores são normalizados em relação ao tratamento com ativina A/Wnt3a.

10 A **figura 7** mostra a expressão de proteína para insulina e glucagon, bem como o número de células, para células diferenciadas de acordo com os métodos descritos no Exemplo 12. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias com 100 ng/mL de ativina A ou 200 ng/mL de GDF-8 em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a durante o
15 primeiro dia, ou 2,5 μ M de Composto 34, ou 2,5 μ M de Composto 56, durante todos os três dias, seguido de subsequente diferenciação por meio das segunda, terceira, quarta e quinta etapas de diferenciação. A expressão de proteína e os números de células, conforme determinado com sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo, são representados para
20 cada grupo de tratamento. Para propósitos de comparação, os valores são normalizados em relação ao tratamento com ativina A/Wnt3a.

A **figura 8** mostra a expressão de proteína SOX17 e o número de células para células-tronco embrionárias humanas, após a diferenciação para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo
25 13. As células H1 foram tratadas durante um total de quatro dias com 100 ng/mL de ativina A ou 100 ng/mL de um fator de crescimento GDF em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a durante o primeiro dia, ou 2,5 μ M de Composto 34, ou 2,5 μ M de Composto 56 durante os primeiros dois dias de teste. A expressão de proteína SOX17 (barras pretas) e os números de
30 células (barras brancas), conforme determinado com sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo, são representados para cada grupo de tratamento. Para propósitos de comparação, os valores são

normalizados em relação ao tratamento com ativina A/Wnt3a. O painel 8A mostra uma série de condições de controle para diferenciação na ausência de quaisquer fatores de crescimento (NENHUM), ou com tratamento de ativina A/Wnt3a (AA/Wnt3a), ou com reagentes individuais por si sós. O

5 painel 8B mostra a diferenciação com GDF-3, por si só ou em múltiplas combinações com Wnt3a, Composto 34 ou Composto 56. O painel 8C mostra a diferenciação com GDF-5, por si só ou em múltiplas combinações com Wnt3a, Composto 34 ou Composto 56. O painel 8D mostra a

10 diferenciação com GDF-8, por si só ou em múltiplas combinações com Wnt3a, Composto 34 ou Composto 56. O painel 8E mostra a diferenciação com GDF-10, por si só ou em múltiplas combinações com Wnt3a, Composto 34 ou Composto 56. O painel 8F mostra a diferenciação com GDF-11, por si só ou em múltiplas combinações com Wnt3a, Composto 34 ou Composto 56.

15 O painel 8G mostra a diferenciação com GDF-15, por si só ou em múltiplas combinações com Wnt3a, Composto 34 ou Composto 56.

A **figura 9** mostra a expressão de proteína SOX17 em células-tronco embrionárias humanas após a diferenciação para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 14. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias com 100 ng/mL de ativina A,

20 ou vários fatores de crescimento nas concentrações mostradas, em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a, ou 2,5 μ M de Composto 34 durante o primeiro dia do teste. A expressão de proteína SOX17 (barras pretas) e os números de células (barras brancas), conforme determinado com sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo, são representados para

25 cada grupo de tratamento. Para propósitos de comparação, os valores são normalizados em relação ao tratamento com ativina A/Wnt3a. O painel 9A mostra uma série de condições de controle para diferenciação com Wnt3a por si só, ou na ausência de quaisquer fatores de crescimento (Nenhum), ou com tratamento de ativina A/Wnt3a (AA/Wnt3a). O painel 9B mostra a

30 diferenciação com GDF-8 (fornecedor: PeproTech), nas concentrações mostradas, em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a. O painel 9C mostra a diferenciação com GDF-8 (fornecedor: Shenendoah), nas concentrações

mostradas, em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a. O painel 9D mostra a diferenciação com TGF β 1, nas concentrações mostradas, em múltiplas combinações com Wnt3a ou Composto 34. O painel 9E mostra a diferenciação com BMP2, nas concentrações mostradas, em múltiplas combinações com Wnt3a ou Composto 34. O painel 9F mostra a diferenciação com BMP3, nas concentrações mostradas, em múltiplas combinações com Wnt3a ou Composto 34. O painel 9G mostra a diferenciação com BMP4, nas concentrações mostradas, em múltiplas combinações com Wnt3a ou Composto 34.

10 A **figura 10** mostra a expressão de proteína SOX17 em células-tronco embrionárias humanas após a diferenciação para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 15. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias em várias exposições temporizadas com 100 ng/mL de ativina A ou 100 ng/mL de GDF-8, em
15 combinação com 20 ng/mL de Wnt3a. A expressão de proteína SOX17, conforme determinada por sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo, é mostrada sob a forma de valores de intensidade total para cada grupo de tratamento, sendo as condições de controle testadas quanto à diferenciação sem a adição de quaisquer fatores de crescimento (nenhum
20 tratamento), com Wnt3a por si só, com ativina A ou GDF-8 por si só, ou com tratamento por ativina A/Wnt3a ou GDF-8/Wnt3a, sendo que o Wnt3a foi adicionado somente durante o primeiro dia do teste, ou durante os três dias de teste, conforme mostrado.

A **figura 11** mostra a expressão de proteína SOX17 em células-tronco embrionárias humanas após a diferenciação para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 15. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias, em várias exposições temporizadas, com 100 ng/mL de ativina A em combinação com o composto de teste (Composto 181 (Painel A), Composto 180 (Painel B), Composto 19
25 (Painel C), Composto 202 (Painel D), Composto 40 (Painel E), Composto 34 (Painel F) ou inibidor de GSK3 BIO (Painel G)) nas concentrações mostradas, sendo que o composto de teste foi adicionado somente no
30

primeiro dia do teste. A expressão de proteína para SOX17, conforme determinado por sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo, é representada por valores de intensidade total.

A **figura 12** mostra a expressão de proteína SOX17 em células-tronco embrionárias humanas após a diferenciação para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 15. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias, em várias exposições temporizadas, com 100 ng/mL de ativina A em combinação com o composto de teste (Composto 181 (Painel A), Composto 180 (Painel B), Composto 19 (Painel C), Composto 202 (Painel D), Composto 40 (Painel E), Composto 34 (Painel F) ou inibidor de GSK3 BIO (Painel G)) nas concentrações mostradas, sendo que o composto de teste foi adicionado durante todos os três dias do teste. A expressão de proteína para SOX17, conforme determinado por sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo, é representada por valores de intensidade total.

A **figura 13** mostra a expressão de proteína SOX17 em células-tronco embrionárias humanas após a diferenciação para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 15. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias, em várias exposições temporizadas, com 100 ng/mL de GDF-8 em combinação com o composto de teste (Composto 181 (Painel A), Composto 180 (Painel B), Composto 19 (Painel C), Composto 202 (Painel D), Composto 40 (Painel E), Composto 34 (Painel F) ou inibidor de GSK3 BIO (Painel G)) nas concentrações mostradas, sendo que o composto de teste foi adicionado somente no primeiro dia do teste. A expressão de proteína para SOX17, conforme determinado por sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo, é representada por valores de intensidade total.

A **figura 14** mostra a expressão de proteína SOX17 em células-tronco embrionárias humanas após a diferenciação para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 15. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias, em várias exposições temporizadas, com 100 ng/mL de GDF-8 em combinação com o composto

de teste (Composto 181 (Painel A), Composto 180 (Painel B), Composto 19 (Painel C), Composto 202 (Painel D), Composto 40 (Painel E), Composto 34 (Painel F) ou inibidor de GSK3 BIO (Painel G)) nas concentrações mostradas, sendo que o composto de teste foi adicionado durante todos os
5 três dias do teste. A expressão de proteína para SOX17, conforme determinado por sondas de anticorpo fluorescentes e análise de alto conteúdo, é representada por valores de intensidade total.

A **figura 15** mostra os rendimentos do número de células após a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 15. As células
10 H1 foram tratadas durante um total de três dias em várias exposições temporizadas com 100 ng/mL de ativina A ou 100 ng/mL de GDF-8, em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a. Os números de células, conforme determinado por uma sonda nuclear fluorescente e por análise de alto
15 conteúdo, são mostrados para cada grupo de tratamento, testando-se as condições de controle para diferenciação sem a adição de nenhum fator de crescimento (nenhum tratamento), com Wnt3a por si só, com ativina A ou GDF-8 por si só, ou com tratamento por ativina A/Wnt3a ou por GDF-8/Wnt3a, sendo que o Wnt3a foi adicionado somente para o primeiro dia do
20 teste, ou para todos os três dias do teste, conforme mostrado.

A **figura 16** mostra os rendimentos do número de células após a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 15. As células
25 H1 foram tratadas durante um total de três dias, em várias exposições temporizadas, com 100 ng/mL de ativina A em combinação com o composto de teste (Composto 181 (Painel A), Composto 180 (Painel B), Composto 19 (Painel C), Composto 202 (Painel D), Composto 40 (Painel E), Composto 34 (Painel F) ou inibidor de GSK3 BIO (Painel G)) nas concentrações mostradas, sendo que o composto de teste foi adicionado somente no
30 primeiro dia do teste. São mostrados os rendimentos do número de células, conforme determinado por uma sonda nuclear fluorescente e por análise de alto conteúdo.

A **figura 17** mostra os rendimentos do número de células após a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 15. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias, em várias exposições temporizadas, com 100 ng/mL de ativina A em combinação com o composto de teste (Composto 181 (Painel A), Composto 180 (Painel B), Composto 19 (Painel C), Composto 202 (Painel D), Composto 40 (Painel E), Composto 34 (Painel F) ou inibidor de GSK3 BIO (Painel G)) nas concentrações mostradas, sendo que o composto de teste foi adicionado durante todos os três dias do teste. São mostrados os rendimentos do número de células, conforme determinado por uma sonda nuclear fluorescente e por análise de alto conteúdo.

A **figura 18** mostra os rendimentos do número de células após a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 15. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias, em várias exposições temporizadas, com 100 ng/mL de GDF-8 em combinação com o composto de teste (Composto 181 (Painel A), Composto 180 (Painel B), Composto 19 (Painel C), Composto 202 (Painel D), Composto 40 (Painel E), Composto 34 (Painel F) ou inibidor de GSK3 BIO (Painel G)) nas concentrações mostradas, sendo que o composto de teste foi adicionado somente no primeiro dia do teste. São mostrados os rendimentos do número de células, conforme determinado por uma sonda nuclear fluorescente e por análise de alto conteúdo.

A **figura 19** mostra os rendimentos do número de células após a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas para endoderma definitivo, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 15. As células H1 foram tratadas durante um total de três dias, em várias exposições temporizadas, com 100 ng/mL de GDF-8 em combinação com o composto de teste (Composto 181 (Painel A), Composto 180 (Painel B), Composto 19 (Painel C), Composto 202 (Painel D), Composto 40 (Painel E), Composto 34 (Painel F) ou inibidor de GSK3 BIO (Painel G)) nas concentrações

mostradas, sendo que o composto de teste foi adicionado durante todos os três dias do teste. São mostrados os rendimentos do número de células, conforme determinado por uma sonda nuclear fluorescente e por análise de alto conteúdo.

5 A **figura 20** mostra a expressão de vários marcadores de proteína em células através das múltiplas etapas de diferenciação, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 16. As células H1 foram tratadas com 100 ng/mL de ativina A ou 100 ng/mL de GDF-8 durante um total de três dias, em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a durante o

10 primeiro dia, ou 2,5 μ M de vários compostos (Composto 19, Composto 202, Composto 40 ou inibidor GSK3 BIO) adicionados somente no primeiro dia. A **figura 20, painel A** mostra a análise de FACS para o marcador de endoderma definitivo, CXCR4, em células após a primeira etapa de diferenciação. A expressão de CXCR4 foi medida com o uso de uma sonda

15 de anticorpo fluorescente e citometria de fluxo, produzindo as porcentagens de células positivas conforme mostrado. A **figura 20, painel B** mostra a análise de imagens de alto conteúdo para expressão de proteína SOX17 normalizada (barras pretas) e números de células recuperadas (barras brancas) resultantes da primeira etapa de diferenciação, testando os

20 tratamentos correspondentes mostrados. A **figura 20, painel C**, mostra a análise de imagens de alto conteúdo para números relativos de células recuperadas de culturas tratadas por meio da etapa de diferenciação 5. A **figura 20, painel D**, mostra a análise de imagens de alto conteúdo para expressão de proteína glucagon a partir de culturas tratadas por meio da

25 etapa de diferenciação 5. A **figura 20, painel E**, mostra a análise de imagens de alto conteúdo para expressão de proteína insulina a partir de culturas tratadas por meio da etapa de diferenciação 5. A **figura 20, painel F** mostra a razão entre as expressões de glucagon e de insulina em células de

30 culturas tratadas por meio da etapa de diferenciação 5. Para propósitos de comparação, os valores de expressão nos painéis B, C, D, E e F são normalizados em relação ao tratamento de controle com ativina A e Wnt3a durante a etapa 1.

A **figura 21** mostra a expressão de vários marcadores de proteína e de RT-PCR em células através das múltiplas etapas de diferenciação, de acordo com os métodos descritos no Exemplo 17. As células H1 foram tratadas com 100 ng/mL de ativina A ou 100 ng/mL de GDF-8 durante um total de três dias, em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a durante o primeiro dia, ou vários compostos nas concentrações apresentadas a seguir (Composto 181, Composto 180, Composto 19, Composto 202, Composto 40, Composto 56 ou inibidor GSK3 BIO) adicionados somente no primeiro dia. A análise FACS quanto ao marcador de endoderma definitivo CXCR4 é mostrada em células após a primeira etapa de diferenciação, em que o tratamento combinou ativina A (**Painel A**) ou GDF-8 (**Painel B**) com Wnt3a ou vários compostos. A expressão de CXCR4 foi medida com o uso de uma sonda de anticorpo fluorescente e citometria de fluxo, produzindo as porcentagens de células positivas conforme mostrado. Nos painéis subsequentes da figura 21, valores normalizados de RT-PCR para vários marcadores de diferenciação são mostrados com os respectivos tratamentos usando ativina A ou GDF-8 durante a primeira etapa de diferenciação, conforme exposto a seguir: marcadores ao final da primeira etapa de diferenciação para tratamentos combinando ativina A (**Painel C**) ou GDF-8 (**Painel D**); marcadores ao final da terceira etapa de diferenciação para tratamentos combinando ativina A (**Painel E**) ou GDF-8 (**Painel F**); marcadores ao final da quarta etapa de diferenciação para tratamentos combinando ativina A (**Painel G**) ou GDF-8 (**Painel H**); marcadores ao final da quinta etapa de diferenciação para tratamentos combinando ativina A (**Painel I**) ou GDF-8 (**Painel J**). Na conclusão da quinta etapa de diferenciação, realizou-se uma análise de alto conteúdo para medir os números de células recuperadas para os tratamentos correspondentes durante a primeira etapa de diferenciação usando ativina A (**Painel K**) ou GDF-8 (**Painel M**). A análise de alto conteúdo foi, também, usada para medir a intensidade de glucagon e insulina nas populações de células recuperadas ao final da quinta etapa de diferenciação, correspondente ao tratamento com ativina A (**Painel L**) ou

GDF-8 (**Painel N**) durante a primeira etapa de diferenciação.

A **figura 22** mostra a expressão de vários marcadores de proteína e RT-PCR em células tratadas de acordo com os métodos descritos no Exemplo 18. As células H1 foram tratadas com 100 ng/mL de ativina A ou 5 100 ng/mL de GDF-8 durante um total de três dias, em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a durante o primeiro dia, ou 2,5 μ M de Composto 40, ou 2,5 μ M de Composto 202, somente no primeiro dia. A **figura 22, painel A** mostra a análise de FACS quanto ao marcador de endoderma definitivo, CXCR4, em células após a primeira etapa de diferenciação. A expressão de 10 CXCR4 foi medida com o uso de uma sonda de anticorpo fluorescente e citometria de fluxo, produzindo as porcentagens de células positivas conforme mostrado. Na **figura 22, painel B**, valores normalizados de RT-PCR para vários marcadores de diferenciação em células recuperadas após a quarta etapa de diferenciação são mostrados correspondendo aos 15 respectivos tratamentos usando ativina A/Wnt3a, ou GDF-8/Composto 40, ou GDF-8/Composto 202, durante a primeira etapa de diferenciação.

A **figura 23** mostra o teor de peptídeo C detectado em camundongos SCID beges que receberam células ao final da quarta etapa do protocolo de diferenciação, conforme descrito no Exemplo 18.

20 A **figura 24, painel A**, mostra a expressão de CXCR4, conforme determinado por FACS, em células ao final da primeira etapa do protocolo de diferenciação descrito no Exemplo 19. O painel B mostra a expressão de vários genes, conforme determinado por RT-PCR em células ao final da quarta etapa do protocolo de diferenciação descrito no Exemplo 19. São 25 mostradas duas réplicas experimentais diferentes (Rep-1 e Rep-2), cada qual submetida a protocolos de tratamento idênticos. O painel C mostra o teor de peptídeo C detectado em camundongos SCID beges que receberam células ao final da etapa quatro do protocolo de diferenciação, conforme tratado com GDF-8 e Wnt3a durante a primeira etapa da diferenciação *in* 30 *vitro*. O painel D mostra o teor de peptídeo C detectado em camundongos SCID beges que receberam células ao final da etapa quatro do protocolo de diferenciação, conforme tratado com GDF-8 e Composto 28 durante a

primeira etapa da diferenciação *in vitro*.

A **figura 25** mostra o número de células (painel A) e a expressão de CXCR4 (painel B) oriundos de células cultivadas em microesferas portadoras, tratadas de acordo com os métodos da presente invenção, conforme descrito no Exemplo 22. As células foram cultivadas sobre microesferas de Cytodex3 sem tratamento (não diferenciadas), ou com tratamento combinando 100 ng/mL de ativina A com 20 ng/mL de Wnt3a (AAWnt3a), ou com vários tratamentos combinando GDF-8, conforme mostrado: 50 ng/mL de GDF-8 com 2,5 µM de Composto 34 (Cmp 34+8); ou 50 ng/mL de GDF-8 com 2,5 µM de Composto 34 e 50 ng/mL de PDGF (Cmp 34+8+D); ou 50 ng/mL de GDF-8 com 2,5 µM de Composto 34, 50 ng/mL de PDGF e 50 ng/mL de VEGF (Cmp 34+8+D+V); ou 50 ng/mL de GDF-8 com 2,5 µM de Composto 34, 50 ng/mL de PDGF, 50 ng/mL de VEGF e 20 ng/mL de muscimol (Cmp 34+8+D+V+M).

A **figura 26** mostra a proliferação de células em seguida ao tratamento dos compostos da presente invenção, conforme descrito no Exemplo 23. Os **painéis B a I** mostram resultados de teste para tratamento com o uso de um composto em combinação com GDF-8 e medindo-se as leituras de MTS OD a 1 dia, 2 dias e 3 dias após o início do teste de diferenciação.

A **figura 27** mostra a expressão de várias proteínas e genes oriundos de células cultivadas em microesferas portadoras, tratadas de acordo com os métodos da presente invenção. O **painel A** mostra a porcentagem de expressão positiva de CXCR4, CD99 e CD9, conforme determinado por FACS em células ao final da primeira etapa do protocolo de diferenciação descrito no Exemplo 24. O **painel B** mostra células recuperadas de tratamentos conforme mostrado, diferenciadas através da etapa três do protocolo de diferenciação. O **painel C** mostra os valores de ddCT para vários marcadores genéticos expressos nas células tratadas conforme mostrado na etapa, e diferenciado através da etapa três do protocolo.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Com propósitos de esclarecimento da descrição, e sem propó-

sitos de limitação, a descrição detalhada da invenção é dividida nas subseções a seguir que descrevem ou ilustram determinadas características, modalidades ou aplicações da presente invenção.

Definições

5 Células-tronco são células não diferenciadas definidas por sua capacidade, em nível unicelular, tanto para autorrenovação como para diferenciação a fim de produzir células-progênie, inclusive progenitoras autorrenováveis, progenitoras não renováveis e células terminalmente diferenciadas. As células-tronco são também caracterizadas por sua capa-
10 cidade de se diferenciar, *in vitro*, em células funcionais de várias linhagens celulares de múltiplas camadas germinativas (endoderma, mesoderma e ectoderma), bem como por sua capacidade de originar, após transplante, tecidos de múltiplas camadas germinativas e de contribuir substancialmente para a maioria, senão todos, dos tecidos após a injeção em blastocistos.

15 As células-tronco são classificadas de acordo com seu potencial de desenvolvimento como: (1) totipotentes, o que significa que são capazes de dar origem a todos os tipos de células embrionárias e extraembrionárias; (2) pluripotentes, o que significa que são capazes de dar origem a todos os tipos de célula embrionária; (3) multipotentes, o que significa que são
20 capazes de dar origem a um subconjunto de linhagens celulares, porém todos dentro de um tecido, órgão ou sistema fisiológico específico (por exemplo, células-tronco hematopoiéticas (HSC) podem produzir progênie que inclui HSC (autorrenovação), progenitoras oligopotentes restritas a células sanguíneas e todos os tipos de células e elementos (por exemplo,
25 plaquetas) que são componentes normais do sangue); (4) oligopotentes, o que significa que são capazes de dar origem a subconjuntos de linhagens celulares mais restritos que aqueles das células-tronco multipotentes; e (5) unipotentes, o que significa que são capazes de dar origem a uma única linhagem celular (por exemplo, células-tronco espermatogênicas).

30 A diferenciação é o processo pelo qual uma célula não especializada ("não comprometida") ou menos especializada adquire as características de uma célula especializada, como uma célula nervosa ou muscular.

Uma célula diferenciada ou induzida por diferenciação é aquela que assumiu uma posição mais especializada ("comprometida") dentro da linhagem de uma célula. O termo "comprometida", quando aplicado ao processo de diferenciação, refere-se a uma célula que avançou na rota de diferenciação até um ponto em que, sob circunstâncias normais, continuará a se diferenciar em um tipo específico de célula, ou em um subconjunto de tipos de célula, e não poderá, sob circunstâncias normais, diferenciar-se em um tipo de célula diferente, ou reverter para um tipo de célula menos diferenciado. A desdiferenciação refere-se ao processo pelo qual uma célula reverte a uma posição menos especializada (ou menos comprometida) dentro da linhagem celular. Para uso na presente invenção, a linhagem de uma célula define a hereditariedade da mesma, isto é, de quais células se originou e a quais células pode dar origem. A linhagem de uma célula a coloca dentro de um esquema hereditário de desenvolvimento e diferenciação. Um marcador específico de linhagem refere-se a uma característica especificamente associada ao fenótipo das células de uma linhagem em questão, e pode ser usado para avaliar a diferenciação de uma célula não comprometida em relação à linhagem em questão.

A expressão "linhagem de células β " refere-se a células com expressão gênica positiva para o fator de transcrição PDX-1 e pelo menos um dentre os seguintes fatores de transcrição: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF-3 beta, MAFA, PAX4 ou PAX6. Células que expressam marcadores característicos da linhagem de célula β incluem células β .

A expressão "células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo", ou "células em Estágio 1", ou "Estágio 1", para uso na presente invenção, refere-se a células que expressam pelo menos um dentre os seguintes marcadores: SOX17, GATA4, HNF-3 beta, GSC, CER1, Nodal, FGF8, braquiúria, proteína homeobox similar a Mix, FGF4 CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 ou OTX2. Células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo incluem

células precursoras da linha primitiva, células da linha primitiva, células de mesendoderma e células do endoderma definitivo.

5 A expressão "células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma pancreático", para uso na presente invenção, refere-se a células que expressam pelo menos um dentre os seguintes marcadores: PDX1, HNF-1 beta, PTF1 alfa, HNF6 ou HB9. Células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática incluem células endodérmicas pancreáticas, células do tubo intestinal primitivo, e células do trato digestivo superior posterior.

10 A expressão "células expressoras de marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática", ou "células em Estágio 5", ou "Estágio 5", para uso na presente invenção, refere-se a células que expressam pelo menos um dentre os seguintes marcadores: NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4 ou PTF-1 alfa. As células expressoras de marcadores
15 característicos da linhagem endócrina pancreática incluem células pancreáticas endócrinas, células pancreáticas expressoras de hormônio e células pancreáticas secretoras de hormônio, bem como células da linhagem de células β .

20 A expressão "endoderma definitivo", para uso na presente invenção, refere-se a células que apresentam as características de células oriundas do epiblasto durante a gastrulação, e que formam o trato gastrointestinal e seus derivados. As células de endoderma definitivo expressam os seguintes marcadores: HNF-3 beta, GATA4, SOX-17, Cerberus, OTX2, goosecoide, C-Kit, CD99 ou MIXL1.

25 A expressão "endoderma extraembrionário", para uso na presente invenção, refere-se a uma população de células que expressam pelo menos um dentre os seguintes marcadores: SOX7, AFP ou SPARC.

30 "Marcadores", para uso na presente invenção, são moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeo que são expressas diferencialmente em uma célula de interesse. Nesse contexto, "expressão diferencial" significa um nível aumentado para um marcador positivo e um nível diminuído para um marcador negativo. O nível detectável do ácido nucleico ou polipeptídeo do

marcador é suficientemente maior ou menor nas células em questão, em comparação com outras células, de modo que a célula em questão pode ser identificada e distinguida de outras células com o uso de qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos na técnica.

5 A expressão "célula de mesendoderma", para uso na presente invenção, refere-se a uma célula que expressa pelo menos um dentre os seguintes marcadores: CD48, eomesodermina (EOMES), SOX17, DKK4, HNF-3 beta, GSC, FGF17 ou GATA-6.

10 Os termos "célula pancreática endócrina", ou "célula que expressa hormônio pancreático", para uso na presente invenção, referem-se a uma célula capaz de expressar pelo menos um dentre os seguintes hormônios: insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático.

15 A expressão "célula de endoderma pancreático", ou "células em Estágio 4", ou "Estágio 4", para uso na presente invenção, refere-se a uma célula capaz de expressar pelo menos um dentre os seguintes marcadores: NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, PAX4 ou NKX2.2.

20 "Célula produtora de hormônio pancreático", para uso na presente invenção, refere-se a uma célula capaz de produzir pelo menos um dos seguintes hormônios: insulina, glucagon, somatostatina, e polipeptídeo pancreático.

A expressão "célula pancreática secretora de hormônio", para uso na presente invenção, refere-se a uma célula capaz de secretar pelo menos um dentre os seguintes hormônios: insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático.

25 A expressão "célula posterior do intestino anterior", ou "células em Estágio 3", ou "Estágio 3", para uso na presente invenção, refere-se a uma célula capaz de secretar pelo menos um dentre os seguintes marcadores: PDX1, HNF1, PTF-1 alfa, HNF6, HB-9 ou PROX-1.

30 "Célula pré-linha primitiva", para uso na presente invenção, refere-se a uma célula que expressa pelo menos um dos seguintes marcadores: Nodal, ou FGF8.

A expressão "célula do tubo intestinal primitivo", ou "células em

Estágio 2", ou "Estágio 2", para uso na presente invenção, refere-se a uma célula capaz de secretar pelo menos um dentre os seguintes marcadores: HNF1, HNF-4 alfa.

5 "Célula da linha primitiva", para uso na presente invenção, refere-se a uma célula que expressa pelo menos um dos seguintes marcadores: Brachyury, proteína Mix-like homeobox, ou FGF4.

Isolamento, expansão e cultura de células-tronco pluripotentes

Caracterização de células-tronco pluripotentes

10 A pluripotência das células-tronco pluripotentes pode ser confirmada, por exemplo, injetando-se as células em camundongos com imunodeficiência combinada grave (SCID), fixando-se os teratomas que se formam com o uso de 4% de paraformaldeído e, então, examinando-os histologicamente quanto a evidências dos tipos de célula oriundos das três camadas germinativas. Alternativamente, a pluripotência pode ser determi-
15 nada criando-se corpos embriões e avaliando-os quanto à presença de marcadores associados às três camadas germinais.

As linhagens de células-tronco pluripotentes propagadas podem ser submetidas a cariotipagem com o uso de uma técnica-padrão de bandamento G, sendo então comparadas aos cariótipos publicados das
20 espécies de primata correspondentes. É desejável a obtenção de células que tenham um "cariótipo normal", o que significa que as células são euploides, em que todos os cromossomos humanos estão presentes e sem alterações perceptíveis.

Fontes de células-tronco pluripotentes

25 Os tipos de células-tronco pluripotentes que podem ser usados incluem linhagens estabelecidas de células pluripotentes derivadas de tecido formado após a gestação, inclusive tecido pré-embriônico (como um blastocisto), tecido embrionário ou tecido fetal coletado a qualquer tempo durante a gestação, tipicamente porém não necessariamente antes de
30 aproximadamente 10 a 12 semanas de gestação. Alguns exemplos não limitadores consistem em linhagens estabelecidas de células-tronco embrionárias humanas ou células germinativas embrionárias humanas, como as

linhagens de célula-tronco embrionária humana H1, H7 e H9 (WiCell). É também contemplado o uso das composições desta descrição durante o estabelecimento inicial ou a estabilização dessas células, caso no qual as células-fonte seriam células pluripotentes primárias coletadas diretamente dos tecidos-fonte. São adequadas, também, as células coletadas de uma população de células-tronco pluripotentes já cultivadas na ausência de células mantenedoras. São adequadas, também, as linhagens de célula-tronco embrionária humana mutantes, como BG01v (BresaGen, Athens, GA, EUA).

10 Em uma modalidade, as células-tronco embrionárias humanas são preparadas conforme descrito por Thomson *et al.* (patente US nº 5.843.780; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 92:7844, 1995).

15 Em uma modalidade, as células-tronco pluripotentes são preparadas conforme descrito por Takahashi *et al.* (Cell 131: 1-12, 2007).

Cultura de células-tronco pluripotentes

20 Em uma modalidade, as células-tronco pluripotentes são tipicamente cultivadas sobre uma camada de células alimentadoras que de várias maneiras oferecem suporte às células-tronco pluripotentes. Alternativamente, as células-tronco pluripotentes são cultivadas em um sistema de cultura que é essencialmente isento de células nutrizas mas que, mesmo assim, suporte a proliferação de células-tronco pluripotentes sem que ocorra uma diferenciação substancial. A proliferação de células-tronco pluripotentes em um meio de cultura isento de células nutrizas sem diferenciação é suportado com o uso de um meio condicionado pelo cultivo prévio com outro tipo de célula. Alternativamente, o crescimento de células-tronco pluripotentes em meio de cultura isento de células nutrizas sem diferenciação é suportado com o uso de um meio quimicamente definido.

30 As células-tronco pluripotentes podem ser aplicadas sobre um substrato de cultura adequado. Em uma modalidade, o substrato de cultura adequado é um componente de matriz extracelular, como aqueles derivados de membrana basal, que possa fazer parte dos acoplamentos receptor-

ligante das moléculas de adesão. Em uma modalidade, o substrato de cultura adequado consiste em MATRIGEL® (Becton Dickenson). MATRIGEL® é uma preparação solúvel feita a partir de células tumorais Engelbreth-Holm-Swarm, que se gelifica à temperatura ambiente para formar
5 uma membrana basal reconstituída.

Outros componentes e misturas de componentes de arranjo extracelular são adequados como alternativa. Dependendo do tipo de célula sendo submetido à proliferação, isto pode incluir laminina, fibronectina, proteoglicano, entactina, sulfato de heparano, e similares, sozinhos ou em
10 várias combinações.

As células-tronco pluripotentes podem ser aplicadas sobre o substrato em uma distribuição adequada e na presença de um meio que promova a sobrevivência, a propagação e a retenção das características desejáveis. Todas essas características se beneficiam da cuidadosa atenção
15 à distribuição da semente, e podem ser prontamente determinadas pelo versado na técnica.

O meio de cultura adequado pode ser produzido a partir dos seguintes componentes, como o meio Eagle modificado da Dulbecco (DMEM), Gibco n° 11965-092; meio Eagle modificado Knockout da Dulbecco
20 (KO DMEM), Gibco n° 10829-018; meio basal DMEM F12/50% da Ham; 200 mM de L-glutamina, Gibco n° 15039-027; solução de aminoácidos não essenciais, Gibco 11140-050; β-mercapto etanol, Sigma n° M7522; fator de crescimento de fibroblastos básico recombinante humano (bFGF), Gibco n° 13256-029.

25 Formação de células produtoras de hormônio pancreático a partir de células-tronco pluripotentes

Em uma modalidade, a presente invenção apresenta um método para produção de células produtoras de hormônio pancreático a partir de células-tronco pluripotentes, compreendendo as etapas de:

- 30
- a. cultivar células-tronco pluripotentes,
 - b. diferenciar as células-tronco pluripotentes nas células que expressam características de marcadores da linhagem endodérmica

definitiva,

c. diferenciar as células que expressam características de marcadores da linhagem endodérmica definitiva em células que expressam características de marcadores da linhagem endodérmica pancreática, e

5 d. diferenciar as células que expressam características de marcadores da linhagem endodérmica pancreática em células que expressam características de marcadores da linhagem endodérmica pancreática.

Em um aspecto da presente invenção, a célula pancreática endócrina é uma célula produtora de hormônio pancreático. Em um aspecto
10 alternativo, a célula pancreática endócrina é uma célula que expressa marcadores característicos da linhagem de células β . Uma célula que expressa marcadores característicos da linhagem de células β expressa PDX1 e pelo menos um dentre os seguintes fatores de transcrição: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF-3 beta, MAFA, PAX4 ou Pax6. Em
15 um aspecto da presente invenção, uma célula que expressa marcadores característicos da linhagem de células β é uma célula β .

As células-tronco pluripotentes adequadas ao uso na presente invenção incluem, por exemplo, a linhagem H9 de células-tronco embrionárias humanas (código NIH: WA09), a linhagem H1 de células-tronco
20 embrionárias humanas (código NIH: WA01), a linhagem H7 de células-tronco embrionárias humanas (código NIH: WA07) e a linhagem SA002 de células-tronco embrionárias humanas (Cellartis, Suécia). São adequadas ao uso na presente invenção, também, as células que expressam pelo menos um dentre os seguintes marcadores característicos de células pluripotentes:
25 ABCG2, cripto, CD9, FOXD3, Conexina43, Conexina45, OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra1-60, ou Tra1-81.

As células-tronco pluripotentes podem ser cultivadas sobre uma camada de células nutrízes. Alternativamente, as células-tronco pluripotentes podem ser cultivadas sobre uma matriz extracelular. A matriz extracelular
30 pode consistir em uma preparação de membrana basal solubilizada, extraída de células de sarcoma de camundongo (conforme vendida pela BD Biosciences sob o nome comercial de MATRIGEL[®]). Alternativamente, a

matriz extracelular pode consistir em MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento. Alternativamente, a matriz extracelular pode consistir em fibronectina. Em uma modalidade alternativa, as células-tronco pluripotentes são cultivadas e diferenciadas sobre substrato para cultura de tecidos revestido com soro humano.

O arranjo extracelular pode ser diluída antes do revestimento do substrato para cultura de tecidos. Exemplos de métodos adequados para diluição da matriz extracelular e para revestimento do substrato para cultura de tecidos podem ser encontrados em Kleinman, H.K., *et al.*, *Biochemistry* 25:312 (1986), e em Hadley, M.A., *et al.*, *J.Cell.Biol.* 101:1511 (1985).

Em uma modalidade, a matriz extracelular consiste em MATRIGEL[®]. Em uma modalidade, o substrato para cultura de tecidos é revestido com MATRIGEL[®] a uma diluição de 1:10. Em uma modalidade alternativa, o substrato para cultura de tecidos é revestido com MATRIGEL[®] a uma diluição de 1:15. Em uma modalidade alternativa, o substrato para cultura de tecidos é revestido com MATRIGEL[®] a uma diluição de 1:30. Em uma modalidade alternativa, o substrato para cultura de tecidos é revestido com MATRIGEL[®] a uma diluição de 1:60.

Em uma modalidade, a matriz extracelular consiste em MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento. Em uma modalidade, o substrato para cultura de tecidos é revestido com MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento a uma diluição de 1:10. Em uma modalidade alternativa, o substrato para cultura de tecidos é revestido com MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento a uma diluição de 1:15. Em uma modalidade alternativa, o substrato para cultura de tecidos é revestido com MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento a uma diluição de 1:30. Em uma modalidade alternativa, o substrato para cultura de tecidos é revestido com MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento a uma diluição de 1:60.

Marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo são selecionados a partir do grupo consistindo em SOX17, GATA4, 3HNF-, GSC, CER1, Nodal, FGF8, Brachyury, proteína Mix-like homeobox, FGF4

CD48, eomesodermina (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, e OTX2. Uma célula que expressa pelo menos um dos marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo é adequada para uso na presente invenção. Em um aspecto da presente invenção, uma célula que expressa marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo é uma célula precursora da linha primitiva. Em um aspecto alternativo, uma célula que expressa marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo é uma célula do mesendoderma. Em um aspecto alternativo, uma célula que expressa marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo é uma célula do endoderma definitivo.

Os marcadores característicos da linhagem de endoderma pancreático são selecionados a partir do grupo consistindo em PDX1, HNF-1 beta, PTF1 alfa, HNF6, HB9 e PROX1. Uma célula que expressa pelo menos um dos marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática é adequada para uso na presente invenção. Em um aspecto da presente invenção, uma célula que expressa marcadores característicos da linhagem do endoderma pancreático é uma célula do endoderma pancreático.

Os marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática são selecionados a partir do grupo consistindo em NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4 e PTF-1 alfa. Em uma modalidade, uma célula pancreática endócrina é capaz de expressar pelo menos um dentre os seguintes hormônios: insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático. É adequada ao uso na presente invenção uma célula que expressa pelo menos um dos marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática. Em um aspecto da presente invenção, uma célula que expressa marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática é uma célula pancreática endócrina. A célula pancreática endócrina pode ser uma célula pancreática que expressa de hormônio. Alternativamente, a célula pancreática endócrina pode ser uma célula pancreática secretora de hormônio.

Formação de células que expressam marcadores característicos

da linhagem de endoderma definitivo

Em um aspecto da presente invenção, as células-tronco pluripotentes podem ser diferenciadas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo mediante cultivo das células-tronco pluripotentes em um meio compreendendo uma quantidade suficiente de GDF-8 para causar a diferenciação das células-tronco pluripotentes em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo.

As células-tronco pluripotentes podem ser cultivadas no meio contendo uma quantidade suficiente de GDF-8 durante cerca de um dia a cerca de sete dias. Alternativamente, as células-tronco pluripotentes podem ser cultivadas no meio contendo uma quantidade suficiente de GDF-8 durante cerca de um dia a cerca de seis dias. Alternativamente, as células-tronco pluripotentes podem ser cultivadas no meio contendo uma quantidade suficiente de GDF-8 durante cerca de um dia a cerca de cinco dias. Alternativamente, as células-tronco pluripotentes podem ser cultivadas no meio contendo uma quantidade suficiente de GDF-8 durante cerca de um dia a cerca de quatro dias. Alternativamente, as células-tronco pluripotentes podem ser cultivadas no meio contendo uma quantidade suficiente de GDF-8 durante cerca de um dia a cerca de três dias. Alternativamente, as células-tronco pluripotentes podem ser cultivadas no meio contendo uma quantidade suficiente de GDF-8 durante cerca de um dia a cerca de dois dias. Alternativamente, as células-tronco pluripotentes podem ser cultivadas no meio contendo uma quantidade suficiente de GDF-8 durante cerca de um dia.

Em uma modalidade, o GDF-8 é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 500 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o GDF-8 é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 50 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o GDF-8 é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 25 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o GDF-8 é usado a uma concentração de cerca de 25 ng/mL.

Em uma modalidade, o meio compreendendo uma quantidade suficiente de GDF-8 também contém pelo menos um outro fator. Em uma

modalidade, o pelo menos um outro fator é selecionado do grupo consistindo em: EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, VEGF, muscimol, PD98059, LY294002, U0124, U0126 e butirato de sódio.

5 Em uma modalidade, o EGF é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 500 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o EGF é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 50 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o EGF é usado a uma concentração de cerca de 50 ng/mL.

10 Em uma modalidade, o FGF4 é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 500 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o FGF4 é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 50 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o FGF4 é usado a uma concentração de cerca de 50 ng/mL.

15 Em uma modalidade, o PDGF-A é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 500 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o PDGF-A é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 50 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o PDGF-A é usado a uma concentração de cerca de 50 ng/mL.

20 Em uma modalidade, o PDGF-B é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 500 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o PDGF-B é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 50 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o PDGF-B é usado a uma concentração de cerca de 50 ng/mL.

25 Em uma modalidade, o PDGF-C é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 500 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o PDGF-C é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 50 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o PDGF-C é usado a uma concentração de cerca de 50 ng/mL.

30 Em uma modalidade, o PDGF-D é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 500 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o PDGF-D é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 50 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o PDGF-D é usado a uma

concentração de cerca de 50 ng/mL.

Em uma modalidade, o VEGF é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 500 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o VEGF é usado a uma concentração de cerca de 5 ng/mL a cerca de 50 ng/mL. Em uma modalidade alternativa, o VEGF é usado a uma concentração de cerca de 50 ng/mL.

Em uma modalidade, o muscimol é usado a uma concentração de cerca de 1 μ M a cerca de 200 μ M. Em uma modalidade alternativa, o muscimol é usado a uma concentração de cerca de 1 μ M a cerca de 20 μ M. Em uma modalidade alternativa, o muscimol é usado a uma concentração de cerca de 20 μ M.

Em uma modalidade, o PD98059 é usado a uma concentração de cerca de 0,1 μ M a cerca de 10 μ M. Em uma modalidade alternativa, o PD98059 é usado a uma concentração de cerca de 0,1 μ M a cerca de 1 μ M. Em uma modalidade alternativa, o PD98059 é usado a uma concentração de cerca de 1 μ M.

Em uma modalidade, o LY294002 é usado a uma concentração de cerca de 0,25 μ M a cerca de 25 μ M. Em uma modalidade alternativa, o LY294002 é usado a uma concentração de cerca de 0,25 μ M a cerca de 2,5 μ M. Em uma modalidade alternativa, o LY294002 é usado a uma concentração de cerca de 2,5 μ M.

Em uma modalidade, o U0124 é usado a uma concentração de cerca de 0,1 μ M a cerca de 10 μ M. Em uma modalidade alternativa, o U0124 é usado a uma concentração de cerca de 0,1 μ M a cerca de 1 μ M. Em uma modalidade alternativa, o U0124 é usado a uma concentração de cerca de 1 μ M.

Em uma modalidade, o U0126 é usado a uma concentração de cerca de 0,1 μ M a cerca de 10 μ M. Em uma modalidade alternativa, o U0126 é usado a uma concentração de cerca de 0,1 μ M a cerca de 1 μ M. Em uma modalidade alternativa, o U0126 é usado a uma concentração de cerca de 1 μ M.

Em uma modalidade, o butirato de sódio é usado a uma

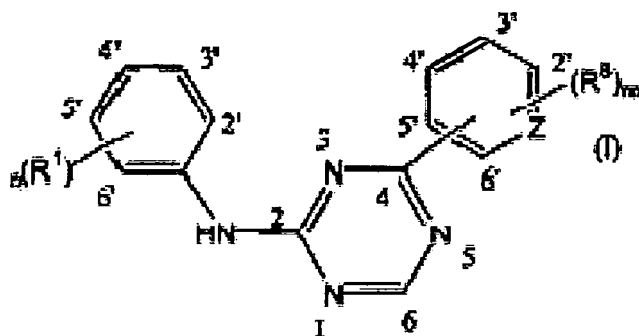
concentração de cerca de 0,05 µM a cerca de 5 µM. Em uma modalidade alternativa, o butirato de sódio é usado a uma concentração de cerca de 0,05 µM a cerca de 0,5 µM. Em uma modalidade alternativa, o butirato de sódio é usado a uma concentração de cerca de 0,5 µM.

5 Em uma modalidade alternativa, esse pelo menos um outro fator é selecionado do grupo consistindo em: uma anilina-piridinotriazina, uma anilina-piridinotriazina cíclica, N-[[1-(fenil metil)azepan-4-il]metil]-2-piridin-3-ilacetamida, 4-[[4-(4-[[2-(piridin-2-ilamino)etil]amino]-1,3,5-triazin-2-il)piridin-2-il]óxi]butan-1-ol, 3-([3-[4-([2-[metil(piridin-2-il)amino]etil)amino]-1,3,5-triazin-2-il]piridin-2-il]amino)propan-1-ol, N~4~-[2-(3-fluorofenil)etil]-N~2~-[3-(4-metil piperazin-1-il)propil]pirido[2,3-d]pirimidina-2,4-diamina, 1-metil-N-[(4-piridin-3-il-2-[[3-(trifluorometil)fenil]amino]-1,3-tiazol-5-il)metil]piperidina-4-carboxamida, {2-[4-([5-[3-(3-hidróxi propil)fenil]-4H-1,2,4-triazol-3-il]amino)fenil]etil}carbamato de 1,1-dimetiletila, {[3-([5-[5-(3-hidróxi propil)-2-(metilóxi)fenil]-1,3-oxazol-2-il]amino)fenil]metil}carbamato de 1,1-dimetiletila, 1-([5-[6-([4-[(4-metil piperazin-1-il)sulfonil]fenil]amino)pirazin-2-il]tiofen-2-il]metil]piperidín-4-ol, 1-([4-[6-([4-[(4-metil piperazin-1-il)sulfonil]fenil]amino)pirazin-2-il]tiofen-2-il]metil]piperidina-4-carboxamida, e 2-[[4-(1-metiletil)fenil]amino]-N-(2-tiofen-2-iletíl)-7,8-diidropirido[4,3-d]pirimidina-20 6(5H)-carboxamida.

Os compostos da presente invenção

A presente invenção apresenta compostos que são capazes de diferenciar células-tronco pluripotentes em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo.

25 Em uma modalidade, o composto que é capaz de diferenciar células-tronco pluripotentes em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo é uma anilina-piridinotriazina com a Fórmula (1):



Fórmula (1).

As formas de N-óxido, os sais de adição farmacologicamente aceitáveis e as formas estereoquimicamente isoméricas da mesma, em que:

m representa um número inteiro de 1 a 4; n representa um número inteiro de 1 a 4; Z representa N ou C;

cada um dentre R^1 e R^8 representa, independentemente, hidrogênio, Het^{14} , ciano, halo, hidróxi, C_{1-6} alcóxi-, C_{1-6} alquil-, mono ou di(C_{1-4} alquil)amino-carbonil-, mono ou di(C_{1-4} alquil)amino-sulfonila, C_{1-6} alcóxi-substituído com halo ou R^1 representa C_{1-6} alquila substituída com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados a partir de hidróxi ou halo;

cada um dentre R^2 e R^9 representa, independentemente, hidrogênio, C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, Het^3 , Het^4 - C_{1-4} alquil-, Het^5 - C_{1-4} alquilcarbonil-, mono ou di(C_{1-4} alquil)amino- C_{1-4} alquil-carbonil- ou fenila opcionalmente substituída com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados a partir de hidrogênio, hidróxi, amino ou C_{1-4} alquilóxi-;

cada um dentre R^3 e R^7 representa, independentemente, hidrogênio, C_{1-4} alquila, Het^6 , Het^7 - C_{1-4} alquil-, C_{2-4} alquenilcarbonil- opcionalmente substituído com Het^8 - C_{1-4} alquilaminocarbonil-, C_{2-4} alquenilsulfonil-, C_{1-4} alquilóxi, C_{1-4} alquil- ou fenila opcionalmente substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados a partir de hidrogênio, hidróxi, amino ou C_{1-4} alquilóxi-;

cada um dentre R^4 , R^5 , R^6 e R^{10} representa, independentemente, hidrogênio ou C_{1-4} alquila opcionalmente substituído com hidróxi, Het^9 ou C_{1-4} alquilóxi;

cada um dentre Het^1 e Het^2 representa, independentemente, um

heterociclo selecionado a partir de pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, piridinila, pirimidinila, pirazinila, imidazolidinila ou pirazolidinila, sendo que os ditos Het¹ e Het² são, opcionalmente, substituídos com amino, hidróxi, C₁₋₄alquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, fenila, fenil-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquil-óxi-C₁₋₄alquil-
5 mono ou di(C₁₋₄alquil) amino- ou amino-carbonil-;

cada um dentre Het³ e Het⁶ representa, independentemente, um heterociclo selecionado a partir de pirrolidinila ou piperidinila, sendo que os ditos Het³ e Het⁶ são, opcionalmente, substituídos com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-;
10

cada um dentre Het⁴, Het⁷ e Het⁹ representa, independentemente, um heterociclo selecionado a partir de morfolinila, pirrolidinila, piperazinila ou piperidinila, sendo que os ditos Het⁴, Het⁷ e Het⁹ são, opcionalmente, substituídos com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-;
15

Het⁵ representa um heterociclo selecionado a partir de morfolinila, pirrolidinila, piperazinila ou piperidinila, sendo que o dito Het⁵ é, opcionalmente, substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados a partir de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-;
20

cada um dentre Het¹⁰, Het¹¹ e Het¹³ representa, independentemente, um heterociclo selecionado a partir de pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, piridinila, pirimidinila, pirazinila, imidazolidinila ou pirazolidinila, sendo que os ditos Het¹⁰, Het¹¹ e Het¹³ são, opcionalmente, substituídos com amino, hidróxi, C₁₋₄alquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, fenila, fenil-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquil-óxi-C₁₋₄alquil-, amino-carbonil- ou mono ou di(C₁₋₄alquil)amino-;
25

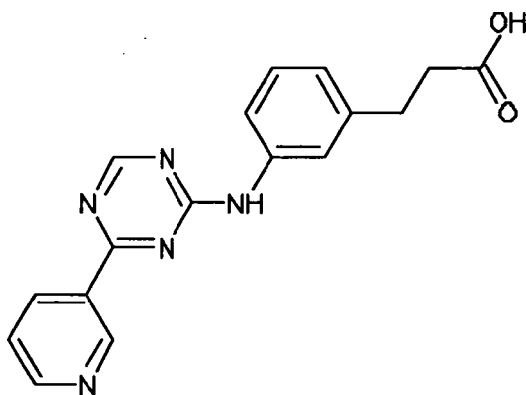
Het¹² representa um heterociclo selecionado a partir de pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, piridinila, pirimidinila, pirazinila, imidazolidinila ou pirazolidinila, sendo que o dito Het¹² é, opcionalmente, substituído com amino, hidróxi, C₁₋₄alquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, fenila, fenil-C₁₋₄alquil-, C₁₋
30

4alquil-óxi-C₁₋₄alquil-; mono ou di(C₁₋₄alquil)amino- ou amino-carbonil-;

Het¹⁴ representa um heterociclo selecionado a partir de morfolinila, pirrolidinila, piperazinila, imidazolila, pirrolila, 2,3,4-triazapirrolila, 1,2,3-triazolila, pirazolila ou piperidinila, sendo que o dito Het¹⁴ é, 5 opcionalmente, substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-; particularmente, Het¹⁴ representa um heterociclo selecionado a partir de morfolinila, pirrolidinila, pirrolila, 2,3,4-triazapirrolila, piperazinila ou piperidinila, sendo que o dito 10 Het¹⁴ é, opcionalmente, substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-; mais particularmente, Het¹⁴ representa um heterociclo selecionado a partir de morfolinila, pirrolidinila, piperazinila ou piperidinila, sendo que o dito Het¹⁴ é, opcional- 15 mente, substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-.

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (1).

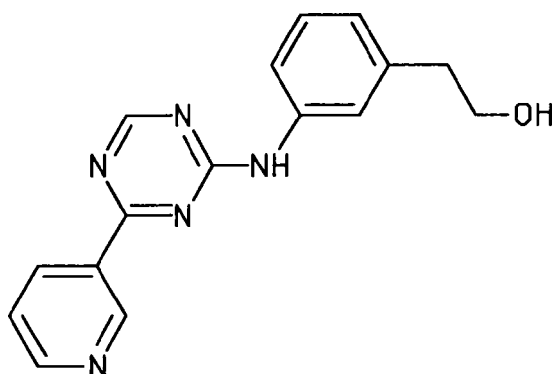
20 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (2).



Fórmula (2): ácido 3-{3-[(4-piridin-3-il)-1,3,5-triazin-2-il]amino}fe- 25 nil}propanoico. Chamado, na presente invenção, de "Composto 1".

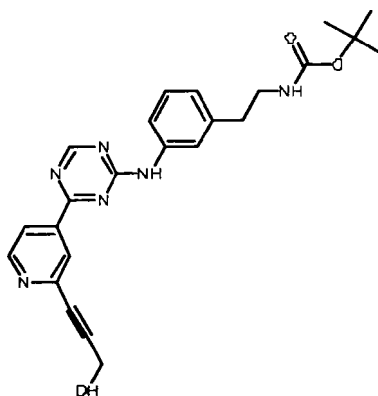
Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da

Fórmula (3).



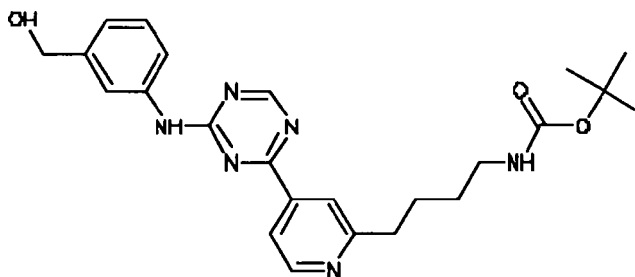
Fórmula (3): 2-[3-[(4-piridin-3-il-1,3,5-triazin-2-il)amino]fenil]etanol. chamado, na presente invenção, de "Composto 2".

5 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (4).



10 Fórmula (4): {2-[3-({4-[2-(3-hidroxi-prop-1-in-1-il)piridin-4-il]-1,3,5-triazin-2-il}amino)fenil]etil}carbamato de 1,1-dimetiletila. Chamado, na presente invenção, de "Composto 3".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (5).

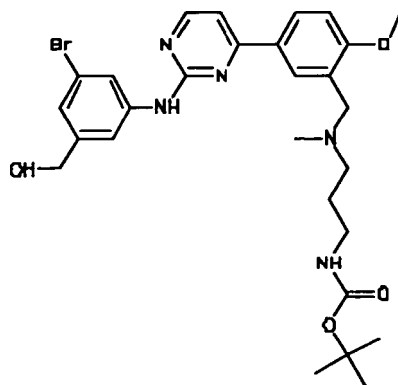


Fórmula (5): {4-[4-(4-[(3-(hidroximetil)fenil]amino)-1,3,5-triazin-2-

il)piridin-2-il]butil}carbamato de 1,1-dimetiletila. Chamado, na presente invenção, de "Composto 4".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (6).

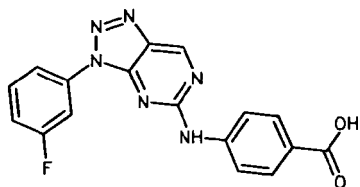
5



Fórmula (6): {3-[[5-(2-[[3-bromo-5-(hidroximetil)fenil]amino]pirimidin-4-il)-2-(metilóxi)fenil]metil}(metil)amino]propil}carbamato de 1,1-dimetiletila. Chamado, na presente invenção, de "Composto 5".

10

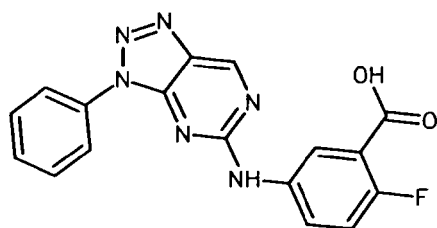
Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (7).



Fórmula (7): ácido 4-[[3-(3-fluorofenil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-5-il]amino}benzoico. Chamado, na presente invenção, de "Composto 6".

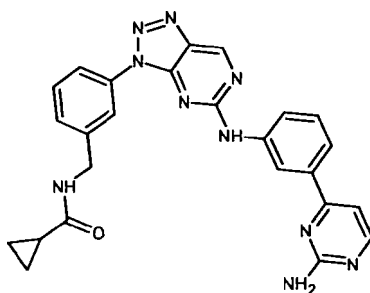
15

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (8).



Fórmula (8): ácido 2-fluoro-5-[(3-fenil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-5-il)amino]benzoico. Chamado, na presente invenção, de "Composto 7".

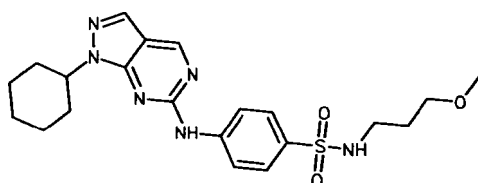
- 5 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (9).



Fórmula (9): N-[[3-(5-[[3-(2-aminopirimidin-4-il)fenil]amino]-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il)fenil]metil]ciclopropanocarboxamida.

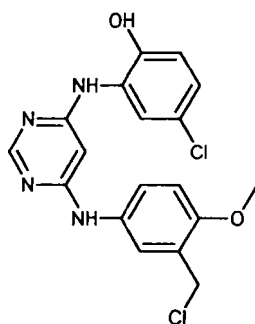
- 10 Chamado, na presente invenção, de "Composto 8".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (10).



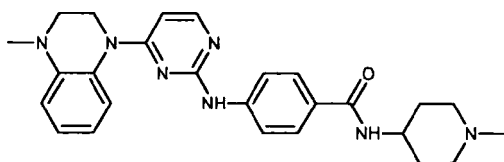
- 15 Fórmula (10): 4-[(1-ciclo-hexil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-il)amino]-N-[3-(metilóxi)propil]benzenossulfonamida. Chamado, na presente invenção, de "Composto 9".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (11).



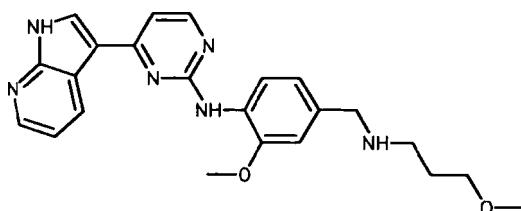
Fórmula (11): 4-cloro-2-[(6-[[3-(clorometil)-4-metoxifenil]amino]pirimidin-4-il)amino]fenol. Chamado, na presente invenção, de "Composto 10".

5 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (12).



Fórmula (12): 4-[[4-(4-metil-3,4-di-hidroquinoxalin-1(2H)-il)pirimidin-2-il]amino]-N-(1-metilpiperidin-4-il)benzamida. Chamado, na presente invenção, de "Composto 11".

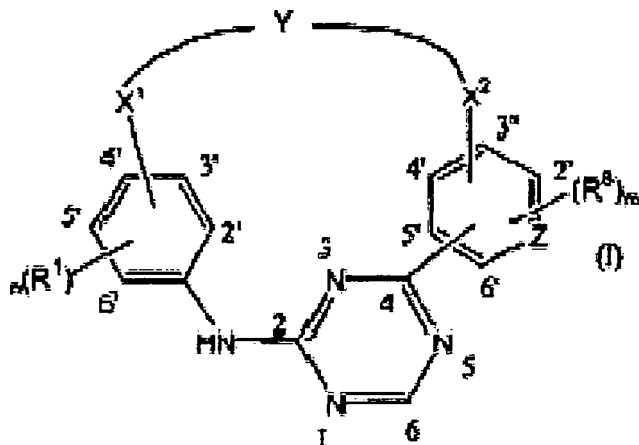
10 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina é um composto da Fórmula (13).



Fórmula (13): N-(2-metóxi-4-[[3-(3-metóxi propil)amino]metil]fenil)-4-(1H-pirrólo[2,3-b]piridin-3-il)pirimidin-2-amina. Chamado, na presente invenção, de "Composto 12".

15 Em uma modalidade, o composto que é capaz de diferenciar células-tronco pluripotentes em células expressoras de marcadores caracte-

rísticos da linhagem de endoderma definitivo é uma anilina-piridinotriazina cíclica com a Fórmula (14):



Fórmula (14).

As formas de N-óxido, os sais de adição farmacologicamente aceitáveis e as formas estereoquimicamente isoméricas da mesma, em que:

5 m representa um número inteiro de 1 a 4; n representa um número inteiro de 1 a 4; Z representa N ou C;

Y representa $-NR^2-C_{1-6}alquil-CO-NR^4-$, $-C_{1-4}alkyl-NR^9-C_{1-4}alquil-$, $C_{1-6}alquil-CO-Het^{10}-$, $-Het^{11}-CO-C_{1-6}alquil-$, $-Het^{12}-C_{1-6}alquil-$, $-CO-Het^{13}-C_{1-6}alquil-$, $-CO-NR^{10}-C_{1-6}alquil-$, $-Het^1-C_{1-6}alquil-CO-NR^5-$, or $-Het^2-CO-NR^6-$, sendo que o ligante $-C_{1-6}alquil-$ em $-NR^2-C_{1-6}alquil-CO-NR^4-$ ou $-Het^1-C_{1-6}alquil-CO-NR^5-$ é, opcionalmente, substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de hidróxi, metóxi, amino carbonila, halo, fenila, indolila, sulfeto de metila, tiol, hidróxi fenila, cianofenila, amino e

15 hidroxicarbonila;

X^1 representa uma ligação direta, $C_{1-4}alquila$, $C_{1-4}alquilóxi-$, $C_{1-4}alquil-CO-$, $C_{2-4}alquenila$, $C_{2-4}alquinila$, ou $C_{1-4}alquil-NR^3-$, sendo que a dita $C_{1-4}alquila$ ou $C_{2-4}alquenila$ é, opcionalmente, substituída com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes halo;

20 X^2 representa uma ligação direta, $C_{1-4}alquila$, $C_{1-4}alquilóxi-$, $C_{1-4}alquil-CO-$, $C_{2-4}alquenila$, $C_{2-4}alquinila$, ou $C_{1-4}alquil-NR^7-$, sendo que a dita $C_{1-4}alquila$ ou $C_{2-4}alquenila$ é, opcionalmente, substituída com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes halo;

cada um dentre R^1 e R^8 representa, independentemente,

hidrogênio, Het¹⁴, ciano, halo, hidróxi, C₁₋₆alcóxi-, C₁₋₆alquil-, mono ou di(C₁₋₄alquil)amino-carbonil-, mono ou di(C₁₋₄alquil)amino-sulfonila, C₁₋₆alcóxi-substituído com halo ou R¹ representa C₁₋₆alquila substituída com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados a partir de hidróxi ou halo;

5 cada um dentre R² e R⁹ representa, independentemente, hidrogênio, C₁₋₄alquila, C₂₋₄alquenila, Het³, Het⁴-C₁₋₄alquil-, Het⁵-C₁₋₄alquil carbonil-, mono ou di(C₁₋₄alquil)amino-C₁₋₄alquil-carbonil- ou fenila opcionalmente substituída com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados a partir de hidrogênio, hidróxi, amino ou C₁₋₄alquilóxi-;

10 cada um dentre R³ e R⁷ representa, independentemente, hidrogênio, C₁₋₄alquila, Het⁶, Het⁷-C₁₋₄alquil-, C₂₋₄alquenilcarbonil- opcionalmente substituído com Het⁸-C₁₋₄alquilaminocarbonil-, C₂₋₄alquenilsulfonil-, C₁₋₄alquilóxi, C₁₋₄alquil- ou fenil opcionalmente substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados a partir de hidrogênio, hidróxi, amino ou C₁₋₄alquilóxi-;

15 cada um dentre R⁴, R⁵, R⁶ e R¹⁰ representa, independentemente, hidrogênio ou C₁₋₄alquila opcionalmente substituído com hidróxi, Het⁹ ou C₁₋₄alquilóxi-;

20 cada um dentre Het¹ e Het² representa, independentemente, um heterociclo selecionado a partir de pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, piridinila, pirimidinila, pirazinila, imidazolidinila ou pirazolidinila, sendo que os ditos Het¹ e Het² são, opcionalmente, substituídos com amino, hidróxi, C₁₋₄alquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, fenila, fenil-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquil-óxi-C₁₋₄alquil- mono ou di(C₁₋₄alquil) amino- ou amino-carbonil-;

25 cada um dentre Het³ e Het⁶ representa, independentemente, um heterociclo selecionado a partir de pirrolidinila ou piperidinila, sendo que os ditos Het³ e Het⁶ são, opcionalmente, substituídos com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-;

30 cada um dentre Het⁴, Het⁷ e Het⁹ representa, independentemente, um heterociclo selecionado a partir de morfolinila, pirrolidinila, piper-

zinila ou piperidinila, sendo que os ditos Het⁴, Het⁷ e Het⁹ são, opcionalmente, substituídos com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-;

5 Het⁵ representa um heterociclo selecionado a partir de morfolinila, pirrolidinila, piperazinila ou piperidinila, sendo que o dito Het⁵ é, opcionalmente, substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados a partir de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-;

10 cada um dentre Het¹⁰, Het¹¹ e Het¹³ representa, independentemente, um heterociclo selecionado a partir de pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, piridinila, pirimidinila, pirazinila, imidazolidinila ou pirazolidinila, sendo que os ditos Het¹⁰, Het¹¹ e Het¹³ são, opcionalmente, substituídos com amino, hidróxi, C₁₋₄alquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, fenila, fenil-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquil-óxi-C₁₋₄alquil-, amino-carbonil- ou mono ou di(C₁₋₄alquil)amino-;

15 Het¹² representa um heterociclo selecionado a partir de pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, piridinila, pirimidinila, pirazinila, imidazolidinila ou pirazolidinila, sendo que o dito Het¹² é, opcionalmente, substituído com amino, hidróxi, C₁₋₄alquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, fenila, fenil-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquil-óxi-C₁₋₄alquil-; mono ou di(C₁₋₄alquil)amino- ou amino-carbonil-;

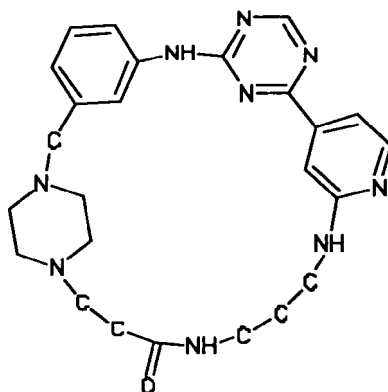
20 Het¹⁴ representa um heterociclo selecionado a partir de morfolinila, pirrolidinila, piperazinila, imidazolila, pirrolila, 2,3,4-triazapirrolila, 1,2,3-triazolila, pirazolila ou piperidinila, sendo que o dito Het¹⁴ é, opcionalmente, substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-; particularmente, Het¹⁴ representa um heterociclo selecionado a partir de morfolinila, pirrolidinila, pirrolila, 2,3,4-triazapirrolila, piperazinila ou piperidinila, sendo que o dito Het¹⁴ é, opcionalmente, substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-; mais particularmente, Het¹⁴ representa um heterociclo selecionado a partir de morfolinila, pirrolidinila, piperazinila

ou piperidinila, sendo que o dito Het¹⁴ é, opcionalmente, substituído com um ou, quando possível, dois ou mais substituintes selecionados de C₁₋₄alquila, C₃₋₆cicloalquila, hidróxi-C₁₋₄alquil-, C₁₋₄alquilóxi C₁₋₄alquila ou poli-hidróxi-C₁₋₄alquil-.

5 Os compostos de Fórmula (7) são descritos em WO2007/003525, atribuída à Janssen Pharmaceutica N.V.

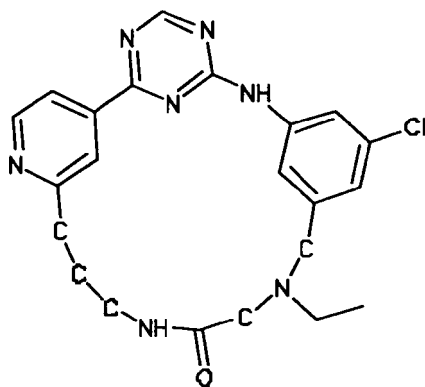
Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (14).

10 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (15).



Fórmula (15): 1,8,10,12,17,19,23,27,33-nona-azapenta-
 ciclo[25.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]tetratriaconta-3(34),4,6,9(33),10,12,
 15 14(32),15,17-nonaen-24-ona. Chamado, na presente invenção, de "Compos-
 to 13".

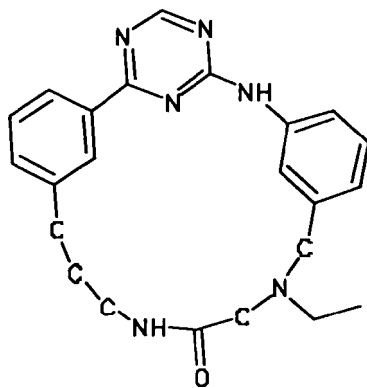
Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (16).



20 Fórmula (16): 10-cloro-14-etil-3,5,7,14,17,22,27-hepta-azatetraci-

clo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacosa-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-nonaen-16-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 14".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (17).

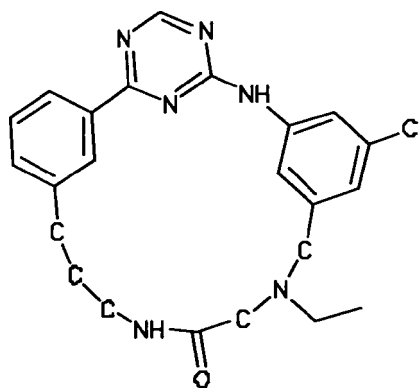


5

Fórmula (17): 14-etil-3,5,7,14,17,27-hexa-azatetraciclo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacosa-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-nonaen-16-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 15".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (18).

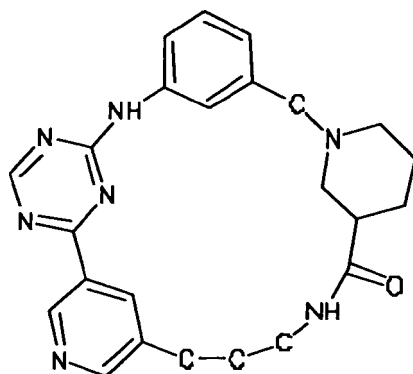
10



Fórmula (18): 10-cloro-14-etil-3,5,7,14,17,27-hexa-azatetraciclo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacosa-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-nonaen-16-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 16".

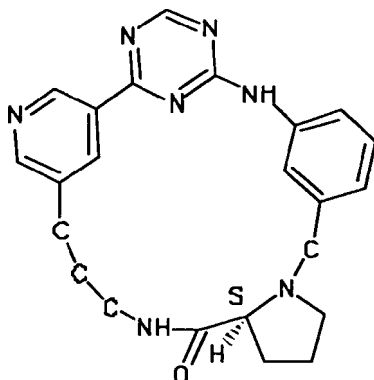
15

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (19).



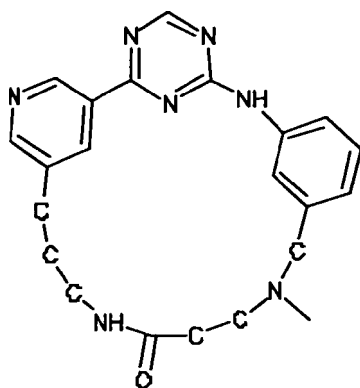
Fórmula (19): 3,5,7,14,20,26,31-hepta-azapentaclo[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.1~14,18~]hentriaconta-1(28),2(31),3,5,8(30),9,11,24,26-nonaen-19-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 5 17".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (20).



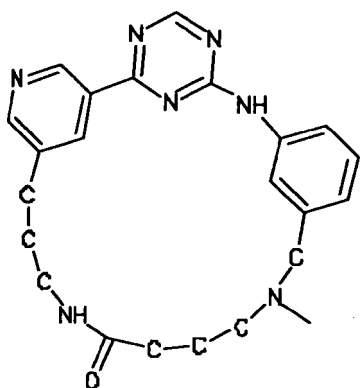
Fórmula (20): (18S)-3,5,7,14,20,26,30-hepta-azapentaclo[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.0~14,18~]triaconta-1(28),2(30),3,5,8(29),9,11,24,26-nonaen-19-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 10 18".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (21).



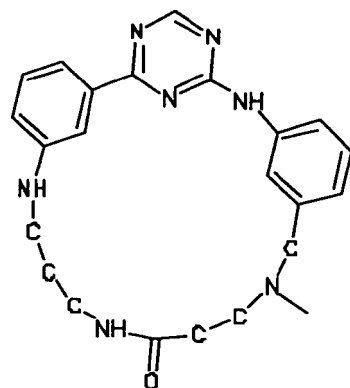
Fórmula (21): 14-metil-3,5,7,14,18,24,28-hepta-azatetracyclo[20.3.1.1~2,6~.1~8,12~]octacosan-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-nonaen-17-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 19".

5 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (22).



Fórmula (22): 14-metil-3,5,7,14,19,25,29-hepta-azatetracyclo[21.3.1.1~2,6~.1~8,12~]nonacosan-1(27),2(29),3,5,8(28),9,11,23,25-nonaen-18-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 20".

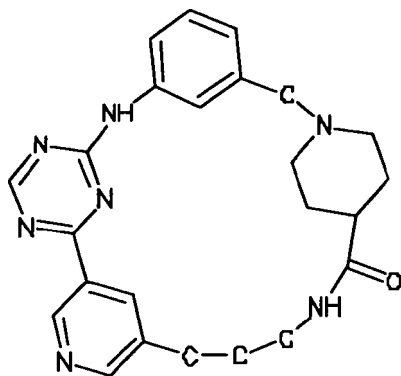
10 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (23).



Fórmula (23): 14-metil-3,5,7,14,18,22,29-hepta-azatetracyclo[21.3.1.1~2,6~.1~8,12~]nonacosan-1(27),2(29),3,5,8(28),9,11,23,25-nonaen-18-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 21".

clo[21.3.1.1~2,6~.1~8,12~]nonacosa-1(27),2(29),3,5,8(28),9,11,23,25-nonaen-17-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 21".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (24).

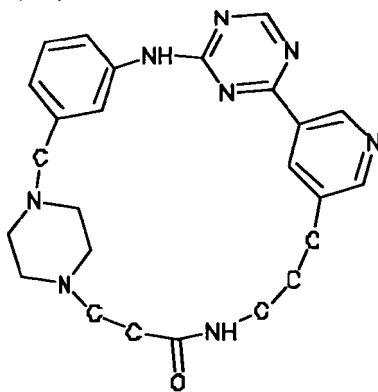


5

Fórmula (24): 1,8,10,12,16,22,30-hepta-azapentaclo[22.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]hentriaconta-3(31),4,6,9(30),10,12,14(29),15,17-nonaen-23-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 22".

10

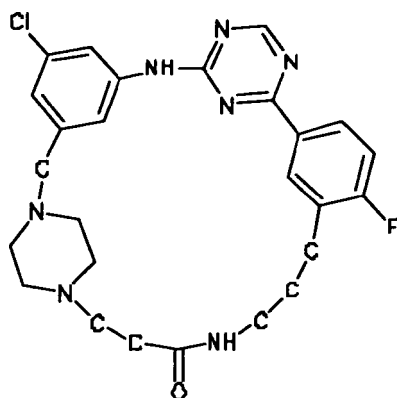
Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (25).



Fórmula (25): 1,8,10,12,16,22,26,32-octa-azapentaclo[24.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]tritriaconta-3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17-nonaen-23-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 23".

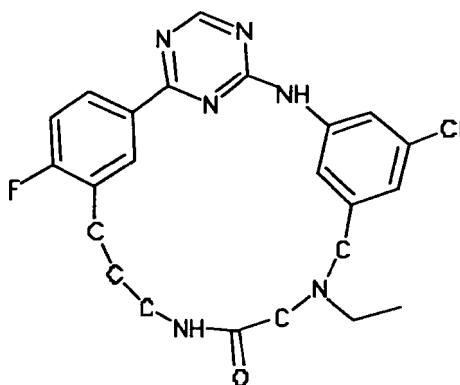
15

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (26).



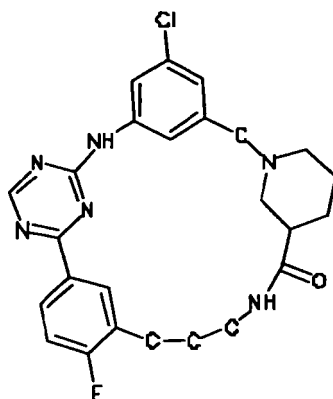
Fórmula (26): 5-cloro-17-fluoro-1,8,10,12,22,26,32-hepta-
 azapentaciclo[24.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]tritriaconta-3(33),4,6,9(32),
 10,12,14(31),15,17-nonaen-23-ona. Chamado, na presente invenção, de
 5 "Composto 24".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um
 composto da Fórmula (27).



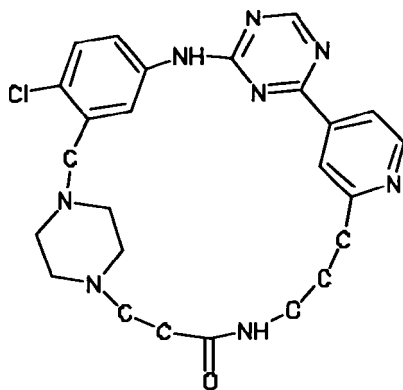
Fórmula (27): 10-cloro-14-etil-22-fluoro-3,5,7,14,17,27-hexa-
 10 azatetraciclo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacosa-1(25),2(27),3,5,8(26),9,
 11,21,23-nonaen-16-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto
 25".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um
 composto da Fórmula (28).



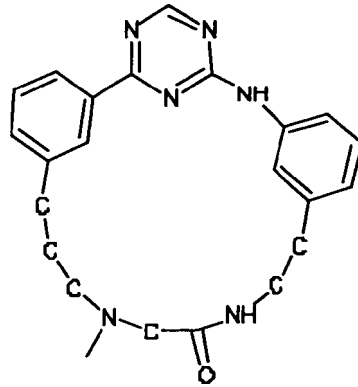
5 Fórmula (28): 10-cloro-25-fluoro-3,5,7,14,20,31-hexa-azapentaciclo[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.1~14,18~]hentriaconta-1(28),2(31),3,5,8(30),9,11,24,26-nonaen-19-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 26".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (29).



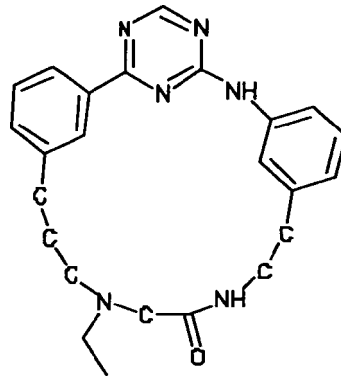
10 Fórmula (29): 4-cloro-1,8,10,12,17,22,26,32-octa-azapentaciclo[24.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]tritriaconta-3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17-nonaen-23-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 27".

15 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (30).



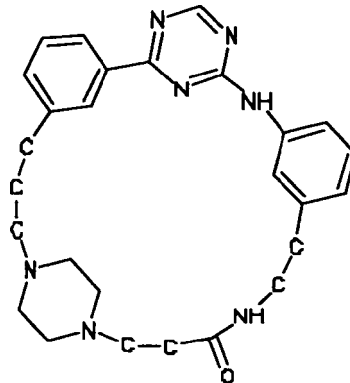
Fórmula (30): 18-metil-3,5,7,15,18,28-hexa-azatetracyclo[20.3.1.1~2,6~.1~8,12~]octacos-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-nonaen-16-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 28".

5 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (31).



Fórmula (31): 18-etil-3,5,7,15,18,28-hexa-azatetracyclo[20.3.1.1~2,6~.1~8,12~]octacos-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-nonaen-16-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 29".

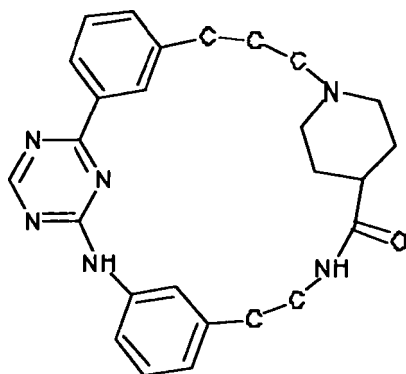
10 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (32).



Fórmula (32): 1,8,10,12,17,19,23,27,33-nona-azapentacyclo[20.3.1.1~2,6~.1~8,12~]octacos-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-nonaen-16-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 30".

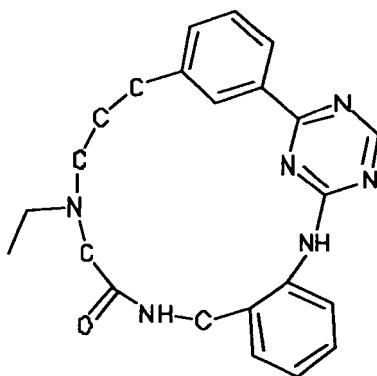
clo[25.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]tetratriaconta-3(34),4,6,9(33),10,12,14(32),15,17-nonaen-24-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 30".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um
5 composto da Fórmula (33).



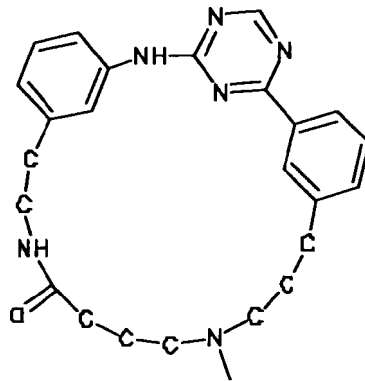
Fórmula (33): 1,11,13,15,23,31-hexa-azapentaciclo[23.2.2.1~5,9~.1~10,14~.1~16,20~]dotriaconta-5(32),6,8,10(31),11,13,16(30),17,19-nonaen-24-ona. Chamado, na presente invenção, de
10 "Composto 31".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (34).



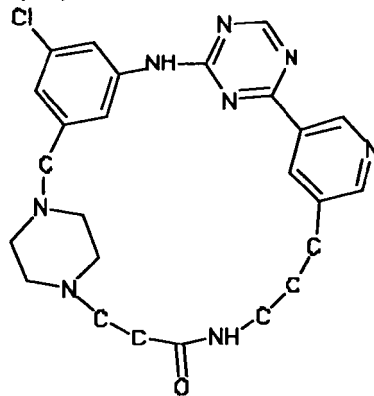
Fórmula (34): 15-etil-13,14,15,16,18,19-hexa-hidro-1H-6,2-(azeno)-7,11-(meteno)-1,3,5,15,18-benzopenta-azaciclo-henicosin-17(12H)-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 32".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (35).



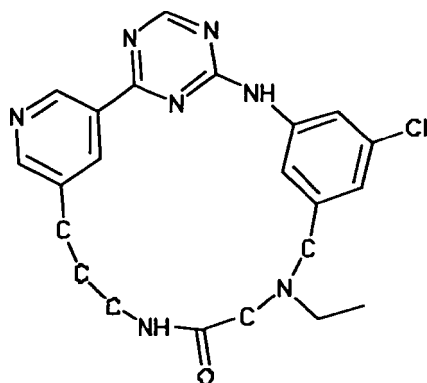
Fórmula (35): 20-metil-3,5,7,15,20,30-hexa-azatetraciclo[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~]trianta-1(28),2(30),3,5,8(29),9,11,24,26-nonaen-16-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 33".

5 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (36).



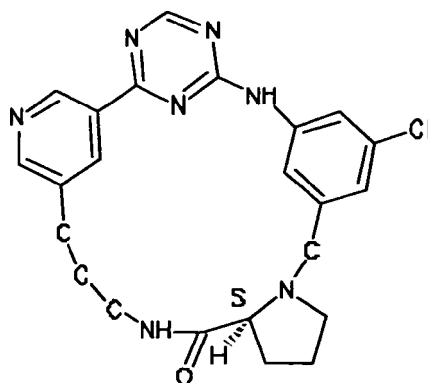
Fórmula (36): 5-cloro-1,8,10,12,16,22,26,32-octa-azapentaciclo[24.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]trianta-3(33),4,6,9(32),10,12,14(31),15,17-nonaen-23-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 34".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (37).



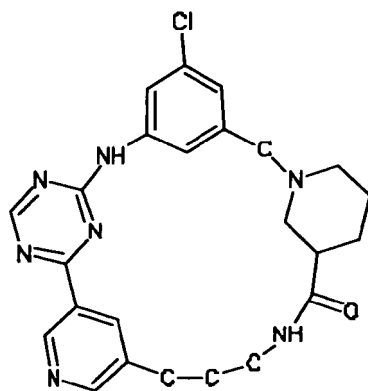
Fórmula (37): 10-cloro-14-etil-3,5,7,14,17,23,27-hepta-azate-traciclo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacos-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-nonaen-16-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 35".

- 5 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (38).



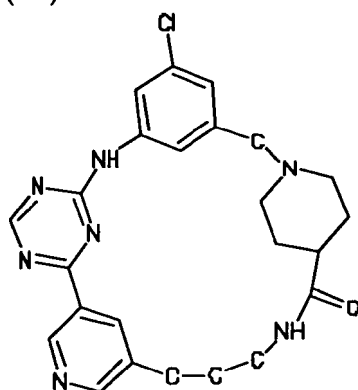
- 10 Fórmula (38): (18S)-10-cloro-3,5,7,14,20,26,30-hepta-azapenta-ciclo[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.0~14,18~]triaconta-1(28),2(30),3,5,8(29),9,11,24,26-nonaen-19-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 36".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (39).



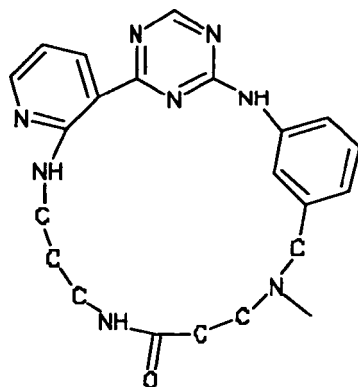
Fórmula (39): 10-cloro-3,5,7,14,20,26,31-hepta-azapentacyclo[22.3.1.1~2,6~.1~8,12~.1~14,18~]hentriaconta-1(28),2(31),3,5,8(30),9,11,24,26-nonaen-19-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 5 37".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (40).



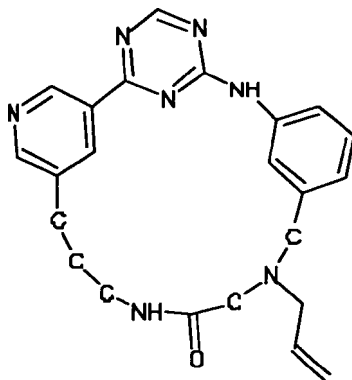
Fórmula (40): 5-cloro-1,8,10,12,16,22,30-hepta-azapentacyclo[22.2.2.1~3,7~.1~9,13~.1~14,18~]hentriaconta-3(31),4,6,9(30),10,12,14(29),15,17-nonaen-23-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 10 38".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (41).



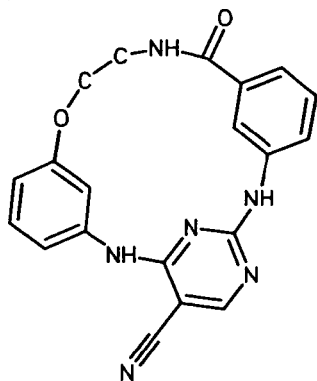
Fórmula (41): 9-metil-2,3,4,5,7,8,9,10-octa-hidro-16H-17,21-(azeno)-11,15-(meteno)pirido[3,2-g][1,3,5,9,13,17]hexa-azaciclotricosin-6(1H)-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 39".

- 5 Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (42).



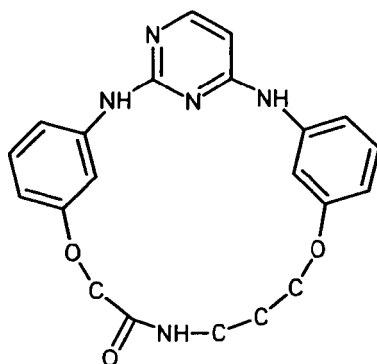
- Fórmula (42): 14-prop-2-en-1-il-3,5,7,14,17,23,27-hepta-azate-traciclo[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]heptacosa-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-nonaen-16-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 40".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (43).



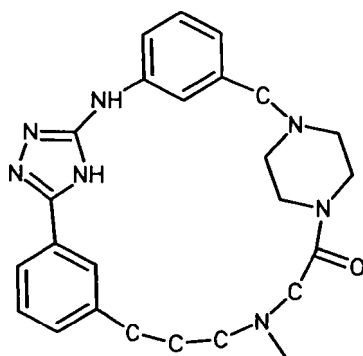
Fórmula (43): 18-oxo-14-oxa-2,4,8,17,25-penta-azatetraciclo[17.3.1.1~3,7~.1~9,13~]pentacosa-1(23),3(25),4,6,9(24),10,12,19,21-nonaeno-6-carbonitrila. Chamado, na presente invenção, de "Composto 41".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um
5 composto da Fórmula (44).



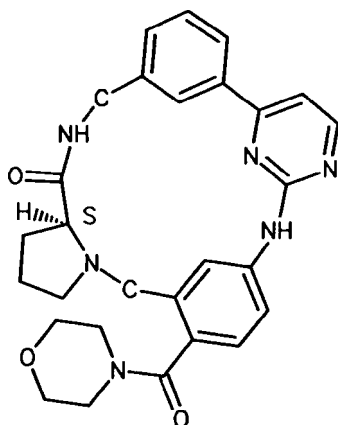
Fórmula (44): 14,21-dioxa-2,4,8,18,28-penta-azatetraciclo[20.3.1.1~3,7~.1~9,13~]octacosa-1(26),3(28),4,6,9(27),10,12,22,24-nonaen-19-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 42".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um
10 composto da Fórmula (45).



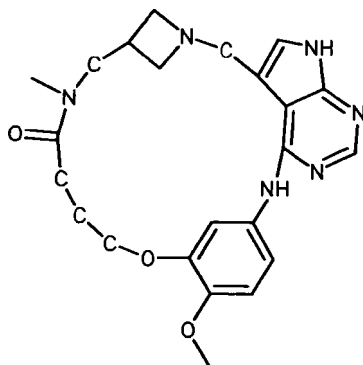
Fórmula (45): 21-metil-1,8,10,11,21,24,30-hepta-azapentaciclo[22.2.2.1~3,7~.1~9,12~.1~13,17~]hentriaconta-3(31),4,6,9,11,13(29),14,
15 16-octaen-23-ona. Chamado, na presente invenção, de "Composto 43".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um
composto da Fórmula (46).



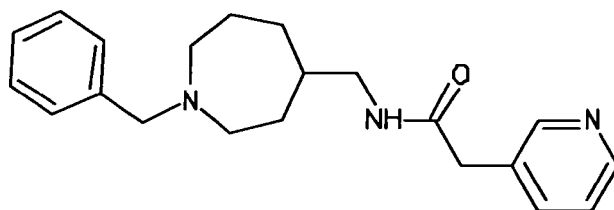
Fórmula (46): (18S)-11-(morfolin-4-ilcarbonil)-5,7,14,20,28-penta-azapentaciclo[20.3.1.1~2,6~.1~8,12~.0~14,18~]octacos-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-nonaen-19-ona. Chamado, na presente
5 invenção, de "Composto 44".

Em uma modalidade, a anilina-piridinotriazina cíclica é um composto da Fórmula (47).



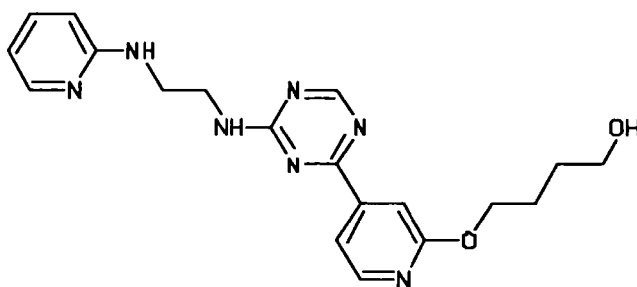
Fórmula (47): 10-metóxi-17-metil-2,14,15,17,18,19,20,22-octa-
10 hidro-6H-19,21-metano-7,11-(meteno)-12-oxa-2,3,5,6,17,21-hexa-azacicloi-
cosa[1,2,3-cd]inden-16(13H)-ona. Chamado, na presente invenção, de
"Composto 45".

Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (48):



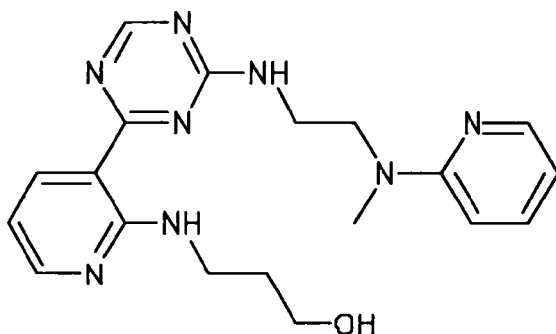
Fórmula (48). N-[[1-(fenilmetil)azepan-4-il]metil]-2-piridin-3-ilacetamida. Chamado, na presente invenção, de "Composto 46".

Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um
5 composto da Fórmula (49):



Fórmula (49). 4-[[4-(4-[[2-(piridin-2-ilamino)etil]amino]-1,3,5-triazin-2-il)piridin-2-il]óxi]butan-1-ol. Chamado, na presente invenção, de "Composto 47".

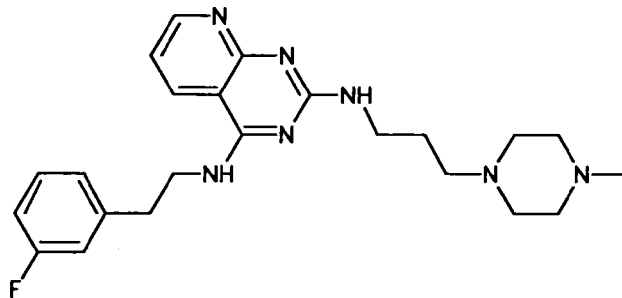
10 Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (50):



Fórmula (50). 3-[[3-[4-((2-[metil(piridin-2-il)amino]etil)amino)-1,3,5-triazin-2-il]piridin-2-il]amino]propan-1-ol. Chamado, na presente inven-

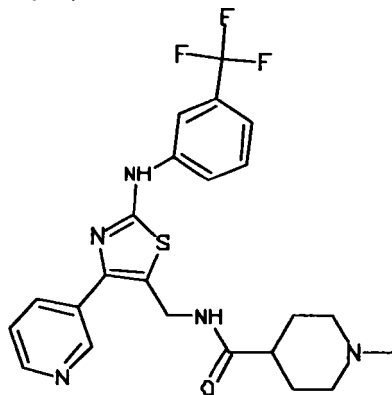
ção, de "Composto 48".

Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (51):



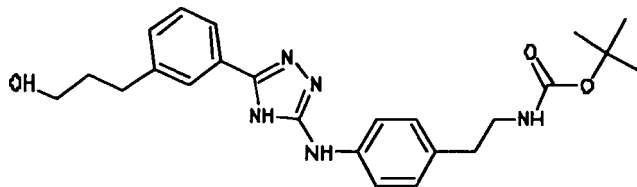
- 5 Fórmula (51). N-(2-(3-fluorofenil)etil)-N-(3-(4-metil piperazin-1-il)propil]pirido[2,3-d]pirimidina-2,4-diamina. Chamado, na presente invenção, de "Composto 49".

Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (52):



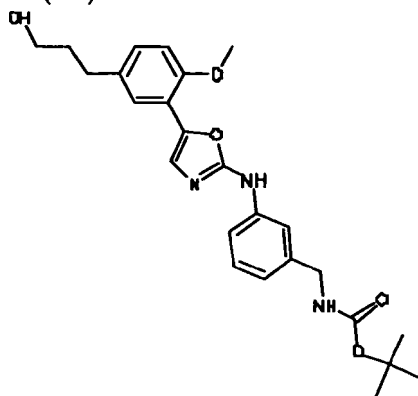
- 10 Fórmula (52). 1-metil-N-([4-(3-(trifluorometil)fenil]amino)-1,3-tiazol-5-il)metil]piperidina-4-carboxamida. Chamado, na presente invenção, de "Composto 50".

- 15 Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (53):



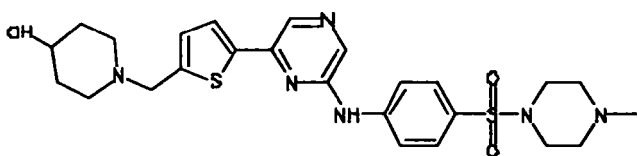
Fórmula (53). {2-[4-({5-[3-(3-hidróxi propil)fenil]-4H-1,2,4-triazol-3-il}amino)fenil]etil}carbamato de 1,1-dimetiletila. Chamado, na presente invenção, de "Composto 51".

- 5 Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (54):



- 10 Fórmula (54). {{3-({5-[5-(3-hidróxi propil)-2-(metilóxi)fenil]-1,3-oxazol-2-il}amino)fenil]metil}carbamato de 1,1-dimetiletila. Chamado, na presente invenção, de "Composto 52".

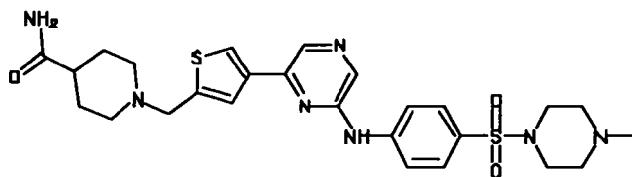
Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (55):



Fórmula (55). 1-({5-[6-({4-[(4-metil piperazin-1-il)sulfonil]fe-

nil}amino)pirazin-2-il]tiofen-2-il}metil)piperidin-4-ol. Chamado, na presente invenção, de "Composto 53".

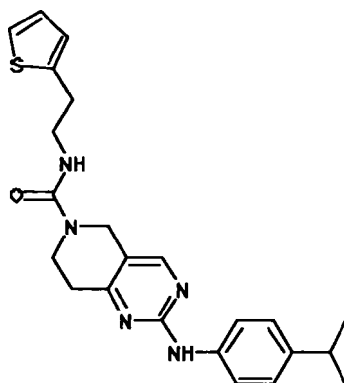
Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (56):



5

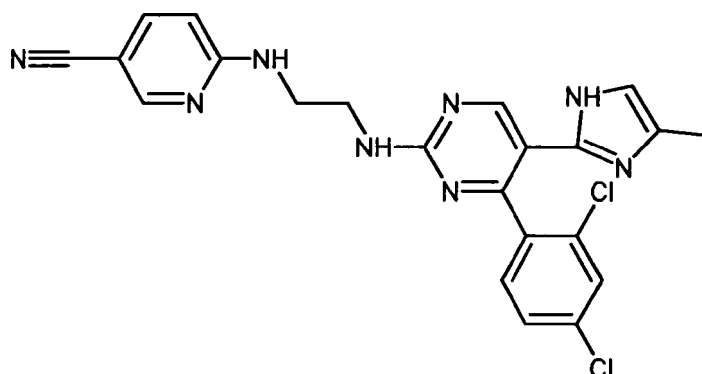
Fórmula (56). 1-({4-[6-({4-[(4-metilpiperazin-1-il)sulfonil]fenil}amino)pirazin-2-il]tiofen-2-il}metil)piperidina-4-carboxamida. Chamado, na presente invenção, de "Composto 54".

Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (57):



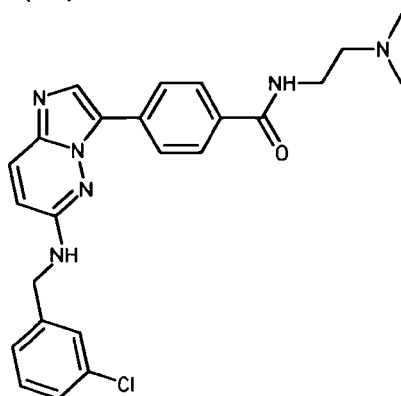
Fórmula (57). 2-{[4-(1-metiletil)fenil]amino}-N-(2-tiofen-2-iletil)-7,8-di-hidropirido[4,3-d]pirimidina-6(5H)-carboxamida. Chamado, na presente invenção, de "Composto 55".

Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (58):



Fórmula (58). 6-[(2-[[4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)pirimidin-2-il]amino]etil)amino]piridina-3-carbonitrila. Chamado, na presente invenção, de "Composto 56".

5 Em uma modalidade, esse pelo menos um outro fator é um composto da Fórmula (59):



Fórmula (59). 4-(6-[[[(3-clorofenil)metil]amino]imidazo[1,2-b]piridazin-3-il]-N-[2-(dimetilamino)etil]benzamida. Chamado, na presente invenção, de "Composto 57".

Detecção de células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo

A formação de células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitiva pode ser determinada testando-se quanto à presença dos marcadores antes e depois de seguir um determinado protocolo. As células-tronco pluripotentes tipicamente não expressam esses marcadores. Portanto, a diferenciação das células pluripotentes é detectada quando as células começam a expressá-los.

A eficiência da diferenciação pode ser determinada expondo-se

uma população de células tratadas a um agente (como um anticorpo) que especificamente reconhece um marcador de proteína expresso por células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo.

5 Os métodos para avaliar a expressão de marcadores de proteína e de ácido nucleico em células cultivadas ou isoladas são padrão na técnica. Estes incluem reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-PCR), Northern blots, *in situ* hibridização (vide, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, Editores, suplemento
10 de 2001)), e imunoenaios como análise imuno-histoquímica de material seccionado, Western blotting e, para marcadores que são acessíveis em células intactas, análise de citometria de fluxo (FACS) (vide, por exemplo, Harlow e Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

15 Por exemplo, as características de células-tronco pluripotentes são bem-conhecidas dos versados na técnica, e características adicionais de células-tronco pluripotentes continuam a ser identificadas. Os marcadores de células-tronco pluripotentes incluem, por exemplo, a expressão de um ou mais dentre os seguintes: ABCG2, cripto, FOXD3, Conexina43, Conexina45,
20 OCT4, SOX2, Nanog, hTERT, UTF-1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra1-60, ou Tra1-81.

Após o tratamento das células-tronco pluripotentes com os métodos da presente invenção, as células diferenciadas podem ser purifi-
cadas mediante exposição de uma população de células tratadas a um
25 agente (como um anticorpo) que especificamente reconhece um marcador de proteína, como CXCR4, expresso por células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo.

Formação de células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática

30 As células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo podem ser diferenciadas em células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pan-

creática por meio de qualquer método na técnica, ou por meio de qualquer método proposto na presente invenção.

Por exemplo, as células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo podem ser diferenciados em células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática, de acordo com os métodos apresentados em D'Amour *et al*, Nature Biotechnology 24, 1392 a 1401 (2006).

Por exemplo, as células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo são adicionalmente diferenciadas em células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática, tratando-se as células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo com um fator de crescimento de fibroblastos e o inibidor da rota de sinalização hedgehog KAAD-ciclopamina, então removendo-se o meio contendo o fator de crescimento de fibroblastos e o KAAD-ciclopamina e, subsequentemente, cultivando-se as células em um meio contendo ácido retinoico, um fator de crescimento de fibroblastos e KAAD-ciclopamina. Um exemplo desse método é descrito em Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

Em um aspecto da presente invenção, células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo são diferenciadas, adicionalmente, em células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática, mediante tratamento das células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo com ácido retinoico e pelo menos um fator de crescimento de fibroblasto durante um período de tempo, de acordo com os métodos descritos no pedido de patente US No. de série 11/736,908, atribuído a LifeScan, Inc.

Em um aspecto da presente invenção, células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo são diferenciadas, adicionalmente, em células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática, por tratar as células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo

com ácido retinoico e pelo menos um fator de crescimento de fibroblasto durante um período de tempo, de acordo com os métodos descritos no pedido de patente US No. de série 11/779.311, atribuído a LifeScan, Inc.

Em um aspecto da presente invenção, as células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo são diferenciadas, adicionalmente, em células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática, mediante tratamento das células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo de acordo com os métodos descritos no pedido de patente com n° de série US 60/990.529.

As células que expressam marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo podem ser tratadas com pelo menos um outro fator adicional que pode aumentar a formação de células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática. Alternativamente, o pelo menos um outro fator adicional pode otimizar a proliferação das células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática formada pelos métodos da presente invenção. Adicionalmente, esse pelo menos um outro fator adicional pode otimizar a capacidade das células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática formada pelos métodos da presente invenção para formar outros tipos de célula, ou otimizar a eficiência de quaisquer outras etapas adicionais de diferenciação.

Esse pelo menos um fator adicional pode ser, por exemplo, nicotinamida, membros de TGF- β família, inclusive TGF- β 1, 2 e 3, albumina sérica, membros da família do fator de crescimento de fibroblastos, fatores AA e BB de crescimento derivados de plaqueta, plasma rico em plaquetas, fator de crescimento similar a insulina (IGF-I, II), fator de diferenciação de crescimento (como GDF-5, 6, 8, 10, 11), peptídeo I e II similar a glucagon (GLP-I e II), mimetocorpo GLP-1 e GLP-2, exendina-4, ácido retinoico, hormônio da paratiroide, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, beta mercaptoetanol, fator de crescimento epidérmico (EGF), gastrina I e II, queladores de cobre, como trietileno pentamina, forscolina,

Na-butirato, ativina, betacelulina, ITS, noguina, fator de crescimento de neuritos, nodal, ácido valproico, tricostatina A, butirato de sódio, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), esfingosina-1, VEGF, MG132 (EMD, CA), suplementos N2 e B27 (Gibco, CA), alcaloide esteroidal, como ciclopamina

5 (EMD, CA), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), família de proteínas Dickkopf, extrato de hipófise bovina, proteína associada à neogênese de ilhotas (INGAP), Indian hedgehog, Sonic hedgehog, inibidores de proteassoma, inibidores da via notch, inibidores de sonic hedgehog ou combinações dos mesmos.

10 Esse pelo menos um outro fator adicional pode ser fornecido pelo meio condicionado obtido a partir de linhagens de células pancreáticas, como PANC-1 (ATCC n°: CRL-1469), CAPAN-1 (ATCC n°: HTB-79), BxPC-3 (ATCC n°: CRL-1687), HPAF-II (ATCC n°: CRL-1997), linhagens de células hepáticas, como HepG2 (ATCC n°: HTB-8065), e linhagens de células

15 intestinais, como FHs 74 (ATCC n°: CCL-241).

Detecção de células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderme pancreática

Os marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática são bem-conhecidos dos versados na técnica, e marcadores

20 adicionais característicos da linhagem endodérmica pancreática continuam a ser identificados. Esses marcadores podem ser usados para confirmar que as células tratadas de acordo com a presente invenção se diferenciaram para adquirir as propriedades características da linhagem endodérmica pancreática. Os marcadores específicos para linhagem endodérmica pan-

25 creática incluem a expressão de um ou mais fatores de transcrição, como Hlx9, PTF-1a, PDX-1, HNF-6 e HNF-1beta.

A eficiência da diferenciação pode ser determinada expondo-se uma população de células tratadas a um agente (como um anticorpo) que especificamente reconhece um marcador de proteína expresso por células

30 que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática.

Os métodos para avaliar a expressão de marcadores de proteína

e de ácido nucleico em células cultivadas ou isoladas são padrão na técnica. Estes incluem reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-PCR), Northern blots, *in situ* hibridização (vide, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, Editores, suplemento de 2001)), e imunoenaios como análise imuno-histoquímica de material seccionado, Western blotting e, para marcadores que são acessíveis em células intactas, análise de citometria de fluxo (FACS) (vide, por exemplo, Harlow e Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

10 Formação de células expressoras de marcadores da linhagem endócrina pancreática

As células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática podem ser diferenciadas em células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática por meio de qualquer método na técnica, ou por meio de qualquer método descrito nesta invenção.

Por exemplo, as células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática podem ser diferenciadas em células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática, de acordo com os métodos descritos em D'Amour *et al*, Nature Biotechnology 24, 1392 a1401 (2006).

Por exemplo, as células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática são adicionalmente diferenciadas em células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática, cultivando-se as células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática em meio contendo DAPT e exendina 4, então removendo-se o meio contendo DAPT e exendina 4 e, subsequentemente, cultivando-se as células em um meio contendo exendina 1, IGF-1 e HGF. Um exemplo desse método é descrito em Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006).

Por exemplo, as células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática são adicionalmente diferen-

ciadas em células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática, cultivando-se as células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática em meio contendo exendina 4, então removendo-se o meio contendo exendina 4 e, subsequentemente, cultivando-se as células em um meio contendo exendina 1, IGF-1 e HGF. Um Exemplo desse método é descrito em D' Amour *et al.*, Nature Biotechnology, 2006.

Por exemplo, as células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática são adicionalmente diferenciadas em células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática, cultivando-se as células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática em um meio contendo DAPT e exendina 4. Um Exemplo desse método é descrito em D' Amour *et al.*, Nature Biotechnology, 2006.

Por exemplo, células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática são adicionalmente diferenciadas em células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática, através do cultivo das células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática em meio contendo exendina 4. Um Exemplo desse método é descrito em D' Amour *et al.*, Nature Biotechnology, 2006.

Em um aspecto da presente invenção, as células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática são adicionalmente diferenciadas em células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática, através do tratamento das células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática com um fator que inibe a via de sinalização de Notch, de acordo com os métodos descritos no pedido de patente US No. de série 11/736.908, atribuído a LifeScan, Inc.

Em um aspecto da presente invenção, as células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática são adicionalmente diferenciadas em células que expressam marcadores carac-

terísticos da linhagem endócrina pancreática, através do tratamento das células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática com um fator que inibe a via de sinalização de Notch, de acordo com os métodos descritos no pedido de patente US No. de série 5 11/779.311, atribuído a LifeScan, Inc.

Em um aspecto da presente invenção, as células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática são adicionalmente diferenciadas em células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática, através do tratamento das 10 células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática com um fator que inibe a via de sinalização de Notch, de acordo com os métodos descritos no pedido de patente US No. de série 60/953.178, atribuído a LifeScan, Inc.

Em um aspecto da presente invenção, as células expressoras de 15 marcadores característicos da linhagem de endoderma pancreático são adicionalmente diferenciadas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática, mediante tratamento das células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma pancreático de acordo com os métodos descritos no pedido de patente 20 com n° serial 60/990.529.

As células que expressam marcadores característicos da linhagem endodérmica pancreática podem ser tratadas com pelo menos um outro fator adicional que pode amplificar a formação de células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática. Alternativa- 25 mente, esse pelo menos um outro fator adicional pode otimizar a proliferação das células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática formada pelos métodos da presente invenção. Além disso, o pelo menos um outro fator adicional pode melhorar a capacidade das células que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina 30 pancreática formadas pelos métodos da presente invenção em formar outros tipos de células, ou aperfeiçoar a eficiência de quaisquer outras etapas de diferenciação adicional.

O pelo menos um fator adicional pode ser, por exemplo, nicotinamida, membros de TGF- β família, inclusive TGF- β 1, 2 e 3, albumina sérica, membros da família do fator de crescimento de fibroblastos, fatores AA e BB de crescimento derivados de plaqueta, plasma rico em plaquetas, 5 fator de crescimento similar a insulina (IGF-I, II), fator de diferenciação de crescimento (como GDF-5, -6, -8, -10, -11), peptídeo I e II similar a glucagon (GLP-I e II), mimetocorpo GLP-1 e GLP-2, exendina-4, ácido retinoico, hormônio da paratiroide, insulina, progesterona, aprotinina, hidrocortisona, etanolamina, beta mercaptoetanol, fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 gastrina I e II, queladores de cobre, como trietileno pentamina, forskolina, Na-butilato, ativina, betacelulina, ITS, noguina, fator de crescimento de neuritos, nodal, ácido valproico, tricostatina A, butirato de sódio, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), esfingosina-1, VEGF, MG132 (EMD, CA), suplementos N2 e B27 (Gibco, CA), alcaloide esteroide, como ciclopamina 15 (EMD, CA), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), família de proteínas Dickkopf, extrato de hipófise bovina, proteína associada à neogênese de ilhotas (INGAP), Indian hedgehog, Sonic hedgehog, inibidores de proteassoma, inibidores da via notch, inibidores de sonic hedgehog ou combinações dos mesmos.

20 O pelo menos um outro fator adicional pode ser fornecido pelo meio condicionado obtido a partir de linhagens de células pancreáticas, como PANC-1 (ATCC n°: CRL-1469), CAPAN-1 (ATCC n°: HTB-79), BxPC-3 (ATCC n°: CRL-1687), HPAF-II (ATCC n°: CRL-1997), linhagens de células hepáticas, como HepG2 (ATCC n°: HTB-8065), e linhagens de células 25 intestinais, como FHs 74 (ATCC n°: CCL-241).

Detecção de células expressoras de marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática

Os marcadores característicos das células da linhagem endócrina pancreática são bem-conhecidos dos versados na técnica, e marcadores 30 adicionais característicos da linhagem endócrina pancreática continuam a ser identificados. Esses marcadores podem ser usados para confirmar que as células tratadas de acordo com a presente invenção se diferenciaram

para adquirir as propriedades características da linhagem endócrina pancreática. Os marcadores específicos para linhagem endócrina pancreática incluem a expressão de um ou mais fatores de transcrição, como NGN3, NEURO ou ISL1.

5 Os marcadores característicos das células da linhagem celular β são bem-conhecidos dos versados na técnica, e marcadores adicionais característicos da linhagem celular β continuam a ser identificados. Esses marcadores podem ser usados para confirmar que as células tratadas de acordo com a presente invenção foram diferenciadas para adquirir as

10 propriedades características da linhagem de célula β . As características específicas da linhagem de células β incluem a expressão de um ou mais fatores de transcrição como PDX1, NKX2.2, NKX6.1, ISL1, PAX6, PAX4, NEUROD, HNF1 beta, HNF6, HNF3 beta ou MAFA, entre outros. Esses fatores de transcrição são bem-estabelecidos na técnica para identificação

15 de células endócrinas. Vide, por exemplo, Edlund (Nature Reviews Genetics 3: 524-632 (2002)).

A eficiência da diferenciação pode ser determinada expondo-se uma população de células tratadas a um agente (como um anticorpo) que especificamente reconhece um marcador de proteína expresso por células

20 que expressam marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática. Alternativamente, a eficiência de diferenciação pode ser determinada expondo-se uma população de células tratadas a um agente (como um anticorpo) que especificamente reconhece um marcador de proteína expresso pelas células expressoras de marcadores característicos da linhagem

25 celular β .

Os métodos para avaliar a expressão de marcadores de proteína e de ácido nucleico em células cultivadas ou isoladas são padrão na técnica. Estes incluem reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-PCR), Northern blots, *in situ* hibridização (vide, por exemplo,

30 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, Editores, suplemento de 2001)), e imunoenaios como análise imuno-histoquímica de material seccionado, Western blotting e, para marcadores que são acessíveis em

células intactas, análise de citometria de fluxo (FACS) (vide, por exemplo, Harlow e Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)).

Em um aspecto da presente invenção, a eficiência da
5 diferenciação é determinada mediante a medição da porcentagem de células
positivas para insulina em uma determinada cultura celular após tratamento.
Em uma modalidade, os métodos da presente invenção produzem cerca de
100% de células positivas para insulina em uma determinada cultura. Em
uma modalidade alternativa, os métodos da presente invenção produzem
10 cerca de 90% de células positivas para insulina em uma determinada
cultura. Em uma modalidade alternativa, os métodos da presente invenção
produzem cerca de 80% de células positivas para insulina em uma determi-
nada cultura. Em uma modalidade alternativa, os métodos da presente
invenção produzem cerca de 70% de células positivas para insulina em uma
15 determinada cultura. Em uma modalidade alternativa, os métodos da pre-
sente invenção produzem cerca de 60% de células positivas para insulina
em uma determinada cultura. Em uma modalidade alternativa, os métodos
da presente invenção produzem cerca de 50% de células positivas para
insulina em uma determinada cultura. Em uma modalidade alternativa, os
20 métodos da presente invenção produzem cerca de 40% de células positivas
para insulina em uma determinada cultura. Em uma modalidade alternativa,
os métodos da presente invenção produzem cerca de 30% de células
positivas para insulina em uma determinada cultura. Em uma modalidade
alternativa, os métodos da presente invenção produzem cerca de 20% de
25 células positivas para insulina em uma determinada cultura. Em uma moda-
lidade alternativa, os métodos da presente invenção produzem cerca de 10%
de células positivas para insulina em uma determinada cultura. Em uma
modalidade alternativa, os métodos da presente invenção produzem cerca
de 5% de células positivas para insulina em uma determinada cultura.

30 Em um aspecto da presente invenção, a eficiência da diferen-
ciação é determinada mediante a medição da secreção de insulina estimu-
lada por glicose, conforme detectado mediante a medição da quantidade de

peptídeo C liberado pelas células. Em uma modalidade, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 1000 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 900 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 800 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 700 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 600 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 500 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 400 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 500 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 400 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 300 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 200 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 100 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 90 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 80 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 70 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 60 ng

de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 50 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 40 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 30 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 20 ng de peptídeo C/pg DNA. Em uma modalidade alternativa, as células produzidas pelos métodos da presente invenção produzem cerca de 10 ng de peptídeo C/pg DNA.

Terapias

Em um aspecto, a presente invenção apresenta um método para tratar um paciente que sofre de, ou que está em risco de desenvolver, diabetes tipo 1. Esse método envolve cultivar células-tronco pluripotentes, diferenciar as células-tronco pluripotentes *in vitro* em uma linhagem celular β , e implantar em um paciente as células de uma linhagem celular β .

Em ainda um outro aspecto, esta invenção apresenta um método para tratamento de um paciente que sofra de, ou esteja em risco de desenvolver, diabetes tipo 2. Esse método envolve cultivar células-tronco pluripotentes, diferenciar as células cultivadas *in vitro* em uma linhagem celular β , e implantar no paciente as células da linhagem celular β .

Se for adequado, o paciente pode ser adicionalmente tratado com agentes farmacêuticos ou bioativos que facilitem a sobrevivência e a função das células transplantadas. Esses agentes podem incluir, por exemplo, insulina, membros da família TGF- β , inclusive TGF- β 1, 2 e 3, proteínas morfogênicas ósseas (BMP-2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12 e 13), fatores 1 e 2 de crescimento de fibroblastos, fatores AA e BB de crescimento derivado de plaqueta, plasma rico em plaquetas, fator de crescimento similar a insulina (IGF-I, II), fator de diferenciação de crescimento (como GDF-5, 6, 7, 8, 10, 15), fator de crescimento derivado de célula endotelial vascular (VEGF), pleiotrofina e endotelina, entre outros. Outros compostos farmacêuticos podem incluir, por exemplo, nicotinamida, peptídeo-I tipo glucagon (GLP-1) e

II, mimeticorpo GLP-1 e 2, Exendina-4, ácido retinoico, hormônio da paratiroide, inibidores MAPK, por exemplo os compostos descritos no pedido publicado US 2004/0209901 e no pedido publicado US 2004/0132729.

As células-tronco pluripotentes podem ser diferenciadas em uma
5 célula produtora de insulina, antes do transplante para um recipiente. Em uma modalidade específica, as células-tronco pluripotentes são totalmente diferenciadas em células β , antes de serem transplantadas para um recipiente. Alternativamente, as células-tronco pluripotentes podem ser transplan-
10 tadas para um recipiente em um estado não diferenciado ou parcialmente diferenciado. Uma diferenciação adicional pode ocorrer no recipiente.

As células de endoderme definitiva ou, alternativamente, as células de endoderme pancreática ou, alternativamente, as células β , podem ser implantadas sob a forma de células dispersas ou formadas em agrupa-
mentos que podem ser aplicados ao paciente por infusão pela veia porta
15 hepática. Alternativamente, as células podem ser fornecidas em suportes poliméricos biocompatíveis e degradáveis, dispositivos porosos não degradáveis, ou encapsulados para proteção contra a resposta imunológica do hospedeiro. As células podem ser implantadas em um sítio adequado do
20 recipiente. Os sítios de implantação incluem, por exemplo, o fígado, o pâncreas natural, o espaço subcapsular renal, o omento, o peritônio, o espaço subseroso, o intestino, o estômago ou um bolso subcutâneo.

Para otimizar a diferenciação adicional, a sobrevivência ou a atividade das células implantadas, fatores adicionais como fatores de crescimento e agentes antioxidantes ou anti-inflamatórios podem ser admi-
25 nistrados antes, simultaneamente, ou após a administração das células. Em certas modalidades, os fatores de crescimento são usados para diferenciar *in vivo* as células administradas. Esses fatores podem ser secretados por células endógenas e expostos *in situ* às células administradas. As células implantadas podem ser induzidas a se diferenciar por qualquer combinação
30 de fatores de crescimento conhecidos na técnica, tanto endógenos como administrados exogenamente.

A quantidade de células usadas na implantação depende de

inúmeros fatores diferentes, inclusive a condição de saúde do paciente e sua resposta à terapia, e pode ser determinada pelo versado na técnica.

Em um aspecto, a presente invenção apresenta um método para tratar um paciente que sofra de, ou que esteja em risco de desenvolver, diabetes. Esse método envolve cultivar células-tronco pluripotentes, diferenciar as células cultivadas *in vitro* em uma linhagem celular β , e incorporar as células a um suporte tridimensional. As células podem ser mantidas *in vitro* nesse suporte, antes da implantação no paciente. Alternativamente, o suporte contendo as células pode ser diretamente implantado no paciente sem cultura *in vitro* adicional. O suporte pode, opcionalmente, ser incorporado com pelo menos um agente farmacêutico que facilite a sobrevivência e o funcionamento das células transplantadas.

Os materiais de suporte adequados ao uso para os propósitos da presente invenção incluem modelos de tecidos, conduítes, barreiras e reservatórios úteis para reparo de tecidos. Em particular, materiais sintéticos e naturais sob a forma de espumas, esponjas, géis, hidrogéis, produtos têxteis e estruturas não tecidas, que têm sido usadas *in vitro* e *in vivo* para reconstruir ou regenerar tecido biológico, bem como para liberar agentes quimiotáticos a fim de induzir a proliferação de tecidos, são adequadas ao uso na prática dos métodos da presente invenção. Vide, por exemplo, os materiais descritos nas patentes US n° 5.770.417, 6.022.743, 5.567.612, 5.759.830, 6.626.950, 6.534.084, 6.306.424, 6.365.149, 6.599.323, 6.656.488, no pedido de patente publicado US 2004/0062753 A1, e nas patentes US n° 4.557.264 e 6.333.029.

Para formar um suporte incorporado com um agente farmacêutico, este pode ser misturado à solução de polímero antes da formação do suporte. Alternativamente, um agente farmacêutico poderia ser aplicado como revestimento sobre um suporte fabricado, de preferência na presença de um portador farmacêutico. O agente farmacêutico pode estar presente sob a forma de um líquido, um sólido finamente dividido, ou qualquer outro formato físico adequado. Alternativamente, os excipientes podem ser adicionados ao suporte para alterar a taxa de liberação do agente farmacêutico.

Em uma modalidade alternativa, o suporte é incorporado a pelo menos um composto farmacêutico que é um composto anti-inflamatório, como os compostos apresentados na patente US nº 6.509.369.

5 O suporte pode ser incorporado a pelo menos um composto farmacêutico que é um composto antiapoptótico, como os compostos descritos na patente US nº 6.793.945.

O suporte pode, também, ser incorporado a pelo menos um composto farmacêutico que é um inibidor de fibrose, como os compostos descritos na patente US nº 6.331.298.

10 O suporte pode, também, ser incorporado a pelo menos um composto farmacêutico que é capaz de acentuar a angiogênese, como os compostos descritos nos pedidos de patente publicados US 2004/0220393 e US 2004/0209901.

15 O suporte pode, também, ser incorporado a pelo menos um composto farmacêutico que é um composto imunossupressivo, como os compostos descritos no pedido publicado US 2004/0171623.

O suporte pode, também, ser incorporado com pelo menos um composto farmacêutico que é um fator de crescimento, como os membros da família TGF- β , inclusive TGF- β 1, 2 e 3, proteínas morfogênicas ósseas (BMP-2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12 e 13), fatores 1 e 2 de crescimento de fibroblastos, fatores AA e BB de crescimento derivado de plaqueta, plasma rico em plaquetas, fator de crescimento similar a insulina (IGF-I, II), fator de diferenciação de crescimento (como GDF-5, 6, 8, 10, 15), fator de crescimento derivado de célula endotelial vascular (VEGF), pleiotrofina e
25 endotelina, entre outros. Outros compostos farmacêuticos podem incluir, por exemplo, nicotinamida, fator 1-alfa induzível por hipóxia, peptídeo-I (GLP-1) similar a glucagon, mimeticorpo GLP-1, GLP-2 e II, exendina-4, nodal, noguina, NGF, ácido retinoico, hormônio da paratiroide, tenascina-C, tropoelastina, peptídeos derivados de trombina, catelicidinas, defensinas,
30 laminina, peptídeos biológicos contendo domínios de ligação a célula e a heparina das proteínas adesivas da matriz extracelular, como fibronectina e vitronectina, inibidores MAPK, como os compostos descritos nos pedidos

publicados US 2004/0209901 e US 2004/0132729.

A incorporação das células da presente invenção em um arcabouço pode ser obtida mediante a simples deposição das células sobre o mesmo. As células podem entrar no arcabouço por difusão simples (J. 5
Pediatr. Surg. 23 (1 Pt 2): 3 a 9 (1988)). Várias outras abordagens foram desenvolvidas para acentuar a eficiência da semeadura de células. Por exemplo, frascos de agitação foram usados na semeadura de condrócitos sobre arcabouços de ácido poliglicólico (Biotechnol. Prog. 14(2): 193 a 202 (1998)). Uma outra abordagem para a semeadura de células é o uso de 10
centrifugação, que resulta em estresse mínimo para as células semeadas, otimizando a eficiência da semeadura. Por exemplo, Yang *et al.* desenvolveu um método para semeadura de células (J. Biomed. Mater. Res. 55(3): 379-86 (2001)), chamado de imobilização centrifugacional da célula (CCI, ou "Centrifugational Cell Immobilization").

15 A presente invenção é ilustrada com mais detalhes pelos exemplos a seguir, porém não é limitada pelos mesmos.

Exemplos

Para esclarecimento da descrição, e sem propósitos de limitação, a descrição detalhada da invenção é dividida nas subseções a seguir 20
que descrevem ou ilustram determinadas características, modalidades ou aplicações da presente invenção.

Exemplo 1

Cultura de célula-tronco embrionária humana

As linhagens H1, H7 e H9 de células-tronco embrionárias 25
humanas foram obtidas junto ao WiCell Research Institute, Inc., (Madison, WI, EUA) e cultivadas de acordo com as instruções fornecidas pelo instituto de origem. As células-tronco embrionárias humanas foram, também, semeadas sobre placas revestidas com uma diluição a 1:30 de MATRIGEL® com teor reduzido de fator de crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231), 30
e cultivadas em meio condicionado com MEF e suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As células cultivadas sobre MATRIGEL® foram rotineiramente passadas como aglomerados com o uso

de colagenase IV (Invitrogen/GIBCO, Cat. n° 17104-019), Dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) ou enzima Liberase CI (Roche, Cat. n° 11814435001). Em alguns casos, as células foram passadas como células individuais com o uso de ACCUTASE (Sigma, Cat. n° A6964).

5 As células-tronco embrionárias humanas usadas nesses exemplos foram mantidas em um estado não diferenciado, pluripotente, com passagem em média a cada quatro dias. A passagem foi realizada mediante a exposição das culturas celulares a uma solução de colagenase (1 ou 10 mg/mL, Sigma-Aldrich) durante 10 a 30 minutos a 37°C, seguida de
10 raspagem suave com a ponta de uma pipeta para recuperar aglomerados celulares. Os aglomerados foram deixados sedimentar por gravidade, sendo em seguida lavados para remover a colagenase residual. Os aglomerados celulares foram divididos a uma razão de 1:3 para cultura de manutenção de rotina ou a uma razão de 1:1 para teste posterior. Todas as linhagens de
15 células ES humanas foram mantidas em números de passagem menores que 50, e foram rotineiramente avaliadas quanto ao fenótipo cariotípico normal e à ausência de contaminação por micoplasma.

Exemplo 2

Bioensaio para formação de células expressoras de marcadores
20 característicos da linhagem de endoderma definitivo

A ativina A é um importante mediador da diferenciação em uma ampla gama de tipos de célula, inclusive na diferenciação de células-tronco embrionárias para endoderma definitivo. Quando as células-tronco embrionárias humanas são tratadas com uma combinação de ativina A e Wnt3a,
25 vários genes representativos do endoderma definitivo são regulados para cima. Um bioensaio que mede essa diferenciação em células-tronco embrionárias humanas foi adaptado em um formato miniaturizado para placas com 96 poços para propósitos de triagem. A validação foi concluída usando-se o
tratamento com fontes comerciais de ativina A e Wnt3a proteínas recombinantes e medindo-se a expressão de proteína do fator de transcrição
30 SOX17, considerado como sendo um marcador representativo do endoderma definitivo.

Live Cell Assay: em resumo, aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados em plástico para cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As células foram passadas usando-se
5 tratamento com colagenase (Invitrogen, Cat. n° 17104-019) e raspagem delicada, foram lavadas para remover quantidades residuais de enzimas, e folheadas a uma razão de 1:1 (área superficial) sobre placas pretas com 96 poços revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Packard ViewPlates, Perkin Elmer, Cat. n° 6005182). As células foram
10 deixadas unir-se sob a forma de aglomerados e, então, recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 1 a 3 dias, com alimentação diária de 100 µl, por poço, de meio condicionado com fibroblasto embrionário de camundongo (MEF) suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB).

15 O teste foi iniciado com a lavagem dos poços de cada placa duas vezes em PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), seguida pela adição, a cada poço, de uma alíquota (100 µl) da amostra de teste em meio basal DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032). As condições de teste foram realizadas em triplicata, com alimentação em dias alternados mediante
20 aspiração e substituição do meio de cada poço com amostras para teste, ao longo de um período de teste total de quatro dias. No primeiro e no segundo dias de teste, as amostras para teste adicionadas aos poços de teste foram diluídas em DMEM:F12 com 0,5% de FCS (HyClone, Cat. n° SH30070.03) e 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN). No terceiro e no
25 quarto dias de teste, as amostras para teste adicionadas aos poços de teste foram diluídas em DMEM:F12 com 2% de FCS, sem qualquer Wnt3a. As amostras de controle positivo consistiam em ativina A humana recombinante (PeproTech, Cat. n° 120-14) adicionada a uma concentração de 100 ng/mL por todo o teste, mais Wnt3a (20 ng/mL) nos dias 1 e 2. Nas amostras de
30 controle negativo foi omitido o tratamento tanto com ativina A como com Wnt3a.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de

cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 4 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para captura de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, coradas somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15 campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína SOX17 foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida

como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 3.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo. Dados normalizados foram calculados para médias e desvios-padrão de cada conjunto de réplicas.

A **figura 1** mostra a validação do teste de triagem, testando uma curva de diluição dupla de uma fonte comercial de ativina A (PeproTech) e medindo tanto o número de células (**figura 1A**) como a intensidade de SOX17 (**figura 1B**). Os efeitos ideais da ativina A para indução da expressão de SOX17 foram geralmente observados na faixa de 100 a 200 ng/mL, com um EC₅₀ de 30 a 50 ng/mL. Omitindo-se o Wnt3a do tratamento nos dias 1 e 2 do teste, deixou de produzir uma expressão mensurável de SOX17 (**figura 1B**, barras brancas). A ausência de ativina A também deixou de resultar na expressão de SOX17 (**figura 1B**).

Exemplo 3

Triagem primária: efeitos dos compostos da presente invenção sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo na ausência de ativina A

A diferenciação de células-tronco pluripotentes em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo é mediado através de uma série de interações receptor–ligante que, por sua vez, ativam as quinases receptoras levando à fosforilação e à translocação nuclear de substratos a jusante, eventualmente regulando a expressão de genes-alvo específicos. A ativação ótima dessas cascatas de sinalização em alguns tipos de célula pode requerer a inibição de rotas-padrão opostas. Em outros casos, as rotas redundantes envolvendo membros alternativos de uma família quinase maior podem substituir, em parte, uma ou mais moléculas sinalizadoras. Em outros casos, as rotas canônicas e não canônicas podem divergir com diferentes estímulos iniciadores, mas podem levar a um resultado funcional similar.

As triagens funcionais baseadas em células são uma abordagem para identificação de alvos e métodos inovadores que podem ter um impacto sobre respostas celulares específicas. Uma abordagem muito poderosa envolve uma série de triagens iterativas por meio das quais as pistas ou os
5 acertos de uma triagem são integrados a outra triagem subsequente. Alternativamente, uma série de variáveis diferentes é integrada de maneira combinatória (por exemplo, fatores de crescimento com inibidores da quinase) para identificar efeitos inovadores sobre a diferenciação celular. Nesse caso, uma biblioteca de moléculas pequenas, compreendendo
10 anilina-piridinotriazinas, anilina-piridinotriazinas cíclicas e estruturas intermediárias em sua síntese, foi testada quanto a propriedades importantes durante a diferenciação do endoderma definitivo de células-tronco embrionárias humanas, especificamente quanto a efeitos para reter ou otimizar o número de células na conclusão de uma 'primeira' etapa de diferenciação
15 em meio com baixo teor de soro e na ausência do fator de crescimento ativina A.

Teste de triagem

Semeadura para teste das células: em resumo, aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico
20 para cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As células foram passadas usando-se tratamento com colagenase (Invitrogen, Cat. n° 17104-019) e raspagem delicada, foram lavadas para remover quantidades residuais de enzima, e folheadas com dispersão uniforme a uma razão de 1:1 (área superficial) sobre placas pretas com 96 poços revestidas por MATRIGEL[®]
25 com teor reduzido de fator de crescimento (Packard ViewPlates, PerkinElmer, Cat. n° 6005182), usando-se volumes de 100 µl/poço. As células foram deixadas unir-se sob a forma de aglomerados para, então, recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 1 a 3 dias,
30 com alimentação diária de meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do

ensaio.

Preparação de compostos e teste: os compostos testados foram disponibilizados como estoques de 5 mM no formato de placas com 96 poços, solubilizados em 100% de DMSO (Sigma, Cat. n° D2650) e armazenados a -80°C . Os compostos da biblioteca foram adicionalmente diluídos até uma concentração intermediária de 0,2 mM em 50 mM de HEPES (Invitrogen, Cat. n° 15630-080) e 20% de DMSO, e armazenados a 4°C . As condições de teste foram realizadas em triplicata, com alimentação em dias alternados ao longo de um período de teste de quatro dias. Ensaios de triagem primários foram iniciados por se aspirar o meio de cultura de cada um dos poços seguido de três lavagens em PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190) para remover quantidades residuais de fatores de crescimento e soro. No primeiro dia do teste, os volumes de teste de 200 μl por poço foram adicionados de volta contendo o meio base DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032), suplementado com 0,5% FCS (HyClone, Cat. n° SH30070.03) e 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN), mais 2,5 mM do composto de teste. No terceiro dia do teste, os volumes de teste de 200 μl por poço foram adicionados de volta contendo o meio base DMEM:F12 suplementado com 2% de FCS mais 2,5 mM de composto de teste, sem Wnt3a. As amostras de controle positivo continham o mesmo meio base suplementado com FCS, substituindo-se 100 ng/mL de ativina A humana recombinante (PeproTech, Cat. n° 120-14) pelo composto de teste por todo o período de testes de quatro dias, juntamente com Wnt3a (20 ng/mL) adicionadas somente nos dias 1 e 2. As amostras de controle negativo continham meio base DMEM:F12 suplementado com FCS, adicionando-se Wnt3a nos dias 1 e 2, mas omitindo-se a ativina A.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As

células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 4 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, corados somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15 campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína SOX17 foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 3.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo. Dados normalizados foram

calculados para médias e desvios-padrão de cada conjunto de réplicas.

A **tabela 1** mostra os resultados da triagem primária para os compostos testados, mostrando seus efeitos sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo, na ausência de ativina A. Os resultados incluem medidas quantitativas tanto do número de células como da intensidade de SOX17, tendo sido calculada a média dos respectivos pontos de dados a partir de poços em triplicata, e analisada quanto a cada parâmetro com o uso de campos idênticos em cada poço. A expressão do fator de transcrição SOX17 é considerada indicativa de diferenciação do endoderma definitivo. Os resultados da triagem primária foram capturados a partir de oito placas de triagem com 96 poços. A variabilidade de uma placa para outra foi reduzida com a inclusão de controles positivo e negativo individuais em cada placa. Os resultados são normalizados e expressos como uma porcentagem do controle positivo. Deu-se ênfase à retenção ou amplificação do número de células na conclusão do teste.

A **tabela 2** lista um subconjunto de 27 compostos e seus resultados analisados a partir da triagem primária, onde esses acertos pareceram reter um número de células em teor equivalente a, ou melhor que, o do controle positivo, apesar da ausência de ativina A no teste de triagem.

Em alguns casos, a expressão de SOX17 foi induzida na ausência de ativina A (por exemplo, os Compostos 35 e 22, à base de anilina-piridinotriazinas cíclicas).

Os compostos mostrados na **tabela 2** foram selecionados para avaliação adicional quanto aos efeitos sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo, na ausência de ativina A.

Exemplo 4

Triagem secundária: efeitos dos compostos da presente invenção sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em

células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo com EGF/FGF4 na ausência de ativina A

Uma curva de titulação para ativina A com uma quantidade constante de Wnt3a mostrou pelo menos dois efeitos durante a diferenciação de endoderma definitivo: 1) manutenção dos números de células ou prevenção de perda celular, e 2) indução de um marcador de endoderma definitivo, por exemplo expressão de SOX17 (**exemplo 2**). A triagem primária do **exemplo 3** identificou compostos que poderiam manter, em um teste, números de células similares ou otimizados em relação à adição de ativina A/Wnt3a por si sós. Conduziu-se um teste de triagem secundária para avaliar o efeito das combinações dos compostos identificados com outros fatores de crescimento, especificamente EGF e FGF4, sobre a geração de endoderma definitivo.

Semeadura para teste das células: aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico para cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As células foram passadas usando-se tratamento com colagenase (Invitrogen, Cat. n° 17104-019) e raspagem delicada, foram lavadas para remover quantidades residuais de enzima, e folheadas com dispersão uniforme a uma razão de 1:1 (área superficial) sobre placas pretas com 96 poços revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Packard ViewPlates, PerkinElmer, Cat. n° 6005182), usando-se volumes de 100 µl/poço. As células foram deixadas unir-se sob a forma de aglomerados para, então, recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 1 a 3 dias, com alimentação diária de meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do ensaio.

Preparação de compostos e fatores de crescimento: as concentrações de estoque para EGF (R&D Systems Cat. n° 236-EG) e FGF4 (R&D Systems, Cat. n° 235-F4) eram de 250 ng/mL, cada qual solubilizado em

PBS com 0,1% de BSA (Sigma, Cat. n° A7888). Os compostos foram disponibilizados sob a forma de estoques de 5 mM no formato de placa com 96 poços, solubilizados em 100% de DMSO (Sigma, Cat. n° D2650) e armazenados a -80°C . Os compostos foram adicionalmente diluídos até
5 uma concentração intermediária de 0,2 mM em 50 mM de HEPES (Invitrogen, Cat. n° 15630-080) e 20% de DMSO, e armazenados a 4°C . Todos os fatores de crescimento e inibidores foram preparados em uma placa de polipropileno com 96 poços profundas, diluídos até 5x com soluções de estoque intermediárias em meio base DMEM:F12 no início do
10 teste, e armazenados a 4°C .

Foi conduzido um teste de triagem secundária, com teste em triplicata e alimentação em dias alternados ao longo do período de teste de quatro dias. Os testes foram iniciados mediante aspiração do meio de cultura de cada um dos poços, seguida de três lavagens em PBS para remover
15 quantidades residuais de fatores de crescimento e soro. Os volumes de teste de 80 μl por poço foram adicionados de volta, contendo meio base DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) suplementado com 0,625% de FCS (HyClone, Cat. n° SH30070.03), 25 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems) e 3,125 μM de composto mais 20 μl de estoque a 5x de fatores de
20 crescimento, para produzir uma concentração final de 0,5% de FCS, 20 ng/mL de Wnt3a e 2,5 μM de composto mais 50 ng/mL de EGF e 50 ng/mL de FGF4 no teste. Os poços com controle positivo (100 μl /poço) continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS, 20 ng/mL de Wnt3a e 100 ng/mL de ativina A. Os poços com controle negativo (100 μl /poço)
25 continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS e 20 ng/mL de Wnt3a, omitindo-se a ativina A.

No dia 3, os poços foram aspirados e alimentados com 80 μl de meio base DMEM:F12 suplementado com 2,5% de FCS (HyClone) e 3,125 μM de composto mais 20 μl de estoque a 5x de fatores de crescimento por
30 poço, para produzir uma concentração final de 2% de FCS e 2,5 μM de composto (omitindo-se o Wnt3a), mais 50 ng/mL de EGF e FGF4 no teste. Os poços com controle positivo (100 μl /poço) continham o mesmo meio base

suplementado com 2% de FCS e 100 ng/mL de ativina A, omitindo-se Wnt3a. Os poços com controle negativo (100 µl/poço) continham o mesmo meio base com 2% de FCS, omitindo-se tanto a ativina A como o Wnt3a.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contraporar os núcleos, adicionou-se 4 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, coradas somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15 campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determi-

nada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína SOX17 foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 3.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo. Dados normalizados foram calculados para médias e desvios-padrão de cada conjunto de réplicas.

A **tabela 3A** mostra os resultados para dois fatores de crescimento, EGF e FGF 4 (50 ng/mL cada), testados em combinação com os compostos de anilina-piridinotriazina mostrados na **tabela 2**, por seus efeitos sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo, na ausência de ativina A. Os resultados são classificados em ordem decrescente quanto aos melhores efeitos sobre a expressão de SOX17. Embora os efeitos desses compostos sobre a expressão de SOX17 tenham sido considerados fracos em relação ao controle positivo com ativina A/Wnt3a, as respostas para alguns desses compostos foram consideradas significativas. Por exemplo, uma seleção dos compostos parece ter propriedades exclusivas no que diz respeito à retenção de altos números de células por poço durante o teste, presumivelmente mediante a prevenção da apoptose ou mediante a modulação do ciclo celular. Além disso, esses compostos parecem criar uma sinergia com EGF e FGF4 para promover uma modesta diferenciação do endoderma definitivo, conforme medido pela expressão de SOX17. Os compostos mais potentes são mencionados na **tabela 3B**. Outros compostos testados em combinação com EGF e FGF4 neste teste foram ineficazes para induzir a expressão de SOX17, mas poderiam reter os números de células em teste (por exemplo o Composto 90, com 85% do número de células e 2% de expressão de SOX17).

Exemplo 5

Efeitos dos compostos da presente invenção, em combinação com outros fatores, sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo na ausência de ativina A

Um teste secundário foi conduzido para avaliar o efeito dos compostos da presente invenção com combinações de outros fatores de crescimento individuais, ou compostos conhecidos na literatura por regular a diferenciação do endoderma definitivo.

10 *Semeadura para teste das células:* aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico para cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As células foram passadas usando-se tratamento com colagenase (Invitrogen, Cat. n° 17104-019) e
15 raspagem delicada, foram lavadas para remover quantidades residuais de enzima, e folheadas com dispersão uniforme a uma razão de 1:1 (área superficial) sobre placas pretas com 96 poços revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Packard ViewPlates, PerkinElmer, Cat. n° 6005182), usando-se volumes de 100 µl/poço. As
20 células foram deixadas unir-se sob a forma de aglomerados para, então, recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 1 a 3 dias, com alimentação diária de meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do
25 ensaio.

Preparação de compostos e fatores de crescimento: os estoques de fatores de crescimento adquiridos junto à R&D Systems foram: EGF (Cat. n° 236-EG), FGF4 (Cat. n° 235-F4), PDGF-A (Cat. n° 221-A-A), PDGF-B (Cat. n° 220-BB), PDGF-C (Cat. n° 1687-CC), PDGF-D (Cat. n° 1159-SB),
30 PDGF-A/B (Cat. n° 222-AB), VEGF (Cat. n° 293-VE), BMP-1 (Cat. n° 1927-ZN)BMP-2 (Cat. n° 355-BM), BMP-4 (Cat. n° 314-BP), BMP-6 (Cat. n° 507-BP), BMP-7 (Cat. n° 222-AB), BMP-2/7 (Cat. n° 3229-BM). Outros agentes

testados foram adquiridos conforme exposto a seguir: BMP-7 (Sigma, Cat. n° B1434), LY294002 (Cayman, Cat. n° 70920), PD98059, U0126, U0124 (EMD Biosciences, Cat. n° 453710), muscimol (Tocris, Cat. n° 0289), bicuculina (Tocris, Cat. n° 0130), butirato de sódio (Sigma, Cat. n° B5887). Todos os

5 fatores de crescimento foram solubilizados em PBS com 0,1% de BSA (Sigma, Cat. n° A7888) e armazenados congelados a -80°C . As moléculas pequenas foram solubilizadas em 100% de DMSO (Sigma, Cat. n° D2650) e armazenadas congeladas a -80°C . Os compostos foram disponibilizados sob a forma de estoques de 5 mM no formato de placa com 96 poços,

10 solubilizados em 100% de DMSO e armazenados a -80°C . Os compostos da presente invenção foram adicionalmente diluídos até uma concentração intermediária de 0,2 mM em 50 mM de HEPES (Invitrogen, Cat. n° 15630-080) e 20% de DMSO, e armazenados a 4°C . Todos os fatores de crescimento e inibidores foram preparados em uma placa de polipropileno com

15 96 poços profundas, diluídos até 5x com soluções de estoque intermediárias em meio base DMEM:F12 no início do teste, e armazenados a 4°C .

Foi conduzido um teste de triagem secundária, com teste em triplicata e alimentação em dias alternados ao longo do período de teste de

20 quatro dias. Os testes foram iniciados mediante aspiração do meio de cultura de cada um dos poços, seguida de três lavagens em PBS para remover quantidades residuais de fatores de crescimento e soro. Os volumes de teste de 80 μl por poço foram adicionados de volta, contendo meio base DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) suplementado com 0,625% de FCS (HyClone, Cat. n° SH30070.03), 25 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems) e

25 3,125 μM de composto mais 20 μl de estoque a 5x de fatores de crescimento ou moléculas pequenas, para produzir uma concentração final de 0,5% de FCS, 20 ng/mL de Wnt3a e 2,5 μM de composto. Todos os fatores de crescimento restantes foram testados a uma concentração final de teste de

30 50 ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PDGF-A/B, VEGF, BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 e BMP-2/7). As concentrações finais de teste das moléculas pequenas testadas eram conforme exposto a seguir: muscimol (20 μM), PD98059 (1 μM), LY294002 (2,5 μM),

U0124 (1 μ M), U0126 (1 μ M), butirato de sódio (0,5 mM). Os poços com controle positivo (100 μ l/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS, 20 ng/mL de Wnt3a e 100 ng/mL de ativina A. Os poços com controle negativo (100 μ l/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS e 20 ng/mL de Wnt3a, omitindo-se a ativina A.

No dia 3, os poços foram aspirados e alimentados com 80 μ l de meio base DMEM:F12 suplementado com 2,5% de FCS (HyClone) e 3,125 μ M de composto de anilina-piridinotriazina cíclica mais 20 μ l de estoque a 5x de fatores de crescimento ou moléculas pequenas por poço, para produzir uma concentração final de 2% de FCS e 2,5 mM de composto (omitindo-se o Wnt3a) e, conforme denotado no primeiro dia para todos os fatores de crescimento ou moléculas pequenas restantes. Os poços com controle positivo (100 μ l/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 2% de FCS e 100 ng/mL de ativina A, omitindo-se Wnt3a. Os poços com controle negativo (100 μ l/poço) continham o mesmo meio base com 2% de FCS, omitindo-se tanto a ativina A como o Wnt3a.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 4 μ g/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570)

durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, corados somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15 campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína SOX17 foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 3500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo. Dados normalizados foram calculados para médias e desvios-padrão de cada conjunto de réplicas.

A **tabela 4** mostra os resultados para a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo, em seguida a tratamento com os compostos da presente invenção, em combinação com fatores de crescimento individuais ou outras moléculas pequenas. Em geral, os membros da família BMP (BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 e BMP-2/7) inibiram ou tiveram efeitos desprezíveis sobre a expressão de

SOX17. O mesmo era verdadeiro para a maioria dos inibidores de enzimas de molécula pequena testadas nesse ensaio (LY294002, PD98059, U0126, U0124 e butirato de sódio). Entretanto, alguns membros da família PDGF (PDGF-A, AB, C e D) forneceram um aumento na expressão de SOX17 (de 5 10 a 25% do controle com ativina A/Wnt3a). Outros fatores de crescimento mostrando aumentos similares na expressão de SOX17 incluíam EGF (34%), VEGF (18%) e FGF4 (17%), embora o FGF4 não tenha sido capaz de suportar a retenção dos números de células. O muscimol (agonista do receptor GABA_A) de molécula pequena, testado em combinação com o 10 Composto 35, também ofereceu um modesto aumento na expressão de SOX17, enquanto o agonista do receptor GABA_A, bicuculina, não teve qualquer efeito sobre a expressão de SOX17. EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-AB, PDGF-C, PDGF-D e muscimol foram selecionados para avaliação adicional durante a diferenciação do endoderma definitivo.

15

Exemplo 6

Efeitos dos compostos da presente invenção, em combinação com outros fatores, sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo na ausência de ativina A

20

Um teste secundário foi conduzido para avaliar o efeito das combinações de diferentes compostos com outros agentes individuais sobre a diferenciação do endoderma definitivo. Os outros agentes selecionados para esta triagem tinham previamente mostrado um modesto aumento na formação de endoderma definitivo, conforme testado com o Composto 17 e 25 conforme denotado na **tabela 5**. Nesta triagem, um painel mais amplo de compostos foi avaliado com esses agentes, seja em comparações individuais em pares, seja em combinações agrupadas.

Semeadura para teste das células: aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico para cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As células foram passadas usando-se tratamento com colagenase (Invitrogen, Cat. n° 17104-019) e 30

raspagem delicada, foram lavadas para remover quantidades residuais de enzima, e folheadas com dispersão uniforme a uma razão de 1:1 (área superficial) sobre placas pretas com 96 poços revestidas por MATRIGEL® com teor reduzido de fator de crescimento (Packard ViewPlates, PerkinElmer, Cat. n° 6005182), usando-se volumes de 100 µ/poço. As células foram deixadas unir-se sob a forma de aglomerados para, então, recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 1 a 3 dias, com alimentação diária de meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As placas foram mantidas a 37°C, 5% CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do teste.

Preparação de compostos e fatores de crescimento: os estoques de fatores de crescimento adquiridos junto à R&D Systems foram EGF (Cat. n° 236-EG), FGF4 (Cat. n° 235-F4), PDGF-A (Cat. n° 221-AA), PDGF-D (Cat. n° 1159-SB), PDGF-A/B (Cat. n° 222-AB) e VEGF (Cat. n° 293-VE). O muscimol foi adquirido junto à Tocris (Cat. n° 0289). Todos os fatores de crescimento foram solubilizados em PBS com 0,1% de BSA (Sigma, Cat. n° A7888) e armazenados congelados a -80°C. O muscimol foi solubilizado em 100% de DMSO (Sigma, Cat. n° D2650) e armazenado congelado a -80°C. Os compostos foram disponibilizados sob a forma de estoques de 5 mM no formato de placa com 96 poços, solubilizados em 100% de DMSO e armazenados a -80°C. Os compostos foram adicionalmente diluídos até uma concentração intermediária de 0,2 mM em 50 mM de HEPES (Invitrogen, Cat. n° 15630-080) e 20% de DMSO, e armazenados a 4°C. Todos os fatores de crescimento e inibidores foram preparados em uma placa de polipropileno com 96 poços profundos, diluídos até 5x com soluções de estoque intermediárias em meio base DMEM:F12 no início do teste, e armazenados a 4°C.

Foi conduzido um teste de triagem secundária, com teste em triplicata e alimentação em dias alternados ao longo do período de teste de quatro dias. Os testes foram iniciados mediante aspiração do meio de cultura de cada um dos poços, seguido de três lavagens em PBS para remover quantidades residuais de fatores de crescimento e soro. Os volumes de teste

de 80 µl por poço foram adicionados de volta, contendo meio base DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) suplementado com 0,625% de FCS (HyClone, Cat. n° SH30070.03), 25 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems) e 3,125 µM de composto mais 20 µl de estoque a 5x de fator de crescimento ou moléculas pequenas, para produzir uma concentração final de 0,5% de FCS, 20 ng/mL de Wnt3a e 2,5 µM. Todos os fatores de crescimento restantes foram testados a uma concentração final de teste de 50 ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-AB e VEGF). A concentração final de teste do muscimol era de 20 µM. Os poços com controle positivo (100 µ/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS, 20 ng/mL de Wnt3a e 100 ng/mL de ativina A. Os poços com controle negativo (100 µ/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS e 20 ng/mL de Wnt3a, omitindo-se a ativina A.

No dia 3, os poços foram aspirados e alimentados com 80 µl de meio base DMEM:F12 suplementado com 2,5% de FCS (HyClone) e 3,125 µM de composto mais 20 µl de estoque a 5x de fatores de crescimento ou moléculas pequenas por poço, para produzir uma concentração final de 2% de FCS e 2,5 µM de composto (omitindo-se o Wnt3a) e, conforme denotado no primeiro dia para todos os fatores de crescimento ou moléculas pequenas restantes. Os poços com controle positivo (100 µ/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 2% de FCS e 100 ng/mL de ativina A, omitindo-se Wnt3a. Os poços com controle negativo (100 µ/poço) continham o mesmo meio base com 2% de FCS, omitindo-se tanto a ativina A como o Wnt3a.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura

ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contraporar os núcleos, adicionou-se 4 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para captura de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, corados somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15 campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína SOX17 foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 3.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo. Dados normalizados foram calculados para médias e desvios-padrão de cada conjunto de réplicas.

A **tabela 5** mostra compostos previamente identificados como acertos (**tabela 2**), testados em um bioensaio de endoderma definitivo em várias combinações com fatores de crescimento e muscimol, sem ativina A. Alguns compostos tiveram efeitos mínimos ou fracos sobre a expressão de SOX17 com todas as combinações de fator de crescimento testadas. Entretanto, alguns compostos foram capazes de induzir expressão de SOX17 significativa com algumas, mas não com todas, as combinações de fator de crescimento. Um composto em particular, o Composto 34, teve respostas sinérgicas significativas com todos os fatores de crescimento testados, e mediou aumentos tanto nos números de células como na expressão de SOX17 neste teste: Composto 39 com 1) EGF+FGF4 = 77% da resposta do controle positivo; ou 2) EGF+FGF4+PDGF-AB = 68% da resposta do controle positivo; ou 3) EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF = 31% da resposta do controle positivo.

15

Exemplo 7

Efeitos do Composto 34, em combinação com outros fatores, sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo na ausência de ativina A

20

Neste exemplo, fez-se um esforço para analisar o número mínimo de fatores de crescimento requeridos, em combinação com o composto de anilina-piridinotriazina cíclica, Composto 34, para produzir uma robusta resposta de SOX17, na ausência de ativina A. Também neste exemplo um novo fator de crescimento, GDF-8, foi adicionado para avaliação. O GDF-8, também conhecido como miostatina, é um membro da família TGF- β e foi demonstrado seu uso nos receptores de ativina tipo II e TGF- β tipo I (ALK4/5) para induzir a fosforilação de SMAD 2/3.

Semeadura para teste das células: aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico para cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As células foram passadas usando-se tratamento com colagenase (Invitrogen, Cat. n° 17104-019) e

30

raspagem delicada, foram lavadas para remover quantidades residuais de enzima, e folheadas com dispersão uniforme a uma razão de 1:1 (área superficial) sobre placas pretas com 96 poços revestidas por MATRIGEL® com teor reduzido de fator de crescimento (Packard ViewPlates, PerkinElmer, Cat. n° 6005182), usando-se volumes de 100 µl/poço. As células foram deixadas unir-se sob a forma de aglomerados para, então, recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 1 a 3 dias, com alimentação diária de meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do ensaio.

Preparação de compostos e fatores de crescimento: estoques de fatores de crescimento adquiridos junto à R&D Systems foram: EGF (Cat. n° 236-EG), FGF4 (Cat. n°235-F4), PDGF-A (Cat. n°221-A-A), PDGF-D (Cat. n°1159-SB), PDGF-A/B (Cat. n°222-AB), VEGF (Cat. n°293-VE) e GDF-8 (Cat. n° 788-G8). O muscimol foi adquirido junto à Tocris (Cat. n° 0289). Todos os fatores de crescimento foram solubilizados em PBS com 0,1% de BSA (Sigma, Cat. n° A7888) e armazenados congelados a -80°C. O muscimol foi solubilizado em 100% de DMSO (Sigma, Cat. n° D2650) e armazenado congelado a -80°C. Os compostos de anilina-piridinotriazina cíclica foram disponibilizados sob a forma de estoques de 5 mM no formato de placa com 96 poços, solubilizados em 100% de DMSO e armazenados a -80°C. O composto 34 foi adicionalmente diluído até uma concentração intermediária de 0,2 mM em 50 mM de HEPES (Invitrogen, Cat. n° 15630-080) e 20% de DMSO, e armazenado a 4°C. Todos os fatores de crescimento e inibidores foram preparados em uma placa de polipropileno com 96 poços profundos, diluídos até 5x com soluções de estoque intermediárias em meio base DMEM:F12 no início do teste, e armazenados a 4°C.

Foi conduzido um teste de triagem secundária, com teste em triplicata e alimentação em dias alternados ao longo do período de teste de quatro dias. Os testes foram iniciados mediante aspiração do meio de cultura de cada uma das poços, seguida de três lavagens em PBS para remover

quantidades residuais de fatores de crescimento e soro. Os volumes de teste de 80 µl por poço foram adicionados de volta, contendo meio base DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) suplementado com 0,625% de FCS (HyClone, Cat. n° SH30070.03), 25 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems) e 3,125 µM de Composto 27 mais 20 µl de estoque a 5x de fatores de crescimento ou moléculas pequenas, para produzir uma concentração final de 0,5% de FCS, 20 ng/mL de Wnt3a e 2,5 µM de Composto 34. Todos os fatores de crescimento restantes foram testados a uma concentração final de teste de 50 ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B e VEGF), com a exceção de GDF-8, que foi testado a 25 ng/mL. A concentração final de teste do muscimol era de 20 µM. Os poços com controle positivo (100 µl/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS, 20 ng/mL de Wnt3a e 100 ng/mL de ativina A. Os poços com controle negativo (100 µl/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS e 20 ng/mL de Wnt3a, omitindo-se a ativina A.

No dia 3, os poços foram aspirados e alimentados com 80 µl de meio base DMEM:F12 suplementado com 2,5% de FCS (HyClone) e 3,125 µM do Composto 34 mais 20 µl de estoque a 5x de fatores de crescimento ou moléculas pequenas por poço, para produzir uma concentração final de 2% de FCS e 2,5 µM de Composto 34 (omitindo-se o Wnt3a) e, conforme denotado no primeiro dia para todos os fatores de crescimento ou moléculas pequenas restantes. Os poços com controle positivo (100 µl/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 2% de FCS e 100 ng/mL de ativina A, omitindo-se Wnt3a. Os poços com controle negativo (100 µl/poço) continham o mesmo meio base com 2% de FCS, omitindo-se tanto a ativina A como o Wnt3a.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas

novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contraporar os núcleos, adicionou-se 4 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, coradas somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15 campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína SOX17 foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 3.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo. Dados normalizados

foram calculados para médias e desvios-padrão de cada conjunto de réplicas.

A **tabela 6** mostra os resultados desse teste. Quando o GDF-8 estava presente em qualquer combinação com o Composto 34, observou-se um aumento substancial na expressão de SOX17. Além disso, o GDF-8 e o Wnt3a com o Composto 34 foram suficientes para produzir uma expressão de SOX17 (88% do controle) em uma faixa similar àquela observada em um tratamento com 100 ng/mL de ativina A/Wnt3a. Parece que o fator de crescimento GDF-8 pode servir como uma substituição à ativina A durante a diferenciação do endoderma definitivo de células-tronco embrionárias humanas.

Exemplo 8

Triagem adicional para compostos capazes de diferenciar células-tronco pluripotentes em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo

Com base nas estruturas de composto para os acertos identificados até então, conduziu-se uma busca por análogos, a fim de encontrar compostos relacionados adicionais para testar no bioensaio de endoderma definitivo. A busca por subestruturas resultou em compostos para triagem. Os parâmetros de triagem para este teste foram designados com a combinação de fatores que rendeu ótimos resultados em testes anteriores, especificamente combinando EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol e GDF-8 com o composto de moléculas pequenas.

Semeadura para teste das células: em resumo, aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico para cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As células foram passadas usando-se tratamento com colagenase (Invitrogen, Cat. n° 17104-019) e raspagem delicada, foram lavadas para remover quantidades residuais de enzima, e folheadas com dispersão uniforme a uma razão de 1:1 (área superficial) sobre placas pretas com 96 poços revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Packard ViewPlates,

PerkinElmer, Cat. n° 6005182), usando-se volumes de 100 µl/poço. As células foram deixadas unir-se sob a forma de aglomerados para, então, recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 1 a 3 dias, com alimentação diária de meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do ensaio.

Preparação de compostos e teste: os fatores de crescimento adquiridos junto à R&D Systems foram: EGF (Cat. n° 236-EG), FGF4 (Cat. n°235-F4), PDGF-A (Cat. n°221-AA), PDGF-D (Cat. n°1159-SB), PDGF-AB (Cat. n°222-AB), VEGF (Cat. n°293-VE) e GDF-8 (Cat. n° 788-G8). O muscimol foi adquirido junto à Tocris (Cat. n° 0289). A triagem foi conduzida com o uso de uma biblioteca de compostos que foram disponibilizados como estoques de 5 mM no formato de placa com 96 poços, solubilizados em 100% de DMSO (Sigma, Cat. n° D2650) e armazenados a -80°C. Os compostos foram adicionalmente diluídos até uma concentração intermediária de 0,2 mM em 50 mM de HEPES (Invitrogen, Cat. n° 15630-080) e 20% de DMSO, e armazenados a 4°C. As condições de teste foram realizadas em poços individuais, com alimentação em dias alternados ao longo de um período de teste de quatro dias. Ensaio de triagem primários foram iniciados por se aspirar o meio de cultura de cada um dos poços seguido de três lavagens em PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190) para remover quantidades residuais de fatores de crescimento e soro. No primeiro dia do teste, os volumes de teste de 200 µl por poço foram adicionados de volta contendo o meio base DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032), suplementado com 0,5% FCS (HyClone, Cat. n° SH30070.03) e 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN), mais 2,5 µM do composto. Todos os fatores de crescimento restantes foram testados a uma concentração final de teste de 50 ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-AB e VEGF), com a exceção de GDF-8, que foi testado a 25 ng/mL. A concentração final de teste do muscimol era de 20 µM. As amostras de controle positivo continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS mais 20 ng/mL de

Wnt3a e 100 ng/mL de ativina A humana recombinante (PeproTech, Cat. n° 120-14). As amostras de controle negativo continham o meio base DMEM:F12 suplementado com 0,5% de FCS e 20 ng/mL Wnt3a. No terceiro dia do teste, os volumes de teste de 200 µl por poço foram adicionados de volta contendo o meio base DMEM:F12 suplementado com 2% de FCS mais 2,5 µM de composto, sem Wnt3a. Todos os fatores de crescimento restantes foram testados a uma concentração final de teste de 50 ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-AB e VEGF), com a exceção de GDF-8, que foi testado a 25 ng/mL. A concentração final de teste do muscimol era de 20 µM. As amostras de controle positivo continham o mesmo meio base suplementado com 2% de FCS mais 100 ng/mL de ativina A humana recombinante (PeproTech, Cat. n° 120-14). As amostras de controle negativo continham o meio base DMEM:F12 suplementado com 2% de FCS. As amostras de controle positivo continham o mesmo meio base suplementado com FCS, substituindo-se 100 ng/mL de ativina A humana recombinante (PeproTech, Cat. n° 120-14) pelo composto de anilina-piridinotriazina por todo o período de testes de quatro dias, juntamente com Wnt3a (20 ng/mL) nos dias 1 e 2. As amostras de controle negativo continham meio base DMEM:F12 suplementado com FCS, adicionando-se Wnt3a nos dias 1 e 2, mas omitindo-se o tratamento com ativina A.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG,

sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 4 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, corados somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15 campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total da proteína SOX17 foi relatada como a intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula vezes a área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 3.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo. Dados normalizados foram calculados para médias e desvios-padrão de cada conjunto de réplicas.

Na **tabela 7**, o GDF-8 e uma combinação de fatores de crescimento/agonistas (EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol) foram testados com um novo conjunto de compostos à base de anilina-piridinotriazina. Os resultados de duas placas de teste neste experimento individual são classificadas em relação às respostas de SOX17 (como uma

porcentagem do tratamento do controle positivo com ativina A e Wnt3a). Foram identificados compostos adicionais que mostram atividade sinérgica significativa com o grupo de fator de crescimento/agonista. Esses compostos foram eficazes tanto para reter o número de células de teste, como para
5 produzir expressão de SOX17 durante a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas na ausência de ativina A. Uma lista desses acertos com atividade maior que 25% do controle positivo é mostrada na **tabela 8**.

Deve-se observar que quatro acertos oriundos da triagem primária inicial (**tabela 2**) foram duplicados na biblioteca de análogos. Dois desses
10 compostos repetiram-se como acertos na triagem de análogos (Composto 34 e Composto 35, mostrados em uma caixa na **tabela 8**), um foi um acerto fraco na triagem de análogos, e um composto não repetiu o resultado.

Exemplo 9

Efeitos dos compostos da presente invenção sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo na presença de baixas concentrações de ativina A
15

É importante determinar se os compostos que foram identificados como acertos nos bioensaios de endoderma definitivo, acima, também
20 poderiam exibir uma atividade sinérgica com doses muito baixas de ativina A. Realizou-se uma avaliação inicial com o uso da lista curta de acertos dos compostos à base de anilina-piridinotriazina cíclica apontados na **tabela 3B**.

Semeadura para teste das células: aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico para
25 cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As células foram passadas usando-se tratamento com colagenase (Invitrogen, Cat. n° 17104-019) e raspagem delicada, foram lavadas para remover quantidades residuais de enzima, e folheadas com dispersão uniforme a uma razão de 1:1 (área superficial)
30 sobre placas pretas com 96 poços revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Packard ViewPlates, PerkinElmer, Cat. n° 6005182), usando-se volumes de 100 µl/poço. As células foram deixadas

unir-se sob a forma de aglomerados para, então, recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 1 a 3 dias, com alimentação diária de meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em
5 uma caixa umidificada por toda a duração do ensaio.

Preparação de compostos e fatores de crescimento: estoques de fatores de crescimento adquiridos junto à R&D Systems foram: EGF (Cat. n° 236-EG), FGF4 (Cat. n°235-F4), PDGF-A (Cat. n°221-AA), PDGF-D (Cat. n°1159-SB), PDGF-A/B (Cat. n°222-AB), VEGF (Cat. n°293-VE) e GDF-8
10 (Cat. n° 788-G8). A ativina A foi adquirida junto à PeproTech (Cat. n°). O muscimol foi adquirido junto à Tocris (Cat. n° 0289). Todos os fatores de crescimento foram solubilizados em PBS com 0,1% de BSA (Sigma, Cat. n° A7888) e armazenados congelados a –80°C. O muscimol foi solubilizado em 100% de DMSO (Sigma, Cat. n° D2650) e armazenado congelado a –80°C.
15 Os compostos foram disponibilizados sob a forma de estoques de 5 mM no formato de placa com 96 poços, solubilizados em 100% de DMSO e armazenados a –80°C. Os compostos foram adicionalmente diluídos até uma concentração intermediária de 0,2 mM em 50 mM de HEPES (Invitrogen, Cat. n° 15630-080) e 20% de DMSO, e armazenados a 4°C.
20 Todos os fatores de crescimento e inibidores foram preparados em uma placa de polipropileno com 96 poços profundas, diluídos até 5x com soluções de estoque intermediárias em meio base DMEM:F12 no início do teste, e armazenados a 4°C.

Foi conduzido um teste de triagem secundária, com teste em
25 triplicata e alimentação em dias alternados ao longo do período de teste de quatro dias. Os testes foram iniciados mediante aspiração do meio de cultura de cada um dos poços, seguido de três lavagens em PBS para remover quantidades residuais de fatores de crescimento e soro. Os volumes de teste de 80 µl por poço foram adicionados de volta, contendo meio base
30 DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) suplementado com 0,625% de FCS (HyClone, Cat. n° SH30070.03), 25 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems), 12,5 ng/mL de ativina A e 3,125 µM de composto mais 20 µl de estoque a 5x

de fator de crescimento ou moléculas pequenas para produzir uma concentração final de 0,5% de FCS, 20 ng/mL de Wnt3a, 10 ng/mL de ativina A e 2,5 μ M de composto. Todos os fatores de crescimento restantes foram testados a uma concentração final de teste de 50 ng/mL (EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-A/B e VEGF), com a exceção de GDF-8, que foi usado a 25 ng/mL. A concentração final de teste do muscimol era de 20 μ M. Os poços com controle positivo (100 μ l/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS, 20 ng/mL de Wnt3a e 10 ng/mL (dose baixa) ou 100 ng/mL (dose alta) de ativina A. Os poços com controle negativo (100 μ l/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 0,5% de FCS e 20 ng/mL de Wnt3a, omitindo-se a ativina A.

No dia 3, os poços foram aspirados e alimentados com 80 μ l de meio base DMEM:F12 suplementado com 2,5% de FCS (HyClone), 12,5 ng/mL de ativina A e 3,125 μ M de composto mais 20 μ l de estoque a 5x de fatores de crescimento ou moléculas pequenas por poço, para produzir uma concentração final de 2% de FCS, 10 ng/mL de ativina A e 2,5 μ M de composto (omitindo-se o Wnt3a) e, conforme denotado no primeiro dia para todos os fatores de crescimento ou moléculas pequenas restantes. Os poços com controle positivo (100 μ l/poço) continham o mesmo meio base suplementado com 2% de FCS e 10 ng/mL ou 100 ng/mL de ativina A, omitindo-se Wnt3a. Os poços com controle negativo (100 μ l/poço) continham o mesmo meio base com 2% de FCS, omitindo-se tanto a ativina A como o Wnt3a.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems,

Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 4 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

10 A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, corados
15 somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15 campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer
20 Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína SOX17 foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada,
25 definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 3.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo. Dados normalizados
30 foram calculados para médias e desvios-padrão de cada conjunto de réplicas.

A **tabela 9** mostra os resultados do teste de vários compostos e

diferentes combinações de fatores de crescimento com baixas doses de ativina A. Alguns compostos exibiram respostas sinérgicas robustas com vários fatores de crescimento. Em outros casos, os efeitos sinérgicos foram mais modestos, porém significativos em relação a um controle com baixa dose de ativina A. Outros compostos não apresentaram qualquer atividade em relação ao controle com baixa dose de ativina A.

Exemplo 10

Efeitos dos compostos da presente invenção sobre a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas individuais em células expressoras de marcadores da linhagem de endoderma definitivo, na ausência de ativina A

Os compostos à base de anilina-piridinotriazina cíclica foram, também, testados em um formato de triagem usando células dispersas, por meio de tratamento enzimático, em células individuais e folheadas em uma camada única para teste. O teste também fez alterações para eliminar o soro que poderia fornecer fatores de crescimento, ainda que em baixas doses. Para isso, o meio basal foi alterado, e o soro foi substituído por BSA isento de ácido graxo. O teste foi encurtado de quatro dias para três dias, de modo a oferecer um período mais estreito para a medição de resultados. Finalmente, o teste incluiu dois fatores de crescimento, EGF e FGF4, que haviam previamente mostrado efeitos significativos porém abaixo do ótimo sobre a diferenciação do endoderma definitivo na ausência de ativina A.

Teste de triagem

Semeadura para teste das células: em resumo, aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico para cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As culturas foram tratadas com Accutase (Sigma, Cat. n° A6964), usando-se volumes equivalentes a 10 µL por 10 cm² de área superficial durante 5 minutos a 37°C e, então, foram delicadamente ressuspensas, peletizadas por centrifugação, e ressuspensas em meio condicionado com MEF para contagem. Para semeadura para o teste, as células foram folheadas a 50.000 células/cm² sobre placas pretas

com 96 poços revestidas por MATRIGEL[®] com fator de crescimento reduzido (Packard ViewPlates, Cat. n° 6005182), usando-se volumes de 100 µl/poço. As células foram deixadas unir-se e recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 3 a 5 dias, com alimentação diária de meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do ensaio.

Preparação de compostos e teste: estoques de EGF e FGF4 foram preparados em uma placa de polipropileno com 96 poços (Corning, Inc., Cat. n° 3960). O Composto 22 estava disponível como um estoque de 5 mM solubilizado em 100% de DMSO (Sigma, Cat. n° D2650) e armazenado a -80°C. Os testes foram iniciados mediante aspiração do meio de cultura de cada um dos poços, seguido de três lavagens em PBS para remover quantidades residuais de fatores de crescimento e soro. Os volumes de teste de 80 µl por poço foram adicionados de volta, contendo meio base RPMI 1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400-089) suplementado com 2,5% de BSA isento de ácido graxo (MP Biomedicals LLC, Cat. n° 152401), 10 ng/mL de bFGF (PeproTech Inc, Cat. n° 100-18B), 25 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN) e 3,125 µM de Composto 22 mais 20 µl de estoque a 5x de fatores de crescimento, para produzir uma concentração final de 2% de BSA isento de ácido graxo, 8 ng/mL de bFGF (PeproTech Inc; Cat. n° 100-18B), 20 ng/mL de Wnt3a, e 2,5 µM de Composto 22 no teste. Os poços de controle positivo continham o mesmo meio base suplementado com 2% de BSA isento de ácido graxo, 8 ng/mL de bFGF, 20 ng/mL de Wnt3a e 100 ng/mL de ativina A humana recombinante (PeproTech, Cat. n° 120-14). Os poços de controle negativo continham o mesmo meio base suplementado com 2% de BSA isento de ácido graxo, 8 ng/mL de bFGF e 20 ng/mL de Wnt3a, mas omitiu-se o tratamento com ativina A.

No segundo dia de teste, os poços foram novamente aspiradas e alimentadas com 80 µl por poço que foram adicionados de volta, contendo meio base RPMI 1640 suplementado com 2,5% de BSA isento de ácido graxo, 10 ng/mL de bFGF e 3,125 µM de Composto 22 mais 20 µl de

estoque a 5x de fatores de crescimento, para produzir uma concentração final de 2% de BSA isento de ácido graxo, 8 ng/mL de bFGF e 2,5 μ M de Composto 22 no teste. Os poços de controle positivo continham o mesmo meio base suplementado com 2% de BSA isento de ácido graxo, 8 ng/mL de bFGF e 100 ng/mL de ativina A humana recombinante. As amostras de controle negativo continham o mesmo meio base suplementado com 2% de BSA isento de ácido graxo e 8 ng/mL de bFGF, mas omitiu-se o tratamento com ativina A.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contraporar os núcleos, adicionou-se 4 μ g/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 μ l/poço de PBS para formação de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, corados somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15

campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína SOX17 foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 3.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo. Dados normalizados foram calculados para médias e desvios-padrão de cada conjunto de réplicas.

A **tabela 10** mostra os resultados desse teste com o Composto 34. As amostras de controle com EGF e/ou FGF4 sozinho, sem o Composto 34, apresentaram baixa expressão de SOX17. A adição do Composto 34 adicionou um otimização significativa da expressão de SOX17.

Exemplo 11

Comparação entre a capacidade da ativina A e do GDF-8 para diferenciar células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo

Um exemplo anterior mostrou que o GDF-8 é capaz de substituir a ativina A para diferenciar células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo. Foi importante conhecer as potências relativas de GDF-8 e ativina A, no que se refere a sua capacidade para diferenciar células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo. Um teste de resposta à dosagem foi conduzido com o uso de concentrações equivalentes de cada fator de

crescimento, para comparar os resultados durante a diferenciação das células-tronco embrionárias.

Preparação de células para teste: culturas de estoque de células-tronco embrionárias humanas (linhagem de células-tronco embrionárias humanas H1) foram mantidas em um estado pluripotente não diferenciado sobre placas revestidas por MATRIGEL com teor reduzido de fator de crescimento, em meio condicionado com MEF e com passagem, em média, a cada quatro dias. A passagem foi realizada mediante a exposição das culturas celulares a uma solução de 1 mg/mL de dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37°C, seguida de enxágue da camada única com meio de cultura condicionado com MEF e raspagem delicada para recuperar os aglomerados celulares. Os aglomerados foram centrifugados a baixa velocidade para coletar-se um pélete de células e para remover quantidades residuais de dispase. Os aglomerados celulares foram divididos a uma razão de 1:3 ou 1:4 para cultura de manutenção de rotina, ou a uma razão de 1:1 para teste imediato. Todas as linhagens de células tronco embrionárias de ser humano foram mantidas com números de passagem menores que 50, e foram rotineiramente avaliadas quanto ao fenótipo cariotípico normal e quanto à ausência de contaminação por micoplasma.

Os aglomerados celulares usados no teste foram uniformemente ressuspensos em meio condicionado com MEF e suplementado com 8 ng/mL de bFGF, e foram semeados sobre placas com 96 poços Packard VIEWPLATES (PerkinElmer, Cat. n° 6005182) revestidas por MATRIGEL® com teor reduzido de fator de crescimento, em volumes de 100 µl/poço. Usou-se um meio condicionado MEF suplementado com 8 ng/ml de bFGF para o plaqueamento inicial e expansão. A alimentação diária foi conduzida aspirando-se o meio de cultura gasto de cada poço, e substituindo o mesmo por um volume igual de meio sem uso. As placas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do teste.

Teste: o teste foi iniciado mediante a aspiração do meio de cultura de cada poço, adicionando-se de volta uma alíquota de 100 µl do

meio para teste. As condições de teste foram realizadas em quadruplicata ao longo de um período de teste total de três dias, com alimentação nos dias 1 e 2, mediante aspiração e substituição do meio em cada poço com meio de teste sem uso. Duas cubas de polipropileno com 12 canaletas (Argos Technologies, Inc, Cat. n° B3135) foram usadas para produzir o meio de teste contendo diferentes concentrações de ativina A (PeproTech, Cat. n°120-14) ou GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8). As canaletas numeradas de 2 a 12 de cada cuba continham 1 mL de meio para teste composto de meio RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n°: 22400) suplementado com 2% de fração V de albumina bovina isenta de ácido graxo (FAF BSA) (MP Biomedicals, Inc, Cat. n° 152401) e 8 ng/mL de bFGF (PeproTech Inc., Cat. n°: 100-18B), e com 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems Cat. n° 1324-WN/CF) adicionados no dia 1, e omitidos nos dias 2 e 3. A canaleta número 1 de cada cuba continha 1.600 ng/mL de ativina A ou 1.600 ng/mL de GDF-8, diluídos no mesmo meio para teste. Transferiu-se 1 mL de meio da canaleta número 1 para a canaleta número 2, misturando-se bem. Uma ponta de pipeta sem uso foi usada para transferir um mL do meio da canaleta número 2 ao canal número 3, seguido de mistura cuidadosa. O mesmo procedimento foi repetido em sequência até a canaleta número 11, para cada respectiva cuba. A canaleta número 12 de cada cuba continha meio sem ativina A ou GDF-8. Desse modo, criou-se uma série de diluições para teste a duas vezes, contendo ativina A ou GDF-8 a concentrações na faixa de 1,6 ng/mL a 1.600 ng/mL, para adição aos respectivos poços de teste.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de três dias de cultura, as placas de teste foram lavadas uma vez com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à

temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha, e adicionado a cada poço durante duas horas, à temperatura ambiente. Após lavar três vezes com PBS, adicionou-se a cada poço o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, Invitrogen, Cat. n° A21467) diluído a 1:200 em PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 5 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante quinze minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

10 A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Foram capturadas imagens de 25 campos por poço. As medições quanto à intensidade total de SOX17 em cada poço foram obtidas com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada conjunto de dados quadruplicado. A expressão total de proteína SOX17 foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 4.500. Os dados da intensidade total de SOX17 foram calculados usando-se GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados foram normalizados para definir os menores e maiores valores em cada conjunto de dados como 0% e 100%, respectivamente. A **tabela 11** mostra os valores normalizados para cada um dentre os conjuntos de dados de ativina A e GDF-8. Duas curvas sigmoidais dose-resposta são mostradas na **figura 2** conforme geradas com o uso dos valores normalizados mostrados na **tabela 11**. Os valores de R^2 , indicando o ajuste de curva, foram calculados com o uso de GraphPad Prism e determinados como sendo 0,9944 para ativina A e 0,9964 para GDF-8. Usando o GraphPad

Prism, os valores EC_{50} para cada fator de crescimento foram calculados e determinados como sendo 13,9 ng/mL para a ativina A e 184,8 ng/mL para o GDF-8. Esses dados indicam que o GDF-8 é menos potente que a ativina A, no que se refere a induzir células-tronco embrionárias humanas à diferenciação para células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo. Ainda assim, o GDF-8 pode substituir a ativina A e, a concentrações específicas, pode induzir uma população equivalente de células de endoderma definitivo, conforme denotado pela expressão de SOX17.

5

Exemplo 12

Células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo, que são formadas de acordo com os métodos da presente invenção, são capazes de diferenciar-se adicionalmente em células expressoras de marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática

10

Populações paralelas de células-tronco embrionárias humanas foram diferenciadas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo com o uso de GDF-8 em combinação com o Composto 34 ou o Composto 56. Em seguida, um protocolo de diferenciação gradual foi aplicado às células tratadas para promover a diferenciação para endoderma pancreático e linhagens endócrinas. Um controle paralelo, consistindo em células tratadas com ativina A e Wnt3a, foi mantido para propósitos de comparação durante todo o processo de diferenciação gradual. As amostras foram tomadas a cada estágio da diferenciação, para determinar o aparecimento de biomarcadores para proteínas e mRNA, representativos dos vários estágios de diferenciação.

15

20

25

30

Preparação de células para teste: culturas de estoque de células-tronco embrionárias humanas (linhagem de células-tronco embrionárias humanas H1) foram mantidas em um estado pluripotente não diferenciado sobre placas revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento, em meio condicionado com MEF e com passagem, em média, a cada quatro dias. A passagem foi realizada mediante a exposição

das culturas celulares a uma solução de 1 mg/mL de dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37°C, seguida de enxágue da camada única com meio de cultura condicionado com MEF e raspagem delicada para recuperar os aglomerados celulares. Os aglomerados foram

5 centrifugados a baixa velocidade para coletar-se um pélete de células e para remover quantidades residuais de dispase. Os aglomerados celulares foram divididos a uma razão de 1:3 ou 1:4 para cultura de manutenção de rotina, ou a uma razão de 1:1 para teste imediato. Todas as linhagens de células ES humanas foram mantidas em números de passagem menores que 50, e

10 foram rotineiramente avaliadas quanto ao cariótipo normal e à ausência de micoplasma.

Os aglomerados celulares foram uniformemente ressuspensos em meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF e semeado sobre as placas de cultura de paredes pretas com 24 poços

15 revestidas por MATRIGEL® com teor reduzido de fator de crescimento (Arctic White, Cat. n° AWLS-303012) em volumes de 0,5 mL/poço. A alimentação diária foi conduzida aspirando-se o meio de cultura gasto de cada poço, e substituindo o mesmo por um volume igual de meio sem uso. As placas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂ por toda a duração do teste.

20 *Teste:* o teste foi iniciado mediante a aspiração do meio de cultura de cada poço, adicionando-se de volta uma alíquota (0,5 mL) de meio para teste. As condições de teste para a primeira etapa de diferenciação foram conduzidos ao longo de um período de três dias, com alimentação diária mediante aspiração e substituição do meio de cada poço

25 com meio de teste sem uso. No primeiro dia do teste, 100 ng/mL de ativina A (PeproTech, Cat. n° 120-14) ou 200 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) foram adicionados aos respectivos poços de teste nas quais cada fator de crescimento foi diluído em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400) com 1% de fração V de albumina bovina isenta de ácido graxo (FAF

30 BSA) (MP Biomedicals, Inc, Cat. n° 152401), 1% de Probumin (Millipore, Cat. n° 81-068-3) e 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF). No segundo dia de teste, diluiu-se 100 ng/mL de ativina A ou 200 ng/mL de

GDF-8 em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de FAF BSA sem Wnt3a. Em algumas amostras para teste usando GDF-8, o Wnt3a foi substituído por um Composto 34 ou um Composto 56, a uma concentração de 2,5 μ M, e um Composto 34 ou um Composto 56 foi adicionado

5 diariamente durante todos os três dias de diferenciação do endoderma definitivo. Na conclusão da primeira etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletadas para análise de citometria de fluxo, de modo a avaliar os níveis de CXCR4, um marcador de formação de endoderma definitivo. Os poços adicionais foram coletadas para análise RT-PCR, de

10 modo a medir outros marcadores de diferenciação.

Na conclusão da primeira etapa de diferenciação, os conjuntos replicados de poços paralelos de cada grupo de tratamento foram submetidos a uma diferenciação gradual adicional. É importante notar que, após a primeira etapa de diferenciação, todos os poços passando por cultura e

15 diferenciação contínuas receberam o mesmo tratamento. O protocolo para essa diferenciação contínua é descrito abaixo.

A etapa 2 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de dois dias. As células foram alimentadas diariamente mediante aspiração do meio de cada poço, substituindo-se o mesmo por uma alíquota sem uso (0,5

20 mL) de meio DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) contendo 2% de fração V de albumina bovina isenta de ácido graxo (FAF BSA) (MP Biomedicals, Inc, Cat. n° 152401), 50 ng/mL de FGF7 (PeproTech, Cat. n° 100-19) e 250 nM de ciclopamina (Calbiochem, Cat. n° 239804).

A etapa 3 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de

25 quatro dias. As células foram alimentadas diariamente mediante aspiração do meio de cada poço, substituindo-se o mesmo por uma alíquota sem uso (0,5 mL) de glicose com alto teor de DMEM (Invitrogen, Cat. n° 10569) suplementado com 1% de B27 (Invitrogen, Cat. n° 17504-044), 50 ng/mL de FGF7, 100 ng/mL de noguina (R&D Systems, Cat. n° 3344-NG), 250 nM de

30 KAAD-ciclopamina (Calbiochem, Cat. n° 239804) e 2 mM de ácido todo-transretinoico (RA) (Sigma-Aldrich, Cat. n° R2625). Na conclusão da terceira etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletadas para

análise de RT-PCR, de modo a medir os marcadores de diferenciação. Outros poços de cultura foram submetidos a análise de imagens de alto conteúdo quanto a níveis de expressão de proteína para Pdx1, um fator de transcrição associado ao endoderma pancreático, e Cdx2, um fator de transcrição associado ao endoderma intestinal.

A etapa 4 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de três dias. As células foram alimentadas diariamente mediante aspiração do meio de cada poço, substituindo-se o mesmo por uma alíquota sem uso (0,5 mL) de glicose com alto teor de DMEM suplementado com 1% de B27, 100 ng/mL de noguina, 100 ng/mL de netrina-4, 1 μ M de DAPT (EMD Biosciences, Cat. n°565770) e 1 μ M de inibidor Alk 5 (Axxora, Cat. n° ALX-270-445). Na conclusão da quarta etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletadas para análise de RT-PCR, de modo a medir os marcadores de diferenciação. Outros poços de cultura foram submetidos a análise de imagens de alto conteúdo quanto a níveis de expressão de proteína para PDX1.

A etapa 5 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de sete dias em glicose com alto teor de DMEM com 1% de B27 e 1 μ M de inibidor Alk 5. O meio em cada poço foi aspirado e substituído por uma alíquota sem uso (0,5 mL) em todos os dias. Na conclusão da quinta etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletadas para análise de RT-PCR, de modo a medir os marcadores de diferenciação. Outros poços de cultura foram submetidos a análise de imagens de alto conteúdo quanto a níveis de expressão de proteína para insulina e glucagon.

A etapa 6 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de sete dias em glicose com alto teor de DMEM com 1% de B27. O meio em cada poço foi aspirado e substituído por uma alíquota sem uso (0,5 mL) em dias alternados. Na conclusão da sexta etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletadas para análise de RT-PCR, de modo a medir os marcadores de diferenciação.

Análise FACS: as células para análise FACS foram bloqueadas em uma solução a 1:5 de 0,5% de gama-globulina humana (Sigma, Cat. n°

G-4386) em PBS (Invitrogen, Cat. n° 14040-133): tampão corante BD FACS – BSA (BD, Cat. n° 554657) durante 15 minutos a 4°C. As células foram, então, coradas com anticorpos para CD9 PE (BD, Cat. n° 555372), CD99 PE (Caltag, Cat. n° MHCD9904) e CXCR4 APC (R&D Systems, Cat. n° FAB173A) durante 30 minutos a 4°C. Após uma série de lavagens em tampão corante BD FACS, as células foram coradas para viabilidade com 7-AAD (BD, Cat. n° 559925) e analisadas em um BD FACSAarray. Um anticorpo de controle de isotipo IgG1K de camundongo, tanto para PE como para APC, foi usado para delimitar a porcentagem de células positivas.

10 *Análise RT-PCR:* amostras de RNA foram purificadas mediante ligação a uma membrana de sílica-gel (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) na presença de um tampão de alta salinidade contendo etanol, seguido de lavagem para remover os contaminantes. O RNA foi adicionalmente purificado com o uso de um kit TURBO isento de DNA (Ambion, INC), e o RNA de alta
15 qualidade foi então eluído em água. O rendimento e a pureza foram avaliados por leituras A260 e A280 em um espectrofotômetro. As cópias de cDNA foram produzidas a partir de RNA purificado com o uso de um kit de arquivo de cDNA de alta capacidade ABI (ABI, CA, EUA).

Exceto onde especificado em contrário, todos os reagentes
20 foram obtidos junto à Applied Biosystems. As reações de PCR em tempo real foram executadas com o uso do sistema de detecção de sequência ABI PRISM® 7900. TAQMAN® UNIVERSAL PCR MASTER MIX® (ABI, CA, EUA) foi usado com 20 ng de RNA transcrito reverso em um volume de reação total de 20 µL. Cada amostra de cDNA foi analisada em duplicata para
25 correção quanto a erros de pipetagem. Os iniciadores e sondas TAQMAN® identificadas com FAM foram usados em concentrações de 200 nM. O nível de expressão para cada gene-alvo foi normalizado com o uso um controle endógeno de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humana (GAPDH) anteriormente desenvolvido por Applied Biosistemas. Os conjuntos de
30 iniciador e sonda são mencionados na **tabela 12**. Após uma incubação inicial a 50°C durante 2 min, seguida de 95°C durante 10 min, as amostras foram submetidas 40 vezes a ciclos em dois estágios, sendo uma etapa de

desnaturação a 95°C durante 15 s seguida de uma etapa de recozimento/extensão a 60°C durante 1 minuto. A análise de dados foi realizada com o uso do software de detecção de sequências GENEAMP®7000 Sequence Detection System. Para cada conjunto de iniciador/ponta de prova, um valor Ct foi determinado como o número de ciclo no qual a intensidade de fluorescência alcançou um valor específico no meio da região exponencial de amplificação. Os níveis de expressão genética relativos foram calculados com o uso do método Ct comparativo. Brevemente, para cada amostra de cDNA, o valor Ct de controle endógeno Ct foi subtraído do gene de interesse Ct para proporcionar o valor de delta Ct (Δ Ct). A quantidade normalizada de alvo foi calculada como $2^{-\Delta$ Ct, assumindo a amplificação em 100% de eficiência. Os dados finais foram expressos em relação a uma amostra de calibração.

Análise de alto conteúdo: na conclusão da cultura, as placas de teste foram lavadas uma vez com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha, e adicionado a cada poço durante duas horas, à temperatura ambiente. Após lavar três vezes com PBS, adicionou-se a cada poço o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, Invitrogen, Cat. n° A21467) diluído a 1:200 em PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 5 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante quinze minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens. Outros anticorpos primários usados para análise incluíram diluição a 1:100 de CDX2 de camundongo anti-humano (Invitrogen, Cat. n° 397800), diluição a 1:100

de Pdx1 de cabra anti-humano (Santa Cruz Biotechnology, Cat. n° SC-14664), diluição a 1:200 de insulina de coelho anti-humano (Cell Signaling, Cat. n° C27C9), e diluição a 1:1500 de glucagon de camundongo anti-humano (Sigma-Aldrich, Cat. n° G2654). Os anticorpos secundários usados para análise incluíram diluição a 1:400 de Alexa Fluor 647 IgG de galinha anti-camundongo (Invitrogen, Cat. n° A-21463), diluição a 1:200 de Alexa Fluor 488 IgG de jumento anti-cabra (Invitrogen, Cat. n° A11055), diluição a 1:1000 de Alexa Fluor 647 IgG de galinha anti-coelho (Invitrogen, Cat. n° A21443), e diluição a 1:1000 de Alexa Fluor 488 IgG de galinha anti-camundongo (Invitrogen, Cat. n° A21200).

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Foram capturadas imagens de 25 campos por poço. As medições quanto à intensidade total foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 4.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo.

Os resultados de PCR para marcadores de diferenciação representativos são mostrados na **tabela 13** para células coletadas a partir de cada etapa de diferenciação. As amostras tratadas com GDF-8 e Wnt3a, ou com GDF-8 e Composto 34 ou Composto 56, mostraram níveis de expressão similares ou, em alguns casos, otimizados para marcadores de expressão associados a diferenciação endodérmica e endócrina.

A **figura 3** mostra os resultados da análise de FACS, mostrando

a expressão do marcador de endoderma definitivo, CXCR4, após a primeira etapa de diferenciação. O tratamento de células-tronco embrionárias humanas com GDF-8 e Wnt3a rendeu uma porcentagem equivalente de células positivas para CXCR4, em comparação ao tratamento com ativina A e Wnt3a. De modo similar, o tratamento de células-tronco embrionárias humanas com GDF-8 e uma molécula pequena (Composto 34 ou Composto 56) também rendeu uma porcentagem equivalente ou ligeiramente mais alta de células positivas para CXCR4. A **figura 4** mostra a análise de imagens de alto conteúdo para expressão de proteína SOX17 normalizada em células-tronco embrionárias humanas, após três dias de diferenciação para endoderma definitivo. Os níveis de expressão para os grupos de tratamento usando GDF-8 com Wnt3a, ou GDF-8 com uma molécula pequena, são similares ao tratamento com ativina A e Wnt3a.

A **figura 5** mostra a análise de imagens de alto conteúdo para expressão de proteínas Pdx1 e Cdx2 normalizada em células-tronco embrionárias humanas, após a terceira etapa de diferenciação para endoderma pancreático. Os níveis de expressão para grupos de tratamento usando GDF-8 com Wnt3a, ou GDF-8 com Wnt3a, ou GDF-8 com um composto da presente invenção, mostra níveis equivalentes de PDX1 e CDX2. Em alguns grupos de tratamento, diminuiu o número de células retidas após diferenciação, aumentando assim a razão entre as células que expressam PDX1. Foram obtidos resultados similares mostrando expressão de PDX1 normalizada equivalente em todos os grupos de tratamento após a quarta etapa de diferenciação, conforme mostrado na **figura 6**. Na **figura 7**, são mostrados níveis normalizados de proteína para insulina e glucagon, demonstrando expressão equivalente entre os grupos de tratamento com ativina A e com GDF-8.

Esses resultados coletivos demonstram que o GDF-8, em combinação com Wnt3a ou Composto 34 ou Composto 56, pode substituir a ativina A durante a diferenciação do endoderma definitivo e a subsequente diferenciação de endoderma pancreático e endócrino.

Exemplo 13Formação de células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo com outros membros da família de proteínas GDF

5 É importante determinar se o tratamento de células-tronco embrionárias humanas com outros membros da família GDF poderia resultar na formação de células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo. Testou-se o Wnt3a, em combinação com o Composto 34 ou o Composto 56, em células-tronco embrionárias humanas
10 em combinação com seis diferentes fatores de crescimento GDF [GDF-3, GDF-5, GDF-8, GDF-10, GDF-11 e GDF-15], para determinar a capacidade dos membros da família de proteínas GDF para diferenciar as células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo. Um controle paralelo de células
15 tratadas com ativina A e Wnt3a foi mantido para propósitos de comparação.

Preparação de células para teste: culturas de estoque de células-tronco embrionárias humanas (linhagem de células-tronco embrionárias humanas H1) foram mantidas em um estado pluripotente não diferenciado sobre placas revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de
20 crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231), em meio condicionado com MEF e com passagem, em média, a cada quatro dias. A passagem foi realizada mediante a exposição das culturas celulares a uma solução de 1 mg/mL de dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37°C, seguida de enxágue da camada única com meio de cultura condi-
25 cionado com MEF e raspagem delicada para recuperar os aglomerados celulares. Os aglomerados foram centrifugados a baixa velocidade para coletar-se um pélete de células e para remover quantidades residuais de dispase. Os aglomerados celulares foram divididos a uma razão de 1:3 ou 1:4 para cultura de manutenção de rotina, ou a uma razão de 1:1 para teste
30 imediato. Todas as linhagens de células ES humanas foram mantidas em números de passagem menores que 50, e foram rotineiramente avaliadas quanto ao cariótipo normal e à ausência de micoplasma.

Os aglomerados celulares foram uniformemente ressuspensos em meio condicionado com MEF e suplementado com 8 ng/mL de bFGF, e foram semeados sobre placas com 96 poços Packard VIEWPLATES (PerkinElmer, Cat. n° 6005182) revestidas por MATRIGEL® com teor
5 reduzido de fator de crescimento, em volumes de 0,1 mL/poço. A alimentação diária foi conduzida aspirando-se o meio de cultura gasto de cada poço, e substituindo o mesmo por um volume igual de meio sem uso. As placas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂ por toda a duração do teste.

Teste: o teste foi iniciado mediante a aspiração do meio de
10 cultura de cada poço, adicionando-se de volta alíquotas de 100 do meio para teste. As condições de teste foram realizadas em triplicata ao longo de um período de teste total de quatro dias, com alimentação nos dias 1 e 3, mediante aspiração e substituição do meio em cada poço com meio de teste sem uso. Vários membros da família de proteínas GDF foram obtidos para
15 teste conforme exposto a seguir: GDF-3 (PeproTech, Cat. n° 120-22), GDF-5 (DePuy Orthopaedics, Inc., uma empresa Johnson & Johnson), GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8), GDF-10 (R&D Systems, Cat. n° 1543-BP), GDF11 (PeproTech, Cat. n° 120-11), GDF-15 (R&D Systems, Cat. n° 957-GD). No primeiro dia do teste, todas os poços receberam uma alíquota (80
20 µl) de meio basal DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) suplementado com 0,5% de soro fetal bovino (Hyclone, Cat. n° SH30070.03). Foi criada uma série de cinco amostras diferentes, de controle ou experimentais para teste, a fim de avaliar a ativina A ou vários GDFs em combinação com Wnt3a ou com o Composto 34 ou o Composto 56. Essas amostras para
25 teste foram adicionadas em alíquotas de 20 µl (concentradas a 5x) a poços de teste adequadamente combinadas, para produzir um volume de teste final de 100 µl em cada poço, nas condições de teste finais indicadas. No primeiro conjunto de amostras de controle, foram testadas as seguintes
30 condições: 1) nenhum aditivo (isto é, nenhum fator de crescimento ou molécula pequena suplementar); 2) 100 ng/mL de ativina A (PeproTech, Cat. n° 120-14) em combinação com 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF); 3) 20 ng/mL de Wnt3a por si só; 4) Composto 34 por si só

(2,5 μM) sem qualquer fator de crescimento ou molécula pequena; 5) Composto 56 por si só (2,5 μM) sem qualquer fator de crescimento ou molécula pequena. No segundo conjunto de amostras para teste, as seguintes condições foram testadas em combinação com 100 ng/mL de GDF3: 1) nenhum aditivo (isto é, GDF-3 por si só); 2) 20 ng/mL de Wnt3a; 3) 20 ng/mL de Wnt3a com o Composto 34 (2,5 μM); 4) Composto 34 (2,5 μM); 5) Composto 56 (2,5 μM); e 6) 20 ng/mL de Wnt3a com o Composto 56 (2,5 μM). No terceiro conjunto de amostras para teste, cada uma das seis condições foi combinada com 100 ng/mL de GDF-5. No quarto conjunto de amostras para teste, cada uma das seis condições foi combinada com 100 ng/mL de GDF-8. No quinto conjunto de amostras para teste, cada uma das seis condições foi combinada com 100 ng/mL de GDF-10. No sexto conjunto de amostras para teste, cada uma das seis condições foi combinada com 100 ng/mL de GDF-11. No sétimo conjunto de amostras para teste, cada uma das seis condições foi combinada com 100 ng/mL de GDF-15. No terceiro dia de teste, todos os poços para todas as amostras para teste, receberam 100 ng/mL de ativina A ou 100 ng/mL do respectivo fator de crescimento GDF, sem Wnt3a ou Composto 34 ou Composto 56, diluído em meio DMEM:F12 suplementado com 2% de FBS.

Análise de alto conteúdo: na conclusão da cultura, as placas de teste foram lavadas uma vez com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha, e adicionado a cada poço durante duas horas, à temperatura ambiente. Após lavar três vezes com PBS, adicionou-se a cada poço o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, Invitrogen, Cat. n° A21467)

diluído a 1:200 em PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 5 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante quinze minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

5 A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Foram capturadas imagens de 25 campos por poço. As medições quanto à intensidade total foram obtidas a partir de cada poço com o uso do

10 software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína foi relatada como intensidade total ou intensidade

15 integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 4.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo.

20 A **figura 8** mostra a análise de imagens de alto conteúdo para expressão de proteína SOX17 em células-tronco embrionárias humanas, após quatro dias de diferenciação para endoderma definitivo. Em cada caso, os resultados são normalizados em relação ao tratamento do controle positivo com ativina A e Wnt3a. Na **figura 8A**, somente o tratamento do

25 controle positivo rendeu uma expressão significativa de SOX17, sendo que o tratamento com Wnt3a por si só, ou qualquer dos Compostos 34 ou 56 por si sós deixou de induzir a expressão de SOX17. Na **figura 8**, **painéis B a G**, são mostrados os níveis de expressão de SOX17 normalizada para cada fator de crescimento GDF substituindo a ativina A nos respectivos

30 tratamentos. GDF-3 (**figura 8B**) e GDF-5 (**figura 8C**) induziram uma expressão fraca de SOX17, e somente em amostras para teste nas quais estava presente um dos compostos da presente invenção. GDF10 (**figura**

8D), GDF11 (**figura 8E**) e GDF15 (**figura 8G**) induziram níveis significativos de expressão de SOX17, mais do que foi observado em tratamentos com GDF3 ou 5, porém menos do que foi observado em tratamentos com ativina A e Wnt3a. Em geral, a expressão de SOX17 foi desprezível quando GDF-
5 10, GDF-11 ou GDF-15 foi combinado com Wnt3a, mas melhorou em combinação com um dos compostos da presente invenção, em particular quando combinado ao Composto 34. A **figura 8D** mostra os resultados para os grupos de tratamento usando GDF-8, nos quais o GDF-8 em combinação com o Composto 34 ou o Composto 56 causou uma indução robusta de
10 SOX17, excedendo os resultados observados no controle positivo de ativina A/Wnt3a. Em alguns desse exemplos, a presença do Composto 34 ou do Composto 56, em combinação com um fator de crescimento GDF, também causou um aumento no número de células durante a diferenciação.

Esses resultados coletivos demonstram que o GDF-8 foi superior
15 a todos os demais membros da família GDF testados, quando usado em combinação com o Composto 34 ou o Composto 56, e poderia substituir a ativina A durante a diferenciação do endoderma definitivo.

Exemplo 14

Formação de células expressoras de marcadores característicos
20 da linhagem de endoderma definitivo com outros membros da superfamília de proteínas TGF

É importante determinar se o tratamento de células-tronco embrionárias humanas com outros membros da superfamília TGF poderia facilitar a formação de células expressoras de marcadores característicos da
25 linhagem de endoderma definitivo. O Composto 34 e Wnt3a foram testados em células-tronco embrionárias humanas em combinação com TGF β -1, BMP2, BMP3 ou BMP4, para determinar a capacidade dos membros da superfamília TGF para diferenciar células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de
30 endoderma definitivo. Em paralelo, duas fontes comerciais diferentes de GDF-8 foram testadas com Wnt3a quanto à sua capacidade para diferenciar células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marca-

dores característicos da linhagem de endoderma definitivo. Um controle positivo usando-se ativina A com Wnt3a foi mantido para propósitos de comparação.

Preparação de células para teste: culturas de estoque de células-tronco embrionárias humanas (linhagem de células-tronco embrionárias humanas H1) foram mantidas em um estado pluripotente não diferenciado sobre placas revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231), em meio condicionado com MEF e com passagem, em média, a cada quatro dias. A passagem foi realizada mediante a exposição das culturas celulares a uma solução de 1 mg/mL de dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37°C, seguida de enxágue da camada única com meio de cultura condicionado com MEF e raspagem delicada para recuperar os aglomerados celulares. Os aglomerados foram centrifugados a baixa velocidade para coletar-se um pélete de células e para remover quantidades residuais de dispase. Os aglomerados celulares foram divididos a uma razão de 1:3 ou 1:4 para cultura de manutenção de rotina, ou a uma razão de 1:1 para teste imediato. Todas as linhagens de célula-tronco embrionária humana foram mantidas em números de passagem menores que 50, e foram rotineiramente avaliadas quanto ao cariótipo normal e à ausência de micoplasma.

Os aglomerados celulares foram uniformemente ressuspensos em meio condicionado com MEF e suplementado com 8 ng/mL de bFGF, e foram semeados sobre placas com 96 poços Packard VIEWPLATES (PerkinElmer, Cat. n° 6005182) revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento, em volumes de 0,1 mL/poço. A alimentação diária foi conduzida aspirando-se o meio de cultura gasto de cada poço, e substituindo o mesmo por um volume igual de meio sem uso. As placas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂ por todo o teste.

Teste: o teste foi iniciado mediante a aspiração do meio de cultura de cada poço, adicionando-se de volta alíquotas de 100 do meio para teste. As condições de teste foram realizadas em triplicata ao longo de um período de teste total de três dias, com alimentação nos dias 1 e 2, mediante

aspiração e substituição do meio em cada poço com meio de teste sem uso. Várias proteínas de fator de crescimento foram obtidas para teste, conforme exposto a seguir: BMP-2 (R&D Systems, Cat. n° 355-BM); BMP-3 (R&D Systems, Cat. n° 113-BP); BMP-4 (R&D Systems, Cat. n° 314-BP); TGFβ-1 (R&D Systems, Cat. n° 240-B); GDF-8 (PeproTech, Cat. n° 120-00); GDF-8 (Shenandoah, Cat. n° 100-22); e ativina A (PeproTech, Cat. n° 120-14). No primeiro dia do teste, cada poço foi tratado com 80 µl de meio de crescimento [RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400) contendo 2,5% de fração V de albumina bovina isenta de ácido graxo (FAF BSA) (MP Biomedicals, Inc, Cat. n° 152401) e 10 ng/mL de bFGF]. Em alguns poços, adicionou-se 25 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF) ao meio de crescimento, para produzir uma concentração final de teste de 20 ng/mL. Em alguns poços, adicionou-se ativina A ao meio de crescimento, para produzir uma concentração final de teste de 100 ng/mL. Em alguns poços, adicionou-se 3,125 µM de Composto 34 ao meio de crescimento, para produzir uma concentração final de teste de 2,5 µM. Uma titulação de dose de fatores de crescimento adicionais (concentrada 5x, diluída em RPMI-1640) também foi adicionada aos respectivos poços de teste, para produzir um volume de teste final de 100 µl em cada poço, para todas as condições de tratamento. No segundo dia de teste, o Wnt3a e o Composto 34 foram omitidos do teste. Todos os poços receberam 80 µl de meio de crescimento [RPMI-1640 contendo 2,5% de FAF BSA e 10 ng/mL de bFGF] e 20 µl da respectiva diluição de fator de crescimento (concentrada 5x, diluída em RPMI-1640). Os controles comparativos para esse teste incluíam: 1) nenhum fator de crescimento adicionado; 2) Wnt3a por si só; e 3) ativina A com Wnt3a. Cada fonte comercial de GDF-8 foi testada em combinação com Wnt3a. Cada um dos fatores de crescimento BMP, bem como TGFβ-1, foi testado em combinação com Wnt3a, com o Composto 34, e com Wnt3a em combinação com o Composto 34.

Análise de alto conteúdo: na conclusão da cultura, as placas de teste foram lavadas uma vez com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à

temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha, e adicionado a cada poço durante duas horas, à temperatura ambiente. Após lavar três vezes com PBS, adicionou-se a cada poço o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, Invitrogen, Cat. n° A21467) diluído a 1:200 em PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 5 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante quinze minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Foram capturadas imagens de 25 campos por poço. As medições quanto à intensidade total foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 4.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo.

A figura 9 mostra a análise de imagens de alto conteúdo para expressão de proteína SOX17 em células-tronco embrionárias humanas, após três dias de diferenciação para endoderma definitivo. Em cada caso, os

resultados são normalizados em relação ao tratamento do controle positivo com ativina A e Wnt3a. Os resultados na **figura 9A** mostram que o tratamento com o meio de crescimento por si só, ou com Wnt3a por si só, deixou de induzir a expressão de SOX17, sendo que somente a adição de

5 ativina A causou uma expressão robusta de SOX17. Na **figura 9, painéis B e C**, são representados os resultados para cada uma das fontes comerciais de GDF-8, mostrando diferenças de potência entre os dois fornecedores. Embora menos potente que a ativina A, houve indução significativa da expressão de SOX17 nas células tratadas com GDF-8 em combinação com

10 Wnt3a. Na **figura 9, painéis D, E, F e G**, são mostrados resultados para a diferenciação do endoderma definitivo com o uso de BMP2, BMP3, BMP4 e TGF β -1, incorporando-se uma titulação de dose para cada fator de crescimento em combinação com Wnt3a, ou o Composto 34, ou Wnt3a juntamente com o Composto 34. Embora alguns tratamentos tenham apre-

15 sentado um efeito significativo sobre os números de células na conclusão do teste (por exemplo BMP2 e BMP4), a indução da expressão de SOX17 resultante de qualquer dessas combinações de fatores de crescimento e tratamentos foi fraca ou desprezível em comparação ao tratamento com Wnt3a por si só.

20 Exemplo 15

Estudo de faixas de dose para a formação de células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo com uma seleção dos compostos da presente invenção

É importante conhecer as concentrações ótimas de trabalho para o Composto 181, o Composto 180, o Composto 19, o Composto 202, o

25 Composto 40 e o Composto 34, que poderiam mediar a formação de células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo. Em conjunto, foram realizadas comparações lado a lado para titulações de cada composto em combinação com ativina A ou GDF-8 no

30 teste de endoderma definitivo. Finalmente, a duração da exposição para cada composto foi testada nos ensaios, também em combinação com ativina A ou GDF-8, adicionando o composto somente no primeiro dia do teste ou

ao longo de todos os três dias de formação de endoderma definitivo.

Preparação de células para teste: culturas de estoque de células-tronco embrionárias humanas (linhagem de células-tronco embrionárias humanas H1) foram mantidas em um estado pluripotente não diferenciado sobre placas revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231), em meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (PeproTech Inc., Cat. n° 100-18B) e com passagem, em média, a cada quatro dias. A passagem foi realizada mediante a exposição das culturas celulares a uma solução de 1 mg/mL de dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37°C, seguida de enxágue da camada única com meio de cultura condicionado com MEF e raspagem delicada para recuperar os aglomerados celulares. Os aglomerados foram centrifugados a baixa velocidade para coletar-se um pélete de células e para remover quantidades residuais de dispase. Os aglomerados celulares foram divididos a uma razão de 1:3 ou 1:4 para cultura de manutenção de rotina, ou a uma razão de 1:1 para teste imediato. Todas as linhagens de célula-tronco embrionária humana foram mantidas em números de passagem menores que 50, e foram rotineiramente avaliadas quanto ao cariótipo normal e à ausência de micoplasma.

Os aglomerados celulares foram uniformemente ressuspensos em meio condicionado com MEF e suplementado com 8 ng/mL de bFGF, e foram semeados sobre placas com 96 poços Packard VIEWPLATES (PerkinElmer, Cat. n° 6005182) revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento, em volumes de 0,1 mL/poço. A alimentação diária foi conduzida aspirando-se o meio de cultura gasto de cada poço, e substituindo o mesmo por um volume igual de meio sem uso. As placas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂ por toda a duração do teste.

Teste: o teste foi iniciado mediante a aspiração do meio de cultura de cada poço, adicionando-se de volta alíquotas de 100 do meio para teste. As condições de teste foram realizadas em quadruplicata ao longo de um período de teste total de quatro dias, com alimentação diária mediante aspiração e substituição do meio em cada poço com meio de teste sem uso.

Cada poço foi tratado com 80 µl de meio de crescimento [RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400) contendo 2,5% de fração V de albumina bovina isenta de ácido graxo (FAF BSA) (MP Biomedicals, Inc, Cat. n° 152401), 10 ng/mL de bFGF e fatores de crescimento adicionais (concentrados a 1,25x)] e 20 µl do composto de teste (concentrado a 5x e diluído em RPMI-1640) para produzir um volume de teste final de 100 µl em cada poço. Os compostos para teste neste ensaio incluíam seis dos compostos da presente invenção: Composto 181, Composto 180, Composto 19, Composto 202, Composto 40 e Composto 34, bem como um inibidor GSK3i BIO comercialmente disponível (EMD Chemicals, Inc., Cat. n° 361550). No primeiro dia do teste, os poços foram tratados com vários controles ou condições experimentais. As condições de controle, com concentrações finais de teste conforme indicadas, eram conforme exposto a seguir: 1) meio de crescimento por si só; 2) somente 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF); 3) 100 ng/mL de ativina A (PeproTech, Cat. n° 120-14); 4) 100 ng/mL de ativina A e 20 ng/mL de Wnt3a; 5) 100 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8); 6) 100 ng/mL GDF-8 e 20 ng/mL de Wnt3a. Os compostos para teste foram diluídos duas vezes em série, para produzir uma faixa de concentração de 78 nM a 10 µM no teste final. As amostras para teste experimentais combinavam cada série de diluição do composto individual com 100 ng/mL de ativina A ou 100 ng/mL de GDF-8, sendo ambos os conjuntos de tratamento na ausência de Wnt3a. No segundo e no terceiro dias do teste, alguns poços continuaram a ser tratados com 20 ng/mL de Wnt3a ou com o composto de teste diluído em combinação com ativina A ou GDF-8. Em outros poços, o tratamento com ativina A ou GDF-8 continuou no segundo e no terceiro dias de teste, mas removeu-se o Wnt3a ou o composto de teste diluído.

Análise de alto conteúdo: na conclusão da cultura, as placas de teste foram lavadas uma vez com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2)

durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, 5 Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha, e adicionado a cada poço durante duas horas, à temperatura ambiente. Após lavar três vezes com PBS, adicionou-se a cada poço o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, Invitrogen, Cat. n° A21467) diluído a 1:200 em PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 10 5 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante quinze minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), 15 usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Foram capturadas imagens de 25 campos por poço. As medições quanto à intensidade total foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala 20 de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério 25 de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 4.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo.

Resultados: os resultados da análise de alto conteúdo são mostrados para a expressão de SOX17 nas **figuras 10 a 14**, e o número de 30 células resultante na conclusão do teste é mostrado nas **figuras 15 a 19**. Na **figura 10**, os resultados são mostrados para a expressão de SOX 17 resultante dos tratamentos de controle usando ativina A ou GDF-8, por si sós

ou em combinação com Wnt3a. Os tratamentos com ativina A resultaram em uma expressão de SOX17 significativamente mais alta do que a observada no tratamento com GDF-8. De modo similar, conforme visto na **figura 15**, o tratamento com ativina A resultou em um número mais alto de células na conclusão do teste do que o observado no tratamento com GDF-8, independentemente da presença do Wnt3a por um ou três dias durante o teste. A adição de qualquer um dentre os Compostos 181, 180, 19, 202, 40 ou 34 ao tratamento com ativina A não otimizou a expressão de SOX17 (**figuras 11 a 12**), nem aumentou o número de células (**figuras 17 a 18**), independentemente de o composto ter estado presente durante um dia no início do teste, ou durante três dias por toda a duração do teste. Entretanto, o tratamento com um dentre os Compostos 181, 180, 19, 202, 40 ou 34 em combinação com GDF-8 aprimorou significativamente a expressão de SOX17 (**figuras 13 a 14**), além de aumentar também o número de células no final do teste (**figuras 18 a 19**). Quando um dos Compostos 181, 180, 19, 202, 40 ou 34 foi usado em combinação com o GDF-8, a otimização da expressão de SOX17 e do número de células foi, em muitos casos, equivalente aos resultados observados no tratamento com ativina A. A melhor diferenciação na combinação com GDF-8 ficou evidente em um efeito de titulação de dose para muitos dos compostos, embora por vezes fosse observada toxicidade nas concentrações mais altas. Na maioria dos casos, os melhores efeitos benéficos do tratamento com o composto e o GDF-8 ficaram evidentes com somente um dia de exposição ao composto, no início do teste. Em alguns casos, a presença do composto ao longo da duração do teste não teve qualquer efeito prejudicial, ou teve um efeito ligeiramente benéfico. A partir desses resultados coletivos, foi determinada uma faixa de concentrações funcionais ótimas para cada composto em combinação com o tratamento por GDF8. Os resultados foram específicos para cada composto, geralmente na faixa de 1 a 10 μ M, conforme testado neste ensaio.

Exemplo 16

Células expressoras de marcadores característicos da linhagem

de endoderma definitivo, que são formadas sem estar de acordo com os métodos da presente invenção, são capazes de diferenciar-se adicionalmente em células expressoras de marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática

5 Moléculas pequenas adicionais foram testadas em combinação com GDF-8 para diferenciação do endoderma definitivo. Estas incluíram um inibidor de GSK3 comercialmente disponível, bem como compostos da presente invenção. Um protocolo de diferenciação gradual foi aplicado a células tratadas com GDF-8 em combinação com várias moléculas pequenas. A eficácia da diferenciação foi determinada por expressão gênica para biomarcadores representativos do endoderma pancreático, ou de linhagens endócrinas pancreáticas. Uma amostra de controle paralela de células tratadas com ativina A e Wnt3a foi mantida para propósitos de comparação durante todo o processo de diferenciação gradual.

15 *Preparação de células para teste:* culturas de estoque de células-tronco embrionárias humanas (linhagem de células-tronco embrionárias humanas H1) foram mantidas em um estado pluripotente não diferenciado sobre placas revestidas por MATRIGEL™ com teor reduzido de fator de crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231), em meio condicionado com MEF e com passagem, em média, a cada quatro dias. A passagem foi realizada mediante a exposição das culturas celulares a uma solução de 20 1 mg/mL de dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37°C, seguida de enxágue da camada única com meio de cultura condicionado com MEF e raspagem delicada para recuperar os aglomerados celulares. Os aglomerados foram centrifugados a baixa velocidade para 25 coletar-se um pélete de células e para remover quantidades residuais de dispase. Os aglomerados celulares foram divididos a uma razão de 1:3 ou 1:4 para cultura de manutenção de rotina, ou a uma razão de 1:1 para teste imediato. Todas as linhagens de célula-tronco embrionária humana foram 30 mantidas em números de passagem menores que 50, e foram rotineiramente avaliadas quanto ao cariótipo normal e à ausência de micoplasma.

Os aglomerados celulares foram uniformemente ressuspensos

em meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF e folheado sobre as placas de cultura de paredes pretas com 24 poços revestidas por MATRIGEL com teor reduzido de fator de crescimento (Arctic White, Cat. n° AWLS-303012) em volumes de 0,5 mL/poço. A alimentação

5 diária foi conduzida aspirando-se o meio de cultura gasto de cada poço, e substituindo o mesmo por um volume igual de meio sem uso. As placas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂ por toda a duração do teste.

Teste: o teste foi iniciado mediante a aspiração do meio de cultura de cada poço, adicionando-se de volta uma alíquota (0,5 mL) de

10 meio para teste. As condições de teste para a primeira etapa de diferenciação foram conduzidos ao longo de um período de três dias, com alimentação diária mediante aspiração e substituição do meio de cada poço com meio de teste sem uso. No primeiro dia do teste, 100 ng/mL de ativina A (PeproTech, Cat. n°120-14) ou 100 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n°

15 788-G8) foram adicionados aos respectivos poços de teste nas quais cada fator de crescimento foi diluído em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400) com 2% de fração V de albumina bovina isenta de ácido graxo (FAF BSA) (Proliant Inc., Cat. n° SKU 68700) e 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF). No segundo dia de teste, diluiu-se 100

20 ng/mL de ativina A ou 100 ng/mL de GDF-8 em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de FAF BSA sem Wnt3a. Em algumas amostras para teste usando GDF-8, o Wnt3a foi substituído por um composto de moléculas pequenas, adicionado somente no primeiro dia da diferenciação do endoderma definitivo. Essas moléculas pequenas incluíam o Composto 19 (2,5 µM

25 no teste), o Composto 202 (2,5 µM no teste), o Composto 40 (2,5 µM no teste), ou um inibidor de GSK3 BIO disponível comercialmente (0,5 µM no teste) (EMD Chemicals, Inc., Cat. n° 361550). Na conclusão da primeira etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletados para análise de citometria de fluxo, de modo a avaliar os níveis de CXCR4, um

30 marcador de formação de endoderma definitivo. Os poços adicionais foram coletados para análise RT-PCR, de modo a medir outros marcadores de diferenciação.

Na conclusão da primeira etapa de diferenciação para endoderma definitivo, os conjuntos replicados de poços paralelos de cada grupo de tratamento foram submetidos a uma diferenciação gradual adicional. É importante notar que, após a primeira etapa de diferenciação, todas os poços passando por cultura e diferenciação subsequente receberam o mesmo tratamento. O protocolo para essa diferenciação contínua é descrito abaixo.

A etapa 2 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de dois dias. As células foram alimentadas diariamente mediante aspiração do meio de cada poço, substituindo-se o mesmo por uma alíquota sem uso (0,5 mL) de meio DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) contendo 2% de FAF BSA, 50 ng/mL de FGF7 (PeproTech, Cat. n° 100-19) e 250 nM de ciclopamina-KAAD (Calbiochem, Cat. n° 239804).

A etapa 3 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de sete dias. As células foram alimentadas diariamente mediante aspiração do meio de cada poço, substituindo-se o mesmo por uma alíquota sem uso (0,5 mL) de glicose com alto teor de DMEM (Invitrogen, Cat. n° 10569) suplementada com 0,1% de Albumax (Invitrogen, Cat. n° 11020-021), 0,5x de insulina-transferrina-selênio (ITS-X, Invitrogen, Cat. n° 51500056), 50 ng/mL de FGF7, 100 ng/mL de noguina (R&D Systems, Cat. n° 3344-NG), 250 nM KAAD-ciclopamina, e 2 μ M ácido todo-transretinoico (RA) (Sigma-Aldrich, Cat. n° R2625). Na conclusão da terceira etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletadas para análise de RT-PCR, de modo a medir os marcadores de diferenciação. Outros poços de cultura foram submetidos a análise de imagens de alto conteúdo quanto a níveis de expressão de proteína para Pdx1 e Cdx2.

A etapa 4 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de três dias. As células foram alimentadas diariamente mediante aspiração do meio de cada poço, substituindo-se o mesmo por uma alíquota sem uso (0,5 mL) de glicose com alto teor de DMEM suplementada com 0,1% de Albumax, 0,5x de insulina-transferrina-selênio, 100 ng/mL de noguina e 1 μ M de inibidor Alk 5 (Axxora, Cat. n° ALX-270-445). Na conclusão da quarta

etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletadas para análise de RT-PCR, de modo a medir os marcadores de diferenciação. Outros poços de cultura foram submetidos a análise de imagens de alto conteúdo quanto a níveis de expressão de proteína para Pdx1.

5 A etapa 5 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de sete dias em glicose com alto teor de DMEM com 0,1% de Albumax, 0,5x de insulina-transferrina-selênio e 1 μ M de inibidor Alk 5. O meio em cada poço foi aspirado e substituído por uma alíquota sem uso (0,5 mL) em todos os dias. Na conclusão da quinta etapa de diferenciação, as células de alguns
10 poços foram coletados para análise de RT-PCR, de modo a medir os marcadores de diferenciação. Outros poços de cultura foram submetidos à análise de imagens de alto conteúdo quanto a níveis de expressão de proteína para insulina e glucagon.

Análise FACS: as células para análise FACS foram bloqueadas
15 em uma solução a 1:5 de 0,5% de gama-globulina humana (Sigma, Cat. n° G-4386) em PBS (Invitrogen, Cat. n° 14040-133): tampão corante BD FACS – BSA (BD, Cat. n° 554657) durante 15 minutos a 4°C. As células foram, então, coradas com anticorpos para CD9 PE (BD, Cat. n° 555372), CD99 PE (Caltag, Cat. n° MHCD9904) e CXCR4 APC (R&D Systems, Cat. n°
20 FAB173A) durante 30 minutos a 4°C. Após uma série de lavagens em tampão corante BD FACS, as células foram coradas para viabilidade com 7-AAD (BD, Cat. n° 559925) e analisadas em um BD FACSAarray. Um anticorpo de controle de isotipo IgG1K de camundongo, tanto para PE como para APC, foi usado para delimitar a porcentagem de células positivas.

25 *Análise RT-PCR:* amostras de RNA foram purificadas mediante ligação a uma membrana de sílica-gel (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) na presença de um tampão de alta salinidade contendo etanol, seguido de lavagem para remover os contaminantes. O RNA foi adicionalmente purificado com o uso de um kit TURBO isento de DNA (Ambion, INC), e o RNA de
30 alta qualidade foi então eluído em água. O rendimento e a pureza foram avaliados por leituras A260 e A280 em um espectrofotômetro. As cópias de CDNA foram produzidas a partir de RNA purificado com o uso de um kit de

arquivo de cDNA de alta capacidade ABI (ABI, CA, EUA).

Exceto onde especificado em contrário, todos os reagentes foram obtidos junto à Applied Biosystems. As reações de PCR em tempo real foram executadas com o uso do sistema de detecção de sequência ABI PRISM[®] 7900. TAQMAN[®] UNIVERSAL PCR MASTER MIX[®] (ABI, CA, EUA) foi usado com 20 ng de RNA transcrito reverso em um volume de reação total de 20 μ L. Cada amostra de cDNA foi analisada em duplicata para correção quanto a erros de pipetagem. Os iniciadores e sondas TAQMAN[®] identificadas com FAM foram usados em concentrações de 200 nM. O nível de expressão para cada gene-alvo foi normalizado com o uso um controle endógeno de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humana (GAPDH) anteriormente desenvolvido por Applied Biosistemas. Os conjuntos de iniciador e sonda são mencionados na **tabela 12**. Após uma incubação inicial a 50°C durante 2 min, seguida de 95°C durante 10 min, as amostras foram submetidas 40 vezes a ciclos em dois estágios, sendo uma etapa de desnaturação a 95°C durante 15 s seguida de uma etapa de recozimento/extensão a 60°C durante 1 minuto. A análise de dados foi realizada com o uso do software de detecção de sequências GENEAMP[®]7000 Sequence Detection System. Para cada conjunto de iniciador/ponta de prova, um valor Ct foi determinado como o número de ciclo no qual a intensidade de fluorescência alcançou um valor específico no meio da região exponencial de amplificação. Os níveis de expressão genética relativos foram calculados com o uso do método Ct comparativo. Brevemente, para cada amostra de cDNA, o valor Ct de controle endógeno Ct foi subtraído do gene de interesse Ct para proporcionar o valor de delta Ct (Δ Ct). A quantidade normalizada de alvo foi calculada como $2^{-\Delta$ Ct, assumindo a amplificação em 100% de eficiência. Os dados finais foram expressos em relação a uma amostra de calibração.

Análise de alto conteúdo: na conclusão da cultura, as placas de teste foram lavadas uma vez com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com

PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha, e adicionado a cada poço durante duas horas, à temperatura ambiente. Após lavar três vezes com PBS, adicionou-se a cada poço o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, Invitrogen, Cat. n° A21467) diluído a 1:200 em PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 5 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante quinze minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens. Outros anticorpos primários usados para análise incluíram diluição a 1:200 de insulina de coelho anti-humano (Cell Signaling, Cat. n° C27C9) e diluição a 1:1.500 de glucagon de camundongo anti-humano (Sigma-Aldrich, Cat. n° G2654). Os anticorpos secundários usados para análise incluíram diluição a 1:1.000 de Alexa Fluor 647 IgG de galinha anti-coelho (Invitrogen, Cat. n° A21443) e diluição a 1:1000 de Alexa Fluor 488 IgG de galinha anti-camundongo (Invitrogen, Cat. n° A21200).

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Foram capturadas imagens de 25 campos por poço. As medições quanto à intensidade total foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação

das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 4.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo.

Os resultados de PCR para marcadores de diferenciação representativos são mostrados na **tabela 14** para células coletadas a partir de cada etapa de diferenciação. As amostras tratadas com GDF-8 e Wnt3a, ou com GDF-8 e uma molécula pequena, mostraram níveis de expressão similares para marcadores associados à diferenciação endodérmica e endócrina.

A **figura 20, painel A** mostra a análise de FACS para o marcador de endoderma definitivo, CXCR4, após a primeira etapa de diferenciação. O tratamento de células-tronco embrionárias humanas com GDF-8 e Wnt3a rendeu uma porcentagem similar de células positivas para CXCR4, em comparação ao tratamento com ativina A e Wnt3a. O tratamento de células-tronco embrionárias humanas com GDF-8 e um composto da presente invenção (Composto 19, Composto 202, Composto 40 ou inibidor GSK3 IX BIO) também rendeu uma porcentagem equivalente ou ligeiramente mais alta de células positivas para CXC4. A **figura 20, painel B** mostra a análise de imagens de alto conteúdo para expressão de proteína SOX17 normalizada em células-tronco embrionárias humanas, após três dias de diferenciação para endoderma definitivo. Em alguns casos, o tratamento com GDF-8 resultou em um número de células mais baixo na conclusão da primeira etapa de diferenciação. Entretanto, o tratamento com GDF-8 em combinação com Wnt3a ou com os inibidores de molécula pequena claramente induziu a expressão de SOX17, um marcador de endoderma definitivo. Em um exemplo, o tratamento com GDF-8 e o Composto 40 rendeu um número de células em cultura e uma expressão de SOX17 equivalentes ao tratamento com ativina A e Wnt3a.

A **figura 20, painel C**, mostra a análise de imagens de alto conteúdo para números relativos de células recuperadas de culturas tratadas por meio da etapa de diferenciação 5. Conforme observado anteriormente, ao final da etapa 1, alguns tratamentos causaram uma queda na recupe-

ração celular em relação ao tratamento com ativina A e Wnt3a. Essa diminuição no número de células foi observada, especificamente, em grupos de tratamento usando GDF-8 com inibidor GSK3 BIO, e também usando GDF-8 com o Composto 19. Os grupos de tratamento com GDF-8 adicionais apresentaram recuperação celular similar à do tratamento com activin A e Wnt3a. Na **figura 20, painéis D a F**, são mostrados os níveis normalizados de proteína para insulina e glucagon, juntamente com sua respectiva razão em cada grupo de tratamento. Níveis similares de insulina e glucagon poderiam ser obtidos em cada um dos tratamentos com GDF-8, em relação ao tratamento com ativina A e Wnt3a, demonstrando que o GDF-8, em combinação com Wnt3a ou uma molécula pequena, pode substituir a ativina A durante a diferenciação do endoderma definitivo e a subsequente diferenciação de endoderma pancreático e endócrino.

Exemplo 17

Células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo, que são formadas com o uso de GDF-8 e um composto da presente invenção, são capazes de diferenciar-se adicionalmente em células expressoras de marcadores característicos da linhagem endócrina pancreática

Moléculas pequenas adicionais foram testadas em combinação com GDF-8 e ativina A para diferenciação do endoderma definitivo. Estas incluíram um inibidor de GSK3 comercialmente disponível, bem como os compostos da presente invenção. Um protocolo de diferenciação gradual foi aplicado a células tratadas com GDF-8 em combinação com várias moléculas pequenas. A eficácia da diferenciação foi determinada por expressão gênica para biomarcadores representativos do endoderma pancreático e de linhagens endócrinas pancreáticas. Uma amostra de controle paralela de células tratadas com ativina A e Wnt3a foi mantida para propósitos de comparação durante todo o processo de diferenciação gradual.

Preparação de células para teste: culturas de estoque de células-tronco embrionárias humanas (linhagem de células-tronco embrionárias humanas H1) foram mantidas em um estado pluripotente não diferen-

ciado sobre placas revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231), em meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (PeproTech Inc., Cat. n° 100-18B) e com passagem, em média, a cada quatro dias. A passagem foi realizada mediante a exposição das culturas celulares a uma solução de 1 mg/mL de dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37°C, seguida de enxágue da camada única com meio de cultura condicionado com MEF e raspagem delicada para recuperar os aglomerados celulares. Os aglomerados foram centrifugados a baixa velocidade para coletar-se um pélete de células e para remover quantidades residuais de dispase. Os aglomerados celulares foram divididos a uma razão de 1:3 ou 1:4 para cultura de manutenção de rotina, ou a uma razão de 1:1 para teste imediato. Todas as linhagens de células ES humanas foram mantidas em números de passagem menores que 50, e foram rotineiramente avaliadas quanto ao cariótipo normal e à ausência de micoplasma.

Os aglomerados celulares foram uniformemente ressuspensos em meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF e folheado sobre as placas de cultura de paredes pretas com 24 poços revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Arctic White, Cat. n° AWLS-303012) em volumes de 0,5 mL/poço. A alimentação diária foi conduzida aspirando-se o meio de cultura gasto de cada poço, e substituindo o mesmo por um volume igual de meio sem uso. As placas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂ por todo o teste.

Teste: o teste foi iniciado mediante a aspiração do meio de cultura de cada poço, adicionando-se de volta uma alíquota (0,5 mL) de meio para teste. As condições de teste para a primeira etapa de diferenciação foram conduzidos ao longo de um período de três dias, com alimentação diária mediante aspiração e substituição do meio de cada poço com meio de teste sem uso. No primeiro dia do teste, 100 ng/mL de ativina A (PeproTech, Cat. n° 120-14) ou 100 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) foram adicionados aos respectivos poços de teste nas quais cada fator de crescimento foi diluído em meio RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400) com

2% de fração V de albumina bovina isenta de ácido graxo (FAF BSA) (MP Biomedicals, Inc; Cat # 152401). Em algumas amostras, incluiu-se também 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF). No segundo dia de teste, diluiu-se 100 ng/mL de ativina A ou 100 ng/mL de GDF-8 em meio 5 RPMI-1640 suplementado com 2% de FAF BSA, omitindo-se o Wnt3a de todas as amostras. Em algumas amostras para teste usando GDF-8, o Wnt3a foi substituído por uma determinada concentração de composto de moléculas pequenas, adicionado somente no primeiro dia da diferenciação do endoderma definitivo. Essas moléculas pequenas incluíam: Composto 10 181 (1,25 μ M no teste), Composto 180 (2,5 μ M no teste), Composto 19 (10 μ M no teste), Composto 202 (2,5 μ M no teste), Composto 40 (5 μ M no teste), Composto 34 (2,5 μ M no teste), Composto 206 (2,5 μ M no teste), e um inibidor GSK3 IX BIO disponível comercialmente (10 μ M no teste) (EMD Chemicals, Inc., Cat. n° 361550). Na conclusão da primeira etapa de 15 diferenciação, as células de alguns poços foram coletadas para análise de citometria de fluxo, de modo a avaliar os níveis de CXCR4, um marcador de formação de endoderma definitivo. Os poços adicionais foram coletadas para análise RT-PCR, de modo a medir outros marcadores de diferenciação.

Na conclusão da primeira etapa de diferenciação para endoderma 20 definitivo, os conjuntos replicados de poços paralelos de cada grupo de tratamento foram submetidos a uma diferenciação gradual adicional. É importante notar que, após a primeira etapa de diferenciação, todos os poços passando por cultura e diferenciação subsequente receberam o mesmo tratamento. O protocolo para essa diferenciação contínua é descrito 25 abaixo.

A etapa 2 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de dois dias. As células foram alimentadas diariamente mediante aspiração do meio de cada poço, substituindo-se o mesmo por uma alíquota sem uso (0,5 mL) de meio DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) contendo 2% de 30 FAF BSA, 50 ng/mL de FGF7 (PeproTech, Cat. n° 100-19) e 250 nM de ciclopamina-KAAD (Calbiochem, Cat. n° 239804).

A etapa 3 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de

quatro dias. As células foram alimentadas diariamente mediante aspiração do meio de cada poço, substituindo-se o mesmo por uma alíquota sem uso (0,5 mL) de glicose com alto teor de DMEM (Invitrogen, Cat. n° 10569) suplementada com 0,1% de Albumax (Invitrogen, Cat. n° 11020-021), 0,5x de insulina-transferrina-selênio (ITS-X, Invitrogen, Cat. n° 51500056), 50 ng/mL de FGF7, 100 ng/mL de noguina (R&D Systems, Cat. n° 3344-NG), 250 nM KAAD-ciclopamina, e 2 mM ácido todo-transretinoico (RA) (Sigma-Aldrich, Cat. n° R2625). Na conclusão da terceira etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletados para análise de RT-PCR, de modo a medir os marcadores de diferenciação.

A etapa 4 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de três dias. As células foram alimentadas diariamente mediante aspiração do meio de cada poço, substituindo-se o mesmo por uma alíquota sem uso (0,5 mL) de glicose com alto teor de DMEM suplementada com 0,1% de Albumax, 0,5x de insulina-transferrina-selênio, 100 ng/mL de noguina e 1 μ M de inibidor Alk 5 (Axxora, Cat. n° ALX-270-445). Na conclusão da quarta etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletados para análise de RT-PCR, de modo a medir os marcadores de diferenciação.

A etapa 5 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de sete dias em glicose com alto teor de DMEM com 0,1% de Albumax, 0,5x de insulina-transferrina-selênio e 1 μ M de inibidor Alk 5. O meio em cada poço foi aspirado e substituído por uma alíquota sem uso (0,5 mL) em todos os dias. Na conclusão da quinta etapa de diferenciação, as células de alguns poços foram coletados para análise de RT-PCR, de modo a medir os marcadores de diferenciação. Outros poços de cultura foram submetidos a análise de imagens de alto conteúdo quanto a níveis de expressão de proteína para insulina e glucagon.

Análise FACS: as células para análise FACS foram bloqueadas em uma solução a 1:5 de 0,5% de gama-globulina humana (Sigma, Cat. n° G-4386) em PBS (Invitrogen, Cat. n° 14040-133): tampão corante BD FACS – BSA (BD, Cat. n° 554657) durante 15 minutos a 4°C. As células foram, então, coradas com anticorpos para CD9 PE (BD, Cat. n° 555372), CD99 PE

(Caltag, Cat. n° MHCD9904) e CXCR4 APC (R&D Systems, Cat. n° FAB173A) durante 30 minutos a 4°C. Após uma série de lavagens em tampão corante BD FACS, as células foram coradas para viabilidade com 7-AAD (BD, Cat. n° 559925) e analisadas em um BD FACSAarray. Um anticorpo de controle de isotipo IgG1K de camundongo, tanto para PE como para APC, foi usado para delimitar a porcentagem de células positivas.

Análise RT-PCR: amostras de RNA foram purificadas mediante ligação a uma membrana de sílica-gel (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) na presença de um tampão de alta salinidade contendo etanol, seguido de lavagem para remover os contaminantes. O RNA foi adicionalmente purificado com o uso de um kit TURBO livre de DNA (Ambion, INC), e o RNA de alta qualidade foi então eluído em água. O rendimento e a pureza foram avaliados por leituras A260 e A280 em um espectrofotômetro. As cópias de CDNA foram produzidas a partir de RNA purificado com o uso de um kit de arquivo de cDNA de alta capacidade ABI (ABI, CA, EUA).

Exceto onde especificado em contrário, todos os reagentes foram obtidos junto à Applied Biosystems. As reações de PCR em tempo real foram executadas com o uso do sistema de detecção de sequência ABI PRISM® 7900. TAQMAN® UNIVERSAL PCR MASTER MIX® (ABI, CA, EUA) foi usado com 20 ng de RNA transcrito reverso em um volume de reação total de 20 µL. Cada amostra de cDNA foi analisada em duplicata para correção quanto a erros de pipetagem. Os iniciadores e sondas TAQMAN® identificadas com FAM foram usados em concentrações de 200 nM. O nível de expressão para cada gene alvo foi normalizado com o uso um controle endógeno de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humana (GAPDH) anteriormente desenvolvido por Applied Biosistemas. Os conjuntos de iniciador e sonda são mencionados na **tabela 12**. Após uma incubação inicial a 50°C durante 2 min, seguida de 95°C durante 10 min, as amostras foram submetidas 40 vezes a ciclos em dois estágios, sendo uma etapa de desnaturação a 95°C durante 15 s seguida de uma etapa de recozimento/extensão a 60°C durante 1 minuto. A análise de dados foi realizada com o uso do software de detecção de sequências GENEAMP®7000 Sequence

Detection System. Para cada conjunto de iniciador/ponta de prova, um valor Ct foi determinado como o número de ciclo no qual a intensidade de fluorescência alcançou um valor específico no meio da região exponencial de amplificação. Os níveis de expressão genética relativos foram calculados com o uso do método Ct comparativo. Brevemente, para cada amostra de cDNA, o valor Ct de controle endógeno Ct foi subtraído do gene de interesse Ct para proporcionar o valor de delta Ct (Δ Ct). A quantidade normalizada de alvo foi calculada como $2^{-\Delta$ Ct, assumindo a amplificação em 100% de eficiência. Os dados finais foram expressos em relação a uma amostra de calibração.

Análise de alto conteúdo: na conclusão da cultura, as placas de teste foram lavadas uma vez com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha, e adicionado a cada poço durante duas horas, à temperatura ambiente. Após lavar três vezes com PBS, adicionou-se a cada poço o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, Invitrogen, Cat. n° A21467) diluído a 1:200 em PBS. Para contraporar os núcleos, adicionou-se 5 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante quinze minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens. Outros anticorpos primários usados para análise incluíram diluição a 1:100 de CDX2 de camundongo anti-humano (Invitrogen, Cat. n° 397800), diluição a 1:100 de Pdx1 de cabra anti-humano (Santa Cruz Biotechnology, Cat. n° SC-14664), diluição a 1:200 de insulina de coelho anti-humano (Cell Signaling, Cat. n° C27C9), e diluição a 1:1500 de glucagon de camundongo anti-humano

(Sigma-Aldrich, Cat. n° G2654). Os anticorpos secundários usados para análise incluíram diluição a 1:400 de Alexa Fluor 647 IgG de galinha anti-camundongo (Invitrogen, Cat. n° A-21463), diluição a 1:200 de Alexa Fluor 488 IgG de jumento anti-cabra (Invitrogen, Cat. n° A11055), diluição a 1:1000 de Alexa Fluor 647 IgG de galinha anti-coelho (Invitrogen, Cat. n° A21443), e diluição a 1:1000 de Alexa Fluor 488 IgG de galinha anti-camundongo (Invitrogen, Cat. n° A21200).

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Foram capturadas imagens de 25 campos por poço. As medições quanto à intensidade total foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de tons cinza entre 200 e 4.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo.

Resultados: os resultados para os marcadores de diferenciação representativos são mostrados na **figura 21** e na **tabela 15**, para células coletadas a partir de cada etapa de diferenciação. Nas **figuras 21A e B**, os resultados da citometria de fluxo para CXCR4 são mostrados para vários tratamentos durante a primeira etapa da diferenciação do endoderma definitivo. A **figura 21A** mostra os efeitos sobre a expressão de CXCR4 do tratamento com vários compostos em combinação com ativina A. A **figura 21B** mostra os efeitos sobre o CXCR4 do tratamento com vários compostos em combinação com GDF-8. Os compostos da presente invenção em combinação com ativina A não acentuaram a expressão de CXCR4. Entre-

tanto, todos os compostos da presente invenção testados neste exemplo acentuaram a expressão de CXCR4 em combinação com GDF-8.

Nas **figuras 21C e 21D**, os valores de RT-PCR normalizados para vários marcadores de diferenciação, ao final da primeira etapa de diferenciação, são mostrados para tratamentos aplicados durante a primeira etapa do protocolo, usando-se os compostos selecionados da presente invenção, em combinação com ativina A (**figura 21C**) ou em combinação com GDF-8 (**figura 21D**). Valores similares de RT-PCR normalizados foram avaliados na conclusão da etapa três do protocolo de diferenciação (**figuras 21E e 21F**), ao final da etapa quatro do protocolo de diferenciação (**figuras 21G e 21H**) e ao final da etapa 5 do protocolo de diferenciação (**figuras 21I e 21J**). Os tratamentos durante a etapa de diferenciação 1, que combinavam um composto da presente invenção com GDF-8, apresentaram expressão acentuada de vários marcadores endodérmicos e pancreáticos em relação ao tratamento com GDF-8 por si só (**figuras 21 F, 21H e 21J**). Os tratamentos combinando compostos da presente invenção com ativina A tiveram pouca ou nenhuma melhoria nos marcadores de expressão, em relação ao tratamento com ativina A por si só ou com ativina A e Wnt3a (**figuras 21E, 21G e 21I**). A **tabela 15** resume os valores de CT comparativos para marcadores genéticos adicionais ao final de cada etapa de diferenciação, comparando tratamentos durante a primeira etapa que combinavam ativina A ou GDF-8, com ou sem um composto da presente invenção. Na conclusão da quinta etapa de diferenciação, realizou-se uma análise de alto conteúdo para medir os números de células (**figuras 21K e 21M**) e a expressão de proteína para insulina e glucagon (**figuras 21L e 21N**). O tratamento com GDF-8 durante a primeira etapa de diferenciação, sozinho ou em combinação com um composto da presente invenção, resultou na expressão de insulina e glucagon na conclusão da quinta etapa de diferenciação, demonstrando que o GDF-8 foi capaz de substituir a ativina A durante a iniciação da formação de endoderma definitivo, levando subsequentemente a células hormonais pancreáticas. Coletivamente, esses dados mostram que a adição de qualquer das respectivas moléculas pequenas

teve efeitos mínimos sobre os marcadores de diferenciação para tratamentos em combinação com ativina A. Entretanto, a adição de uma molécula pequena em combinação com tratamento por GDF8 teve efeitos aprimorados significativos sobre a imediata diferenciação do endoderma definitivo, na conclusão da primeira etapa de diferenciação e também em marcadores de diferenciação a jusante, na conclusão das etapas 3, 4 e 5. Foi observada uma variabilidade dentro do painel de moléculas pequenas, talvez atribuível à concentração do composto usado no teste, e/ou de seu mecanismo de ação.

10 Exemplo 18

Células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo que foram formadas com o uso de GDF-8 e um composto da presente invenção são capazes de liberar peptídeo C em seguida ao transplante para um roedor

15 É importante determinar se as células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma pancreático geradas *in vitro* por tratamento com GDF-8 e uma molécula pequena poderiam produzir células endócrinas funcionais *in vivo*. Foi feito um estudo de transplante *in vivo*, para comparar as células diferenciadas por tratamento com ativina A e
20 *Wnt3a versus* tratamento com GDF-8 e compostos de molécula pequena.

Preparação de células: aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico para cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231), com passagem em média a cada quatro dias.

25 Um meio condicionado com MEF e suplementado com 8 ng/ml de bFGF foi usado para semeadura inicial e expansão. Todas as linhagens de células ES humanas foram mantidas em números de passagem menores que 50, e foram rotineiramente avaliadas quanto ao cariótipo normal e à ausência de contaminação por micoplasma.

30 A passagem das células foi realizada mediante a exposição das culturas celulares a uma solução de 1 mg/mL de dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37°C, seguida de enxágue da camada

única com meio de cultura condicionado com MEF e raspagem delicada para recuperar os aglomerados celulares. Os aglomerados celulares foram centrifugados a baixa velocidade em meio condicionado com MEF, para remover quantidades residuais de dispase e, então, uniformemente ressus-
5 pensos em meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (PeproTech Inc., Cat. n° 100-18B) para semeadura sobre placas com 6 poços (Nunc, Cat. n° 140685) revestidas por MATRIGEL com teor reduzido de fator de crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231) a uma razão de 1:3, usando volumes de 2,5 mL/poço. A alimentação diária foi conduzida
10 aspirando-se o meio de cultura gasto de cada poço, e substituindo o mesmo por um volume igual de meio sem uso. As placas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂ por toda o tempo em cultura.

Diferenciação celular: o processo de diferenciação foi iniciado três dias depois de as células serem semeadas sobre placas com 6 poços
15 revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento. Um protocolo em quatro etapas foi usado para diferenciação *in vitro* de células-tronco embrionárias humanas H1 em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma pancreático. A etapa 1 foi conduzida ao longo de três dias para gerar células de endoderma definitivo.
20 No primeiro dia da etapa 1, a diferenciação foi iniciada mediante a aspiração do meio de cultura gasto, seguida da adição de um volume igual de meio basal RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400) com 2% de fração V de albumina bovina isenta de ácido graxo (FAF BSA) (Proliant Biologicals, Cat. n° SKU 68700) e 8 ng/mL de bFGF. Em um grupo de tratamento, as células
25 foram expostas a 100 ng/mL de ativina A (PeproTech, Cat. n° 120-14) com 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF). Em um segundo grupo de tratamento, as células foram expostas a 100 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) com 2,5 µM de Composto 40. Em um terceiro grupo de tratamento, as células foram expostas a 100 ng/mL de
30 GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) com 2,5 µM de Composto 202. No segundo e no terceiro dias da etapa 1 de diferenciação, as células em todos os grupos de tratamento foram alimentadas com RPMI-1640 contendo 2%

de FAF BSA, 8 ng/mL de bFGF e ou 100 ng/mL de ativina A (grupo de tratamento 1), ou 100 ng/mL de GDF-8 (grupos de tratamento 2 e 3), sem a adição de Wnt3a ou um composto da presente invenção. Ao final do terceiro dia de cultura, um poço de cada grupo de tratamento foi coletado para análise de FACS.

A etapa 2 do protocolo de diferenciação foi conduzida ao longo de três dias. As células de todos os grupos de tratamento foram alimentadas diariamente com DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) suplementado com 2% de FAF BSA e 50 ng/mL de FGF7 (PeproTech, Cat. n° 100-19).

A etapa 3 do protocolo de diferenciação foi conduzida ao longo de quatro dias. As células de todos os grupos de tratamento foram alimentadas diariamente com glicose com alto teor de DMEM (Invitrogen, Cat. n°10569) suplementado com 1% de B27 (Invitrogen, Cat. n° 17504-044), 50 ng/mL de FGF7, 100 ng/mL de noguina (R&D Systems, Cat. n° 3344-NG), 250 nM de KAAD-ciclopamina (Calbiochem, Cat. n° 239804) e 2 µM de ácido todo-transretinoico (RA) (Sigma-Aldrich, Cat. n° R2625).

A etapa 4 do protocolo de diferenciação foi conduzida ao longo de três dias. As células de todos os grupos de tratamento foram alimentadas diariamente, durante os primeiros dois dias, com glicose com alto teor de DMEM suplementado com 1% de B27, 100 ng/mL de noguina e 1 µM de inibidor ALK5 (Axxora, Cat. n° ALX-270-445). No terceiro dia, as células foram coletadas do substrato mediante o uso de uma ponta de 20 µl (Rainin, Cat. n° RT-L10F) e um raspador de células (Corning, Cat. n° 3008) e, então, transferidas para um tubo de 50 mL. As células foram deixadas sedimentar por gravidade, e o sobrenadante foi aspirado sem perturbar o pélete de células. As células foram ressuspensas em glicose com alto teor de DMEM suplementado com 1% de B27, 100 ng/mL de noguina e 1 mM de inibidor ALK5 e, então, cultivadas de um dia para o outro em microplacas de seis poços com fixação ultrabaixa Costar (Corning Inc., Cat. n° 3471). No dia seguinte, as células na cultura em suspensão foram coletadas e contadas. Alíquotas de 10×10^6 células/camundongo foram usadas para transplante. Alíquotas de $0,5 \times 10^6$ células foram coletadas para análise por RT-PCR.

A **figura 22** mostra os resultados da citometria de fluxo para células de endoderma definitivo geradas ao final da etapa 1 para cada um dos respectivos grupos de tratamento. O tratamento com ativina A e Wnt3a, ou o tratamento com GDF-8 e um composto da presente invenção, resultou em células que expressam níveis similares de CXCR4 (mais que 85%) ao final da etapa 1, sugerindo que uma população equivalente de células de endoderma definitivo foi derivada de cada grupo de tratamento.

Os resultados da análise de RT-PCR para células de cada grupo de tratamento na conclusão da etapa 4 do protocolo de diferenciação são mostrados na **figura 22, painel B**. As células diferenciadas em endoderma pancreático (PE) com o uso de ativina A e Wnt3a, ou com o uso de GDF-8 e o Composto 40, ou com o uso de GDF-8 e o Composto 202, expressaram níveis equivalentes de marcadores para PE: CDX2, MAFA, NGN3, NKX6.1, PDX1 e Ptf1 alfa. Esses resultados sugerem que o protocolo de diferenciação usando GDF-8 e uma molécula pequena foi igualmente eficaz na criação de uma população de células precursoras de endoderma pancreático.

Transplante, para camundongos, de células-tronco embrionárias humanas tratadas de acordo com os métodos da presente invenção: camundongos SCID beges machos (C.B-*Igh-1b/GbmsTac-Prkdc^{scid}-Lyst^{bg}* N7) com cinco a seis semanas de idade foram adquiridos junto à Taconic Farms. Os camundongos foram acomodados em gaiolas microisoladoras com livre acesso a alimento e água esterilizados. Em preparação para a cirurgia, os camundongos foram identificados por etiquetas na orelha, seu peso corporal foi medido, e sua glicose sanguínea foi determinada com o uso de um glicosímetro manual (LifeScan, One Touch). No dia da cirurgia, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de isoflurano e oxigênio, e o sítio cirúrgico foi raspado com aparadores próprios para pequenos animais. No pré-operatório, os camundongos receberam uma dose subcutânea de 0,1 mg.kg de Buprenex. O sítio cirúrgico foi preparado com sucessivas lavagens de 70% de álcool isopropílico, 10% de povidona-iodeto e 70% de álcool isopropílico, e uma incisão lateral esquerda foi feita através das camadas de pele e músculo. O rim esquerdo foi externalizado e

mantido úmido com cloreto de sódio a 0,9%. Um cateter I.V. de 24G x 3/4" foi usado para penetrar a cápsula renal, e a agulha foi removida. O cateter foi, então, avançado sob a cápsula renal até o pólo distal do rim. Durante a preparação pré-operatória dos camundongos, as células para transplante foram centrifugadas em um tubo de 1,5 mL para microfuga, e a maior parte do sobrenadante foi removida, deixando uma quantidade suficiente de meio para coletar o pélete de células. As células foram coletadas em uma ponta de pipeta Rainin Pos-D para deslocamento positivo, e a pipeta foi invertida para deixar as células decantarem por gravidade. O excesso de meio foi dispensado, deixando uma preparação de células pronta para transplante. Para o transplante, a ponta de pipeta Pos-D foi colocada firmemente na parte central do cateter, e as células foram dispensadas da pipeta através do cateter sob a cápsula renal, para aplicação ao pólo distal do rim. O lúmen do cateter foi purgado com um pequeno volume de meio de cultura, para transportar quaisquer células restantes, e o cateter foi removido. A cápsula renal foi selada com um cautério de baixa temperatura, e o rim foi retornado a sua posição anatômica original. O músculo foi fechado por suturas contínuas com o uso de suturas 5-0 VICRYL, e a pele foi fechada com grampos cirúrgicos. O camundongo foi removido da anestesia e deixado recuperar-se totalmente. No pós-operatório, os camundongos receberam uma dose subcutânea de 1,0 mg.kg de Metacam.

Em seguida ao transplante, os camundongos foram pesados uma vez por semana, e a glicose sanguínea foi medida duas vezes por semana. Em vários intervalos em seguida ao transplante, os camundongos receberam doses de 3 g/kg de glicose IP e, 60 minutos após a injeção de glicose, foi coletado sangue via sinus retro-orbital e colocado em tubos para microfuga contendo uma pequena quantidade de heparina. O sangue foi centrifugado, e o plasma foi colocado em um segundo tubo de microfuga, e congelado em gelo seco para armazenamento a -80°C, até que fosse realizado o teste de peptídeo C humano. Os níveis de peptídeo C humano foram determinados com o uso do kit para diagnóstico Mercodia/ALPCO Diagnostics Ultrasensitive C-peptide ELISA, de acordo com as instruções do

fabricante.

Os resultados do teste ELISA para peptídeo C humano são mostrados na **figura 23** para camundongos transplantados com células obtidas de cada um dos respectivos grupos de tratamento. Nenhum peptídeo C humano circulante foi detectado quatro semanas após o transplante, para qualquer dos camundongos que receberam células de qualquer dos grupos de tratamento. Oito semanas após o transplante, peptídeo C detectável foi encontrado em um dentre dois camundongos que receberam células tratadas com ativina A e Wnt3a, um dentre três camundongos que receberam células tratadas com GDF-8 e Composto 40, e duas dentre três camundongos que receberam células tratadas com GDF-8 e Composto 202. Esses resultados sugerem que uma população equivalente de células precursoras endócrinas poderia ser derivada do protocolo de diferenciação com GDF-8 e uma molécula pequena, e que as células adicionalmente maturaram *in vivo* para uma célula secretora de insulina e responsiva a glicose.

Exemplo 19

Células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo que foram formadas com o uso de GDF-8 são capazes de liberar peptídeo C em seguida ao transplante para um roedor

É importante demonstrar que as células diferenciadas com GDF-8 na ausência de ativina A poderiam, também, ser adicionalmente diferenciadas para uma população de células endócrinas capaz de secretar peptídeo C humano em um modelo de transplante de roedor *in vivo*.

Preparação de células: aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico para cultura de tecidos revestido por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231), com passagem em média a cada quatro dias. Um meio condicionado com MEF e suplementado com 8 ng/ml de bFGF foi usado para semeadura inicial e expansão. Todas as linhagens de células ES humanas foram mantidas em números de passagem menores que 50, e foram rotineiramente avaliadas quanto ao cariótipo normal e à ausência de contaminação por micoplasma.

A passagem das células foi realizada mediante a exposição das culturas celulares a uma solução de 1 mg/mL de dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37°C, seguida de enxágue da camada única com meio de cultura condicionado com MEF e raspagem delicada para recuperar os aglomerados celulares. Os aglomerados celulares foram centrifugados a baixa velocidade em meio condicionado com MEF, para remover quantidades residuais de dispase e, então, uniformemente ressuspensos em meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (PeproTech Inc., Cat. n° 100-18B) para semeadura sobre placas com 6 poços (Nunc, Cat. n° 140685) revestidas por MATRIGEL® com teor reduzido de fator de crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231) a uma razão de 1:3, usando volumes de 2,5 mL/poço. A alimentação diária foi conduzida aspirando-se o meio de cultura gasto de cada poço, e substituindo o mesmo por um volume igual de meio sem uso. As placas foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂ durante toda a cultura.

Diferenciação celular. o processo de diferenciação foi iniciado três dias depois de as células serem semeadas em placas com 6 poços. Um protocolo em quatro etapas foi usado para diferenciação *in vitro* de células-tronco embrionárias humanas H1 em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma pancreático. A etapa 1 foi conduzida ao longo de três dias, para gerar células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo. No primeiro dia da etapa 1, a diferenciação foi iniciada mediante a aspiração do meio de cultura gasto, seguida da adição de um volume igual de meio basal RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400) com 2% de fração V de albumina bovina isenta de ácido graxo (FAF BSA) (Proliant Biologicals, Cat. n° SKU 68700) e 8 ng/mL de bFGF. Em um grupo de tratamento, conjuntos de células em duplicata foram tratados com 100 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) e 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF). Em um segundo grupo de tratamento, conjuntos de células em duplicata foram tratados com 100 ng/mL de GDF-8 e 2,5 mM do Composto 40. No segundo e no terceiro dias da primeira etapa de diferenciação, as células em todos os

grupos de tratamento foram alimentadas com RPMI-1640 contendo 2% de FAF BSA, 8 ng/mL de bFGF e 100 ng/mL de GDF-8, porém sem a adição de Wnt3a ou do Composto 40. Ao final do terceiro dia de cultura, um poço de cada grupo de tratamento foi coletado para análise de FACS.

5 A etapa 2 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de três dias. As células de todos os grupos de tratamento foram alimentadas diariamente com DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) suplementado com 2% de FAF BSA e 50 ng/mL de FGF7 (PeproTech, Cat. n° 100-19).

10 A etapa 3 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de quatro dias. As células de todos os grupos de tratamento foram alimentadas diariamente com glicose com alto teor de DMEM (Invitrogen, Cat. n° 10569) suplementado com 1% de B27 (Invitrogen, Cat. n° 17504-044), 50 ng/mL de FGF7, 100 ng/mL de noguina (R&D Systems, Cat. n° 3344-NG), 250 nM de KA-AD-ciclopamina (Calbiochem, Cat. n° 239804) e 2 µM de ácido todo-
15 trans-retinoico (RA) (Sigma-Aldrich, Cat. n° R2625).

A etapa 4 do protocolo de diferenciação foi realizada ao longo de três dias. As células de todos os grupos de tratamento foram alimentadas diariamente com glicose com alto teor de DMEM suplementada com 1% de B27, 100 ng/mL de noguina e 1 µM de inibidor ALK5 (Axxora, Cat. n° ALX-
20 270-445), e 100 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) durante os primeiros dois dias. No terceiro dia da etapa 4, as células foram coletadas das placas com 6 poços usando-se uma ponta de 20 µl (Rainin, Cat. n° RT-L10F) e um raspador de células (Corning, Cat. n° 3008), sendo então transferidas para um tubo de 50 mL. As células foram deixadas sedimentar por gravidade, e o sobrenadante foi aspirado sem perturbar o pélete de
25 células. As células foram ressuspensas em glicose com alto teor de DMEM suplementado com 1% de B27, 100 ng/mL de noguina e 1 mM de inibidor ALK5 e, então, cultivadas de um dia para o outro em microplacas de seis poços com fixação ultrabaixa Costar (Corning Inc., Cat. n° 3471). No dia
30 seguinte, as células na cultura em suspensão foram coletadas e contadas. Aliquotas de 10×10^6 células/camundongo foram usadas para transplante. Aliquotas de $0,5 \times 10^6$ células foram coletadas para análise por RT-PCR.

A **figura 24A** mostra os resultados da citometria de fluxo para células de endoderma definitivo geradas ao final da etapa 1 para cada um dos respectivos grupos de tratamento. Os resultados para tratamento com GDF-8 e Wnt3a, ou tratamento com GDF-8 e Composto 40, expressaram níveis similares de CXCR4 ao final da etapa 1, sugerindo que uma população celular de endoderma definitivo equivalente e robusta resultou de cada grupo de tratamento. Conjuntos de tratamento em duplicata apresentaram forte concordância. Os resultados antes do transplante para análise de RT-PCR na conclusão da etapa 4 do protocolo de diferenciação são mostrados na **figura 24B**. As células diferenciadas para endoderma pancreático (PE) com o uso de GDF-8 e Wnt3a, ou GDF-8 e Composto 40, expressaram níveis equivalentes de marcadores característicos da linhagem de endoderma pancreático, como: CDX2, MafA, Ngn3, NKX6.1, Pdx-1 e Ptf1A. Esses resultados demonstram que o protocolo de diferenciação usando GDF-8 e Wnt3a, ou GDF-8 e um composto da presente invenção, foi igualmente eficaz na criação de uma população de células precursoras de endoderma pancreático. O protocolo de diferenciação foi conduzido em dois conjuntos de tratamento independentes porém idênticos. Os resultados dos conjuntos de tratamento em duplicata apresentaram forte concordância, conforme mostrado por análise de RT-PCR.

Transplante, para camundongos, de células-tronco embrionárias humanas: camundongos SCID beiges machos (C.B-*Igh*-1b/*GbmsTac-Prkdc^{scid}-Lyst^{bg}* N7) com cinco a seis semanas de idade foram adquiridos junto à Taconic Farms. Os camundongos foram acomodados em gaiolas microisoladoras com livre acesso a alimento e água esterilizados. Em preparação para a cirurgia, os camundongos foram identificados por etiquetas na orelha, seu peso corporal foi medido, e sua glicose sanguínea foi determinada com o uso de um glicosímetro manual (LifeScan, One Touch). No dia da cirurgia, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de isoflurano e oxigênio, e o sítio cirúrgico foi raspado com aparadores próprios para pequenos animais. No pré-operatório, os camundongos receberam uma dose subcutânea de 0,1 mg.kg de Buprenex. O sítio cirúrgico foi

preparado com sucessivas lavagens de 70% de álcool isopropílico, 10% de povidona-iodeto e 70% de álcool isopropílico, e uma incisão lateral esquerda foi feita através das camadas de pele e músculo. O rim esquerdo foi externalizado e mantido úmido com cloreto de sódio a 0,9%. Um cateter I.V. de 24G x 3/4" foi usado para penetrar a cápsula renal, e a agulha foi removida. O cateter foi, então, avançado sob a cápsula renal até o pólo distal do rim. Durante a preparação pré-operatória dos camundongos, as células para transplante foram centrifugadas em um tubo de 1,5 mL para microfuga, e a maior parte do sobrenadante foi removida, deixando uma quantidade suficiente de meio para coletar o pélete de células. As células foram coletadas em uma ponta de pipeta Rainin Pos-D para deslocamento positivo, e a pipeta foi invertida para deixar as células decantarem por gravidade. O excesso de meio foi dispensado, deixando uma preparação de células pronta para o transplante. Para o transplante, a ponta de pipeta Pos-D foi colocada firmemente na parte central do cateter, e as células foram dispensadas da pipeta através do cateter sob a cápsula renal, para aplicação ao pólo distal do rim. O lúmen do cateter foi purgado com um pequeno volume de meio de cultura, para transportar quaisquer células restantes, e o cateter foi removido. A cápsula renal foi selada com um cautério de baixa temperatura, e o rim foi retornado a sua posição anatômica original. O músculo foi fechado por suturas contínuas com o uso de 5-0 VICRYL, e a pele foi fechada com grampos cirúrgicos. O camundongo foi removido da anestesia e deixado recuperar-se totalmente. No pós-operatório, os camundongos receberam uma dose subcutânea de 1,0 mg.kg de Metacam.

Em seguida ao transplante, os camundongos foram pesados uma vez por semana, e a glicose sanguínea foi medida duas vezes por semana. Em vários intervalos em seguida ao transplante, os camundongos receberam doses de 3 g/kg de glicose IP e, 60 minutos após a injeção de glicose, foi coletado sangue via sinus retro-orbital e colocado em tubos para microfuga contendo uma pequena quantidade de heparina. O sangue foi centrifugado, e o plasma foi colocado em um segundo tubo de microfuga, e

congelado em gelo seco para armazenamento a -80°C , até que fosse realizado o teste de peptídeo C humano. Os níveis de peptídeo C humano foram determinados com o uso do kit para diagnóstico Mercodia/ALPCO Diagnostics Ultrasensitive C-peptide ELISA, de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados do teste ELISA para peptídeo C humano são mostrados nas **figuras 29C e D** para camundongos transplantados com células obtidas de cada um dos respectivos grupos de tratamento. Níveis similares de peptídeo C humano eram detectáveis 8 semanas após o transplante, para cada categoria de tratamento, indicando que uma população equivalente de células endócrinas precursoras poderia ser derivada do protocolo de diferenciação com o uso de GDF-8 e Wnt3a, ou de GDF-8 e um composto da presente invenção.

Exemplo 20

Avaliação do potencial dos inibidores de CDK, GSK3 e TRK para diferenciar células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo

Um subconjunto de 14 moléculas pequenas proprietárias, conhecidas por terem especificidade para rotas de sinalização de CDK, GSK3 e/ou TRK, foram avaliadas quanto a seu potencial para diferenciar células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo.

Semeadura para teste das células: em resumo, aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico para cultura de tecidos revestido por Matrigel[®] com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As células foram passadas usando-se tratamento com colagenase (Invitrogen, Cat. n° 17104-019) e raspagem delicada, foram lavadas para remover quantidades residuais de enzima, e folheadas com dispersão uniforme a uma razão de 1:1 (área superficial) sobre placas pretas com 96 poços (Packard ViewPlates, PerkinElmer, Cat. n° 6005182) revestidas por MATRIGEL[®] com teor reduzido de fator de crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231), usando-se volumes de 100 μl /poço. As células foram deixadas unir-se para, então,

recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 1 a 3 dias, com alimentação diária de meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do ensaio.

5 *Preparação de compostos e teste:* a triagem foi realizada usando-se os compostos descritos na **tabela 16**. Além disso, o Composto 34 foi incluído como um controle positivo, conforme demonstrado nos exemplos anteriores. Os compostos foram disponibilizados sob a forma de estoques de 10 5 mM no formato de placa com 96 poços, solubilizados em 100% de DMSO (Sigma, Cat. n° D2650) e armazenados a -80°C. Os compostos da biblioteca foram adicionalmente diluídos até uma concentração intermediária de 0,2 mM em 50 mM de HEPES (Invitrogen, Cat. n° 15630-080) e 20% de DMSO, e armazenados a 4°C. As condições de teste foram realizadas em triplicata, 15 com alimentação em dias alternados ao longo de um período de teste de quatro dias. O teste foi iniciado mediante aspiração do meio de cultura de cada poço, seguido de três lavagens em PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190) para remover quantidades residuais de fatores de crescimento. No primeiro dia do teste, os volumes de teste de 200 µl por poço foram adicionados a 20 cada poço usando-se meio base DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) suplementado com 0,5% de FCS (HyClone, Cat. n° SH30070.03) e 100 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) mais 2,5 mM de composto. Um conjunto paralelo de amostras para teste foi tratado de maneira idêntica, porém omitindo-se o GDF-8 do meio. No terceiro dia do teste, os volumes de 25 teste de 100 µl por poço foram adicionados a cada poço usando-se meio base DMEM:F12 suplementado com 2% de FCS mais 100 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8). O GDF-8 foi omitido das amostras para teste que não foram tratadas com GDF-8 no primeiro dia do teste. As amostras de controle positivo continham o mesmo meio base suplementado 30 com FCS e 100 ng/mL de ativina A humana recombinante (PeproTech, Cat. n° 120-14) durante todo o teste de quatro dias, juntamente com adição de Wnt3a (20 ng/mL) nos dias 1 e 2. As amostras de controle negativo conti-

nham meio base DMEM:F12 suplementado com FCS.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical, Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contraporar os núcleos, adicionou-se 4 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, corados somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15 campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calcula-

dos para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total de proteína SOX17 foi relatada como intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula multiplicada pela área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de cinza entre 200 e 3.500. Coletou-se a média de dados das poços em triplicata. A porcentagem de poços tratados em relação ao controle positivo foi calculada.

Os resultados para essa triagem são mostrados na **tabela 17**. Nenhuma das moléculas pequenas induziu uma expressão de SOX17 significativa na ausência de GDF-8 durante o processo de diferenciação em quatro dias. O Composto 34 serviu como um controle experimental, e induziu uma expressão de SOX17 significativa na presença de GDF-8, equivalente aos níveis observados com o controle positivo usando ativina A e Wnt3a. Os demais compostos da presente invenção testados neste exemplo apresentaram uma faixa de atividades com indução entre fraca e moderada para expressão de SOX17. Deve-se observar que a atividade de diferenciação nesse subconjunto de compostos foi observada em associação com a seletividade para todas as três rotas sinalizadoras enzimáticas, tornando difícil determinar conclusivamente um mecanismo de ação claro.

20 Exemplo 21

Triagem quanto a análogos dos compostos da presente invenção que são capazes de mediar a formação de células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo

Com base nas estruturas dos compostos da presente invenção, conduziu-se uma busca por análogos e 118 análogos foram encontrados. A triagem inicial determinou que alguns análogos eram capazes de induzir diferenciação do endoderma definitivo na ausência de ativina A, em combinação com outros fatores de crescimento. É importante determinar se esses análogos também poderiam induzir a diferenciação do endoderma definitivo em combinação apenas com GDF-8.

Semeadura para teste das células: em resumo, aglomerados de células-tronco embrionárias humanas H1 foram cultivados sobre plástico

para cultura de tecidos revestido por Matrigel® com teor reduzido de fator de crescimento (Invitrogen, Cat. n° 356231). As células foram passadas usando-se tratamento com colagenase (Invitrogen, Cat. n° 17104-019) e raspagem delicada, foram lavadas para remover quantidades residuais de enzima, e folheadas com dispersão uniforme a uma razão de 1:1 (área superficial) sobre placas pretas com 96 poços (Packard ViewPlates, PerkinElmer, Cat. n° 6005182) revestidas por MATRIGEL® com teor reduzido de fator de crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231), usando-se volumes de 100 µl/poço. As células foram deixadas unir-se para, então, recuperar a proliferação na fase log ao longo de um período de 1 a 3 dias, com alimentação diária de meio condicionado com MEF suplementado com 8 ng/mL de bFGF (R&D Systems, Cat. n° 233-FB). As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do ensaio.

Preparação de compostos e teste: a triagem foi realizada usando-se uma biblioteca de compostos análogos. Os compostos dessa biblioteca foram disponibilizados sob a forma de estoques de 5 mM no formato de placa com 96 poços, solubilizados em 100% de DMSO (Sigma, Cat. n° D2650) e armazenados a -80°C. Os compostos da biblioteca foram adicionalmente diluídos até uma concentração intermediária de 0,2 mM em 50 mM de HEPES (Invitrogen, Cat. n° 15630-080) e 20% de DMSO, e armazenados a 4°C. As condições de teste foram realizadas em triplicata, com alimentação em dias alternados ao longo de um período de teste de quatro dias. Os testes foram iniciados mediante aspiração do meio de cultura de cada poço, seguido de três lavagens em PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190) para remover quantidades residuais de fatores de crescimento. No primeiro dia do teste, os volumes de teste de 200 µl por poço foram adicionados a cada poço usando-se meio base DMEM:F12 (Invitrogen, Cat. n° 11330-032) suplementado com 0,5% de FCS (HyClone, Cat. n° SH30070.03) e 200 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) mais 2,5 µM de composto. No terceiro dia do teste, os volumes de teste de 100 µl por poço foram adicionados a cada poço usando-se meio base DMEM:F12 suplementado com 2% de FCS mais 200 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8).

As amostras de controle positivo continham o mesmo meio base suplementado com FCS e 100 ng/mL de ativina A humana recombinante (PeproTech, Cat. n° 120-14) durante todo o teste de quatro dias, juntamente com Wnt3a (20 ng/mL) nos dias 1 e 2. As amostras de controle negativo
5 continham meio base DMEM:F12 suplementado com FCS, adicionando-se Wnt3a nos dias 1 e 2, mas omitindo-se o tratamento com ativina A.

Análise de alto conteúdo: na conclusão de quatro dias de cultura, as placas de teste foram lavadas duas vezes com PBS (Invitrogen, Cat. n° 14190), fixadas com 4% de paraformaldeído (Alexis Biochemical,
10 Cat. n° ALX-350-011) à temperatura ambiente durante 20 minutos e, então, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma, Cat. n° T8760-2) durante 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente três vezes com PBS e bloqueadas com 4% de soro de galinha (Invitrogen, Cat. n° 16110082) em PBS durante 30
15 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário (cabra anti-humano SOX17, R&D Systems, Cat. n° AF1924) foi diluído a 1:100 e 4% de soro de galinha e adicionado a cada poço durante uma hora, à temperatura ambiente. O anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 488 (galinha anti-cabra IgG, sondas moleculares, Cat. n° AZ1467) foi diluído a 1:200 em PBS
20 e adicionado a cada poço de amostra, após lavagem por três vezes com PBS. Para contracorar os núcleos, adicionou-se 4 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Cat. n° H3570) durante dez minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas uma vez com PBS e deixadas em 100 µl/poço de PBS para formação de imagens.

25 A captura de imagens foi realizada com o uso de um equipamento de análise celular IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare), usando o filtro dicróico 51008bs para células coradas com Hoechst 33342 e Alexa Fluor 488. Os tempos de exposição foram otimizados a partir de poços com controle positivo e de poços com controle negativo não tratado, coradas
30 somente com anticorpo secundário. Foram capturadas imagens de 15 campos por poço, para compensar por qualquer perda celular ocorrida durante o bioensaio e os procedimentos de coloração subsequentes. As medições

quanto ao número total de células e à intensidade total de SOX17 foram obtidas a partir de cada poço com o uso do software IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare). A segmentação para os núcleos foi determinada com base em níveis de escala de tons de cinza (linha de base na faixa de 100 a 300) e tamanho nuclear. Médias e desvios-padrão foram calculados para cada réplica de conjunto de dados. A expressão total da proteína SOX17 foi relatada como a intensidade total ou intensidade integrada, definida como a fluorescência total da célula vezes a área da célula. O fundo foi eliminado com base no critério de aceitação das faixas de escala de cinza entre 200 e 3.500. Os dados de intensidade total foram normalizados mediante a divisão das intensidades totais para cada poço pela intensidade total média para o controle positivo. Dados normalizados foram calculados para médias e desvios-padrão de cada conjunto de réplicas.

Os resultados da triagem são mostrados na **tabela 18**, a partir de quatro placas de teste neste único experimento. Os compostos são classificados em relação à expressão de SOX17 como uma porcentagem do tratamento do controle positivo com ativina A e Wnt3a. Esse teste identificou uma lista de 12 novos acertos de análogo, conforme mostrado na **tabela 19**.

Exemplo 22

Células-tronco embrionárias humanas cultivadas em micropor-tadores podem ser diferenciadas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma definitivo de acordo com os métodos da presente invenção

Para os propósitos de diferenciação e produção de grandes números de células endócrinas sob condições escalonáveis, foi importante mostrar que as células-tronco embrionárias humanas podiam ser cultivadas e diferenciadas para endoderme definitiva sobre microesferas portadoras com o uso dos métodos da presente invenção.

Preparação de células para teste e diferenciação: células H1 p49C3 foram rotineiramente cultivadas sobre microesferas Cytodex3 (GE Healthcare Life Sciences, NJ, EUA) em um 125 mL frasco de agitação, de acordo com os métodos descritos no pedido de patente US nº 61/116.447.

Após sete dias, as células e as microesferas foram transferidas para uma placa com 6 poços (Vendor; Cat # XXX) a uma razão de 30 cm² de área superficial da microesfera por poço, e a placa foi colocada em uma plataforma de agitação. As células sobre as microesferas no poço para

5 tratamento do controle positivo (designada AAWnt3a) foram diferenciadas com adição de 100 ng/mL de ativina A (PeproTech, Cat. n° 120-14) e 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF) durante dois dias, seguido de 100 ng/mL de ativina A e 8 ng/mL de bFGF (PeproTech Inc., Cat. n° 100-18B) durante um dia em RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400) com

10 2% de BSA isento de ácido graxo (MP Biomedicals, Inc, Cat. n° 152401), usando volumes de 2 mL/poço. O Composto 34, a uma concentração final de 2,5 µM, foi adicionado a uma poço de tratamento para controle negativo (designada CMP por si só) em RPMI-1640 com 2% de BSA isento de ácido graxo (2 mL/poço) durante três dias, na ausência de qualquer outro

15 tratamento por fator de crescimento. Um terceiro poço de tratamento (designada CMP+8) recebeu o Composto 34 a 2,5 µM mais 50 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) em RPMI-1640 com 2% de BSA isento de ácido graxo (2 mL/poço) durante três dias. Um quarto poço de tratamento (designada CMP+8+D) recebeu o Composto 34 a 2,5 µM com 50

20 ng/mL de GDF-8 e 50 ng/mL de PDGF-D me RPMI-1640 com 2% de BSA isento de ácido graxo (2 mL/poço) durante três dias. Um quinto poço de tratamento (designada CMP+8+D+V) recebeu o Composto 34 a 2,5 µM com 50 ng/mL de GDF-8, 50 ng/mL de PDGF-D e 50 ng/mL de VEGF em RPMI-1640 com 2% de BSA isento de ácido graxo (2 mL/poço) durante três dias.

25 Um sexto poço de tratamento (designada CMP+8+D+V+M) recebeu o Composto 34 a 2,5 µM com 50 ng/mL de GDF-8, 50 ng/mL de PDGF-D, 50 ng/mL de VEGF e 20 ng/mL de Muscimol em RPMI-1640 com 2% de BSA isento de ácido graxo (2 mL/poço) durante três dias. Todos os meios e tratamentos foram trocados diariamente.

30 Na conclusão do tratamento e do cultivo, as células foram coletadas das microesferas, de acordo com os métodos descritos no pedido de patente US n° 61/116.447. As células coletadas foram contadas e analisa-

das por citometria de fluxo, de acordo com os métodos acima descritos.

Os resultados são mostrados na **figura 25**. Conforme mostrado no painel A, números similares de células foram recuperados para todos os grupos de tratamento passando por diferenciação. Conforme mostrado no

5 painel B, as células tratadas somente com o Composto 34 não se diferenciaram em células positivas para CXCR4. O tratamento do controle positivo, adicionando ativina A e Wnt3a durante a diferenciação, induziu a expressão de CXCR4 em 68% da população celular resultante. O Composto

10 34, adicionado com as várias combinações de fator de crescimento, induziu a expressão de CXCR4 em 50% da células, em média. Deve-se notar que níveis equivalentes de expressão de CXCR4 foram observados durante o tratamento com o Composto 34 em combinação com um único fator de crescimento, GDF-8, ou em combinação com múltiplos fatores de crescimento que incluíam GDF-8. Isso prova que o Composto 34, em combinação

15 com pelo menos GDF-8, pode substituir a ativina A e o Wnt3a para promover a diferenciação do endoderma definitivo. Esse exemplo mostra, também, que o procedimento para tratamento é eficaz para células cultivadas e diferenciadas sobre microesferas portadoras.

Exemplo 23

20 Os compostos da presente invenção, juntamente com GDF-8, acentuam a proliferação celular

Um exemplo anterior mostrou que o GDF-8 é capaz de substituir a ativina A para diferenciar células-tronco embrionárias humanas em células expressoras de marcadores característicos da linhagem de endoderma

25 definitivo. Foi importante conhecer as potências relativas do GDF-8 e da ativina A em relação à formação de endoderma definitivo. Um teste de resposta à dosagem foi conduzido com o uso de concentrações equivalentes de cada fator de crescimento, para comparar os resultados durante a diferenciação das células-tronco embrionárias humanas.

30 Os compostos da presente invenção usados em combinação com GDF-8 durante a diferenciação do endoderma definitivo foram avaliados quanto a sua capacidade para induzir a proliferação celular. Os resultados

foram comparados ao tratamento com ativina A ou GDF-8 por si sós.

Preparação de células para teste: culturas de estoque de células-tronco embrionárias humanas (linhagem de células-tronco embrionárias humanas H1) foram mantidas em um estado pluripotente não diferenciado sobre placas revestidas por MATRIGEL® com teor reduzido de fator de crescimento (BD Biosciences, Cat. n° 356231), em meio condicionado com MEF e com passagem, em média, a cada quatro dias. A passagem foi realizada mediante a exposição das culturas celulares a uma solução de 1 mg/mL de dispase (Invitrogen, Cat. n° 17105-041) durante 5 a 7 minutos a 37°C, seguida de enxágue da camada única com meio de cultura condicionado com MEF e raspagem delicada para recuperar os aglomerados celulares. Os aglomerados foram centrifugados a baixa velocidade para coletar-se um pélete de células e para remover quantidades residuais de dispase. Os aglomerados celulares foram divididos a uma razão de 1:3 ou 1:4 para cultura de manutenção de rotina, ou a uma razão de 1:1 para teste imediato. Todas as linhagens de células-tronco embrionárias de ser humano foram mantidas com números de passagem menores que 50, e foram rotineiramente avaliadas quanto ao fenótipo cariotípico normal e quanto à ausência de contaminação por micoplasma.

Os aglomerados celulares usados no teste foram uniformemente ressuspensos em meio condicionado com MEF e suplementado com 8 ng/mL de bFGF, e foram semeados sobre placas com 96 poços Packard VIEWPLATES (PerkinElmer, Cat. n° 6005182) revestidas por MATRIGEL® com teor reduzido de fator de crescimento, em volumes de 100 µl/poço. Um meio condicionado com MEF e suplementado com 8 ng/ml de bFGF foi usado para semeadura inicial e expansão. A alimentação diária foi conduzida aspirando-se o meio de cultura gasto de cada poço, e substituindo o mesmo por um volume igual de meio sem uso. Um conjunto de poços de fundo em cada placa de teste não foi semeado com células, mas foi tratado durante todo o teste com condições de meio basal. As placas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em uma caixa umidificada por toda a duração do ensaio.

Teste: o teste foi iniciado mediante a aspiração do meio de cultura de cada poço, adicionando-se de volta uma alíquota final de 100 µl do meio para teste. As condições de teste foram realizadas em triplicata ao longo de um período de teste total de três dias, com alimentação diária mediante aspiração e substituição do meio em cada poço com meio de teste sem uso. Testes idênticos foram preparados simultaneamente em paralelo, para avaliação ao final de 24, 48 e 72 horas.

No primeiro dia do teste, todos os poços contendo células receberam uma alíquota (80 µl) de meio RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400) suplementado com 2,5% de fração V de albumina bovina isenta de ácido graxo (FAF BSA, 2% no teste final) (Proliant Inc., Cat. n° SKU 68700). Várias amostras para controle e para teste foram criadas a uma concentração de 5x para serem adicionadas a poços adequados (20 µl por poço). As condições de controle incluíam o seguinte, com concentrações finais de fator de crescimento conforme indicado: 1) meio basal com 2% de FAF BSA; 2) 100 ng/mL de ativina A (PeproTech, Cat. n°120-14) com 8 ng/mL de bFGF (PeproTech, Cat. n° 100-18B); 3) 100 ng/mL de ativina A com 8 ng/mL de bFGF e 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF); 4) 100 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) com 8 ng/mL de bFGF; 5) GDF-8 com 8 ng/mL de bFGF e 20 ng/mL de Wnt3a. As células em um conjunto adicional de poços de controle foram tratadas com meio condicionado com MEF durante todo o teste. Em algumas amostras de controle usando GDF-8, o Wnt3a foi substituído por um composto da presente invenção. Para as amostras para teste experimentais, os oito diferentes compostos foram diluídos duas vezes em série, para criar três diferentes concentrações de dose, então combinadas com 100 ng/mL de GDF-8 e 8 ng/mL de bFGF. Essas moléculas pequenas incluíam os compostos proprietários Composto 181, Composto 180, Composto 19, Composto 202, Composto 40, Composto 34 e Composto 56, e um inibidor GSK3 BIO disponível comercialmente (EMD Chemicals, Inc., Cat. n° 361550). No segundo e no terceiro dias de teste, todos os poços para amostras de controle e experimentais foram aspirados e alimentados novamente

usando-se condições de tratamento idênticas, exceto pelo fato de que o Wnt3a foi removido de alguns poços de controle.

Teste de MTS: na conclusão de 24, 48 ou 72 horas de cultura, um conjunto de placas de teste foi submetido a um teste de MTS (Promega, Cat. n° G3581), seguindo-se as instruções do fabricante. Em resumo, adicionou-se 20 µl de MTS a cada poço, e as placas de teste foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante quatro horas, antes de serem tomadas as leituras de OD490. As medidas estatísticas foram calculadas menos o plano de fundo (isto é, poços de tratamento sem células), para determinar os valores médios para cada conjunto em triplicata, em adição a um erro-padrão da média.

O teste de MTS é uma medida de atividade metabólica celular na redução enzimática de um composto de tetrazólio para um produto de formazano. Em um único ponto no tempo, o teste de MTS pode ser usado como um indicador comparativo da viabilidade celular. Os testes de MTS avaliados em paralelo e a pontos sequenciais no tempo, podem agregar informações adicionais referentes a aumentos na atividade metabólica celular que, por sua vez, podem ser correlacionados com a proliferação celular para cada condição de tratamento. A **figura 26, painel A** mostra as leituras de OD490 para todos os tratamentos de controle ao longo do período de teste de três dias. As células tratadas com meio condicionado mostraram pouca alteração em OD490 ao longo de três dias, indicando que os números de células nesse grupo de tratamento permaneceram estáticos. Em contraste, as células cultivadas em meio basal sem fatores de crescimento (nenhum tratamento), mostraram um declínio constante em OD490, correlacionado com uma perda no número de células ao longo do tempo. Os tratamentos com ativina A durante o processo de diferenciação, com e sem Wnt3a, mostraram aumentos incrementais em OD490, indicando expansão significativa da população celular ao longo do tempo. O tratamento com GDF-8 na ausência de Wnt3a resultou em uma diminuição de OD490, em relação ao tratamento com ativina A, sendo isso perceptível no primeiro dia e mantido ao longo dos três dias de cultivo. A adição de Wnt3a ao grupo de

tratamento com GDF-8 resultou em recuperação e aumento de OD490 pelo terceiro dia de cultivo.

Da figura 26, painel B, até a figura 26, painel I, são mostrados os resultados do teste MTS para tratamento com um inibidor de molécula pequena em combinação com GDF-8. As leituras de OD490 referentes aos tratamentos com um composto da presente invenção e GDF-8 apresentaram resultados equivalentes a, ou melhores que, aqueles do tratamento com ativina A. Em todos os casos, uma concentração ótima de cada molécula pequena combinada com GDF-8 resultou em leituras de OD490 otimizadas ao longo dos três dias de teste em relação ao tratamento com GDF-8 por si só. Isso sugere que os compostos da presente invenção são importantes para induzir a proliferação e a expansão de uma população celular durante a diferenciação do endoderma definitivo.

Exemplo 24

Células-tronco embrionárias humanas cultivadas em micropor-tadores podem ser diferenciadas em células progenitoras endócrinas de acordo com os métodos da presente invenção

Para os propósitos de diferenciação e produção de grandes números de células endócrinas sob condições industriais, foi importante mostrar que as células-tronco embrionárias humanas podiam ser cultivadas e diferenciadas para células progenitoras endócrinas sobre microesferas portadoras, com o uso de um protocolo sem ativina A.

Preparação de células para teste e diferenciação: células H1 p45 foram cultivadas sobre microesferas Cytodex3 (GE Healthcare, Cat. n° 17-0485-01) em uma placa de fixação ultrabaixa com 6 poços (Costar, Cat. n° 3471) colocada sobre uma plataforma de agitação com cerca de 1 rotação a cada 10 segundos (Vari Mix, Thermo Scientific, Cat. n° M79735). Um meio condicionado em MEF foi trocado diariamente durante seis dias. Então, o meio foi alterado para os tratamentos apresentados a seguir, para iniciar a diferenciação de endoderma. As células sobre as microesferas no poço para tratamento do controle positivo (designada AA+Wnt) foram diferenciadas com adição de 100 ng/mL de ativina A (PeproTech, Cat. n° 120-14), 8 ng/mL

de bFGF (PeproTech Inc., Cat. n° 100-18B) e 20 ng/mL de Wnt3a (R&D Systems, Cat. n° 1324-WN/CF) durante um dia, seguido de 100 ng/mL de ativina A e 8 ng/mL de bFGF (PeproTech Inc., Cat. n° 100-18B) durante dois dias em RPMI-1640 (Invitrogen, Cat. n° 22400) com 2% de BSA isento de ácido graxo (Proliant Biomedicals, Inc, SKU n° 68700), usando volumes de 2 mL/poço. Um segundo poço de tratamento (designada GDF-8+MCX) recebeu o Composto 202 a 2,5 μ M mais 200 ng/mL de GDF-8 (R&D Systems, Cat. n° 788-G8) e 8 ng/mL de bFGF durante um dia, seguido de dois dias com 200 ng/mL de GDF-8 e 8 ng/mL de bFGF em meio RPMI-1640 com 2% de BSA isento de ácido graxo (2 mL/poço). Um terceiro poço de tratamento (designada GDF-8+Wnt) recebeu 200 ng/mL de GDF-8 com 20 ng/mL de Wnt3a e 8 ng/mL de bFGF durante um dia, seguido de dois dias com 200 ng/mL de GDF-8 e 8 ng/mL de bFGF em meio RPMI-1640 com 2% de BSA isento de ácido graxo (2 mL/poço). Todos os meios e tratamentos foram trocados diariamente.

Na conclusão do tratamento e do cultivo, as células foram coletadas e contadas para se determinar a recuperação celular e para submetê-las a citometria de fluxo. Observou-se altos teores de CXCR4 e CD99 em seguida a todos os três regimes de tratamento (**figura 27A**). O número de células variou entre amostras (**figura 27B**). Um menor número de células foi observado em amostras tratadas com GDF-8 e nos grupos de endoderma definitivo e quarto estágio, em comparação a outros grupos de tratamento. Isso sugere que os compostos da presente invenção podem aumentar a proliferação das células durante a diferenciação.

Ao final do estágio 3, os genes para endoderma PDX1, HNF4 alfa e CDX2 são expressos nas células (**figuras 27C e 27D**). O tratamento das células com GDF-8 e um composto na presente invenção durante o primeiro estágio de diferenciação resultou em uma melhor expressão de Pdx1, em comparação ao tratamento de diferenciação para controle. Ao final do estágio 4, os genes para endoderma estavam adicionalmente regulados para cima (**figuras 27E e 27F**). Esses resultados concluem que o GDF-8 mais o Composto 202 podem substituir a ativina A e o Wnt3a para diferen-

ciação do endoderma definitivo, resultando na formação de endoderma pancreático.

As publicações citadas ao longo deste documento estão aqui incorporadas a título de referência, em sua totalidade. Embora os vários aspectos da invenção tenham sido ilustrados acima, por meio de referência a exemplos e modalidades preferenciais, deve-se compreender que o escopo da invenção é definido não pela supracitada descrição, mas pelas reivindicações apresentadas a seguir, adequadamente interpretadas sob os princípios da legislação de patentes.

10

TABELA 1					
Placa nº	Composto nº	Número de célula		Expressão de Sox17	
		Número médio de células	% total de controles positivos	Intensidade total média	% de controles positivos
placa 5	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	7159	67,42	8,12E+06	2,51
placa 5	Ativina A / Wnt3a	10619	100,00	3,23E+08	100,00
placa 5	Composto 58	4848	45,66	-1,60E+06	-0,49
placa 5	Composto 59	20	0,19	-4,62E+06	-1,43
placa 5	Composto 60	3348	31,52	-2,33E+05	-0,07
placa 5	Composto 61	2931	27,60	-3,05E+06	-0,94
placa 5	Composto 62	7171	67,53	-2,04E+06	-0,63
placa 5	Composto 3	14211	133,82	-2,34E+06	-0,73
placa 6	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	3264	32,97	2,52E+06	0,80
placa 6	Ativina A / Wnt3a	9902	100,00	3,14E+08	100,00
placa 6	Composto 63	1917	19,36	4,75E+05	0,15
placa 6	Composto 26	5434	54,88	-6,33E+05	-0,20
placa 6	Composto 27	6288	63,50	-1,13E+06	-0,36
placa 6	Composto 28	4121	41,62	-1,89E+06	-0,60

placa 6	Composto 39	5164	52,15	-1,66E+06	-0,53
placa 6	Composto 30	4726	47,73	-1,23E+06	-0,39
placa 7	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	9545	47,57	-4,87E+06	-0,99
placa 7	Ativina A / Wnt3a	20064	100,00	4,92E+08	100,00
placa 7	Composto 31	7230	36,03	-3,45E+06	-0,70
placa 7	Composto 32	14655	73,04	-3,03E+06	-0,62
placa 7	Composto 33	13891	69,23	-8,11E+06	-1,65
placa 7	Composto 34	11674	58,18	-2,24E+06	-0,46
placa 7	Composto 35	15379	76,65	-7,30E+06	-1,48
placa 7	Composto 36	8356	41,65	-4,57E+06	-0,93
placa 8	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	6868	36,97	-2,31E+06	-0,52
placa 8	Ativina A / Wnt3a	18575	100,00	4,47E+08	100,00
placa 8	Composto 37	9048	48,71	-3,51E+06	-0,79
placa 8	Composto 38	11361	61,16	-4,31E+06	-0,96
placa 8	Composto 39	7054	37,98	-3,83E+06	-0,86
placa 8	Composto 40	8104	43,63	-4,59E+06	-1,03
placa 1	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	2972	27,98	1,64E+07	19,74
placa 1	Ativina A / Wnt3a	3126	29,44	8,33E+07	100,00
placa 1	Composto 64	2201	20,72	1,71E+07	20,52
placa 1	Composto 65	3030	28,53	2,83E+07	33,95
placa 1	Composto 66	1990	18,74	2,36E+07	28,30
placa 1	Composto 67	2074	19,53	2,63E+07	31,55
placa 1	Composto 68	1432	13,48	1,03E+07	12,39
placa 1	Composto 69	2593	24,42	2,62E+07	31,43
placa 1	Composto 70	2236	21,05	2,59E+07	31,11
placa 1	Composto 71	2996	28,22	3,07E+07	36,92
placa 1	Composto 72	2179	20,52	1,21E+07	14,50
placa 1	Composto 73	2817	26,53	2,93E+07	35,25

placa 1	Composto 74	2853	26,86	2,25E+07	27,01
placa 1	Composto 75	1689	15,91	1,42E+07	17,05
placa 1	Composto 76	2324	21,89	1,48E+07	17,81
placa 1	Composto 77	2306	21,71	2,04E+07	24,55
placa 1	Composto 78	3298	31,06	2,58E+07	31,00
placa 1	Composto 79	2855	26,88	2,79E+07	33,47
placa 1	Composto 80	3603	33,93	3,22E+07	38,62
placa 1	Composto 81	2263	21,31	1,07E+07	12,91
placa 1	Composto 82	1210	11,39	1,36E+07	16,33
placa 1	Composto 83	1805	17,00	1,82E+07	21,87
placa 1	Composto 84	2024	19,06	2,48E+07	29,80
placa 1	Composto 85	2840	26,74	3,45E+07	41,44
placa 1	Composto 86	1447	13,63	8,43E+06	10,13
placa 1	Composto 87	5336	50,25	4,20E+07	50,38
placa 2	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	4033	35,50	2,14E+07	21,70
placa 2	Ativina A / Wnt3a	4292	37,78	9,86E+07	100,00
placa 2	Composto 88	3416	30,06	4,17E+07	42,28
placa 2	Composto 89	4751	41,82	2,11E+07	21,40
placa 2	Composto 90	4542	39,98	3,03E+07	30,70
placa 2	Composto 91	1401	12,33	1,29E+06	1,31
placa 2	Composto 92	4210	37,06	2,95E+07	29,90
placa 2	Composto 93	4157	36,59	2,29E+07	23,26
placa 2	Composto 94	4046	35,61	2,85E+07	28,91
placa 2	Composto 95	8368	73,66	4,02E+07	40,72
placa 2	Composto 96	3695	32,53	2,92E+07	29,57
placa 2	Composto 97	3437	30,26	2,41E+07	24,44
placa 2	Composto 98	4178	36,77	3,75E+07	38,07
placa 2	Composto 99	3739	32,91	2,10E+07	21,29
placa 2	Composto 100	2275	20,02	1,27E+07	12,86
placa 2	Composto 101	3496	30,77	2,98E+07	30,17

placa 2	Composto 102	4874	42,90	2,10E+07	21,32
placa 2	Composto 103	4228	37,22	2,69E+07	27,32
placa 2	Composto 104	6115	53,82	4,93E+07	49,99
placa 2	Composto 105	6484	57,07	5,03E+07	50,95
placa 2	Composto 106	4211	37,06	3,94E+07	40,00
placa 2	Composto 107	2853	25,11	1,78E+07	18,04
placa 2	Composto 108	3779	33,27	2,39E+07	24,26
placa 2	Composto 108	2869	25,26	2,04E+07	20,71
placa 2	Composto 110	4398	38,71	2,53E+07	25,65
placa 3	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	2589	91,17	1,17E+07	5,89
placa 3	Ativina A / Wnt3a	6933	244,13	1,98E+08	100,00
placa 3	Composto 111	6816	240,04	5,33E+07	26,90
placa 3	Composto 112	5357	188,66	3,52E+07	17,74
placa 3	Composto 113	6002	211,37	8,55E+07	43,11
placa 3	Composto 114	3308	116,49	3,85E+07	19,44
placa 3	Composto 115	5007	176,31	3,96E+07	19,95
placa 3	Composto 116	3802	133,89	3,12E+07	15,75
placa 3	Composto 117	6521	229,64	4,16E+07	20,97
placa 3	Composto 118	6128	215,81	5,53E+07	27,91
placa 3	Composto 119	4184	147,35	3,41E+07	17,21
placa 3	Composto 120	2489	87,66	2,87E+07	14,49
placa 3	Composto 121	4985	175,54	3,94E+07	19,87
placa 3	Composto 25	4151	146,17	4,03E+07	20,32
placa 3	Composto 122	6407	225,61	4,15E+07	20,95
placa 3	Composto 123	4465	157,24	5,35E+07	26,99
placa 3	Composto 124	4417	155,53	4,67E+07	23,55
placa 3	Composto 125	6367	224,23	5,73E+07	28,93
placa 3	Composto 126	6157	216,82	7,47E+07	37,70
placa 3	Composto 127	5593	196,97	5,61E+07	28,28
placa 3	Composto 128	4160	146,50	4,91E+07	24,77

placa 3	Composto 129	3778	133,03	3,54E+07	17,88
placa 3	Composto 130	4357	153,43	4,15E+07	20,92
placa 3	Composto 131	6135	216,05	4,28E+07	21,61
placa 3	Composto 132	4421	155,69	4,58E+07	23,12
placa 3	Composto 133	7069	248,94	6,52E+07	32,88
placa 4	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	3274	86,62	1,25E+07	12,79
placa 4	Ativina A / Wnt3a	4158	110,03	9,79E+07	100,00
placa 4	Composto 134	5277	139,62	3,43E+07	35,04
placa 4	Composto 64	5657	149,67	3,38E+07	34,48
placa 4	Composto 135	2790	73,83	1,63E+07	16,63
placa 4	Composto 34	4774	126,33	4,35E+07	44,47
placa 4	Composto 136	4881	129,16	3,20E+07	32,73
placa 4	Composto 137	1740	46,05	9,16E+06	9,35
placa 4	Composto 30	6367	168,46	4,22E+07	43,13
placa 4	Composto 37	5377	142,27	2,85E+07	29,14
placa 4	Composto 138	7722	204,32	3,07E+07	31,37
placa 4	Composto 139	3574	94,56	1,30E+07	13,32
placa 4	Composto 140	3893	103,00	1,12E+07	11,46
placa 4	Composto 39	6114	161,77	3,45E+07	35,22
placa 4	Composto 141	4310	114,04	1,61E+07	16,48
placa 4	Composto 142	5091	134,71	3,74E+07	38,22
placa 4	Composto 35	6601	174,65	8,50E+07	86,77
placa 4	Composto 143	3582	94,79	2,17E+07	22,14
placa 4	Composto 144	6787	179,57	5,45E+07	55,69
placa 4	Composto 145	3752	99,29	2,23E+07	22,81
placa 4	Composto 146	2554	67,59	1,83E+07	18,71
placa 4	Composto 112	3289	87,03	1,48E+07	15,11
placa 4	Composto 113	3819	101,06	2,34E+07	23,93
placa 4	Composto 114	1259	33,32	1,34E+07	13,67
placa 4	Composto 22	5517	145,98	7,09E+07	72,39

placa 4	Composto 150	5104	135,04	3,34E+07	34,11
placa 5	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	7159	116,70	8,12E+06	2,51
placa 5	Ativina A / Wnt3a	10619	173,09	3,23E+08	100,00
placa 5	Composto 151	2785	45,39	-1,03E+06	-0,32
placa 5	Composto 152	4693	76,50	-3,08E+06	-0,95
placa 5	Composto 153	9718	158,40	-1,20E+06	-0,37
placa 5	Composto 154	3479	56,70	-1,97E+06	-0,61
placa 5	Composto 155	9343	152,28	-3,45E+06	-1,07
placa 5	Composto 156	3813	62,16	-2,58E+05	-0,08
placa 6	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	3264	68,37	2,52E+06	0,80
placa 6	Ativina A / Wnt3a	9902	207,40	3,14E+08	100,00
placa 6	Composto 157	2480	51,94	-1,22E+06	-0,39
placa 6	Composto 158	5271	110,41	-1,30E+06	-0,41
placa 6	Composto 159	6478	135,68	-1,84E+06	-0,59
placa 6	Composto 160	4212	88,21	1,30E+05	0,04
placa 6	Composto 161	2439	51,09	-9,20E+05	-0,29
placa 6	Composto 162	1260	26,39	-1,35E+06	-0,43
placa 7	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	9545	156,12	-4,87E+06	-0,99
placa 7	Ativina A / Wnt3a	20064	328,17	4,92E+08	100,00
placa 7	Composto 163	16557	270,81	-7,31E+06	-1,49
placa 7	Composto 164	16472	269,42	-7,37E+06	-1,50
placa 7	Composto 165	3015	49,32	-7,34E+06	-1,49
placa 7	Composto 166	13845	226,45	-7,98E+06	-1,62
placa 7	Composto 167	10325	168,87	-7,35E+06	-1,49
placa 7	Composto 168	14139	231,26	-6,49E+06	-1,32
placa 7	Composto 169	4468	73,08	-6,38E+06	-1,30
placa 8	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	6868	179,83	-2,31E+06	-0,52

placa 8	Ativina A / Wnt3a	18575	486,35	4,47E+08	100,00
placa 8	Composto 170	13140	344,04	-4,13E+06	-0,93
placa 8	Composto 171	10894	285,22	-2,61E+06	-0,58
placa 8	Composto 172	3416	89,44	-4,72E+06	-1,06
placa 8	Composto 173	8815	230,81	-4,25E+06	-0,95
placa 8	Composto 174	11760	307,91	-3,33E+06	-0,75
placa 8	Composto 175	5	0,13	-4,91E+06	-1,10
placa 8	Composto 176	10139	265,47	-4,73E+06	-1,06
placa 8	Composto 177	9994	261,68	-2,95E+06	-0,66
placa 8	Composto 178	8998	235,58	-3,74E+06	-0,84
placa 5	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	7159	67,42	8,12E+06	2,51
placa 5	Ativina A / Wnt3a	10619	100,00	3,23E+08	100,00
placa 5	Composto 21	4719	44,44	-1,96E+06	-0,61
placa 5	Composto 22	2036	19,18	-1,79E+06	-0,55
placa 5	Composto 23	2563	24,13	-1,56E+06	-0,48
placa 5	Composto 24	4470	42,09	-7,05E+05	-0,22
placa 5	Composto 24	6085	57,30	-3,08E+06	-0,95
placa 5	Composto 26	7276	68,52	-2,38E+06	-0,74
placa 5	Composto 27	4588	43,20	-5,63E+05	-0,17
placa 5	Composto 28	2682	25,26	-1,37E+06	-0,43
placa 5	Composto 29	5778	54,41	-1,94E+06	-0,60
placa 5	Composto 30	620	5,84	-5,05E+06	-1,56
placa 5	Composto 31	3419	32,19	-1,42E+06	-0,44
placa 6	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	3264	69,07	2,52E+06	0,80
placa 6	Ativina A / Wnt3a	9902	209,51	3,14E+08	100,00
placa 6	Composto 32	2142	45,32	-1,33E+06	-0,42
placa 6	Composto 33	5564	117,73	-8,63E+05	-0,27
placa 6	Composto 34	5927	125,41	-2,01E+06	-0,64
placa 6	Composto 35	10068	213,01	-2,15E+06	-0,68

placa 6	Composto 36	5170	109,39	-1,22E+06	-0,39
placa 6	Composto 37	3098	65,55	1,91E+06	0,61
placa 6	Composto 38	1537	32,52	4,48E+04	0,01
placa 6	Composto 39	3650	77,23	-2,01E+06	-0,64
placa 6	Composto 40	5817	123,07	4,91E+05	0,16
placa 6	Composto 64	4359	92,23	-1,07E+05	-0,03
placa 6	Composto 30	4035	85,38	2,09E+06	0,66
placa 6	Composto 65	3279	69,37	-5,63E+05	-0,18
placa 6	Composto 67	2698	57,08	-1,95E+06	-0,62
placa 7	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	9545	321,22	-4,87E+06	-0,99
placa 7	Ativina A / Wnt3a	20064	675,20	4,92E+08	100,00
placa 7	Composto 68	10894	366,62	-5,15E+06	-1,05
placa 7	Composto 69	9734	327,58	-3,97E+06	-0,81
placa 7	Composto 70	16736	563,21	-6,51E+06	-1,32
placa 7	Composto 71	17999	605,71	-7,38E+06	-1,50
placa 7	Composto 72	7309	245,96	-6,47E+06	-1,32
placa 7	Composto 73	8888	299,10	-3,03E+06	-0,62
placa 7	Composto 74	11496	386,85	-2,67E+06	-0,54
placa 7	COMPOSTO 75	9739	327,74	-7,75E+06	-1,57
placa 7	Composto 76	14439	485,89	-4,19E+06	-0,85
placa 7	Composto 77	12331	414,95	-6,03E+06	-1,22
placa 7	Composto 78	9702	326,49	-6,57E+06	-1,33
placa 7	Composto 79	8535	287,22	-6,92E+06	-1,41
placa 8	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	6868	295,49	-2,31E+06	-0,52
placa 8	Ativina A / Wnt3a	18575	799,17	4,47E+08	100,00
placa 8	Composto 80	13939	599,68	-4,23E+06	-0,95
placa 8	Composto 81	10466	450,29	-4,91E+06	-1,10
placa 8	Composto 82	10323	444,14	-4,90E+06	-1,10
placa 8	Composto 83	14619	628,95	1,48E+06	0,33

placa 8	Composto 84	14105	606,84	-4,44E+06	-0,99
placa 8	Composto 85	12172	523,66	-3,48E+06	-0,78
placa 8	Composto 86	7218	310,54	-4,22E+06	-0,94
placa 8	Composto 87	5383	231,58	-4,07E+06	-0,91
placa 8	Composto 88	10419	448,27	-4,27E+06	-0,96
placa 8	Composto 89	11780	506,83	-3,94E+06	-0,88
placa 8	Composto 90	7002	301,25	-1,54E+06	-0,35
placa 8	Composto 91	6224	267,78	-4,53E+06	-1,01

Tabela 2		
Composto n°	Número de célula	Intensidade de Sox17
	% de controles positivos	% de controles positivos
Composto 17	133,8	-0,7
Composto 95	195,0	40,7
Composto 138	185,7	31,4
Composto 87	170,7	50,4
Composto 144	163,2	55,7
Composto 35	158,7	86,8
Composto 30	153,1	43,1
Composto 105	151,0	51,0
Composto 39	147,0	35,2
Composto 104	142,5	50,0
Composto 29	136,0	34,5
Composto 22	132,7	72,4
Composto 37	129,3	29,1
Composto 134	126,9	35,0
Composto 150	122,7	34,1
Composto 142	122,4	38,2
Composto 136	117,4	32,7
Composto 80	115,2	38,6
Composto 34	114,8	44,5
Composto 102	113,5	21,3

Composto 89	110,7	21,4
Composto 105	105,8	30,7
Composto 78	105,5	31,0
Composto 141	103,6	16,5
Composto 110	102,5	25,7
Composto 133	102,0	32,9

TABELA 3						
Composto nº	tratamentos		Número de célula		Expressão de Sox17	
			Número total médio de células	% de controles positivos	Intensidade total média	% de controles positivos
Nenhum	nenhuma ativina A, com Wnt3a		23253	124,16	1,97E+07	10,59
Nenhum	Ativina A / Wnt3a		18728	100,00	1,86E+08	100,00
Composto 17	nenhuma AA (com Wnt3a)		21445	114,51	3,43E+07	18,48
Nenhum	nenhuma ativina A, com Wnt3a		23253	124,16	1,97E+07	10,59
Nenhum	Ativina A / Wnt3a		18728	100,00	1,86E+08	100,00
Composto 22	nenhuma AA (com Wnt3a)	EGF+FGF4	18336	97,91	3,72E+07	20,05
Composto 34	nenhuma AA (com Wnt3a)	EGF+FGF4	18891	100,87	3,26E+07	17,55
Composto 29	nenhuma AA (com Wnt3a)	EGF+FGF4	20221	107,97	2,83E+07	15,27
Composto 39	nenhuma AA (com Wnt3a)	EGF+FGF4	17095	91,28	2,82E+07	15,19
Composto 37	nenhuma AA (com Wnt3a)	EGF+FGF4	15605	83,32	2,67E+07	14,37
Composto 35	nenhuma AA (com Wnt3a)	EGF+FGF4	23823	127,20	2,54E+07	13,69

	nenhuma AA					
Composto 80	(com Wnt3a)	EGF+FGF4	19864	106,07	2,33E+07	12,54
	nenhuma AA(com					
Composto 141	Wnt3a)	EGF+FGF4	17719	94,61	2,24E+07	12,04
	nenhuma AA(com					
Composto 30	Wnt3a)	EGF+FGF4	18063	96,45	2,18E+07	11,73
	nenhuma AA(com					
Composto 150	Wnt3a)	EGF+FGF4	16833	89,88	2,16E+07	11,63
	nenhuma AA(com					
Composto 144	Wnt3a)	EGF+FGF4	17100	91,31	2,04E+07	11,01
	nenhuma AA(com					
Composto 104	Wnt3a)	EGF+FGF4	17863	95,38	1,89E+07	10,19
	nenhuma AA(com					
Composto 142	Wnt3a)	EGF+FGF4	18955	101,21	1,84E+07	9,90
	nenhuma AA(com					
Composto 110	Wnt3a)	EGF+FGF4	17534	93,62	1,76E+07	9,45
	nenhuma AA(com					
Composto 78	Wnt3a)	EGF+FGF4	17703	94,52	1,71E+07	9,23
	nenhuma AA(com					
Composto 133	Wnt3a)	EGF+FGF4	16521	88,22	1,67E+07	8,97
	nenhuma AA(com					
Composto 87	Wnt3a)	EGF+FGF4	16495	88,07	1,55E+07	8,33

	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	16900	90,24	1,43E+07	7,72
Composto 95						
	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	19167	102,34	7,91E+06	4,26
Composto 136						
	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	15217	81,25	7,45E+06	4,01
Composto 105						
	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	17208	91,88	7,40E+06	3,99
Composto 134						
	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	16695	89,14	6,65E+06	3,58
Composto 138						
	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	14652	78,24	3,89E+06	2,10
Composto 89						
	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	15903	84,92	3,53E+06	1,90
Composto 90						
	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	12943	69,11	2,85E+05	0,15
Composto 102						
Nenhum	nenhuma ativina A, com Wnt3a		23253	124,16	1,97E+07	10,59
Nenhum	Ativina A / Wnt3a		18728	100,00	1,86E+08	100,00
	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	18294	97,68	1,99E+07	10,70
Composto 35						

Tabela 3B		
	Número de célula	Intensidade de Sox17
Composto nº	% de controles positivos	% de controles positivos
Composto 22	97,91	20,05
Composto 34	100,87	17,55
Composto 29	107,97	15,27
Composto 39	91,28	15,19
Composto 37	83,32	14,37
Composto 35	127,20	13,69

TABELA 4						
Composto nº	tratamentos		Número de célula		Expressão de Sox17	
			Número total médio de células	% de controles positivos	Intensidad e total média	% de controles positivos
Nenhum	nenhuma ativina A (com Wnt3a)		7107	67,96	-1,27E+07	-7,94
Nenhum	Ativina A / Wnt3a		10459	100,00	1,60E+08	100,00
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF	6942	73,43	1,27E+06	0,74
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	5738	60,69	3,14E+06	1,83
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB	4453	47,10	9,30E+05	0,54
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-AB+Muscimol	10391	109,91	8,92E+06	5,20
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+PDGF-A+VEGF	5728	60,59	2,14E+06	1,24
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF4+PDGF-A+VEGF	13198	139,59	1,29E+07	7,54
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	10480	110,85	8,97E+06	5,23

	nenhuma AA(com	EGF+FGF4+PD				
Composto 17	Wnt3a)	GF-A+Muscimol	13649	144,37	1,45E+07	8,43
Nenhum	nenhuma ativina A (com Wnt3a)		3117	34,86	-1,41E+06	-0,72
Nenhum	Ativina A / Wnt3a		8942	100,00	1,95E+08	100,00
Composto 35	nenhuma AA(com	EGF	19334	216,23	6,62E+07	33,86
Composto 35	Wnt3a)	PDGF-AB	16662	186,34	4,95E+07	25,33
Composto 35	nenhuma AA(com	PDGF-A	16885	188,84	4,48E+07	22,94
Composto 35	Wnt3a)	VEGF	18263	204,25	3,51E+07	17,98
Composto 35	nenhuma AA(com	FGF4	4410	49,32	3,33E+07	17,04
Composto 35	Wnt3a)	Muscimol	18867	211,00	2,61E+07	13,35
Composto 35	nenhuma AA(com	PDGF-C	16642	186,12	1,85E+07	9,46
Composto 35	Wnt3a)	PDGF-D	17618	197,03	1,84E+07	9,41
Composto 35	nenhuma AA(com	PDGF-B	14168	158,46	1,52E+07	7,76
Composto 35	Wnt3a)	PD98059	18877	211,11	1,30E+07	6,64
Composto 35	nenhuma AA(com	BMP1	18849	210,81	1,29E+07	6,59
Composto 35	Wnt3a)	LY294002	18374	205,49	1,03E+07	5,28
Composto 35	nenhuma AA(com	BMP4	16748	187,31	8,97E+06	4,59
Composto 35	Wnt3a)					

Composto 35	nenhuma AA(com Wnt3a)	BMP2	16218	181,38	8,89E+06	4,55
Composto 35	nenhuma AA(com Wnt3a)	BMP7	20111	224,91	8,05E+06	4,12
Composto 35	nenhuma AA(com Wnt3a)	U0124	16539	184,97	7,54E+06	3,86
Composto 35	nenhuma AA(com Wnt3a)	BMP6	17838	199,50	7,32E+06	3,75
Composto 35	nenhuma AA(com Wnt3a)	BMP2/7	12042	134,67	7,08E+06	3,62
Composto 35	nenhuma AA(com Wnt3a)	bicuculina	19312	215,98	1,95E+06	1,00
Composto 35	nenhuma AA(com Wnt3a)	U0126	19961	223,24	-5,75E+05	-0,29
Composto 35	nenhuma AA(com Wnt3a)	butirato	14238	159,24	-1,85E+06	-0,94
Nenhum		nenhuma ativina A (com Wnt3a)	6049	45,2	-1,31E+07	-5,2
Nenhum		Ativina A/Wnt3a	13392	100,0	2,50E+08	100,0
Composto 20		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	9434	70,4	1,48E+08	59,1
Composto 17		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	7988	59,6	1,13E+08	45,0

Composto 16		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	8303	62,0	9,20E+07	36,7
Composto 13		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	7045	52,6	7,22E+07	28,8
Composto 19		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	7799	58,2	6,82E+07	27,2
Composto 92		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5886	44,0	5,63E+07	22,5
Composto 93		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5463	40,8	4,38E+07	17,5
Composto 94		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5100	38,1	4,18E+07	16,7

		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	4510	33,7	3,32E+07	13,3
Composto 95						
		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	4570	34,1	3,09E+07	12,3
Composto 96						
		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	4561	34,1	2,15E+07	8,6
Composto 97						
		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3176	23,7	9,86E+06	3,9
Composto 98						
		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	1209	9,0	-1,56E+07	-6,2
Composto 99						
Nenhum		nenhuma ativina A (com Wnt3a)	15494	98,0	-1,25E+07	-4,4
Nenhum		Ativina A/Wnt3a	15807	100,0	2,86E+08	100,0

		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	8742	55,3	1,01E+08	35,4
Composto 18						
		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	8464	53,5	8,33E+07	29,1
Composto 14						
		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	7234	45,8	7,95E+07	27,8
Composto 15						
		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	6805	43,0	5,88E+07	20,6
Composto 100						
		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5668	35,9	5,34E+07	18,7
Composto 101						
		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	6195	39,2	5,29E+07	18,5
Composto 102						

Composto 103	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	7545	47,7	5,13E+07	18,0
Composto 104	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	4757	30,1	4,58E+07	16,0
Composto 105	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	6285	39,8	4,29E+07	15,0
Composto 106	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	5622	35,6	2,86E+07	10,0
Composto 107	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3951	25,0	1,72E+07	6,0
Composto 108	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3226	20,4	1,58E+07	5,5

Composto 109		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3473	22,0	1,46E+07	5,1
Composto 110		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3703	23,4	1,32E+07	4,6
Composto 111		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2918	18,5	1,22E+07	4,3
Composto 112		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2975	18,8	1,04E+07	3,6
Composto 113		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2910	18,4	9,18E+06	3,2
Composto 114		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2734	17,3	6,13E+06	2,1

Composto 115		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2169	13,7	3,77E+06	1,3
Composto 116		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3107	19,7	3,52E+06	1,2
Composto 117		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3343	21,1	5,35E+05	0,2
Composto 118		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	3034	19,2	2,37E+05	0,1
Composto 119		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2263	14,3	-1,66E+06	-0,6
Composto 120		EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	1771	11,2	-5,57E+06	-2,0

Composto 121	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	1136	7,2	-1,79E+07	-6,3
Composto 122	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	2021	12,8	-2,09E+07	-7,3

TABELA 5						
Composto n°	tratamentos	Número de célula		Expressão de Sox17		
		Número total médio de células	% de controles positivos	Intensidade total média	% de controles positivos	
Nenhum	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	7107	67,96	-1,27E+07	-7,94	
Nenhum	Ativina A / Wnt3a	10459	100,00	1,60E+08	100,00	
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF	6942	73,43	1,27E+06	0,74
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4	5738	60,69	3,14E+06	1,83
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4+PDG F-AB	4453	47,10	9,30E+05	0,54
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4+PDG F-AB+Muscimol	10391	109,91	8,92E+06	5,20
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+PDGF- A+VEGF	5728	60,59	2,14E+06	1,24
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF4+PDGF- A+VEGF	13198	139,59	1,29E+07	7,54
Composto 17	nenhuma AA(com Wnt3a)	EGF+FGF4+PDG F-A+VEGF	10480	110,85	8,97E+06	5,23

Composto 17	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+Muscimol	13649	144,37	1,45E+07	8,43
Nenhum	nenhuma ativina A (com Wnt3a)			7107	67,96	-1,27E+07	-7,94
Nenhum	Ativina A / Wnt3a			10459	100,00	1,60E+08	100,00
Composto 35	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF	23887	228,40	-1,01E+07	-6,32
Composto 35	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4	21268	203,36	1,36E+06	0,85
Composto 35	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB	17611	168,39	1,28E+07	8,03
Composto 35	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB+Muscimol	17949	171,62	1,54E+06	0,96
Composto 35	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+PDGF- A+VEGF	23242	222,23	1,23E+07	7,72
Composto 35	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	FGF4+PDGF- A+VEGF	16068	153,63	3,92E+07	24,57
Composto 35	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+VEGF	16132	154,25	9,11E+07	57,04
Composto 35	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+Muscimol	15457	147,80	6,89E+07	43,15
Composto 29	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF	1971	18,84	-1,44E+07	-9,00
Composto 29	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4	7436	71,10	-4,35E+06	-2,72
Composto 29	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB	6535	62,48	-7,52E+06	-4,71
Composto 29	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB+Muscimol	1376	13,15	-1,42E+07	-8,91
Composto 29	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+PDGF- A+VEGF	8880	84,91	-8,53E+06	-5,34
Composto 29	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	FGF4+PDGF- A+VEGF	8146	77,89	-4,82E+06	-3,02

Composto 29	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+VEGF	8858	84,70	-7,15E+06	-4,48
Composto 29	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+Muscimol	10071	96,30	2,95E+06	1,85
Composto 37	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF	7966	76,17	-1,19E+07	-7,42
Composto 37	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4	6932	66,28	-4,62E+06	-2,89
Composto 37	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB	7473	71,46	-2,61E+06	-1,63
Composto 37	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB+Muscimol	7914	75,67	-1,91E+06	-1,20
Composto 37	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+PDGF- A+VEGF	12956	123,88	-1,25E+07	-7,82
Composto 37	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	FGF4+PDGF- A+VEGF	6731	64,36	-1,10E+07	-6,89
Composto 37	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+VEGF	8778	83,93	1,39E+05	0,09
Composto 37	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+Muscimol	5821	55,66	-1,22E+07	-7,64
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF	13062	124,89	2,78E+07	17,39
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4	13133	125,58	1,23E+08	76,85
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB	12532	119,83	1,09E+08	68,41
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB+Muscimol	15811	151,18	6,90E+06	4,32
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+PDGF- A+VEGF	11801	112,84	4,04E+06	2,53
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	FGF4+PDGF- A+VEGF	15262	145,93	1,15E+07	7,18

Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+VEGF	12901	123,36	5,01E+07	31,35
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+Muscimol	12208	116,72	5,56E+07	34,83
Nenhum	nenhuma ativina A (com Wnt3a)			10224	108,14	7,36E+05	0,43
Nenhum	Ativina A / Wnt3a			9455	100,00	1,72E+08	100,00
Composto 39	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF	11615	122,85	1,49E+05	0,09
Composto 39	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4	10456	110,59	5,11E+06	2,98
Composto 39	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB	9972	105,47	1,62E+06	0,94
Composto 39	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB+Muscimol	10540	111,48	2,22E+06	1,29
Composto 39	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+PDGF- A+VEGF	17050	180,34	4,84E+06	2,82
Composto 39	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	FGF4+PDGF- A+VEGF	8856	93,67	7,01E+05	0,41
Composto 39	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+VEGF	7973	84,33	5,30E+06	3,09
Composto 39	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-A+Muscimol	9103	96,28	7,32E+05	0,43
Composto 22	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF	14105	149,19	1,75E+06	1,02
Composto 22	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4	12971	137,19	1,04E+07	6,05
Composto 22	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB	16580	175,36	8,60E+06	5,01
Composto 22	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDG F-AB+Muscimol	14676	155,23	5,61E+06	3,27
Composto 22	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+PDGF- A+VEGF	20372	215,48	4,99E+06	2,91

Composto 22	nenhuma Wnt3a)	AA(com	FGF4+PDGF-A+VEGF	12277	129,85	4,90E+06	2,86
Composto 22	nenhuma Wnt3a)	AA(com	EGF+FGF4+PDGF-A+VEGF	12522	132,44	7,88E+06	4,59
Composto 22	nenhuma Wnt3a)	AA(com	EGF+FGF4+PDGF-A+Muscimol	11610	122,80	1,33E+07	7,77

TABELA 6							
Composto nº	tratamentos	Número de célula		Expressão de Sox17			
		Número total médio de células	% de controles positivos	Intensidade total média	% de controles positivos		
Nenhum	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	477	6,64	7,4E+04	0,09		
Nenhum	Ativina A / Wnt3a	7185	100,00	8,0E+07	100,00		
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com	Nenhum	4611	64,18	1,4E+07	17,21
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com	EGF	6145	85,53	1,5E+07	19,18
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com	FGF4	5323	74,09	2,7E+07	33,75
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com	PDGF-D	5017	69,84	1,5E+07	18,76
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com	PDGF-A	4175	58,11	1,1E+07	13,43
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com	VEGF	4713	65,60	1,0E+07	12,49
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com	GDF8	6354	88,44	7,1E+07	88,59
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com	Muscimol	7286	101,41	3,1E+07	38,38

Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	PDGF-D+VEGF	5030	70,01	1,2E+07	14,58
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	VEGF+Muscimol	776	10,81	1,3E+06	1,56
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	PDGF-D+Muscimol	3490	48,57	6,5E+06	8,02
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	GDF8+PDGF-D	6889	95,88	5,8E+07	72,59
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	PDGF- D+Muscimol+VEGF	2133	29,68	2,7E+06	3,32
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	GDF8+PDGF- D+VEGF	5585	77,74	6,6E+07	81,75
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	GDF8+VEGF+Musci mol	6083	84,67	5,6E+07	69,62
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	GDF8+PDGF- D+VEGF+Muscimol	9455	131,60	9,6E+07	119,24
Composto 34	nenhuma nenhum Wnt3a)	A-A,	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF+PDGF- D+Muscimol+GDF8	4757	66,21	3,9E+07	48,77
Composto 34	nenhuma Wnt3a)	AA(com)	EGF+FGF4+PDGF- A+VEGF+PDGF- D+Muscimol+GDF8	6028	83,90	7,0E+07	87,44

TABELA 7						
Placa	Tratamento	Composto n°	Número de célula		Expressão de Sox17	
			Número total médio de células	% de controles positivos	Intensidade total média	% de controles positivos
1	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	Nenhum	6049	45,2	-1,31E+07	-5,2
1	Ativina A/Wnt3a	Nenhum	13392	100,0	2,50E+08	100,0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 18	13037	97,3	1,63E+08	65,2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	COMPOSTO 14	9344	69,8	1,23E+08	49,0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 15	8448	63,1	8,64E+07	34,5
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 16	5498	41,1	6,56E+07	26,2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 64	5063	37,8	5,88E+07	23,5
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 65	4788	35,8	4,57E+07	18,2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 66	8129	60,7	3,53E+07	14,1
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 67	6791	50,7	3,18E+07	12,7
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 68	3456	25,8	2,30E+07	9,2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 69	3995	29,8	1,69E+07	6,8
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 70	474	3,5	-1,80E+07	-7,2
2	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	Nenhum	15494	98,0	-1,25E+07	-4,4

2	Ativina A/Wnt3a	Nenhum	15807	100,0	2,86E+08	100,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 19	8425	53,3	1,19E+08	41,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 13	9123	57,7	1,13E+08	39,7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 71	6048	38,3	5,51E+07	19,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 72	6060	38,3	5,46E+07	19,1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 73	5545	35,1	3,99E+07	14,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 74	10898	68,9	3,91E+07	13,7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 75	4117	26,0	3,01E+07	10,5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 76	3825	24,2	2,74E+07	9,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 77	5928	37,5	2,44E+07	8,5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 78	3303	20,9	2,03E+07	7,1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 79	4767	30,2	1,85E+07	6,5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 80	2194	13,9	1,22E+07	4,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 81	2920	18,5	9,16E+05	0,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 82	1819	11,5	-1,05E+07	-3,7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 83	2153	13,6	-1,19E+07	-4,2

2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 84	58	0,4	-2,94E+07	-10,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 85	57	0,4	-3,03E+07	-10,6
1	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	Nenhum	6049	45,2	-1,31E+07	-5,2
1	Ativina AWnt3a	Nenhum	13392	100,0	2,50E+08	100,0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 20	9434	70,4	1,48E+08	59,1
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 17	7988	59,6	1,13E+08	45,0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 16	8303	62,0	9,20E+07	36,7
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 13	7045	52,6	7,22E+07	28,8
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 19	7799	58,2	6,82E+07	27,2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 92	5886	44,0	5,63E+07	22,5
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 93	5463	40,8	4,38E+07	17,5
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 94	5100	38,1	4,18E+07	16,7
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 95	4510	33,7	3,32E+07	13,3
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 96	4570	34,1	3,09E+07	12,3
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 97	4561	34,1	2,15E+07	8,6
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 98	3176	23,7	9,86E+06	3,9

1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 99	1209	9,0	-1,56E+07	-6,2
2	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	Nenhum	15494	98,0	-1,25E+07	-4,4
2	Ativina A/Wnt3a	Nenhum	15807	100,0	2,86E+08	100,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 18	8742	55,3	1,01E+08	35,4
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 14	8464	53,5	8,33E+07	29,1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 15	7234	45,8	7,95E+07	27,8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 100	6805	43,0	5,88E+07	20,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 101	5668	35,9	5,34E+07	18,7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 102	6195	39,2	5,29E+07	18,5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 103	7545	47,7	5,13E+07	18,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 104	4757	30,1	4,58E+07	16,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 105	6285	39,8	4,29E+07	15,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 106	5622	35,6	2,86E+07	10,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 107	3951	25,0	1,72E+07	6,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 108	3226	20,4	1,58E+07	5,5
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 109	3473	22,0	1,46E+07	5,1

2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 110	3703	23,4	1,32E+07	4,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 111	2918	18,5	1,22E+07	4,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 112	2975	18,8	1,04E+07	3,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 113	2910	18,4	9,18E+06	3,2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 114	2734	17,3	6,13E+06	2,1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 115	2169	13,7	3,77E+06	1,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 116	3107	19,7	3,52E+06	1,2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 117	3343	21,1	5,35E+05	0,2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 118	3034	19,2	2,37E+05	0,1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 119	2263	14,3	-1,66E+06	-0,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 120	1771	11,2	-5,57E+06	-2,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 121	1136	7,2	-1,79E+07	-6,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 122	2021	12,8	-2,09E+07	-7,3
1	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	Nenhum	6049	45,2	-1,31E+07	-5,2
1	Ativina A/Wnt3a	Nenhum	13392	100,0	2,50E+08	100,0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 19	15878	118,6	2,67E+08	106,5

1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 24	12714	94,9	2,46E+08	98,2
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 23	12165	90,8	2,15E+08	86,0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 21	12640	94,4	1,65E+08	65,9
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 13	11491	85,8	1,61E+08	64,3
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 30	11396	85,1	1,34E+08	53,4
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 36	7964	59,5	9,47E+07	37,8
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 32	8066	60,2	9,29E+07	37,1
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 26	7415	55,4	8,30E+07	33,1
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 17	6994	52,2	7,76E+07	31,0
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 31	6957	51,9	6,59E+07	26,3
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 179	3573	26,7	2,43E+07	9,7
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 180	922	6,9	-2,20E+07	-8,8
1	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 181	8	0,1	-2,68E+07	-10,7
2	nenhuma ativina A (com Wnt3a)	Nenhum	15494	98,0	-1,25E+07	-4,4
2	Ativina A/Wnt3a	Nenhum	15807	100,0	2,86E+08	100,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 18	21102	133,5	4,18E+08	146,3

2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 15	15373	97,3	3,74E+08	130,8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 14	9008	57,0	2,62E+08	91,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 38	9650	61,0	2,46E+08	86,2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 35	10461	66,2	1,59E+08	55,7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 16	9064	57,3	1,48E+08	51,8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 34	8907	56,3	9,99E+07	35,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 20	7346	46,5	8,90E+07	31,2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 27	8044	50,9	8,81E+07	30,8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 28	7591	48,0	8,77E+07	30,7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 40	4049	25,6	8,23E+07	28,8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 33	7485	47,4	8,10E+07	28,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 25	6571	41,6	7,60E+07	26,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 182	7631	48,3	6,74E+07	23,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 183	6777	42,9	5,93E+07	20,8
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 184	5475	34,6	5,44E+07	19,0
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 185	4093	25,9	4,92E+07	17,2

2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 186	5274	33,4	4,63E+07	16,2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 187	5342	33,8	4,02E+07	14,1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 188	5533	35,0	3,98E+07	13,9
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 189	5928	37,5	3,96E+07	13,9
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 190	4822	30,5	3,90E+07	13,7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 191	4249	26,9	3,81E+07	13,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 192	5616	35,5	3,54E+07	12,4
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 193	4158	26,3	3,23E+07	11,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 194	3470	22,0	2,96E+07	10,4
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 195	3800	24,0	2,95E+07	10,3
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 196	4619	29,2	2,78E+07	9,7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 197	4011	25,4	2,45E+07	8,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 198	4367	27,6	1,92E+07	6,7
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 199	3162	20,0	1,20E+07	4,2
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 200	2087	13,2	4,43E+06	1,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 201	1568	9,9	-6,17E+06	-2,2

2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 202	5213	33,0	-1,41E+07	-4,9
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 203	7	0,0	-3,04E+07	-10,6
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 204	11	0,1	-3,18E+07	-11,1
2	EGF, FGF, PDGF-A, VEGF, PDGF-D, muscimol, GDF8	Composto 205	10	0,1	-3,20E+07	-11,2

Tabela 8				
Composto nº	Número de célula		Expressão de Sox17	
	Número total médio de células	% de controles positivos	INTENSIDADE TOTAL MÉDIA	% de controles positivos
Composto 18	21102	133,5	4,18E+08	146,3
Composto 15	15373	97,3	3,74E+08	130,8
Composto 19	15878	118,6	2,67E+08	106,5
Composto 24	12714	94,9	2,46E+08	98,2
Composto 14	9008	57,0	2,62E+08	91,6
Composto 38	9650	61,0	2,46E+08	86,2
Composto 23	12165	90,8	2,15E+08	86,0
Composto 21	12640	94,4	1,65E+08	65,9
Composto 13	11491	85,8	1,61E+08	64,3
Composto 35	10461	66,2	1,59E+08	55,7
Composto 30	11396	85,1	1,34E+08	53,4
Composto 16	9064	57,3	1,48E+08	51,8
Composto 36	7964	59,5	9,47E+07	37,8
Composto 32	8066	60,2	9,29E+07	37,1
Composto 34	8907	56,3	9,99E+07	35,0
Composto 26	7415	55,4	8,30E+07	33,1
Composto 20	7346	46,5	8,90E+07	31,2
Composto 17	6994	52,2	7,76E+07	31,0
Composto 27	8044	50,9	8,81E+07	30,8

Composto 28	7591	48,0	8,77E+07	30,7
Composto 40	4049	25,6	8,23E+07	28,8
Composto 33	7485	47,4	8,10E+07	28,3
Composto 25	6571	41,6	7,60E+07	26,6
Composto 31	6957	51,9	6,59E+07	26,3
Composto 20	9434	70,4	1,48E+08	59,1
Composto 17	7988	59,6	1,13E+08	45,0
Composto 16	8303	62,0	9,20E+07	36,7
Composto 18	8742	55,3	1,01E+08	35,4
Composto 14	8464	53,5	8,33E+07	29,1
Composto 13	7045	52,6	7,22E+07	28,8
Composto 15	7234	45,8	7,95E+07	27,8
Composto 19	7799	58,2	6,82E+07	27,2

TABELA 9							
tratamentos				Número de célula		Expressão de Sox17	
Placa nº	Ativina A	Composto nº	Fatores de crescimento	Número de total médio de células	% de controles positivos	INTENSIDADE TOTAL MÉDIA	% de controles positivos
1	Nenhum	Nenhum	Nenhum	9164	149,46	-5,91E+06	-5,17
1	10 ng/mL de A-A	Nenhum	Nenhum	6132	100,00	1,52E+06	1,33
1	100 ng/mL de A-A	Nenhum	Nenhum	9658	157,51	1,14E+08	100,00
1	10 ng/mL de A-A	Composto 22	EGF+FGF4+PDGF -A+VEGF+PDGF- D+Muscimol+GDF 8+Wnt3a	8556	139,53	8,78E+07	76,82
1	10 ng/mL de A-A	Composto 22	EGF+FGF4+PDGF -AB+VEGF+Wnt3a	7657	124,87	4,70E+07	41,09
1	10 ng/mL de A-A	Composto 22	EGF+FGF4+PDGF -	8100	132,10	4,42E+07	38,65

			A+Muscimol+Wnt 3a				
1	10 ng/mL de A-A	Composto 22	EGF+FGF4+PDGF -AB+Wnt3a	7975	130,06	3,43E+07	30,03
1	10 ng/mL de A-A	Composto 22	EGF+FGF4+Wnt3a	9800	159,83	4,59E+07	40,13
1	10 ng/mL de A-A	Composto 22	FGF4+Wnt3a	6490	105,84	4,28E+07	37,43
1	10 ng/mL de A-A	Composto 22	EGF+Wnt3a	5001	81,55	2,80E+07	24,45
1	10 ng/mL de A-A	Composto 22	wnt3a	4543	74,09	3,05E+07	26,65
1	10 ng/mL de A-A	Composto 35	EGF+FGF4+PDGF -A+VEGF+PDGF- D+Muscimol+GDF 8+Wnt3a	2522	41,14	-4,86E+06	-4,25
1	10 ng/mL de A-A	Composto 35	EGF+FGF4+PDGF -AB+VEGF+Wnt3a	3479	56,74	-3,96E+06	-3,46
1	10 ng/mL de A-A	Composto 35	EGF+FGF4+PDGF - A+Muscimol+Wnt 3a	3820	62,29	-1,67E+06	-1,46
1	10 ng/mL de A-A	Composto 35	EGF+FGF4+PDGF -AB+Wnt3a	3263	53,21	-4,56E+06	-3,99
1	10 ng/mL de A-A	Composto 35	EGF+FGF4+Wnt3a	2704	44,10	-4,17E+06	-3,65
1	10 ng/mL de A-A	Composto 35	FGF4+Wnt3a	284	4,64	-7,54E+06	-6,59
1	10 ng/mL de A-A	Composto 35	EGF+Wnt3a	155	2,53	-7,82E+06	-6,84
1	10 ng/mL de A-A	Composto 35	wnt3a	173	2,83	-7,61E+06	-6,66

1	10 ng/mL de A-A	Composto 29	EGF+FGF4+PDGF -A+VEGF+PDGF- D+Muscimol+GDF 8+Wnt3a	2737	44,63	2,41E+07	21,10
1	10 ng/mL de A-A	Composto 29	EGF+FGF4+PDGF -AB+VEGF+Wnt3a	2283	37,23	5,59E+06	4,88
1	10 ng/mL de A-A	Composto 29	EGF+FGF4+PDGF - A+Muscimol+Wnt 3a	4676	76,26	2,41E+07	21,11
1	10 ng/mL de A-A	Composto 29	EGF+FGF4+PDGF -AB+Wnt3a	3964	64,65	2,27E+07	19,89
1	10 ng/mL de A-A	Composto 29	EGF+FGF4+Wnt3a	1736	28,31	1,98E+06	1,73
1	10 ng/mL de A-A	Composto 29	FGF4+Wnt3a	2139	34,89	6,98E+06	6,10
1	10 ng/mL de A-A	Composto 29	EGF+Wnt3a	365	5,96	-4,86E+06	-4,25
1	10 ng/mL de A-A	Composto 29	wnt3a	2090	34,09	4,89E+06	4,28
2	Nenhum	Nenhum	Nenhum	9325	121,89	-3,35E+06	-3,01
2	10 ng/mL de A-A	Nenhum	Nenhum	5177	67,67	3,89E+06	3,49
2	100 ng/mL de A-A	Nenhum	Nenhum	7650	100,00	1,11E+08	100,00
2	10 ng/mL de A-A	Composto 34	EGF+FGF4+PDGF -A+VEGF+PDGF- D+Muscimol+GDF 8+Wnt3a	18362	240,02	3,45E+08	309,74
2	10 ng/mL de A-A	Composto 34	EGF+FGF4+PDGF -AB+VEGF+Wnt3a	15574	203,58	2,59E+08	232,70

			EGF+FGF4+PDGF				
2	10 ng/mL de A-A	Composto 34	A+Muscimol+Wnt 3a	17890	233,85	2,88E+08	258,30
2	10 ng/mL de A-A	Composto 34	EGF+FGF4+PDGF -AB+Wnt3a	17875	233,65	2,68E+08	241,07
2	10 ng/mL de A-A	Composto 34	EGF+FGF4+Wnt3a	14158	185,07	2,40E+08	215,35
2	10 ng/mL de A-A	Composto 34	FGF4+Wnt3a	13323	174,15	2,19E+08	196,86
2	10 ng/mL de A-A	Composto 34	EGF+Wnt3a	14527	189,89	2,28E+08	204,84
2	10 ng/mL de A-A	Composto 34	wnt3a	3589	46,91	7,02E+07	63,08
2	10 ng/mL de A-A	Composto 39	EGF+FGF4+PDGF -A+VEGF+PDGF- D+Muscimol+GDF 8+Wnt3a	5738	75,00	2,14E+07	19,24
2	10 ng/mL de A-A	Composto 39	EGF+FGF4+PDGF -AB+VEGF+Wnt3a	2531	33,08	2,82E+06	2,53
2	10 ng/mL de A-A	Composto 39	EGF+FGF4+PDGF - A+Muscimol+Wnt 3a	2879	37,64	3,61E+06	3,24
2	10 ng/mL de A-A	Composto 39	EGF+FGF4+PDGF -AB+Wnt3a	2989	39,07	-1,78E+04	-0,02
2	10 ng/mL de A-A	Composto 39	EGF+FGF4+Wnt3a	734	9,59	-3,93E+06	-3,53
2	10 ng/mL de A-A	Composto 39	FGF4+Wnt3a	521	6,81	-4,46E+06	-4,01
2	10 ng/mL de A-A	Composto 39	EGF+Wnt3a	211	2,75	-4,54E+06	-4,08

2	10 ng/mL de A-A	Composto 39	wnt3a	518	6,78	-2,37E+06	-2,13
2	10 ng/mL de A-A	Composto 37	EGF+FGF4+PDGF -A+VEGF+PDGF- D+Muscimol+GDF 8+Wnt3a	5711	74,65	1,21E+07	10,82
2	10 ng/mL de A-A	Composto 37	EGF+FGF4+PDGF -AB+VEGF+Wnt3a	4767	62,31	-5,16E+05	-0,46
2	10 ng/mL de A-A	Composto 37	EGF+FGF4+PDGF - A+Muscimol+Wnt 3a	4540	59,34	9,23E+05	0,83
2	10 ng/mL de A-A	Composto 37	EGF+FGF4+PDGF -AB+Wnt3a	4223	55,20	-6,15E+05	-0,55
2	10 ng/mL de A-A	Composto 37	EGF+FGF4+Wnt3a	3501	45,77	5,60E+05	0,50
2	10 ng/mL de A-A	Composto 37	FGF4+Wnt3a	3930	51,37	-1,88E+06	-1,69
2	10 ng/mL de A-A	Composto 37	EGF+Wnt3a	1431	18,70	-2,75E+06	-2,47
2	10 ng/mL de A-A	Composto 37	wnt3a	791	10,34	-2,99E+06	-2,68

TABELA 10							
Composto n°	tratamentos	Número de célula		Expressão de Sox17			
		Número total de células	% de controles positivos	Intensidade total média	% de controles positivos		
Nenhum	Nenhuma ativina A (com Wnt3a)	4273	33,70	4,75E+07	17,49		
Nenhum	Ativina A (com Wnt3a)	12676	100,00	2,72E+08	100,00		

Composto	Nenhuma						
34	AA(sem Wnt3a)	FGF (50 ng/mL)	EGF (50 ng/mL)	13317	105,06	2,01E+08	74,08
Composto	Nenhuma						
34	AA(sem Wnt3a)	FGF (50 ng/mL)	EGF (100 ng/mL)	14189	111,93	2,01E+08	73,90
Composto	Nenhuma						
34	AA(sem Wnt3a)	FGF (100 ng/mL)	EGF (50 ng/mL)	12616	99,52	1,80E+08	66,21
Composto	Nenhuma						
34	AA(sem Wnt3a)	FGF (100 ng/mL)	EGF (100 ng/mL)	8269	65,23	1,13E+08	41,73
Composto	nenhuma						
34	AA(com Wnt3a)	Nenhum	Nenhum	11711	92,38	1,65E+08	60,68
Composto	nenhuma						
34	AA(com Wnt3a)	Nenhum	EGF (25 ng/mL)	16052	126,63	2,14E+08	78,82
Composto	nenhuma						
34	AA(com Wnt3a)	Nenhum	EGF (50 ng/mL)	13593	107,23	1,94E+08	71,52
Composto	nenhuma						
34	AA(com Wnt3a)	Nenhum	EGF (100 ng/mL)	13170	103,90	1,93E+08	71,04
Composto	nenhuma						
34	AA(com Wnt3a)	FGF (25 ng/mL)	Nenhum	18433	145,41	2,49E+08	91,72
Composto	nenhuma						
34	AA(com Wnt3a)	FGF (25 ng/mL)	EGF (25 ng/mL)	18841	148,63	2,60E+08	95,72

Composto 34	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (25 ng/mL)	EGF (50 ng/mL)	16232	128,05	2,30E+08	84,79
Composto 34	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (25 ng/mL)	EGF (100 ng/mL)	9309	73,44	1,39E+08	51,00
Composto 34	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (50 ng/mL)	Nenhum	12757	100,64	1,66E+08	61,10
Composto 34	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (50 ng/mL)	EGF (25 ng/mL)	17720	139,79	2,31E+08	85,01
Composto 34	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (50 ng/mL)	EGF (50 ng/mL)	16331	128,83	2,26E+08	83,11
Composto 34	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (50 ng/mL)	EGF (100 ng/mL)	16336	128,87	2,32E+08	85,24
Composto 34	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (100 ng/mL)	Nenhum	19853	156,61	2,59E+08	95,45
Composto 34	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (100 ng/mL)	EGF (25 ng/mL)	19880	156,83	2,59E+08	95,47
Composto 34	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (100 ng/mL)	EGF (50 ng/mL)	18166	143,30	2,35E+08	86,30
Composto 34	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (100 ng/mL)	EGF (100 ng/mL)	11241	88,68	1,55E+08	57,10

Nenhum	nenhuma AA(com Wnt3a)	Nenhum	EGF (50 ng/mL)	5558	43,85	5,01E+07	18,44
Nenhum	nenhuma AA(com Wnt3a)	Nenhum	EGF (100 ng/mL)	6818	53,79	6,42E+07	23,62
Nenhum	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (50 ng/mL)	Nenhum	8494	67,01	6,62E+07	24,35
Nenhum	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (50 ng/mL)	EGF (50 ng/mL)	10138	79,98	7,30E+07	26,87
Nenhum	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (50 ng/mL)	EGF (100 ng/mL)	10219	80,62	7,75E+07	28,51
Nenhum	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (100 ng/mL)	Nenhum	9944	78,45	6,68E+07	24,59
Nenhum	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (100 ng/mL)	EGF (50 ng/mL)	11046	87,14	8,17E+07	30,07
Nenhum	nenhuma AA(com Wnt3a)	FGF (100 ng/mL)	EGF (100 ng/mL)	7695	60,71	6,87E+07	25,28

Tabela 11				
	Intensidade de SOX17 normalizada			
	Ativina A		GDF8	
ng/mL	Média	SD	Média	SD
1600	100,00	9,20	100,00	9,00
800	100,00	6,60	84,90	6,30

400	100,00	3,30	72,20	7,50
200	100,00	1,90	51,30	5,30
100	90,70	8,70	32,70	5,10
50	85,20	4,70	17,60	4,80
25	73,10	2,80	5,10	3,60
12,50	50,90	6,20	0,90	0,80
6,25	18,40	4,80	0,70	1,40
3,13	3,00	1,90	0,10	0,20
1,56	0,10	0,00	0,00	0,20
0,00	0,00	0,20	0,30	0,30

Tabela 12	
nome do marcador	n° de catálogo *
AFP	Hs00173490_m1
CD99	Hs00365982_m1
CD9	Hs00233521_m1
CDH1	Hs00170423_m1
CDH2	Hs00169953_m1
CDX2	Hs00230919_m1
CER1	Hs00193796_m1
CXCR4	Hs00237052_m1
FGF17	Hs00182599_m1
FGF4	Hs00173564_m1
FOXA2	Hs00232764_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
GATA4	Hs00171403_m1
GATA6	Hs00232018_m1
GSC	Hs00418279_m1
HLXB9	Hs00232128_m1
KIT	Hs00174029_m1
MIXL1	Hs00430824_g1

NANOG	Hs02387400_g1
OTX2	Hs00222238_m1
POU5F1	Hs00742896_s1
SOX17	Hs00751752_s1
SOX7	Hs00846731_s1
T	Hs00610080_m1
ALB	Hs00609411_m1
AMY2A	Hs00420710_g1
ARX	Hs00292465_m1
CDX2	Hs00230919_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
GCG	Hs00174967_m1
HNF4A	Hs00230853_m1
INS	Hs00355773_m1
ISL1	Hs00158126_m1
MAFA	Hs01651425_s1
MAFB	Hs00534343_s1
NEUROD1	Hs00159598_m1
NEUROG3	Hs00360700_g1
NKX2-2	Hs00159616_m1
NKX2-5	Hs00231763_m1
NKX6-1	Hs00232355_m1
PAX4	Hs00173014_m1
PAX6	Hs00240871_m1
PDX1	Hs00236830_m1
PECAM1	Hs00169777_m1
POU3F4	Hs00264887_s1
PTF1A	Hs00603586_g1
SST	Hs00356144_m1
ZIC1	Hs00602749_m1

Tabela 13																									
Etapa de diferenciação 1 Valores de CT																									
Tratamento	GAPDH	AFP	CD9	CD99	CDH1	CDH2	CDX2	CER1	CXCR4	FGF1	FGF4	FOXA2	GATA4	GATA6	GSC	KIT	MIXL1	MXN	NANOG	DTX2	POU5F1	SOX1	SOX7	T	
AAAMA	19,5	34,7	23,8	24,1	24,5	21,5	36,8	18,4	22,7	20	33,5	24,7	23,7	22,1	22,3	25	23,4	28	23,8	22,6	31,4	23,5	32,2	32,3	
GDF8/Wnt3a	18,7	36,1	23	23,5	23,3	21	36,2	17,8	21,9	19,9	33,1	23,8	23,7	21,9	22,1	23,9	23,1	28,6	23	21,9	29,6	23,4	31,9	32,2	
GDF8/ Composto 34	18,5	33	23	23,1	23,6	20,9	35,3	17,9	21,3	19,7	32,6	24	23,2	21,7	21,9	24	23	27,5	23,2	21,5	30,1	23,2	31,7	32,1	
GDF8/ Composto 56	17	31,2	20,8	20,9	21,2	18,4	35,3	15,5	19,4	17,2	29,7	21,1	20,8	19,6	20	21,5	21,5	25	21,1	19,3	27,9	21,8	31,1	30,3	
Etapa de diferenciação 3 Valores de CT																									
Tratamento Us	GAPDH	ALB	AMY2	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAF	NEDROD1	NEDROG	NKX2	NKX2	NKX6	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SSST		
AAWnt3a	18,7	23,1	30,2	30,8	22,4	34,1	21,1	34,9	27,9	35,1	26,8	30,6	28	29,3	33,1	38,5	30,6	36	25,6	28,3	29,5	38,4	30,3	32,7	
GDF8/Wnt3a	18,4	23,1	29,7	30,9	22,5	34,5	21,1	34,7	27,4	34,6	26,9	30,5	28	30	36,4	36	31,1	33,5	25,4	30,4	30,1	38,5	27,9	32,4	
GDF8/ Composto 34	18,4	23,3	29,7	34,7	22,5	36,6	21,1	38,1	27,5	34,2	26,8	33,3	31	32,2	33,8	37,8	33,2	36,5	26,3	28,1	31,1	36,4	27,6	33,2	
GDF8/ Composto 56	18,2	23,5	29,7	31,6	22,5	36,3	21,2	35,7	27,3	34,4	27	30,6	27,9	30	33,8	38,2	30,8	32,7	25	28,9	30,4	34,8	27,5	32,7	

Etapa de diferenciação 4	Valores de CT																							
Tratamento\CTs	GAPDH	ALB	AMY2	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAF	NEDROD1	NEDROG	NKX2- NKX2- 2	NKX2- NKX2- 5	NKX6- PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SSST	bc1	
AAWnt3a	18,3	18,3	27,1	23,8	21,7	19,5	20,6	20,5	23,3	31	23,8	23	27,9	24,6	31,5	27,5	26,4	24,1	26,9	27,6	40	25,2	31,4	
GDF8/Wnt3a	18,9	19,3	27,7	24,1	22,2	19,9	21,2	20,7	23,7	31,2	24,2	23,5	27,8	25	35,4	27,7	26,3	24,5	29,5	29,3	38,2	24,9	31,4	
GDF8/ Composto 34	18,9	18,9	27,1	25	22,3	21,5	21	22,2	24,4	31,3	24,6	24,6	29,7	25,8	31,6	27,9	26,4	23,9	27,5	28,1	37,1	24,7	29,5	
GDF8/ Composto 56	18,3	18,8	27,1	22,3	22,6	17,6	21,3	18,6	22,4	29,9	22,9	22,7	25,5	23,2	32	27,9	25,5	23,8	23,2	27,8	27,5	30,9	22,8	32,1

Etapa de diferenciação 5	Valores de CT																						
Tratamento Us	GAPDH	ALB	AMY2	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAF	NEDROD1	NEDROG	NKX2- NKX2- 2	NKX2- NKX2- 5	NKX6- PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SSST	bc1
AAWnt3a	18,3	18,5	27,8	24	22,3	18,2	21,4	16,5	23,4	31,3	23,7	24,1	32,5	25,4	29,7	28	25,1	24,2	26,9	29	37,5	22,5	29,9
GDF8/Wnt3a	19,3	19,7	28,5	24,2	23,1	18,2	22	16,7	23,4	31,1	23,4	24,6	32,3	25,6	29,9	28,1	25,4	24,6	29,9	29,9	33,4	22,1	32,1
GDF8/ Composto 34	19,9	20,6	29	24,1	23,7	17,8	22,4	16,3	23,7	31,3	24	24,4	32,4	25,8	31,3	28,4	25,6	24,6	29,7	30,7	34,5	21,6	35
GDF8/ Composto 56	20	21,1	29	25,1	24,8	18,3	23,2	17,1	24,6	32,1	24,9	24,8	33,8	26,3	34	29,7	27,3	25,9	29,7	31,5	34,7	22,1	33,3

Etapa de diferenciação 6	Valores de Ct																							
Tratamento\ Cts	GAPDH	ALB	AMY2	ARX	CDX2	SCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAF	NEDROD1	NEDROG	NKX2-	NKX2-	NKX6-	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1ASST	Sox1	
AAWnt3a	20,4	24,3	30,7	27,6	25,7	19,4	24,7	20,5	26,4	34,6	27,2	27,1	40	29,6	30,7	33,4	30,9	28,6	29,2	31,3	32,8	38,4	22,2	34,8
GDF8/Wnt3a	20,7	23,5	30,4	26,8	25,2	18,4	24,3	19,3	26,2	35,2	26,3	26,5	35	29	32,3	30,5	30,7	27,8	28,5	32,3	31,5	33,9	22,4	27,4
GDF8/ Composto	34	21,3	24,6	31,3	27,1	26	18,4	24,7	20,1	34,8	26,4	27	34,5	29,2	31,6	33,1	30,4	28,1	29	32,9	33,9	37,7	22,1	34,5
GDF8/ Composto	56	21,2	25	30,9	26	25,9	17,4	24,4	19,6	34,7	25,9	26,1	34,3	28,1	33,8	30,7	29,3	27,2	27,9	33,6	33,2	35,2	21	34,9

Tabela 14

Etapa de diferenciação

1 Valor de Ct

Tratamento	GAPD	AFP	CD9	CD99	CDH1	CDH	CDX2	CER	CXCR4	FGF1	FGF4	FOXA2	GATA4	GATA6	GSC	HLXB9	KIT	MIXL1	NANOG	OTX2	POU5F	SOX1	SOX7	T
AAWnt3a	20	35,6	24,1	24,2	26	20,9	40	17,5	22,7	19,8	35,8	24,7	23,8	22,1	21,6	23,4	23,2	28,1	24,5	22	32,6	23,2	33	36,8
GDF8/Wnt3a	20,1	34	23,8	24,5	24,6	21,6	40	19,5	23,3	21	34,8	25,1	24,5	23,3	23,3	17,6	25,5	28,3	24,9	23	31	23,7	33,3	34,2
GDF8/GSK3 inh BIO	19	34,4	23,7	24,1	24,3	21,3	36	18,7	23	20,1	33,5	24,2	24,2	22,4	21,8	23,4	24,2	28,4	23,7	21,8	30,8	23	33,7	33,1
GDF8/ Composto	19	34,8	23,8	24	24,6	20,7	37,7	18,8	22,3	20	34,4	24,2	23,6	22,5	21,9	23,1	24,3	28	24,3	21,8	31,3	22,3	33	32,9
GDF8/ Composto	202	19,8	40	24,5	23,5	20,8	40	18,8	22,2	20,3	36,5	24,4	23,4	22,3	22,3	24	24,8	27,3	26	21,9	33,3	22,7	32,6	32,1
GDF8/ Composto	40													23	23	2b			26					

Etapa de diferenciação

Tratamento	Valor de Ct																							
	GAPD	ALB	AMY2	ARX	CDX2	GCG	HNf4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEURO	NEUR	NKX2-2	NKX2-5	NKX6-1	PAX	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F	PTF1	SST	ZIC1
	H		A				A				D1	O G3				4					4	A		
AAWnt3a	17,9	25,4	29,5	28,4	23,3	34,1	21,8	29,2	29,4	34	27	25,8	25,2	27,3	34,1	28,3	27,8	35,2	22,7	28,3	28,6	30,8	32,2	37,4
GDF8/Wnt3a	18,5	26,5	30,4	29,4	23,9	34,2	22,6	29	29	34,4	27,1	27,2	26,4	27,9	37,8	29	29,2	31,4	23,3	32,2	30,1	30,7	31	30,1
GDF8/GSK3 inh BIO	18,5	25,2	30,3	29,4	23,6	32,8	22,6	28,8	29,3	34,7	27,6	26,8	26,2	27,6	35	28,8	28,7	32,9	23,2	32,2	29,5	30,6	31,3	31,1
GDF8/ Composto 19	18,4	26,1	30,2	29,1	24	33,1	22,5	28,5	30	34,4	27,3	26,6	25,9	27,5	37,6	27,8	28,3	33,8	22,9	31,7	29,7	30	32,4	33,4
GDF8/ Composto 202	18,7	26,7	31,1	29,6	24	34,9	22,7	30,3	31,6	34,2	27,8	27,2	27	28	40	30	29	36,2	23,7	30,9	30,2	32,4	32,4	34,6
GDF8/ Composto 40	18,6	25,8	30,5	29,6	23,8	37,6	22,5	30	31,1	34,5	27,9	27,2	26,2	27,8	37,2	29,5	29	37,1	23,2	31,5	30,2	31,5	32,4	35,5

Etapa de diferenciação

Tratamento	Valor de Ct																							
	GAPD	ALB	AMY2	ARX	CDX2	GCG	HNf4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEURO	NEUR	NKX2-2	NKX2-5	NKX6-1	PAX	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F	PTF1	SST	ZIC1
	H		A				A				D1	O G3				4					4	A		
AAWnt3a	18,9	21,3	28,8	24,6	23,4	21,7	21,9	21,6	25,2	32,4	24,9	23,7	23,8	24,2	33,9	25,6	25,6	27	23	29,2	27	28,1	25,3	32,6
GDF8/Wnt3a	18,3	21,3	28,5	25,3	23,1	22,6	21,9	21,9	25,7	33,1	24,9	24,3	24,2	24,7	35,4	25,8	26,2	27,3	23,2	31,2	27	28,7	24,7	24,6
GDF8/GSK3 inh BIO	19	21,1	28,7	25,3	23,3	22,3	21,9	22	25,7	32,5	25,4	24	24	24,7	35,4	26,1	26	27,7	23,2	30,7	27,4	28,5	25,6	31,5

GDF8/ Composto 19	18,9	21,7	28,9	25,2	23,5	22,4	22,2	22	25,6	34	25,4	24,1	23,9	24,6	35,9	25,7	25,7	27,8	23,1	31,4	27,1	28,6	25,5	31,4
GDF8/ Composto 202	19	20,9	29,2	25,1	23,6	22,4	22,1	22	25,5	33,3	25,5	23,9	24,1	24,5	35,7	26	25,8	27,6	23,4	30,2	27,5	28,8	26,1	35,7
GDF8/ Composto 40	19,2	21,1	29,4	25,5	23,7	22,8	22,3	22,3	26	33,5	25,8	24,2	24,2	24,6	37,3	25,9	25,9	28,4	23,1	30,4	27,6	28,4	26,3	34,4

Etapa de diferenciação

5	Valor de Ct																							
Tratamento	GAPD	ALB	AMY2	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEURO	NEUR	NKX2-2	NKX2-5	NKX6-1	PAX	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F	PTF1	SST	ZIC1
AAMWnt3a	19,1	19,5	28,6	23,1	23,9	16,2	21,9	16,9	23,4	33,7	23,3	21,7	27,4	24	33,1	25	26,4	24,7	22,6	27,1	28,4	27,5	22	34,1
GDF8/Wnt3a	18,4	19,9	28,4	23,8	23,8	17,2	22,3	17,4	24	32,6	23,9	22,6	28,6	24,2	33,1	25,8	27,2	25,6	23,6	29,2	28,9	29,1	22,7	25,6
GDF8/GSK3 inh BIO	19,1	19,2	29,1	24	24,2	17,2	22,4	17,6	24	33,5	23,8	22,9	28,4	24,4	40	25,1	27,3	25,6	23,6	29,2	28,1	28,7	23	26,3
GDF8/ Composto 19	19	20	28,8	23,4	24,2	17	22,6	17,1	23,8	33,2	23,8	22,8	28,6	24,1	34,6	25	26,8	25,6	23,4	29,8	28,2	28,2	22,9	28,8
GDF8/ Composto 202	19,2	20	29	23	23,9	16,7	22,2	16,8	23,2	32,7	23,8	22,3	28,2	23,2	40	26	27,2	25,8	23,4	29,9	29,1	28,4	22,6	33,8
GDF8/ Composto 40	19,6	19,5	29	23,7	24,2	16,9	22,2	17,1	23,9	33,2	23,9	22,5	28,1	23,5	34,8	25	27,3	26,4	23,4	29,9	29,2	27,5	22,3	34,8

Tabela 15		Valores de RT-PCR CT																					
Etapa 1																							
Tratamento	GAPD	AFP/CD9	CD9	CDH	CDH/CDX2	CER	CXCR4	FGF1	FGF4	FOXA2	GATA4	GATA	GSC	HLXB9	KIT	MKL1	NANOG	OTX2	POU5F	SOX1	SOX7	T	
H			9	1		1	7				6								1	7			
AA	194	32,8/25,2	24,0	26,1	21,8	36,0	18,3	20,4	20,7	34,0	25,1	25,0	22,9	22,4	24,8	22,7	28,9	24,1	22,5	32,2	21,6	32,3	36,1
AA+Whi3a	18,2	40,0/23,5	22,0	24,1	20,9	40,0	17,1	22,0	18,7	33,4	22,9	23,1	21,8	22,8	23,3	22,9	27,7	22,7	19,9	31,0	21,2	31,2	34,1
AA+Composto181	20,1	40,0/24,5	23,3	26,0	20,7	35,9	18,2	22,0	20,1	35,1	25,6	24,7	22,9	20,8	25,5	19,7	27,8	24,8	22,3	32,8	22,2	33,0	33,8
AA+Composto	18,4	34,2/23,6	21,6	25,9	21,4	35,2	17,2	22,0	18,9	34,0	24,0	23,1	22,6	22,5	24,8	22,6	27,9	23,7	20,3	32,1	21,4	32,0	32,7
180																							
AA+Composto 19	20,1	35,4/24,4	24,9	26,3	20,8	40,0	17,9	17,7	20,5	32,8	25,6	25,1	22,7	21,3	26,0	22,6	29,5	24,1	22,9	32,1	22,3	33,0	29,6
AA+Composto	20,3	40,0/25,1	23,7	25,9	21,4	40,0	18,3	22,0	20,4	36,0	25,7	24,5	23,0	21,8	25,2	23,9	27,7	24,5	22,5	32,7	22,6	32,1	33,5
202																							
AA+Composto 40	19,9	40,0/24,6	23,6	25,8	20,4	40,0	17,7	22,7	20,2	35,1	25,5	24,6	22,5	20,9	25,5	22,9	28,0	23,8	22,0	33,6	22,3	32,5	32,8
AA+GSK3	inhib	20,2	35,0/25,4	23,7	27,2	21,9	35,5	18,5	22,2	20,9	36,0	25,8	23,2	22,2	25,2	23,7	28,5	24,9	22,8	34,3	23,4	32,7	33,5
BIO																							
AA+Composto	19,8	40,0/24,9	23,7	25,5	21,1	40,0	18,3	19,6	20,7	36,2	24,4	24,8	22,7	22,6	24,1	23,7	27,6	23,9	22,0	33,2	23,3	32,4	34,6
206																							
GDF8	21,6	40,0/25,5	25,9	25,2	22,3	40,0	20,1	24,6	22,1	34,9	25,9	27,5	24,8	24,2	25,3	25,4	30,6	25,0	24,3	29,5	25,2	29,8	32,9

Etapa 3		Valores de RT-PCR CT																						
Tratamiento	GAPD	ALB	AMY2	ARX	CDX2/GC	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEMOD1	NEUROG	NKX2-NKX2	NKX6-1	PAX4	PAX6	PDX1	PECA	POU3F	PTF1	SST	ZIC1		
	H	A			G	A						3	2	5	M	4	A							
AA	18,5	26,9	30,6	32,0	22,9	34,1	22,4	34,8	29,3	36,4	27,4	30,1	28,0	29,3	34,6	32,2	31,4	40,0	23,3	31,0	30,5	34,6	33,2	34,8
AA+Wnt3a	18,4	27,3	30,2	33,0	23,0	34,7	22,4	40,0	28,8	33,9	27,7	30,4	28,1	29,0	40,0	34,9	31,9	38,1	23,8	30,9	30,7	40,0	32,8	40,0
AA+Composto	18,6	26,0	30,1	34,2	22,3	40,0	22,3	40,0	30,4	34,6	28,5	31,4	29,0	30,3	33,9	35,8	33,3	40,0	25,0	30,0	30,8	36,0	34,6	34,8
181																								
AA+Composto	18,8	25,5	30,0	33,3	22,5	35,1	22,5	40,0	29,4	34,3	28,6	32,6	30,3	31,1	32,5	35,3	36,2	26,3	28,9	31,3	40,0	34,7	34,4	
180																								
AA+Composto 19	34,1	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	37,4	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
AA+Composto	18,5	26,2	30,7	33,0	22,5	34,8	22,6	35,1	29,8	35,1	28,2	30,0	28,5	29,5	33,6	33,9	32,0	36,6	24,1	29,7	31,9	40,0	34,2	40,0
202																								
AA+Composto 40	18,5	25,8	30,1	34,9	22,2	40,0	22,3	40,0	29,7	34,1	28,1	30,8	29,1	30,3	33,6	34,4	32,9	40,0	24,8	30,3	31,3	35,6	35,3	35,4
AA+GSK3 inhib	18,5	24,9	30,1	34,6	22,0	40,0	21,5	40,0	30,2	34,9	27,8	34,0	31,0	31,8	32,6	40,0	34,9	40,0	26,1	31,0	32,4	40,0	35,2	34,9
BIO																								
AA+Composto	18,3	27,0	30,3	33,7	22,7	35,7	22,5	40,0	28,4	34,4	27,8	30,7	28,6	29,8	32,8	35,0	31,5	30,4	23,9	29,7	31,2	35,0	31,9	40,0
206																								
GDF8	18,0	28,7	30,4	35,3	23,8	40,0	23,6	40,0	28,5	33,6	27,2	30,3	28,7	30,3	34,4	35,0	32,4	24,8	25,5	30,0	30,8	34,2	29,5	26,1
GDF8+Wnt3a	17,4	27,0	29,5	33,8	23,1	35,1	22,4	40,0	26,3	30,5	26,1	30,1	27,5	29,1	40,0	32,9	31,5	25,8	23,1	32,2	29,8	34,0	27,7	28,2

Etapa 5		Valores de RT-PCR CT																						
Tratamento	GAPD	ALB	AMY2	ARX	CDX2	GC	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD	NEUROG	NKX2	NKX2	NKX6	PAX4	PAX6	PDX1	PECA	POU3F	PTF1	SST	ZIC1
	H		A			G					1	3	2	5	1					M	4	A		
AA	18,3	20,2	27,6	22,0	23,4	14,1	21,3	14,9	22,4	31,8	22,2	22,8	28,1	23,7	34,1	25,5	27,3	24,0	23,2	30,1	28,8	27,3	19,6	34,4
AA+Wnt3a	18,0	20,0	27,7	21,9	23,1	14,0	20,9	14,6	22,3	31,6	22,0	21,6	28,0	23,4	34,8	26,1	27,3	23,7	23,3	29,6	28,8	27,5	19,4	32,5
AA+Composto	18,0	18,8	27,6	22,0	22,9	14,3	20,9	14,5	22,1	31,4	22,2	21,5	28,9	23,3	32,2	26,1	26,8	24,0	23,1	27,5	28,8	28,0	18,8	31,2
181																								
AA+Composto	18,0	18,8	27,6	22,4	22,9	14,9	21,0	14,7	22,4	31,9	22,6	21,7	29,5	23,8	30,2	26,5	27,2	24,3	23,2	26,7	29,0	28,7	18,7	30,3
180																								
AA+Composto	17,9	23,6	28,6	28,2	25,4	27,0	24,2	26,9	26,2	32,0	24,4	27,2	31,2	28,0	30,1	25,8	35,1	28,6	29,4	31,5	28,2	32,4	23,1	24,0
AA+Composto	18,6	19,2	28,0	22,6	23,4	14,9	21,3	15,0	22,7	31,8	22,6	21,9	28,6	23,7	29,9	25,8	26,9	24,7	23,6	27,7	29,2	27,9	19,4	32,8
202																								
AA+Composto	18,3	18,9	27,9	22,3	23,0	14,6	21,1	14,7	22,5	31,5	22,4	21,6	29,0	23,5	32,9	26,1	27,1	24,4	23,2	28,1	29,2	28,1	19,1	31,9
AA+GSK3 inhib	18,3	17,1	28,0	23,0	22,6	15,1	20,5	15,1	22,8	31,8	22,8	22,1	29,5	24,2	33,8	27,5	27,4	24,9	23,8	28,3	29,9	29,7	19,5	32,0
BIO																								
AA+Composto	18,2	19,5	27,9	22,2	23,4	14,4	21,3	14,8	22,5	31,1	22,4	21,7	28,0	23,6	35,8	25,9	27,1	24,1	23,3	29,0	28,7	27,5	19,7	32,7
206																								
GDF8	17,4	20,5	28,2	25,2	24,4	18,1	22,9	17,7	24,3	31,8	23,3	24,2	30,1	25,9	31,4	26,6	29,4	26,6	25,6	29,7	27,8	29,5	21,1	22,5

Tabela 16	
Composto nº	SELETIVIDADE PRIMÁRIA
Composto 6	Seletivo para GSK
Composto 7	Seletivo para GSK
Composto 8	Seletivo para GSK
Composto 9	Seletivo para CDK
Composto 57	Seletivo para Trk
Composto 41	Seletivo para GSK
Composto 42	Seletivo para CDK
Composto 10	Seletivo para CDK
Composto 34	controle positivo
Composto 11	Seletivo para CDK
Composto 43	Seletivo para Trk
Composto 44	Seletivo para GSK
Composto 12	Seletivo para CDK
Composto 45	Seletivo para Trk

Tabela 17							
Placa	Tratamento	COMPOSTO Nº	Seletividade do composto	Número de célula		Expressão de Sox17	
				Número total de células	% de controles positivos	Intensidade total média	% de controles positivos
1	nenhum a Ativina A	NENHUM	N/D	9809	67,8	-4,0E+05	-0,2
1	Ativina A/Wnt3a	Nenhum	N/D	14476	100,0	2,3E+08	100,0
1	Nenhum GDF8	Composto 11	Seletivo para CDK	565	3,9	-1,1E+06	-0,5
1	Nenhum GDF8	Composto 44	Seletivo para GSK	14	0,1	-1,1E+06	-0,5
1	Nenhum	Composto 43	Seletivo para Trk	8610	59,5	-2,1E+05	-0,1

237/247

	GDF8						
	Nenhum						
1	GDF8	Composto 42	Seletivo para CDK	8700	60,1	-2,4E+05	-0,1
	Nenhum						
1	GDF8	Composto 57	Seletivo para Trk	1222	8,4	-7,1E+05	-0,3
	Nenhum						
1	GDF8	Composto 10	Seletivo para CDK	7011	48,4	-6,6E+05	-0,3
	Nenhum						
1	GDF8	Composto 41	Seletivo para GSK	9995	69,0	5,9E+04	0,0
	Nenhum						
1	GDF8	Composto 7	Seletivo para CDK	3	0,0	-1,4E+06	-0,6
	Nenhum						
1	GDF8	Composto 45	Seletivo para Trk	8857	61,2	-4,5E+05	-0,2
	Nenhum						
1	GDF8	Composto 6	Seletivo para GSK	14827	102,4	-1,8E+05	-0,1
	Nenhum						
1	GDF8	Composto 9	Seletivo para CDK	7156	49,4	-4,2E+04	0,0
	Nenhum						
1	GDF8	Composto 12	Seletivo para GSK	13124	90,7	-2,3E+05	-0,1
	Nenhum						
1	GDF8	Composto 8	Seletivo para GSK	13235	91,4	3,8E+05	0,2
1	GDF8	Composto 34	controle positivo	13926	96,2	2,6E+08	111,8
1	GDF8	Composto 45	Seletivo para Trk	9540	65,9	1,1E+08	47,9
1	GDF8	Composto 7	Seletivo para GSK	5296	36,6	7,0E+07	30,4
1	GDF8	Composto 10	Seletivo para CDK	4627	32,0	6,6E+07	28,6
1	GDF8	Composto 6	Seletivo para GSK	5118	35,4	5,8E+07	25,2
1	GDF8	Composto 43	Seletivo para Trk	6682	46,2	5,4E+07	23,4
1	GDF8	Composto 42	Seletivo para CDK	5686	39,3	4,9E+07	21,2
1	GDF8	Composto 8	Seletivo para GSK	5018	34,7	4,7E+07	20,4
1	GDF8	Composto 9	Seletivo para CDK	4816	33,3	4,5E+07	19,4
1	GDF8	Composto 41	Seletivo para GSK	4455	30,8	3,4E+07	14,8
1	GDF8	N/D	N/D	2856	19,7	2,2E+07	9,4

1	GDF8	Composto 57	Seletivo para Trk	2110	14,6	1,1E+07	4,8
1	GDF8	Composto 11	Seletivo para CDK	210	1,4	-4,9E+05	-0,2
1	GDF8	Composto 44	Seletivo para GSK	226	1,6	-9,5E+05	-0,4
1	GDF8	Composto 12	Seletivo para CDK	31	0,2	-1,3E+06	-0,6

Tabela 18										
Placa	Tratamento	COMPOSTO N°	NÚMERO DE CÉLULA				Expressão de Sox17			
			Número total médio de células	SD	% de CV	% de controles positivos	Intensidade de total média	SD	% de CV	% de controles positivos
1	nenhum a ativina A (com Wnt3a)	Nenhum	15489	0	0,00	103,2	3,75E+07	00	0,00	10,9
1	Ativina A/Wnt3a	Nenhum	15007	1991	13,27	100,0	3,45E+08	07	20,75	100,0
1	GDF8	Composto 206	20568	1683	8,18	137,1	5,19E+08	07	4,41E+8,51	150,3
1	GDF8	Composto 207	19224	1091	5,68	128,1	2,54E+08	07	5,69E+22,41	73,6
1	GDF8	Composto 19	12569	1524	12,13	83,8	2,40E+08	07	6,34E+26,44	69,5
1	GDF8	Composto 23	8758	474	5,41	58,4	1,16E+08	06	9,07E+7,80	33,7
1	GDF8	Composto 170	6460	2305	35,68	43,0	9,44E+07	07	6,98E+73,93	27,4
1	GDF8	Composto 208	4848	1225	25,27	32,3	2,26E+07	07	2,15E+94,96	23,6
1	GDF8	Composto 209	4831	1243	25,74	32,2	3,97E+07	07	1,61E+40,56	11,5
1	GDF8	Composto	4338	1520	35,04	28,9	3,63E+07	3,27E+	90,14	10,5

		32						07		
		Composto						1,04E+		
1	GDF8	30	4679	435	9,29	31,2	3,47E+07	07	30,03	10,1
		Composto						2,74E+		
1	GDF8	223	3704	1077	29,08	24,7	3,45E+07	07	79,43	10,0
		Composto						2,81E+		
1	GDF8	2	4538	632	13,93	30,2	2,95E+07	06	9,50	8,6
		Composto						2,45E+		
1	GDF8	210	2645	817	30,88	17,6	2,90E+07	07	84,73	8,4
		Composto						1,66E+		
1	GDF8	24	5012	1263	25,21	33,4	2,64E+07	07	62,95	7,7
		Composto						5,02E+		
1	GDF8	211	5165	796	15,41	34,4	2,61E+07	06	19,23	7,6
		Composto						1,18E+		
1	GDF8	212	5476	1445	26,39	36,5	2,54E+07	07	46,53	7,4
		Composto						8,26E+		
1	GDF8	224	5188	761	14,67	34,6	2,46E+07	06	33,56	7,1
		Composto						2,65E+		
1	GDF8	225	4431	1149	25,92	29,5	2,45E+07	07	108,19	7,1
		Composto						2,30E+		
1	GDF8	13	3123	1508	48,27	20,8	2,44E+07	07	94,13	7,1
		Composto						1,97E+		
1	GDF8	213	1261	1028	81,49	8,4	2,07E+07	07	95,03	6,0
		Composto						6,90E+		
1	GDF8	52	4932	386	7,82	32,9	1,99E+07	06	34,67	5,8
		Composto						1,39E+		
1	GDF8	214	3345	335	10,01	22,3	1,93E+07	07	72,18	5,6
		Composto						1,10E+		
1	GDF8	51	4289	940	21,91	28,6	1,70E+07	07	64,86	4,9
		Composto						5,93E+		
1	GDF8	26	4896	545	11,14	32,6	1,65E+07	06	36,02	4,8
1	GDF8	Composto	3617	577	15,94	24,1	1,59E+07	4,96E+	31,21	4,6

		226						06		
		Composto						2,69E+		
1	GDF8	215	4326	165	3,81	28,8	1,45E+07	06	18,53	4,2
		Composto						4,63E+		
1	GDF8	31	3619	1011	27,92	24,1	1,36E+07	06	34,15	3,9
		Composto						2,30E+		
1	GDF8	216	3364	629	18,70	22,4	8,75E+06	06	26,32	2,5
		Composto						1,94E+		
1	GDF8	217	2859	544	19,03	19,1	8,75E+06	06	22,16	2,5
		Composto						9,70E+		
1	GDF8	218	1327	118	8,92	8,8	6,44E+06	05	15,05	1,9
		Composto						1,29E+		
1	GDF8	219	368	168	45,67	2,5	1,79E+06	06	72,17	0,5
		nenhum a ativina A (com Wnt3a)						0,00E+		
2		Nenhum	15778	0	0,00	103,2	2,24E+07	00	0,00	6,7
		Ativina A/Wnt3a						2,84E+		
2		Nenhum	15290	1119	7,32	100,0	3,37E+08	07	8,44	100,0
		Composto						1,94E+		
2	GDF8	202	20177	987	4,89	132,0	4,85E+08	07	4,00	144,0
		Composto						6,69E+		
2	GDF8	227	2911	4619	9	158,6	3,89E+07	07	172,00	11,5
		Composto						3,57E+		
2	GDF8	15	4383	1775	40,49	28,7	3,57E+07	07	100,03	10,6
		Composto						2,53E+		
2	GDF8	228	4043	1253	30,98	26,4	3,10E+07	07	81,62	9,2
		Composto						1,46E+		
2	GDF8	229	3451	892	25,85	22,6	1,80E+07	07	81,07	5,4
		Composto						3,54E+		
2	GDF8	4	3163	805	25,44	20,7	1,58E+07	06	22,32	4,7
2	GDF8	Composto	2791	1453	52,05	18,3	1,40E+07	9,00E+	64,28	4,2

		220						06		
		Composto						7,52E+		
2	GDF8	5	3137	1172	37,34	20,5	1,30E+07	06	57,85	3,9
		Composto						1,55E+		
2	GDF8	230	2624	248	9,46	17,2	1,24E+07	07	124,73	3,7
		Composto						6,51E+		
2	GDF8	231	4773	2651	55,55	31,2	1,22E+07	06	53,37	3,6
		Composto						1,51E+		
2	GDF8	232	3273	1290	39,41	21,4	1,18E+07	07	127,98	3,5
		Composto						1,54E+		
2	GDF8	221	1950	361	18,52	12,8	1,18E+07	07	131,11	3,5
		Composto						1,09E+		
2	GDF8	233	3041	180	5,93	19,9	1,12E+07	07	97,44	3,3
		Composto						9,80E+		
2	GDF8	147	3434	1199	34,91	22,5	1,12E+07	06	87,75	3,3
		Composto						5,67E+		
2	GDF8	234	2835	623	21,98	18,5	9,47E+06	06	59,84	2,8
		Composto						6,51E+		
2	GDF8	235	3391	2269	66,91	22,2	9,10E+06	06	71,52	2,7
		Composto						6,32E+		
2	GDF8	236	2868	561	19,57	18,8	6,73E+06	06	93,82	2,0
		Composto						2,45E+		
2	GDF8	33	2362	511	21,66	15,4	6,60E+06	06	37,20	2,0
		Composto						3,09E+		
2	GDF8	1	3213	166	5,16	21,0	6,48E+06	06	47,67	1,9
		Composto						2,89E+		
2	GDF8	53	2783	441	15,86	18,2	6,36E+06	06	45,36	1,9
		Composto						3,00E+		
2	GDF8	237	2973	292	9,83	19,4	6,02E+06	06	49,79	1,8
		Composto						6,10E+		
2	GDF8	238	2739	485	17,70	17,9	5,97E+06	06	102,07	1,8
2	GDF8	Composto	3156	667	21,15	20,6	5,60E+06	2,42E+	43,24	1,7

		239						06		
		Composto						3,13E+		
2	GDF8	240	3002	287	9,55	19,6	4,68E+06	06	66,80	1,4
		Composto						1,88E+		
2	GDF8	200	2308	209	9,04	15,1	4,39E+06	06	42,83	1,3
		Composto						2,52E+		
2	GDF8	222	1776	719	40,47	11,6	3,33E+06	06	75,78	1,0
		Composto						1,55E+		
2	GDF8	241	2949	446	15,14	19,3	3,29E+06	06	47,03	1,0
		Composto						8,85E+		
2	GDF8	242	385	184	47,83	2,5	1,08E+06	05	81,61	0,3
		Composto						3,07E+		
2	GDF8	243	249	55	22,21	1,6	2,53E+05	05	121,25	0,1
		Composto						2,27E+		
2	GDF8	204	250	21	8,38	1,6	1,36E+05	04	16,66	0,0
		nenhum						0,00E+		
		a ativina								
		A (com								
3	Wnt3a)	Nenhum	15796	0	0,00	99,6	2,82E+07	00	0,00	8,0
		Ativina						2,40E+		
3	A/Wnt3a	Nenhum	15867	785	4,95	100,0	3,54E+08	07	6,77	100,0
		Composto						9,51E+		
3	GDF8	34	6974	3723	53,38	44,0	2,07E+08	07	45,85	58,6
		Composto						4,08E+		
3	GDF8	185	10892	1552	14,24	68,6	1,53E+08	07	26,72	43,1
		Composto						4,86E+		
3	GDF8	35	7746	1873	24,17	48,8	1,35E+08	07	36,08	38,0
		Composto						5,04E+		
3	GDF8	22	6727	1927	28,64	42,4	1,06E+08	07	47,73	29,8
		Composto						2,11E+		
3	GDF8	34	4889	1152	23,57	30,8	4,31E+07	07	48,95	12,2
3	GDF8	Composto	4173	1758	42,14	26,3	3,94E+07	2,24E+	56,78	11,1

		184						07		
		Composto						2,51E+		
3	GDF8	223	4234	1604	37,88	26,7	3,55E+07	07	70,56	10,0
		Composto						1,56E+		
3	GDF8	37	4187	338	8,06	26,4	3,11E+07	07	50,18	8,8
		Composto						1,52E+		
3	GDF8	244	4479	1229	27,43	28,2	2,73E+07	07	55,71	7,7
		Composto						1,03E+		
3	GDF8	245	4725	99	2,09	29,8	2,59E+07	07	39,90	7,3
		Composto						2,69E+		
3	GDF8	246	3820	1091	28,57	24,1	2,30E+07	07	117,08	6,5
		Composto						1,04E+		
3	GDF8	247	3730	966	25,90	23,5	2,14E+07	07	48,63	6,1
		Composto						9,45E+		
3	GDF8	248	3875	445	11,48	24,4	2,13E+07	06	44,45	6,0
		Composto						1,21E+		
3	GDF8	25	3879	658	16,95	24,4	1,76E+07	07	69,04	5,0
		Composto						3,27E+		
3	GDF8	195	3703	405	10,94	23,3	1,61E+07	06	20,34	4,5
		Composto						1,35E+		
3	GDF8	227	2904	397	13,68	18,3	1,43E+07	07	94,25	4,0
		Composto						1,14E+		
3	GDF8	183	3306	969	29,32	20,8	1,35E+07	07	84,25	3,8
		Composto						9,02E+		
3	GDF8	187	2768	1426	51,51	17,4	1,35E+07	06	66,67	3,8
		Composto						1,69E+		
3	GDF8	201	3213	1114	34,66	20,3	1,35E+07	07	125,02	3,8
		Composto						5,25E+		
3	GDF8	197	3268	211	6,46	20,6	1,30E+07	06	40,51	3,7
		Composto						6,79E+		
3	GDF8	249	3840	348	9,06	24,2	1,29E+07	06	52,72	3,6
3	GDF8	Composto	2404	213	8,86	15,1	1,12E+07	4,95E+	44,30	3,2

		141						06		
		Composto						2,11E+		
3	GDF8	194	3177	354	11,14	20,0	9,75E+06	06	21,63	2,8
		Composto						4,78E+		
3	GDF8	250	3683	420	11,40	23,2	9,14E+06	06	52,32	2,6
		Composto						4,59E+		
3	GDF8	251	3021	668	22,10	19,0	8,41E+06	06	54,60	2,4
		Composto						1,86E+		
3	GDF8	20	2793	205	7,35	17,6	6,77E+06	06	27,45	1,9
		Composto						2,31E+		
3	GDF8	252	2580	135	5,24	16,3	6,20E+06	05	3,72	1,8
		Composto						1,47E+		
3	GDF8	253	2485	820	32,98	15,7	5,83E+06	06	25,20	1,6
		Composto						2,62E+		
3	GDF8	202	2095	518	24,71	13,2	5,75E+06	06	45,66	1,6
		Composto						3,07E+		
3	GDF8	21	371	294	79,19	2,3	2,36E+06	06	129,78	0,7
		nenhum a ativina A (com						0,00E+		
4	Wnt3a)	Nenhum	16629	0	0,00	119,3	2,42E+07	00	0,00	7,8
		Ativina						4,77E+		
4	A/Wnt3a	Nenhum	13945	1535	11,01	100,0	3,09E+08	07	15,46	100,0
		Composto						1,82E+		
4	GDF8	34	7416	6482	87,41	53,2	2,10E+08	08	86,70	68,0
		Composto						4,41E+		
4	GDF8	240	11283	2023	17,93	80,9	1,61E+08	07	27,34	52,2
		Composto						3,08E+		
4	GDF8	28	5236	1787	34,12	37,5	4,03E+07	07	76,36	13,1
		Composto						5,55E+		
4	GDF8	198	3985	2674	67,10	28,6	3,89E+07	07	142,91	12,6
4	GDF8	Composto	4861	1501	30,87	34,9	3,03E+07	1,98E+	65,37	9,8

		196						07		
		Composto						3,65E+		
4	GDF8	18	1921	1759	91,56	13,8	2,94E+07	07	123,90	9,5
		Composto						1,42E+		
4	GDF8	186	3486	425	12,19	25,0	2,34E+07	07	60,78	7,6
		Composto						2,27E+		
4	GDF8	254	3960	1521	38,42	28,4	2,31E+07	07	98,10	7,5
		Composto						7,13E+		
4	GDF8	168	3460	324	9,36	24,8	2,28E+07	06	31,23	7,4
		Composto						1,58E+		
4	GDF8	190	3402	1318	38,74	24,4	1,87E+07	07	84,61	6,1
		Composto						1,05E+		
4	GDF8	255	4006	1625	40,57	28,7	1,52E+07	07	68,91	4,9
		Composto						8,30E+		
4	GDF8	50	2666	743	27,86	19,1	1,48E+07	06	56,15	4,8
		Composto						9,69E+		
4	GDF8	27	3721	721	19,37	26,7	1,19E+07	06	81,29	3,9
		Composto						8,65E+		
4	GDF8	256	2922	1275	43,64	21,0	9,41E+06	06	92,01	3,0
		Composto						4,49E+		
4	GDF8	257	3182	705	22,14	22,8	8,06E+06	06	55,75	2,6
		Composto						7,24E+		
4	GDF8	258	2731	472	17,29	19,6	7,89E+06	06	91,70	2,6
		Composto						5,36E+		
4	GDF8	189	2350	1625	69,16	16,9	7,72E+06	06	69,41	2,5
		Composto						2,58E+		
4	GDF8	259	2195	955	43,49	15,7	6,92E+06	06	37,29	2,2
		Composto						3,33E+		
4	GDF8	260	2468	741	30,04	17,7	6,64E+06	06	50,18	2,2
		Composto						2,10E+		
4	GDF8	261	2965	456	15,38	21,3	6,23E+06	06	33,61	2,0
4	GDF8	Composto	2377	572	24,08	17,0	6,17E+06	2,76E+	44,65	2,0

		192						06		
		Composto						3,00E+		
4	GDF8	262	2894	399	13,78	20,8	5,75E+06	06	52,20	1,9
		Composto						3,97E+		
4	GDF8	188	3005	759	25,26	21,6	5,02E+06	06	79,06	1,6
		Composto						1,14E+		
4	GDF8	263	2129	230	10,79	15,3	4,77E+06	06	23,93	1,5
		Composto						2,17E+		
4	GDF8	264	2630	342	13,00	18,9	4,28E+06	06	50,73	1,4
		Composto						1,15E+		
4	GDF8	265	2636	1372	52,04	18,9	4,27E+06	06	26,86	1,4
		Composto						9,51E+		
4	GDF8	14	274	14	5,02	2,0	1,56E+05	04	60,91	0,1
		Composto						6,83E+		
4	GDF8	205	241	3	1,20	1,7	1,36E+05	04	50,42	0,0
		Composto						3,34E+		
4	GDF8	266	271	7	2,67	1,9	1,18E+05	04	28,43	0,0
		Composto						3,49E+		
4	GDF8	203	253	4	1,49	1,8	1,09E+05	04	32,09	0,0

Tabela 19	
	EXPRESSÃO DE SOX17
Composto n°	% de controles positivos
Composto 181	150,3
Composto 202	144,0
Composto 180	73,6
Composto 19	69,5
Composto 34	68,0
Composto 40	52,2
Composto 185	43,1
Composto 185	38,0

247/247

Composto 35	33,7
Composto 23	29,8
Composto 22	27,4
Composto 17	23,6

REIVINDICAÇÕES

1. Método para diferenciar células-tronco pluripotentes em células que expressam marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo que compreende tratar as células-tronco pluripotentes com um meio desprovido de activina A, e contendo um composto selecionado do grupo consistindo em: EGF, FGF4, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, VEGF, GDF-8, muscimol, PD98059, LY294002, U0124, U0126, e butirato de sódio, durante um período de tempo suficiente para a diferenciação das células-tronco pluripotentes em células que expressam marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a activina A ausente também contém pelo menos um outro composto selecionado do grupo consistindo em: uma anilina-piridinotriazina e uma anilina-piridinotriazina cíclica.

Figura 1A

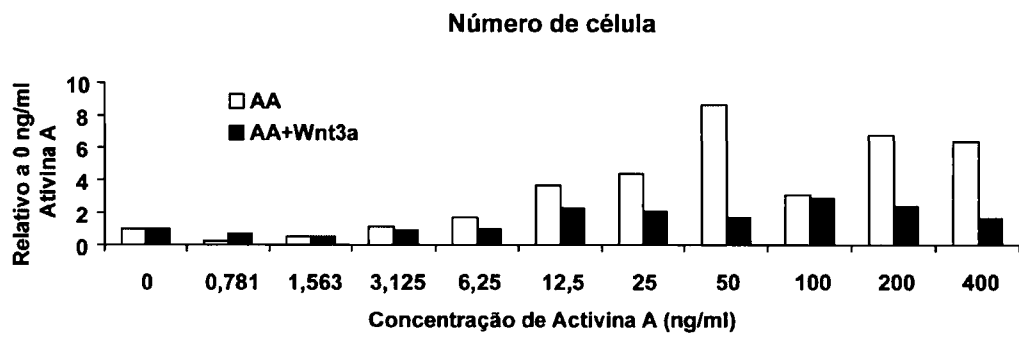


Figura 1B

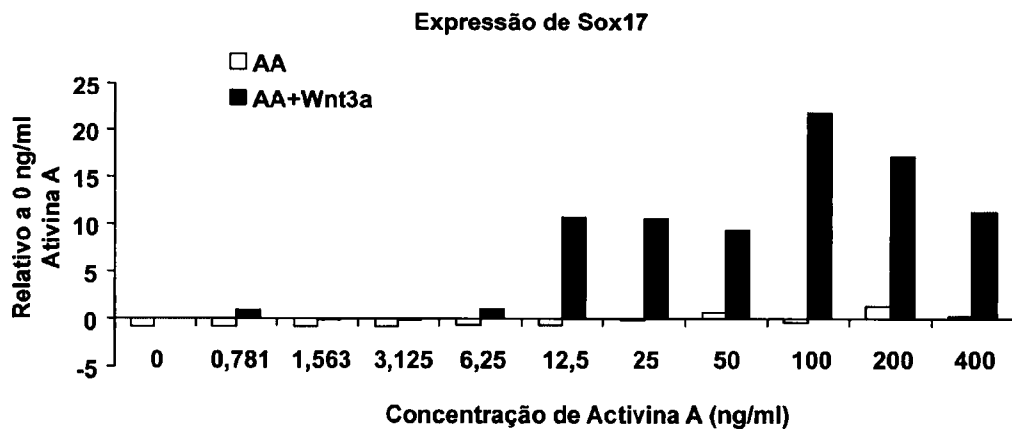


Figura 2

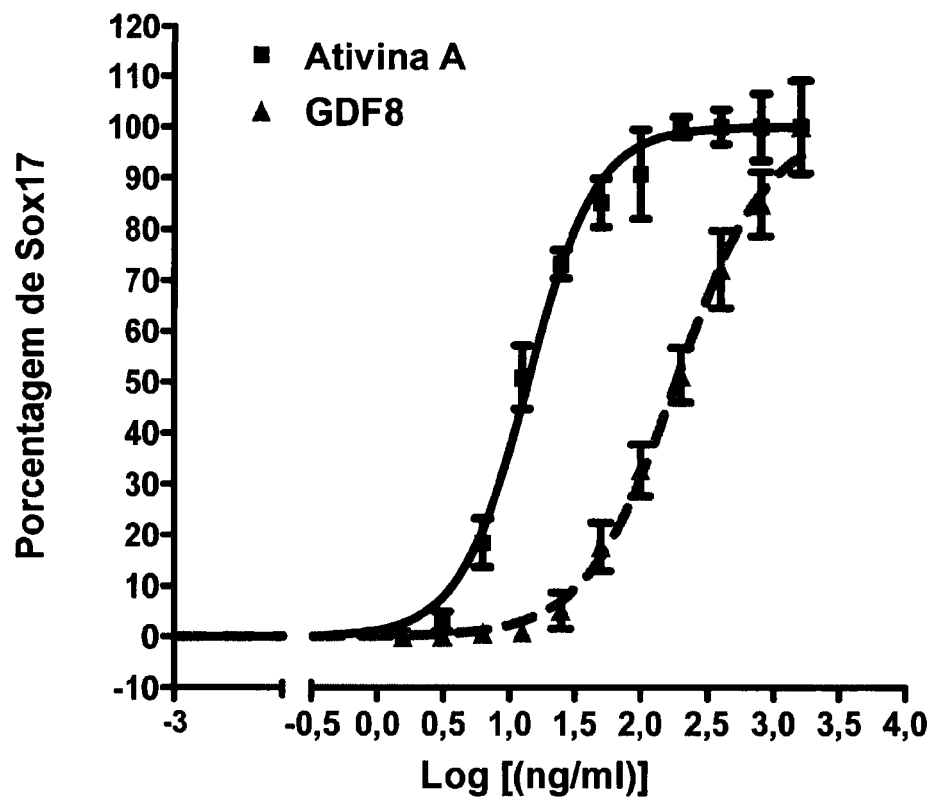


Figura 3

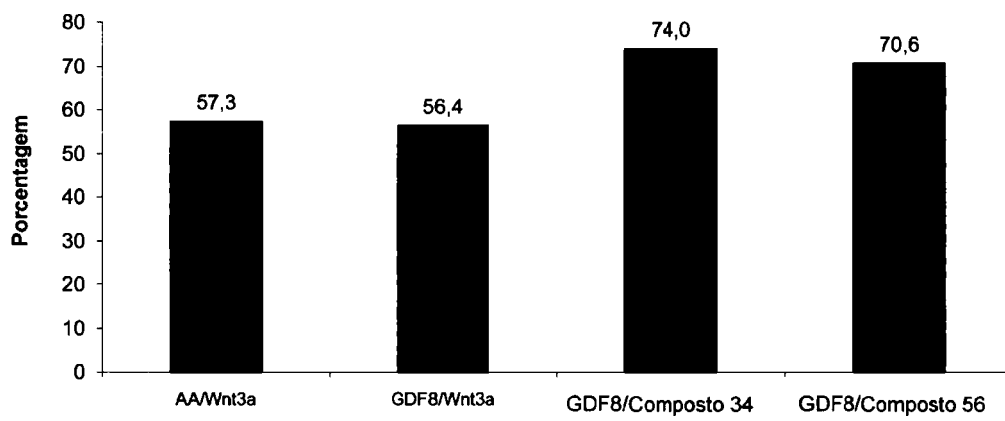


Figura 4

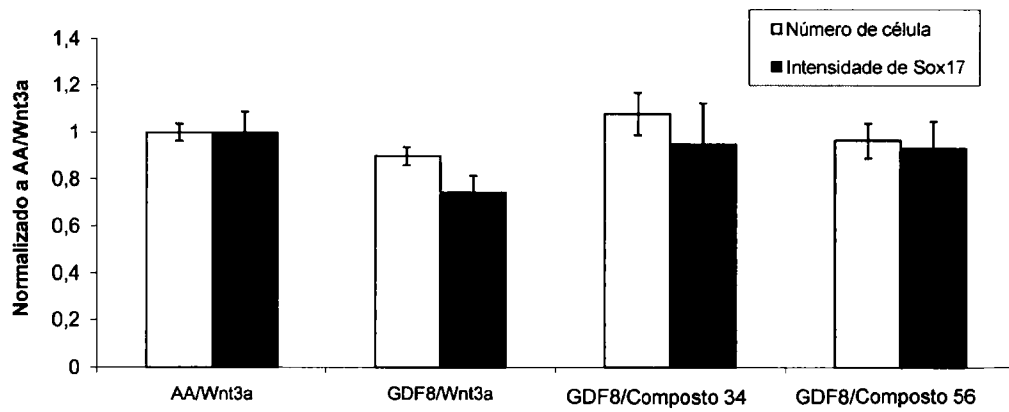


Figura 5

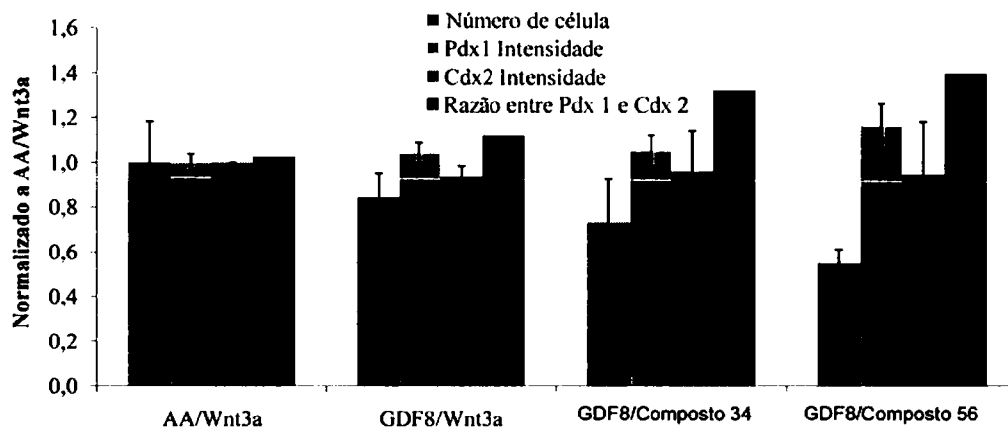


Figura 6

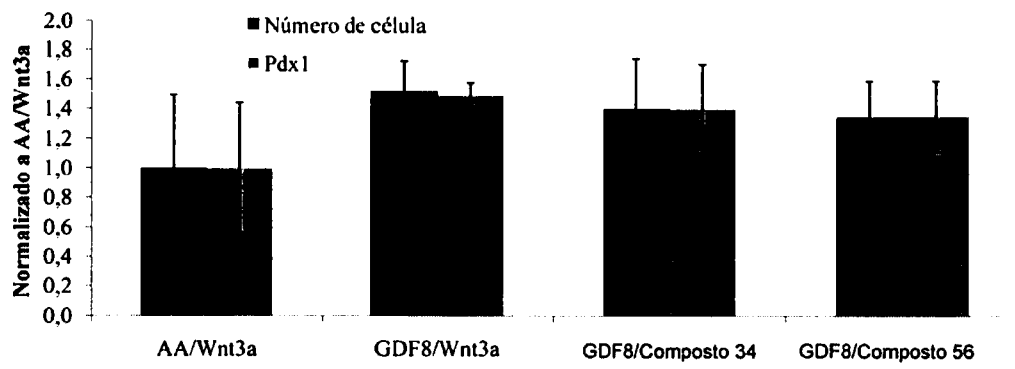


Figura 7

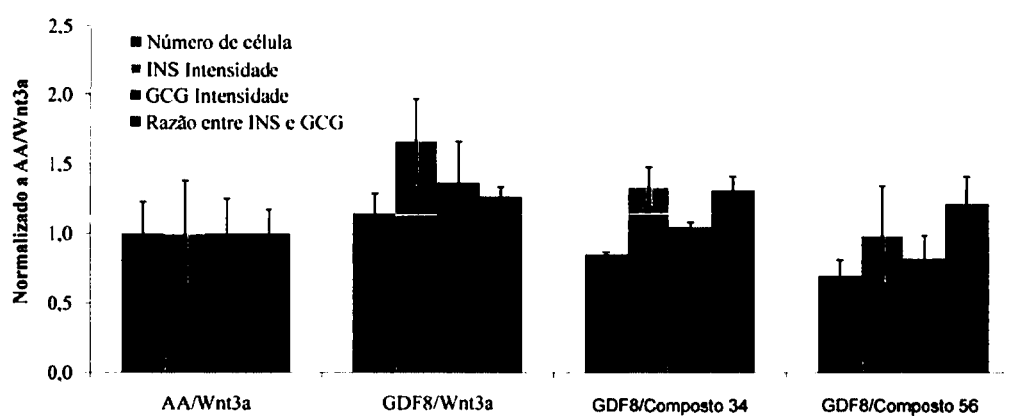


Figura 8A

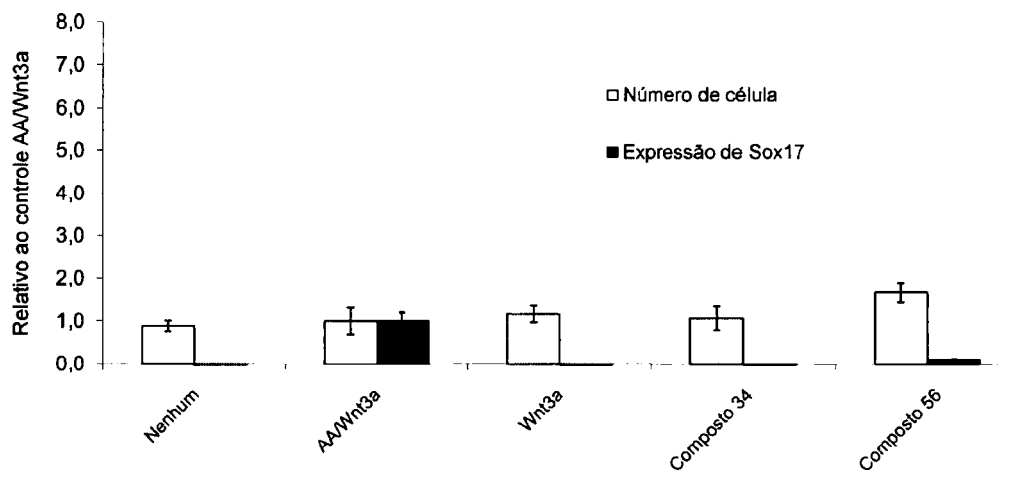


Figura 8B

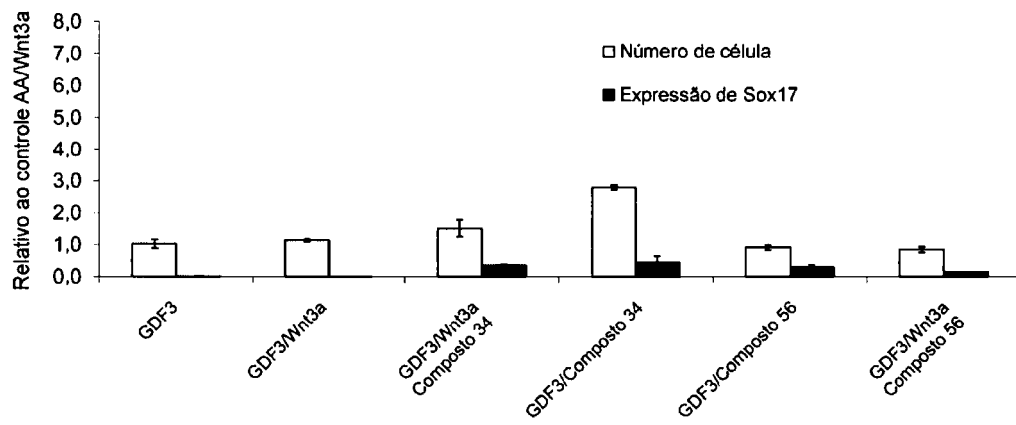


Figura 8C

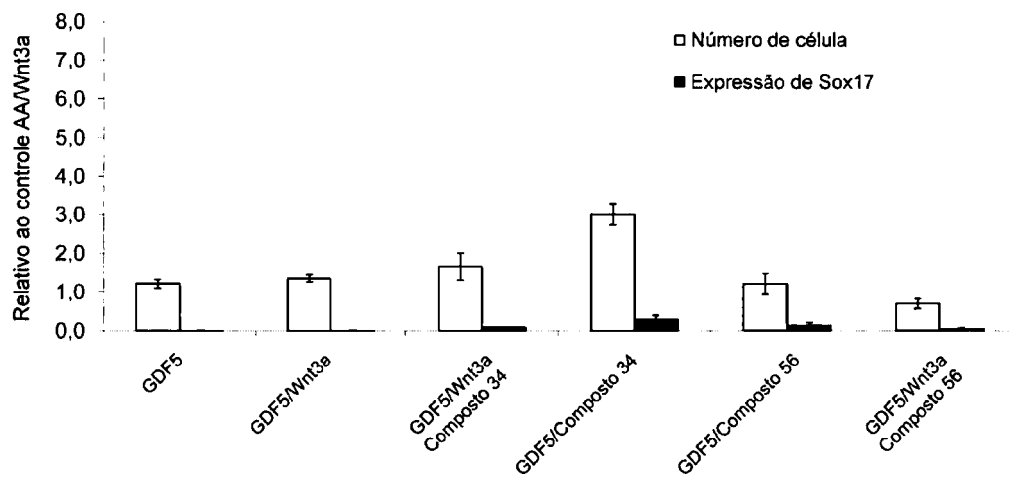


Figura 8D

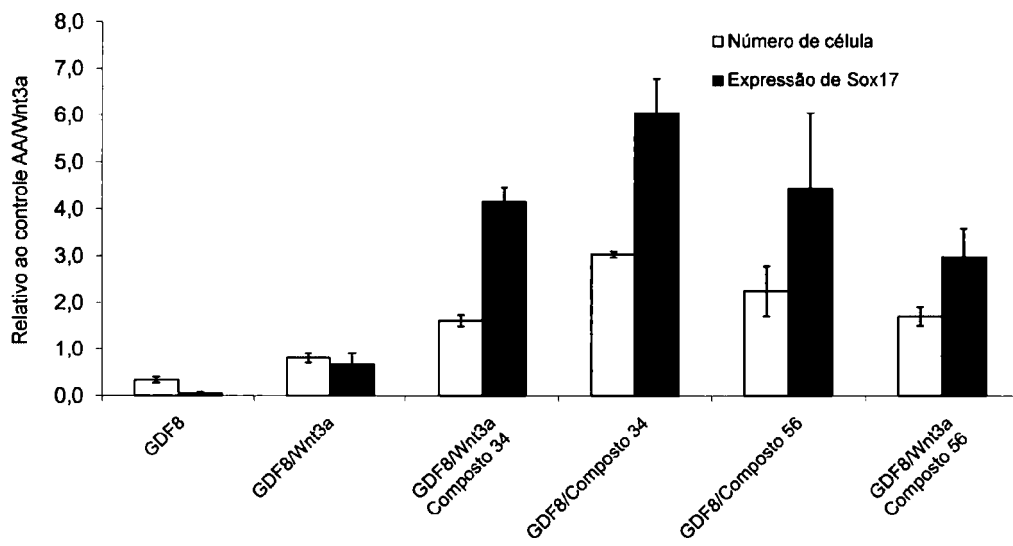


Figura 8E

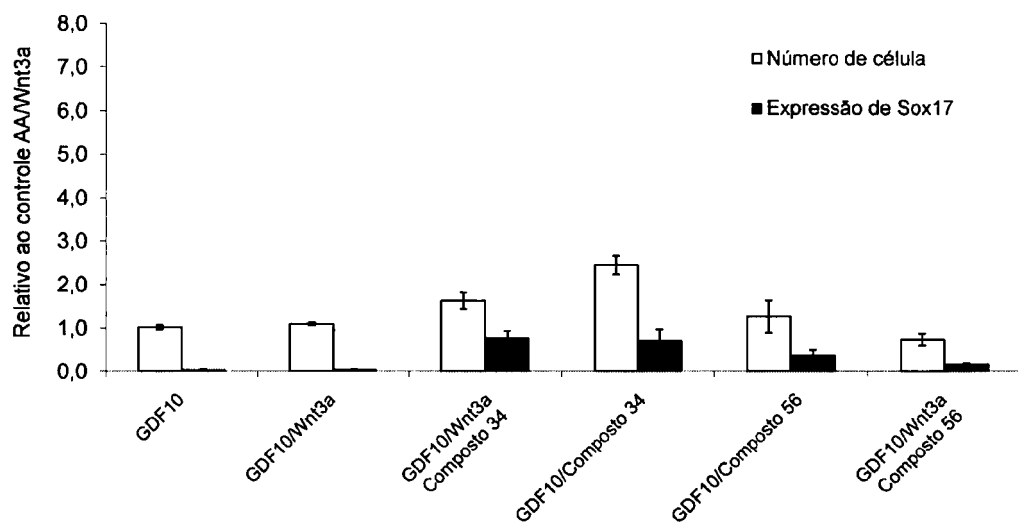


Figura 8F

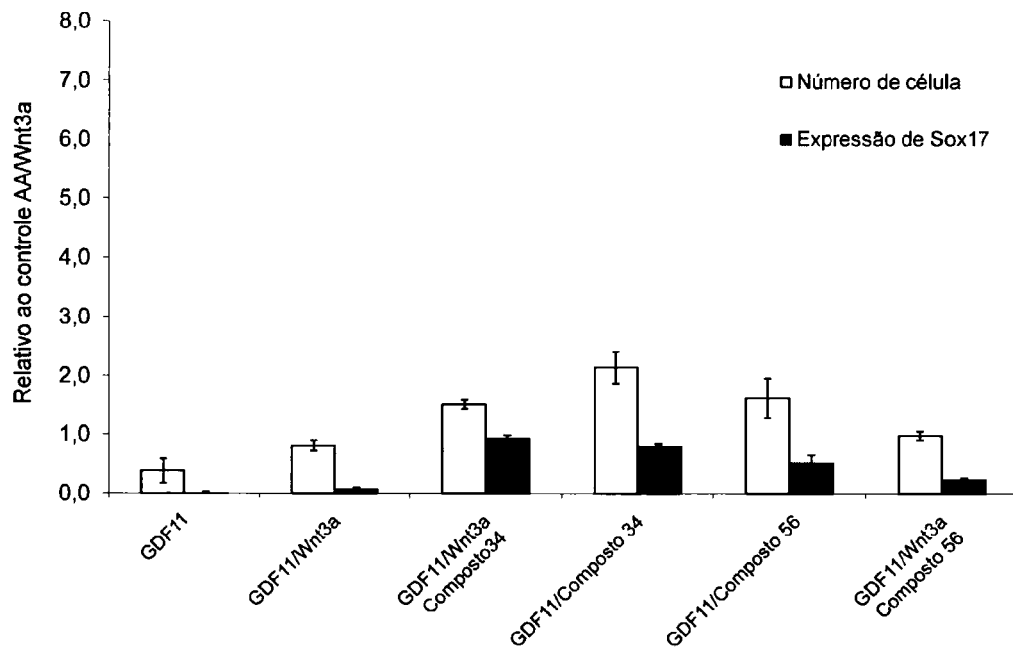


Figura 8G

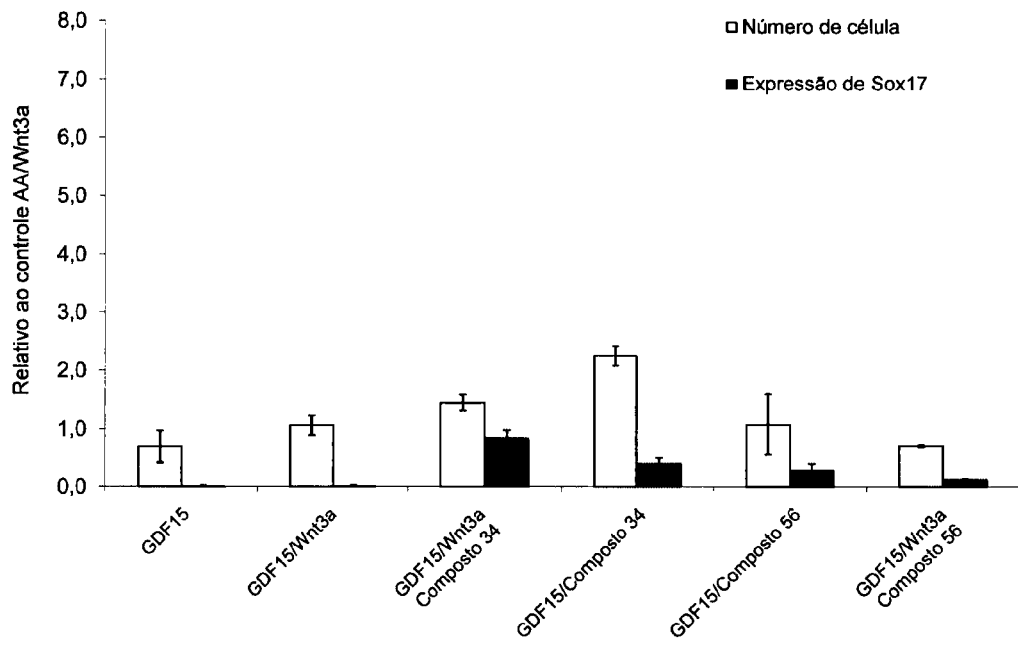


Figura 9A

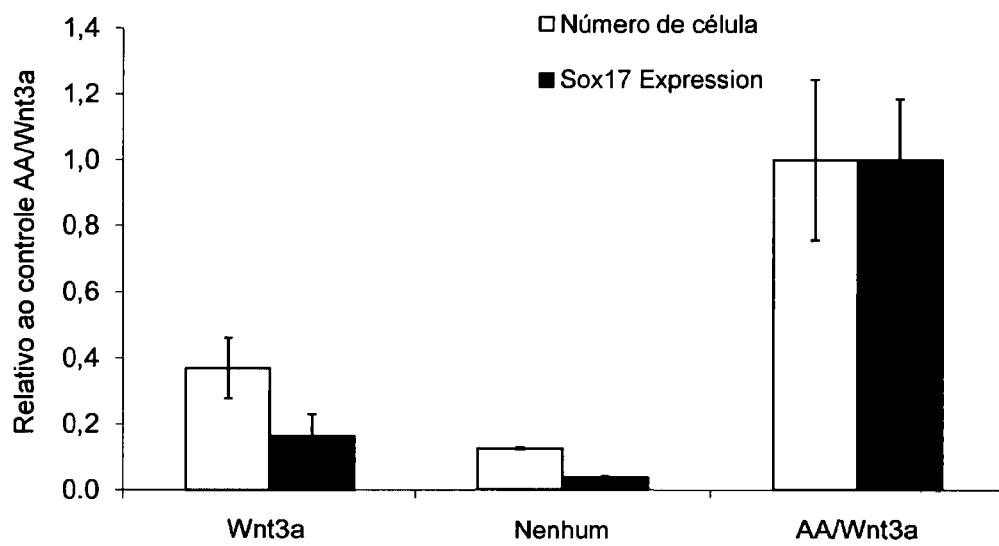


Figura 9B

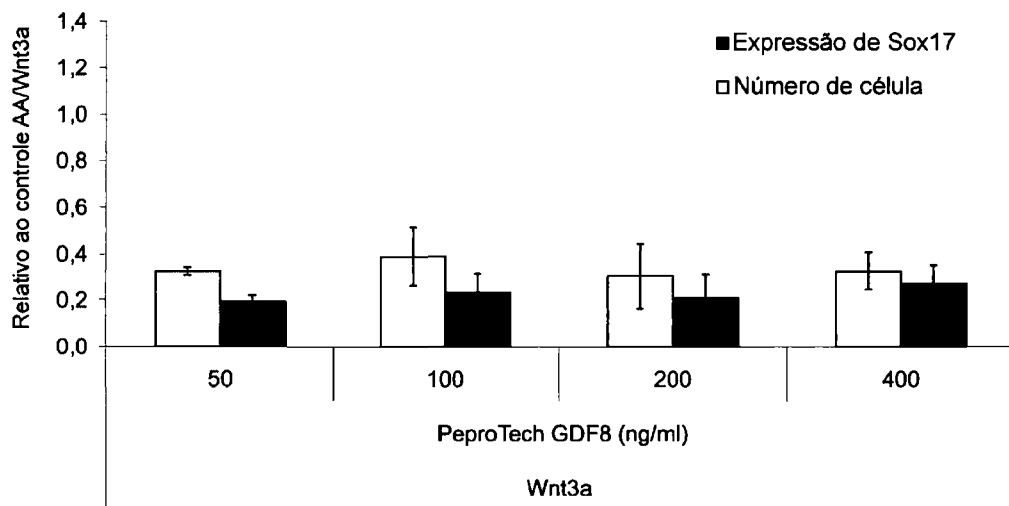


Figura 9C

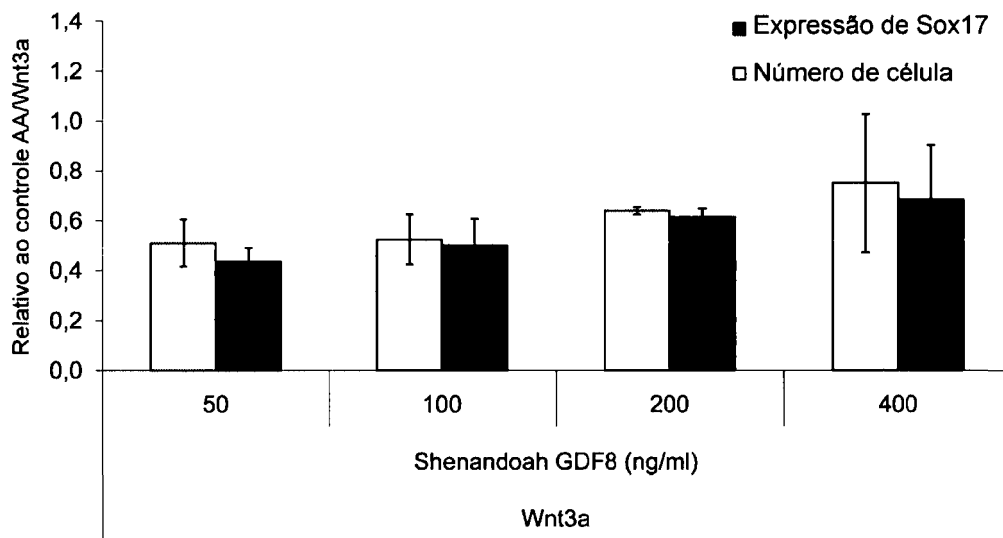


Figura 9D

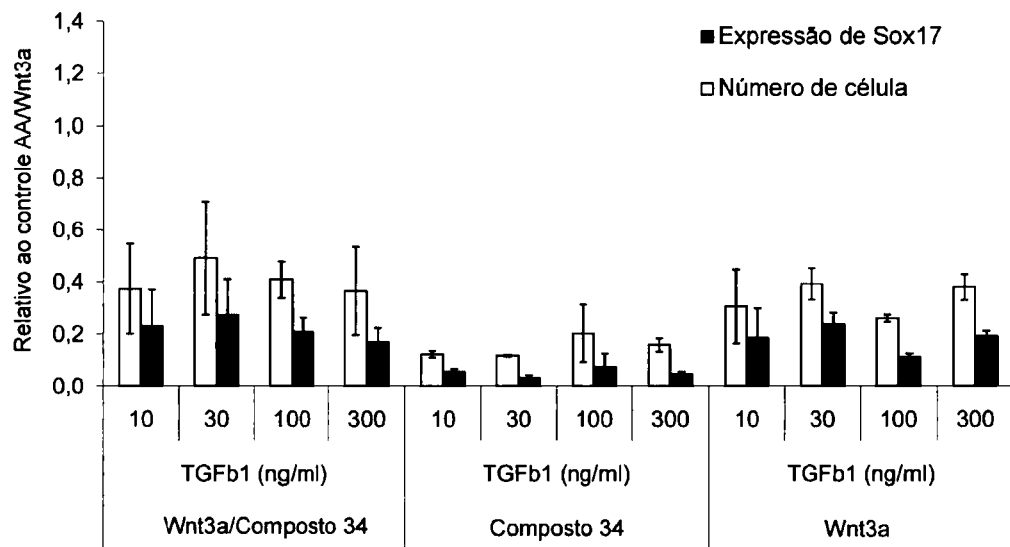


Figura 9E

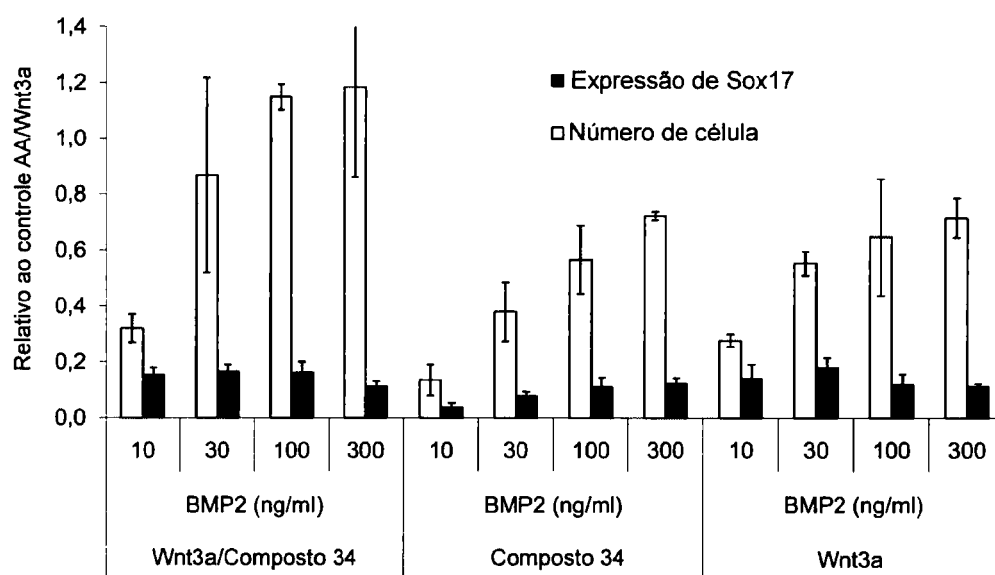


Figura 9F

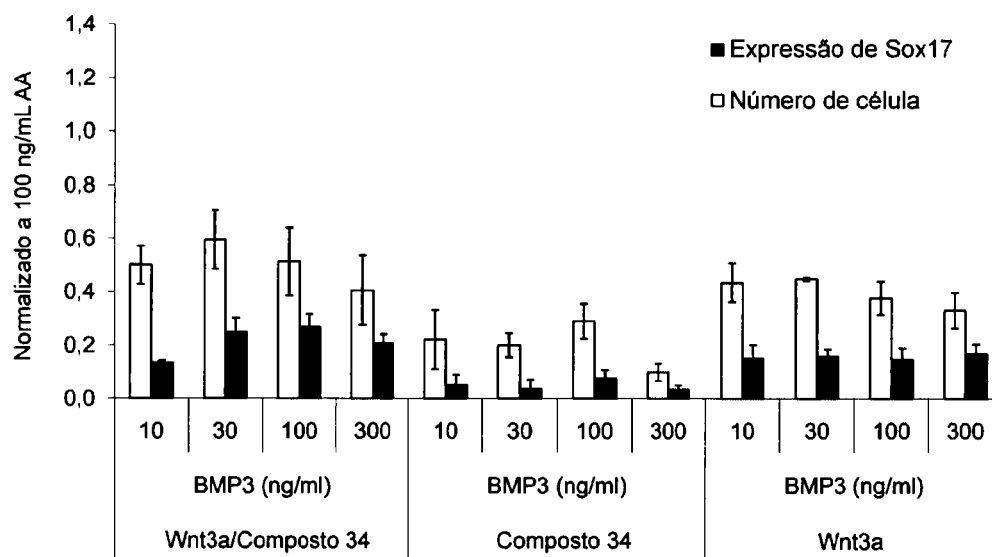


Figura 9G

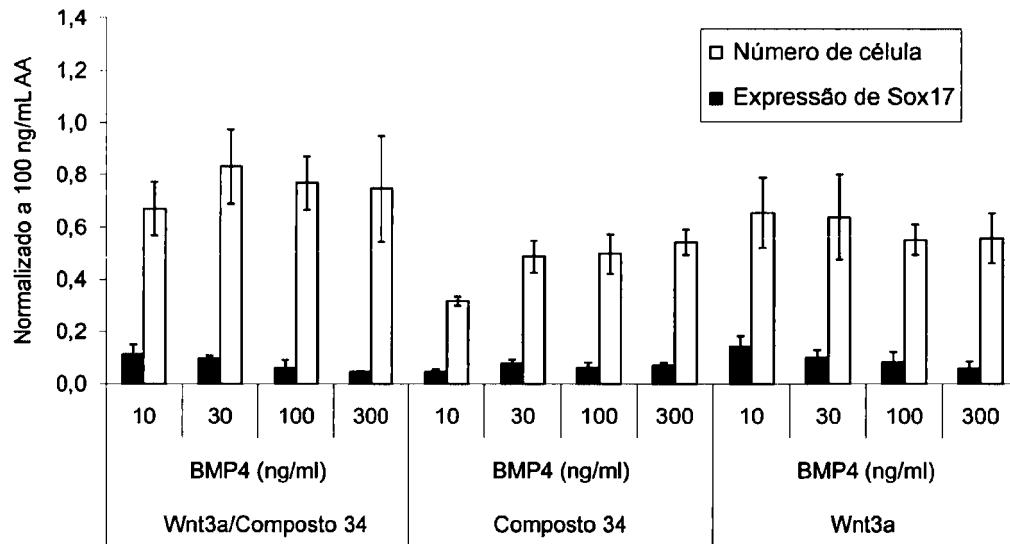


Figura 10

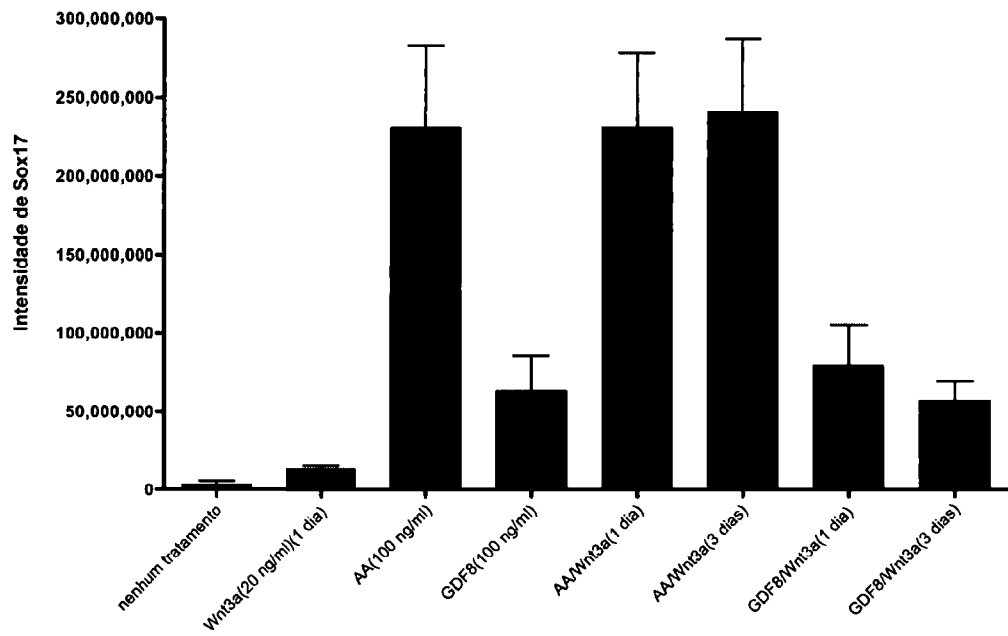


Figura 11A

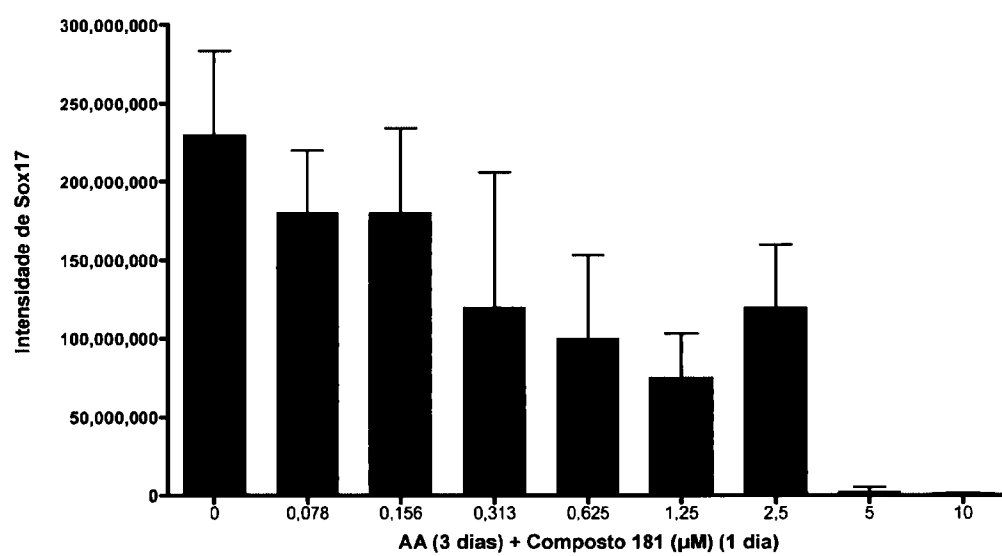


Figura 11B

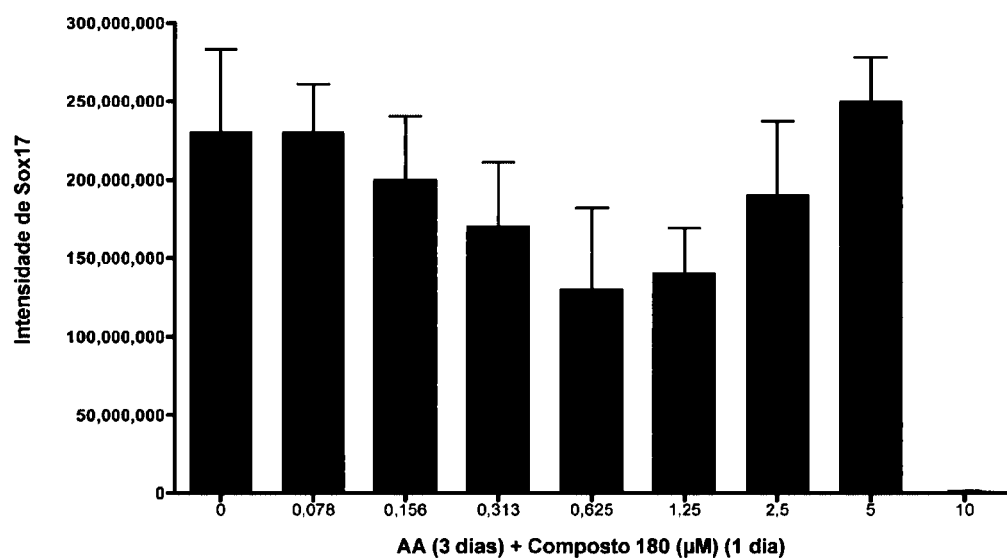


Figura 11C

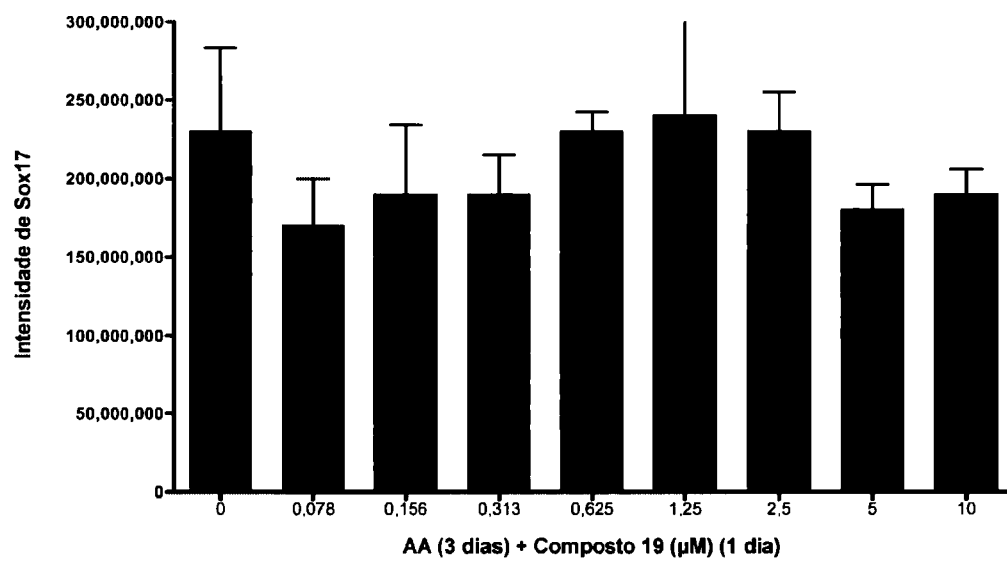


Figura 11D

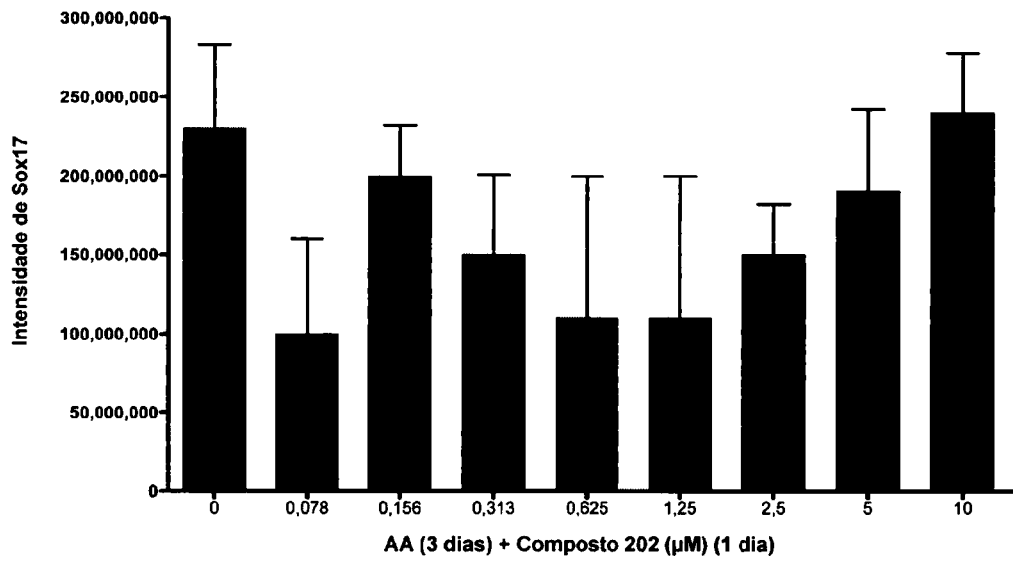


Figura 11E

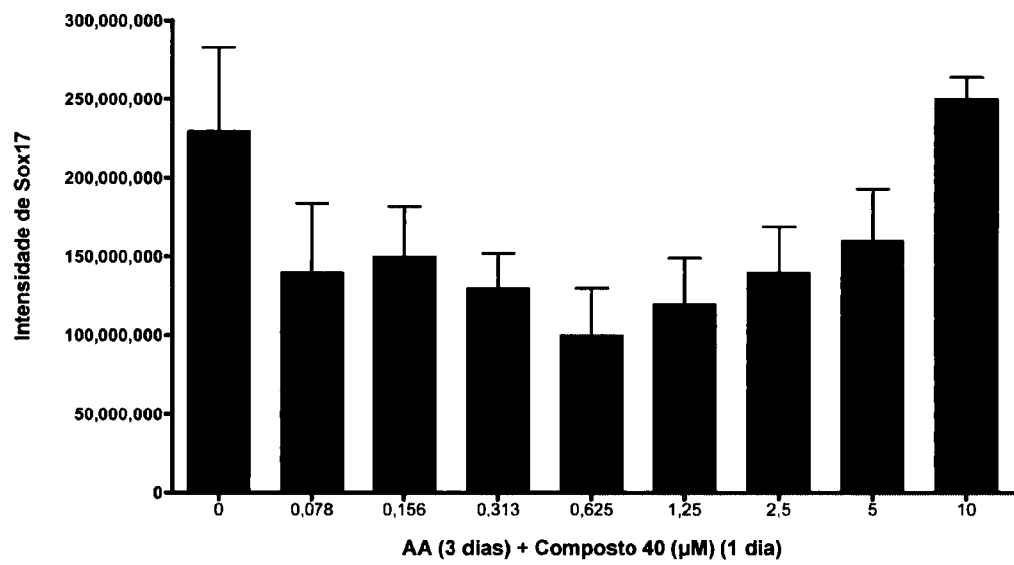


Figura 11F

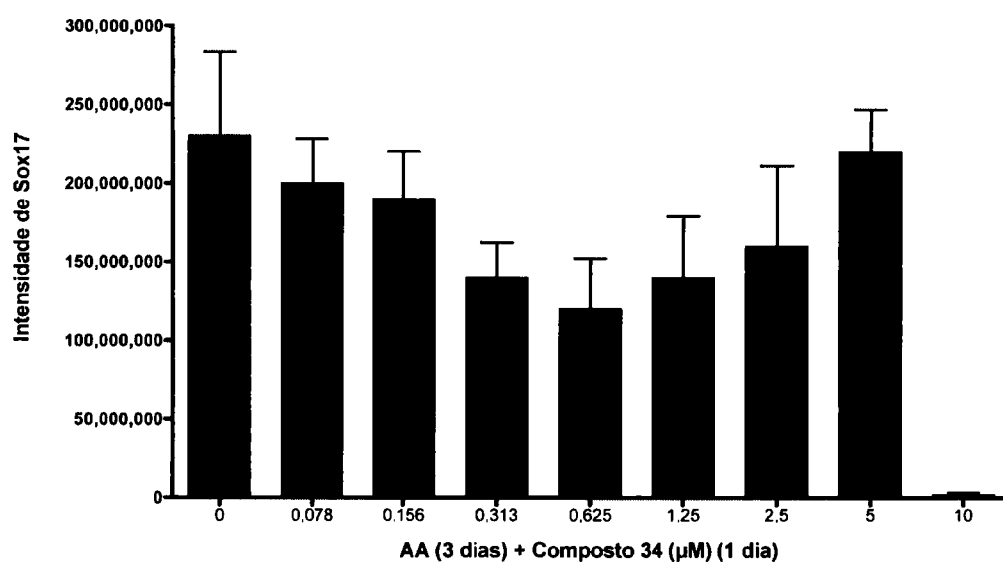


Figura 11G

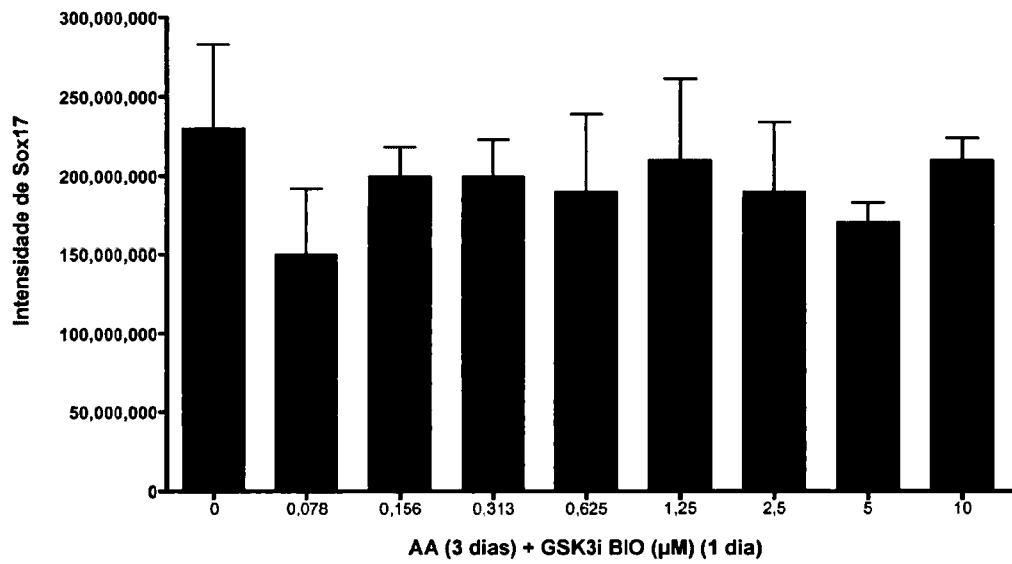


Figura 12A

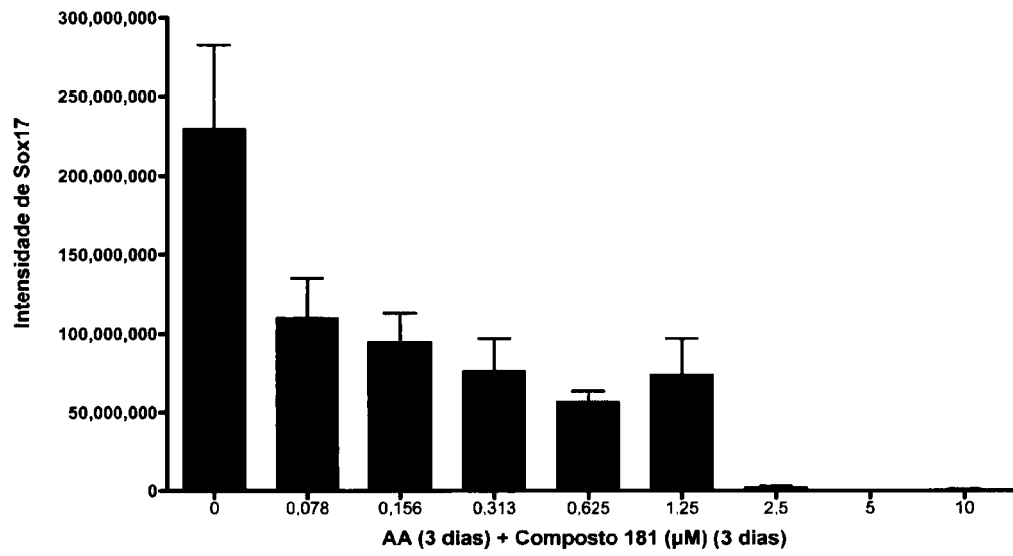


Figura 12B

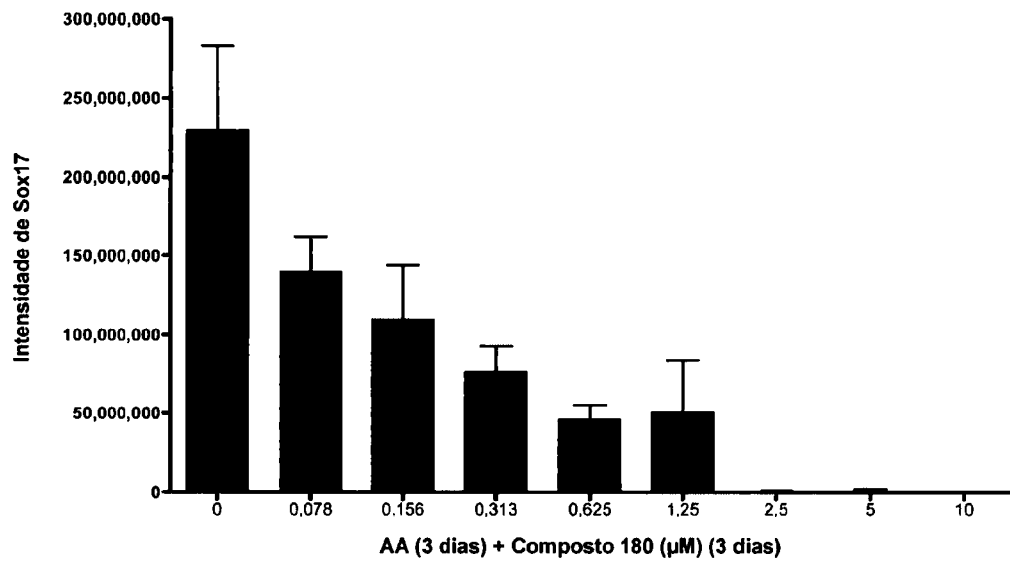


Figura 12C

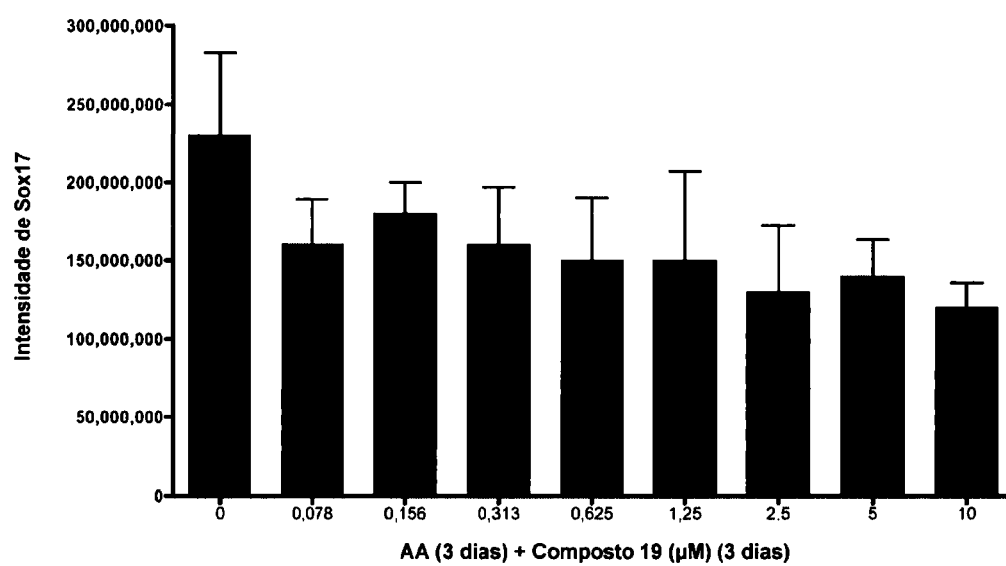


Figura 12D

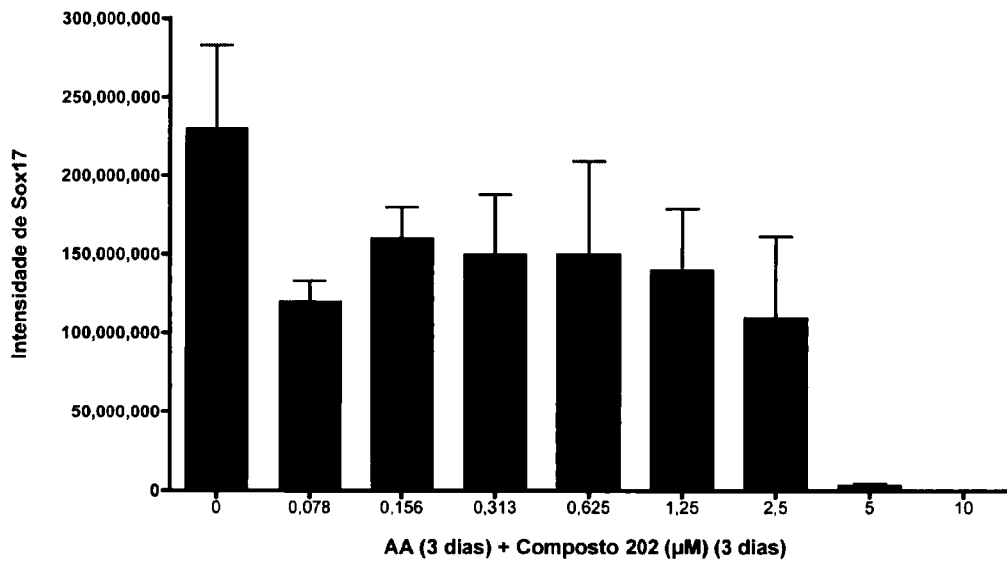


Figura 12E

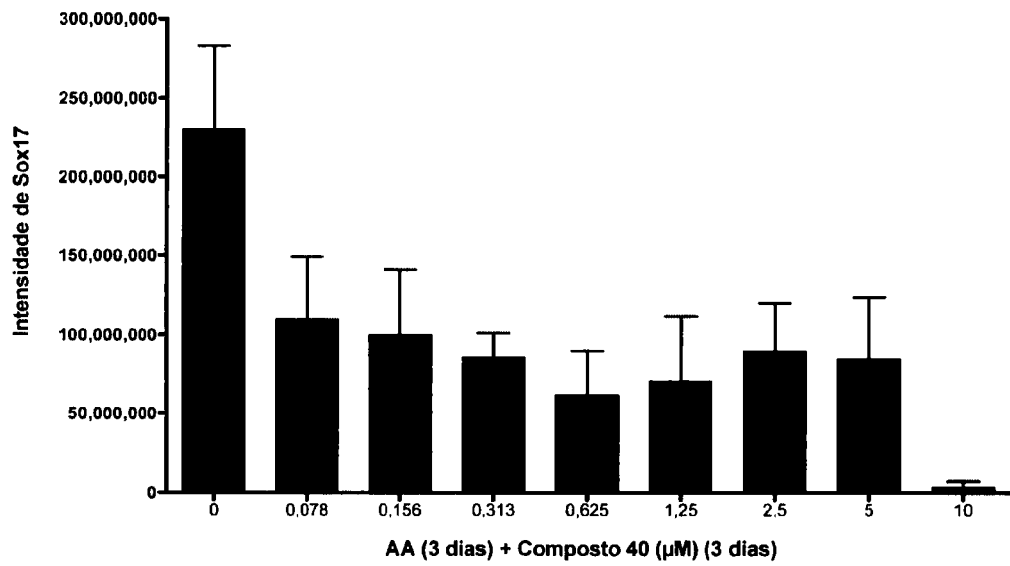


Figura 12F

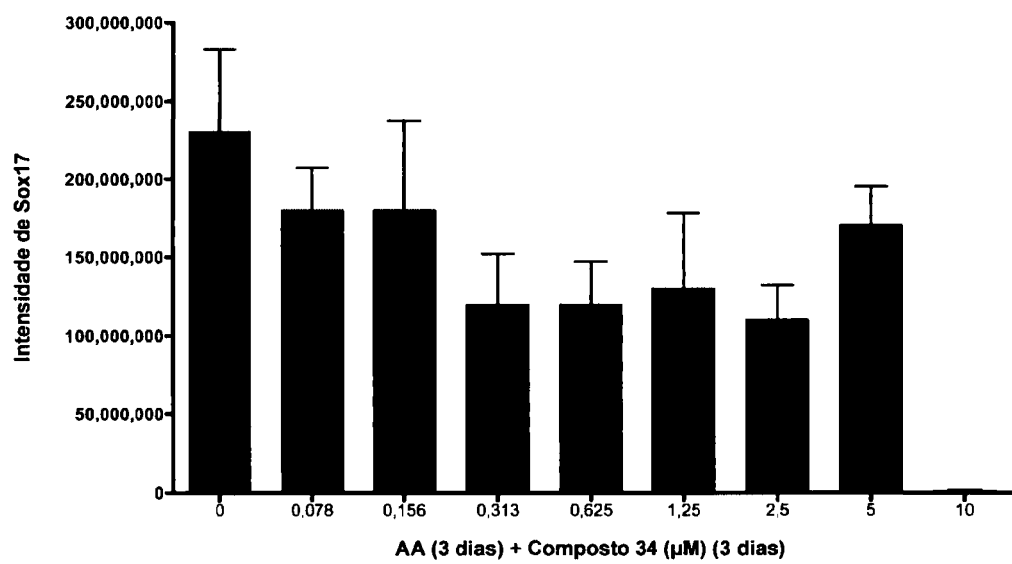


Figura 12G

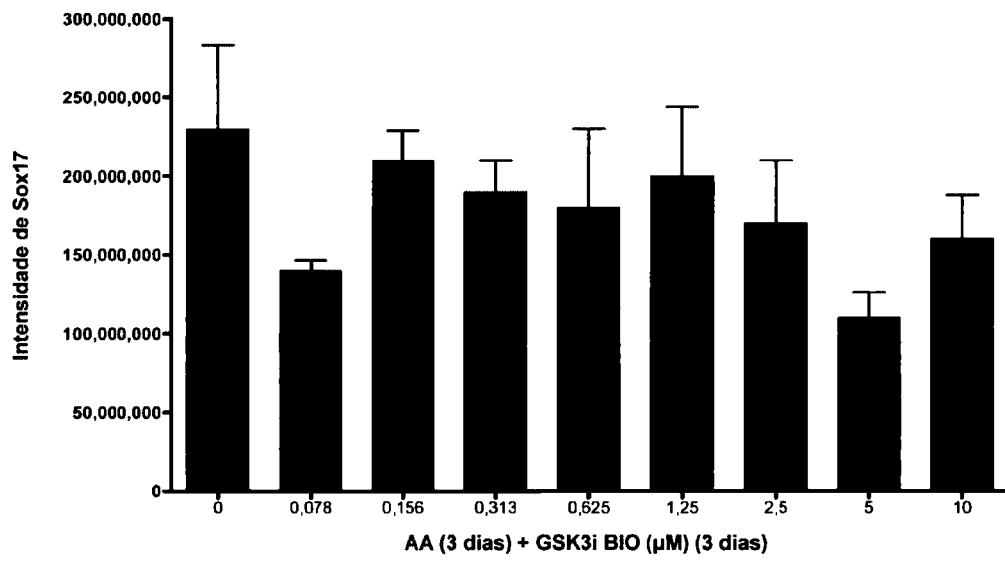


Figura 13A

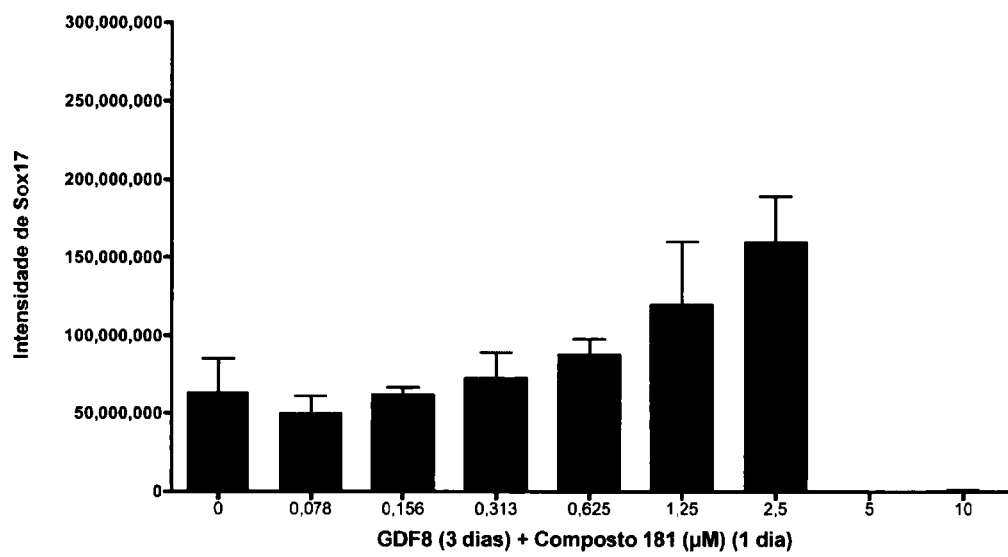


Figura 13B

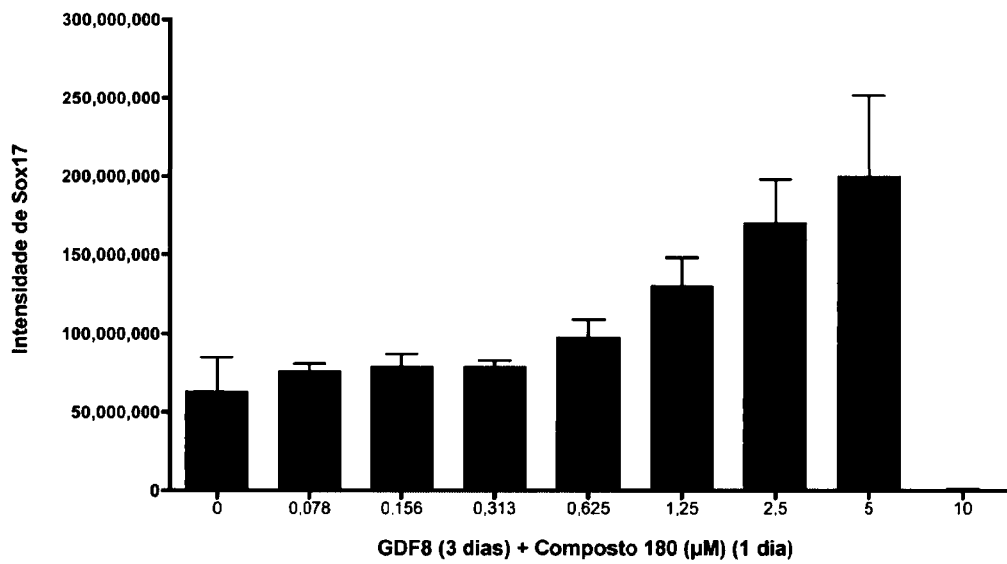


Figura 13C

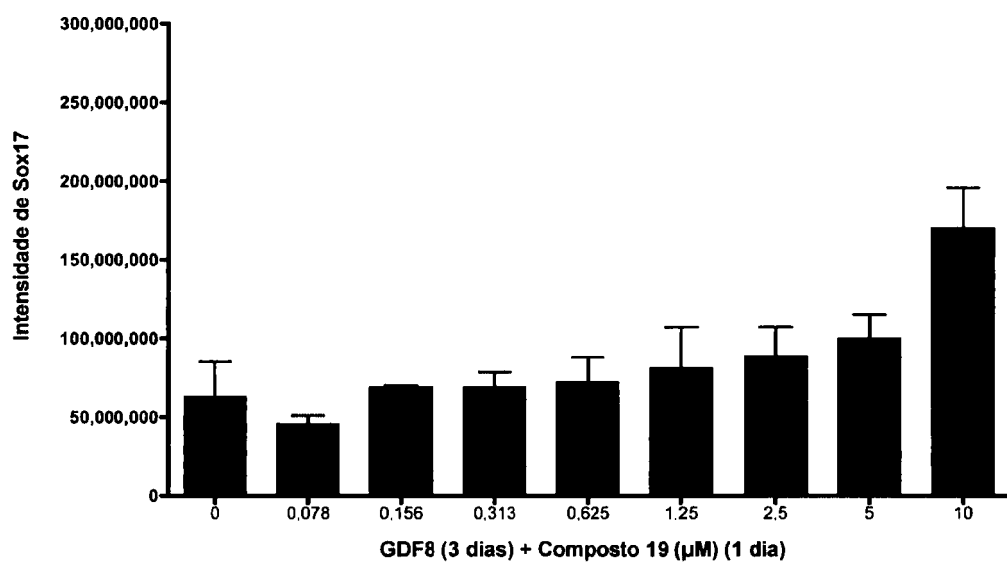


Figura 13D

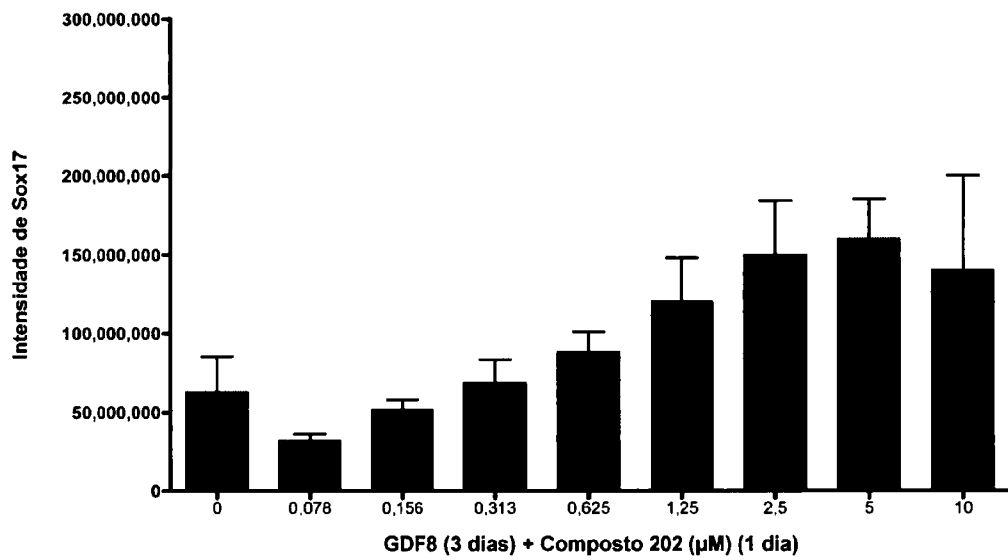


Figura 13E

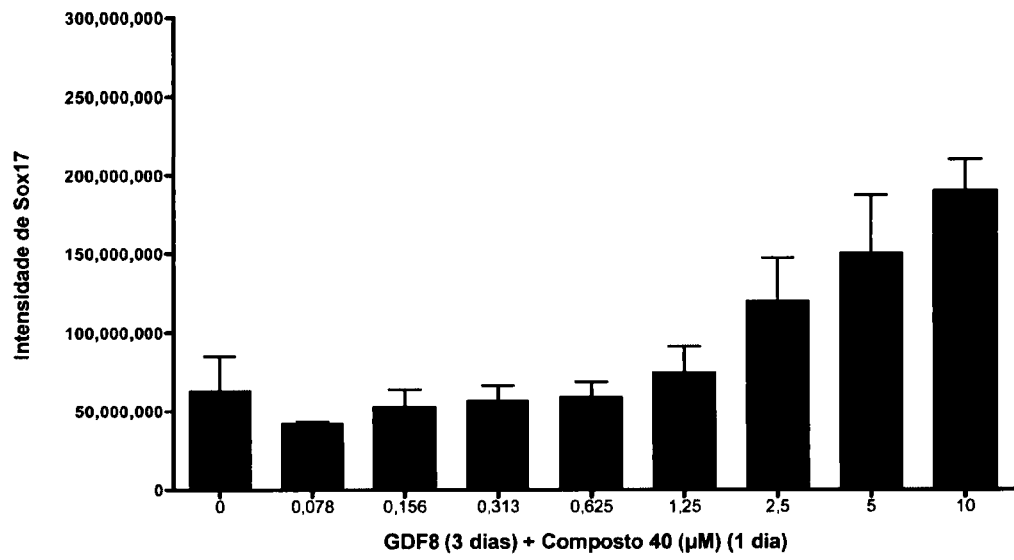


Figura 13F

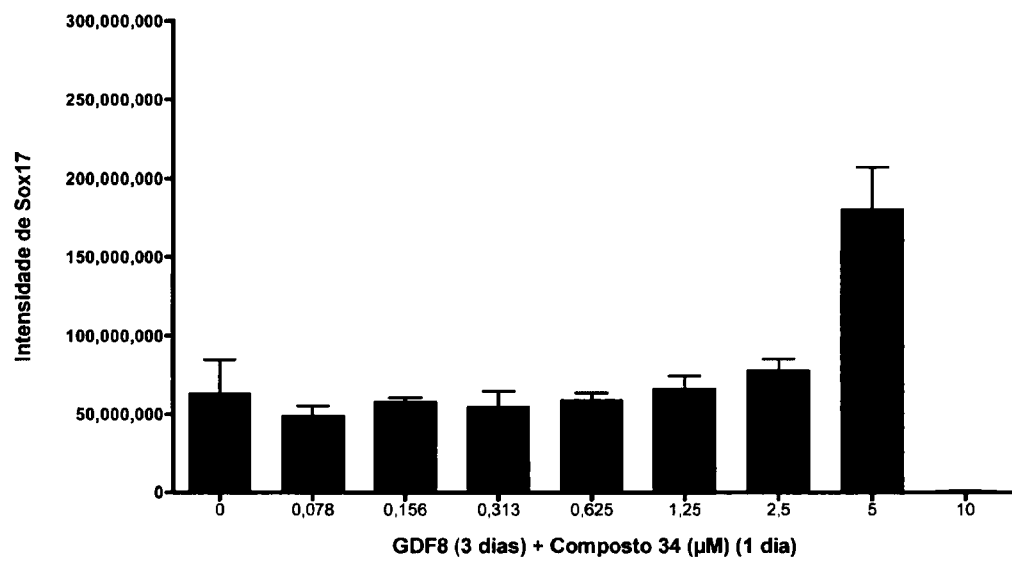


Figura 13G

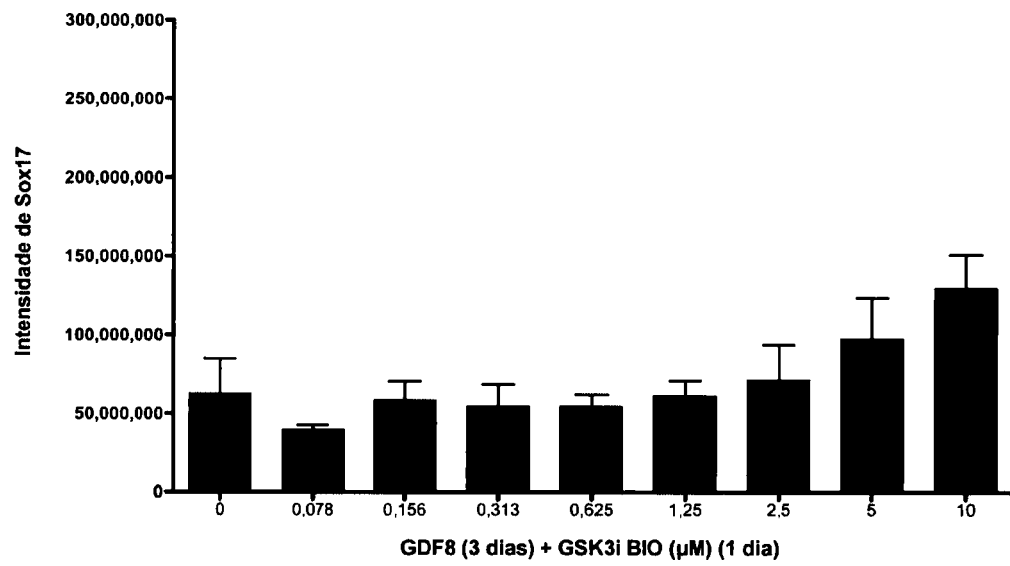


Figura 14A

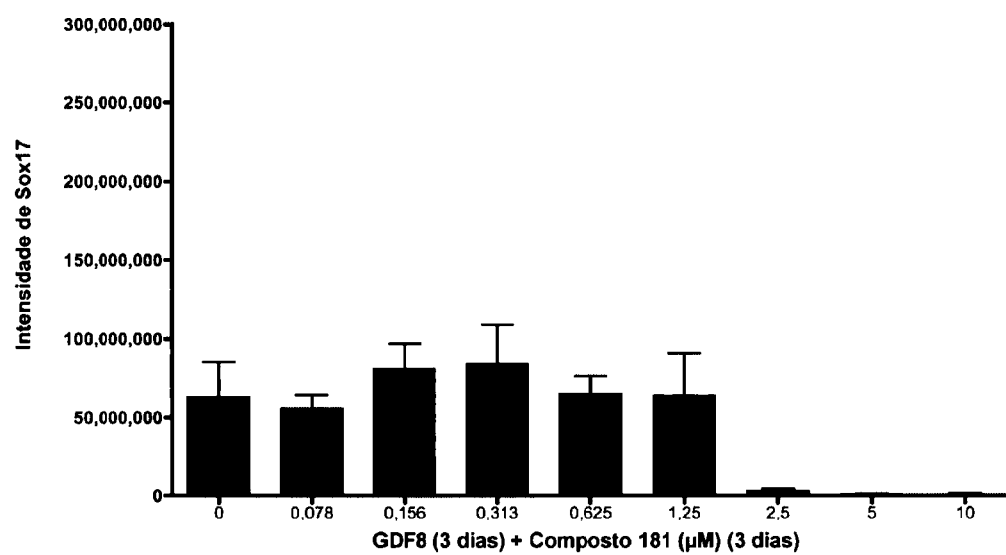


Figura 14B

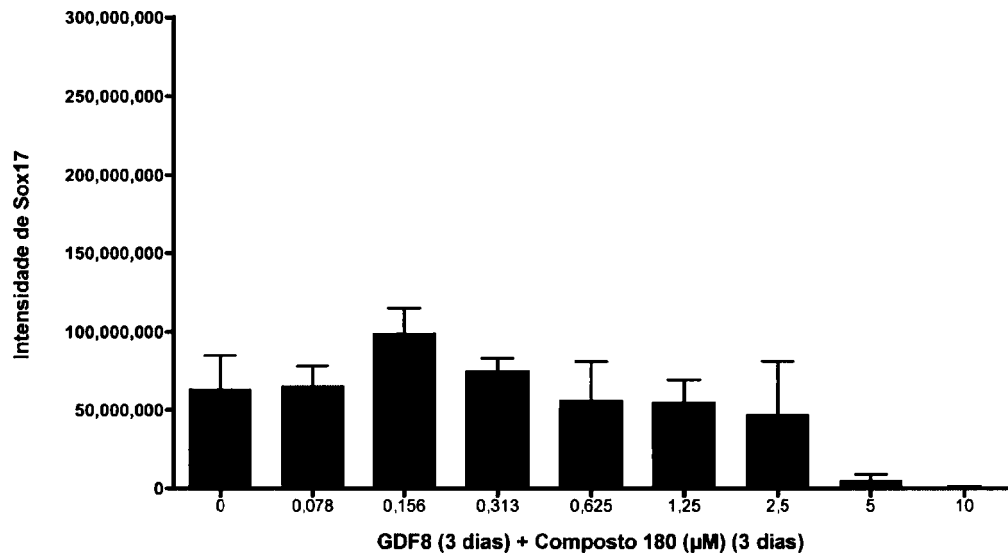


Figura 14C

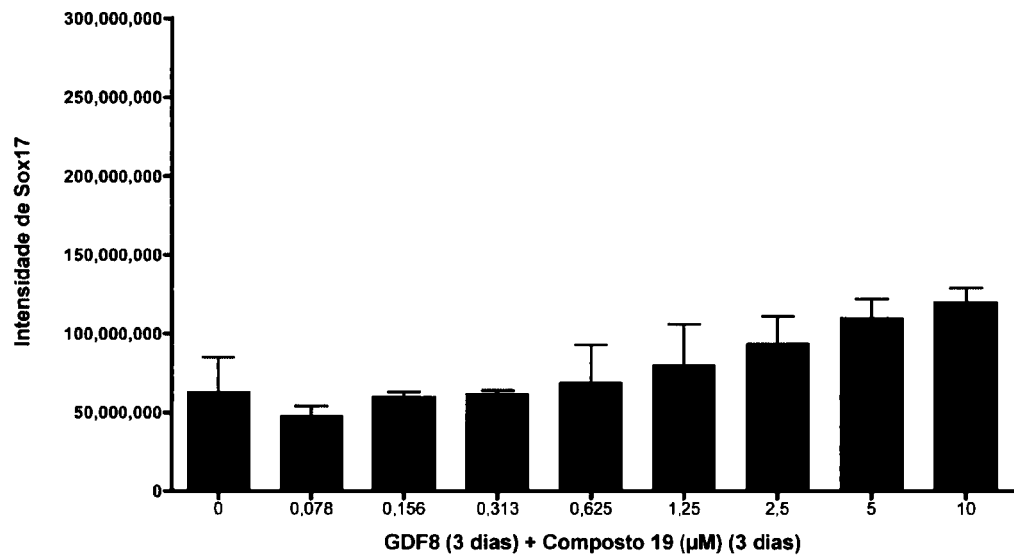


Figura 14D

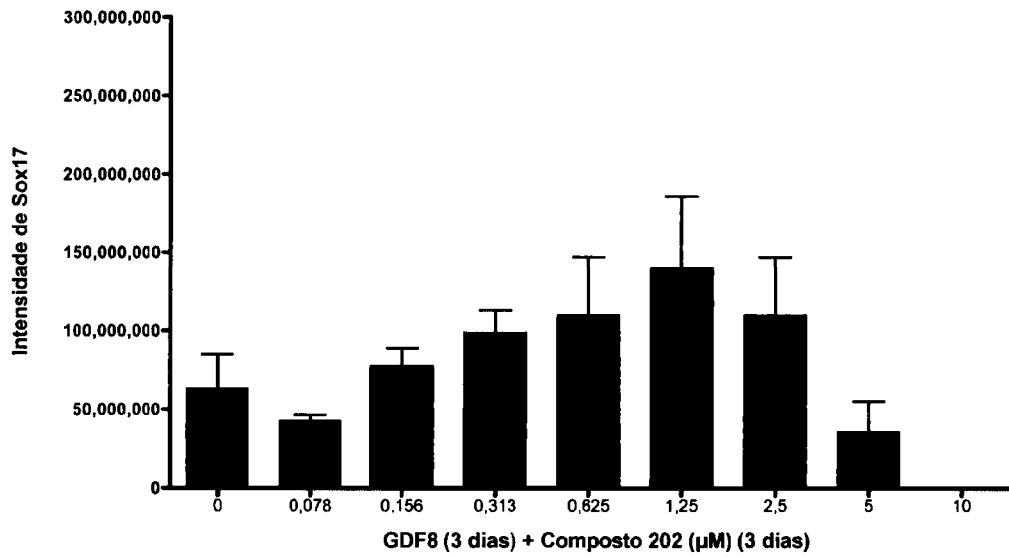


Figura 14E

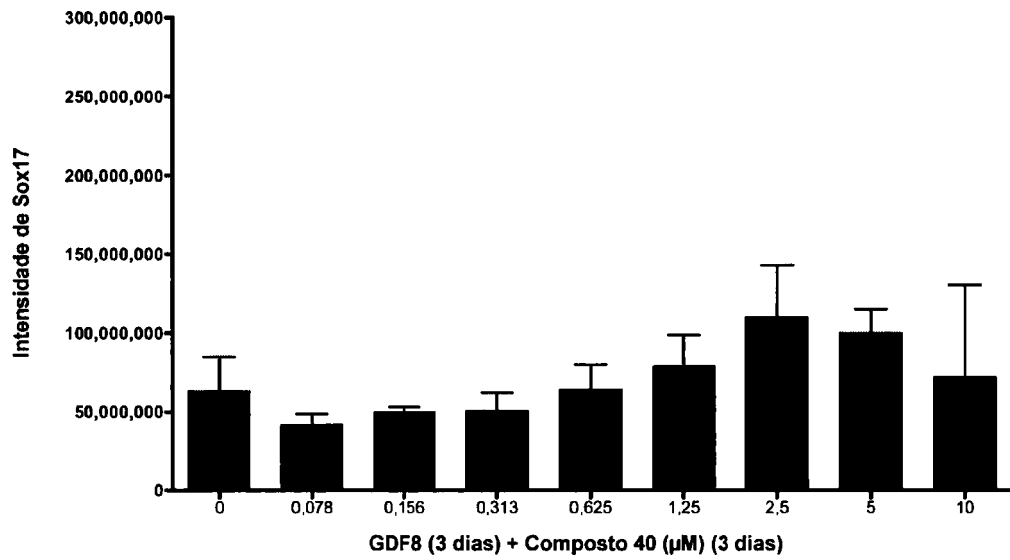


Figura 14F

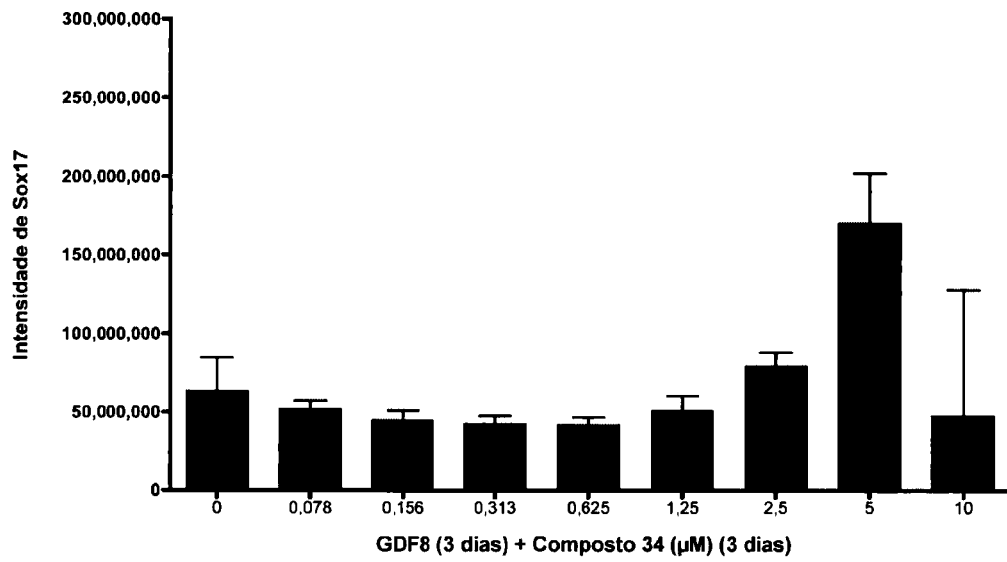


Figura 14G

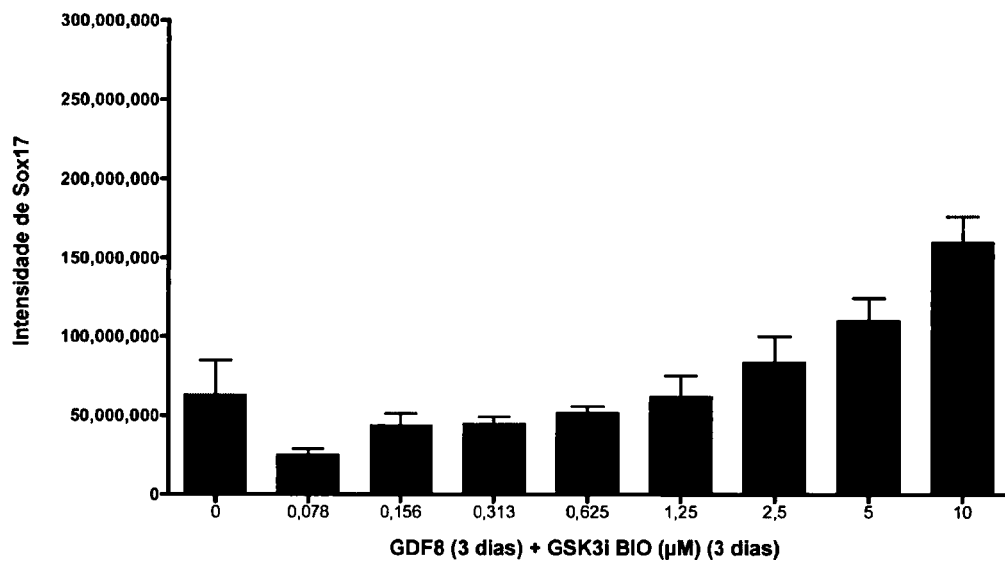


Figura 15

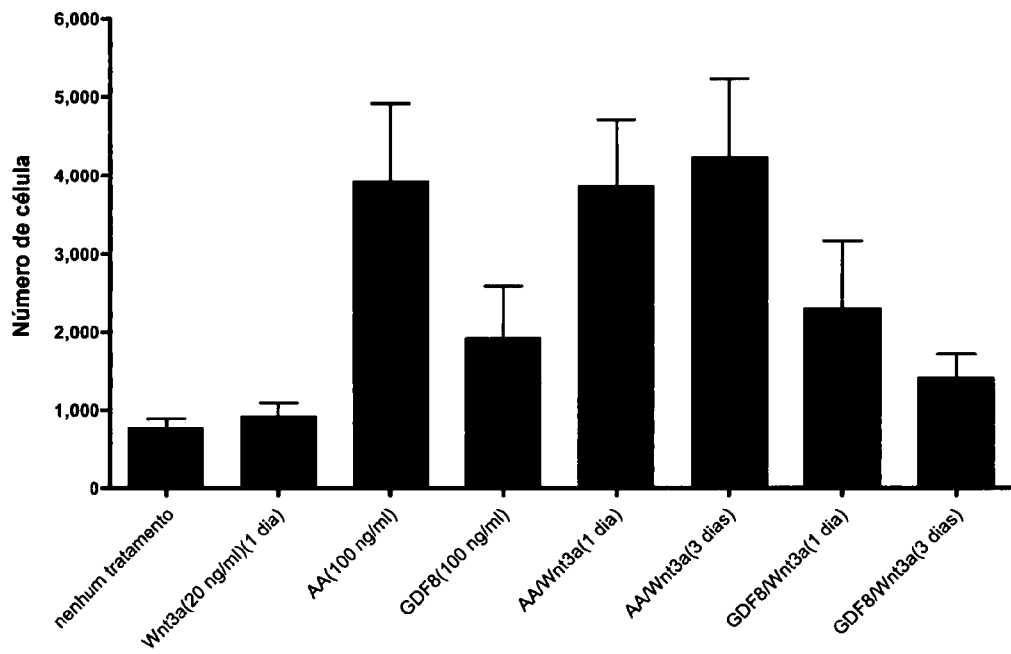


Figura 16A

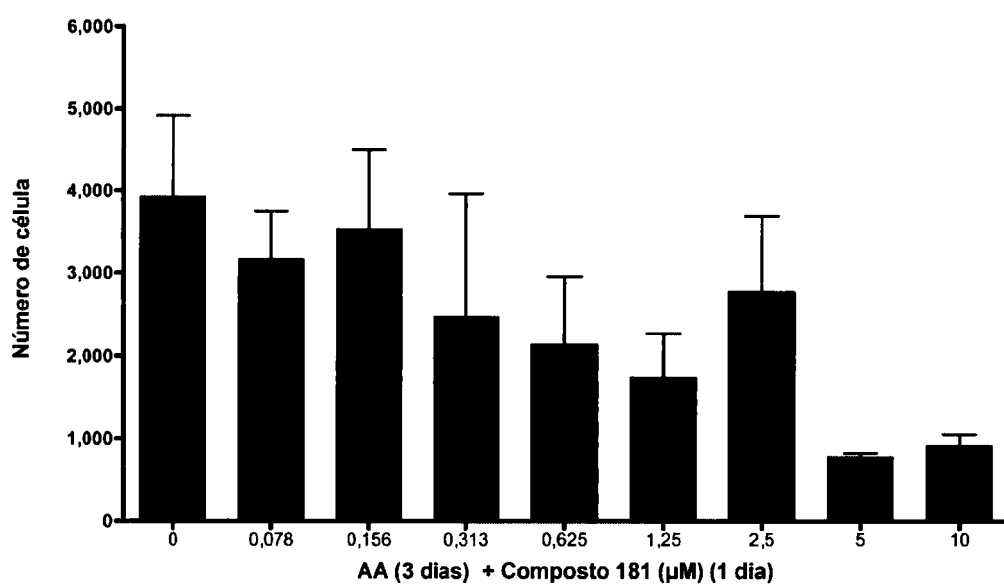


Figura 16B

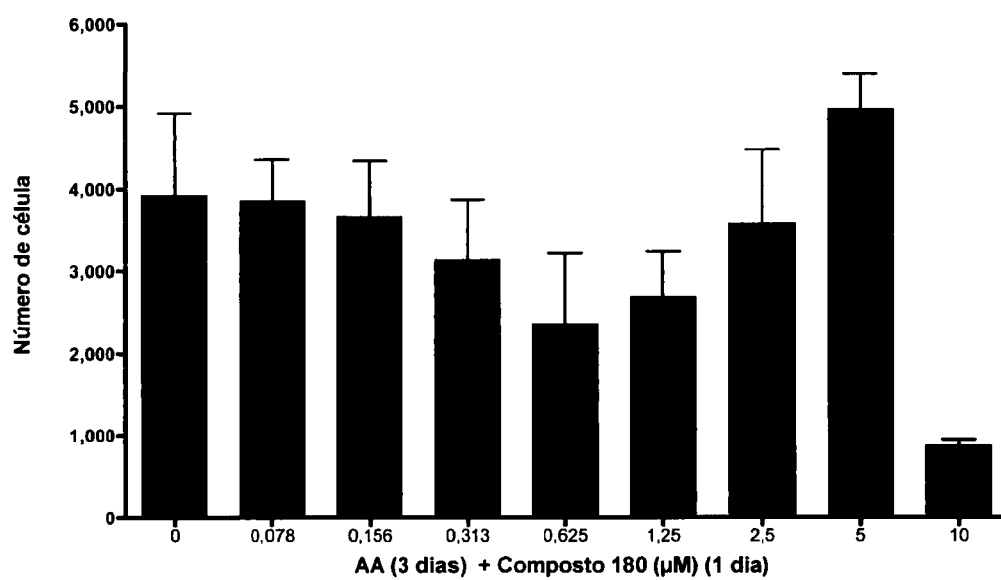


Figura 16C

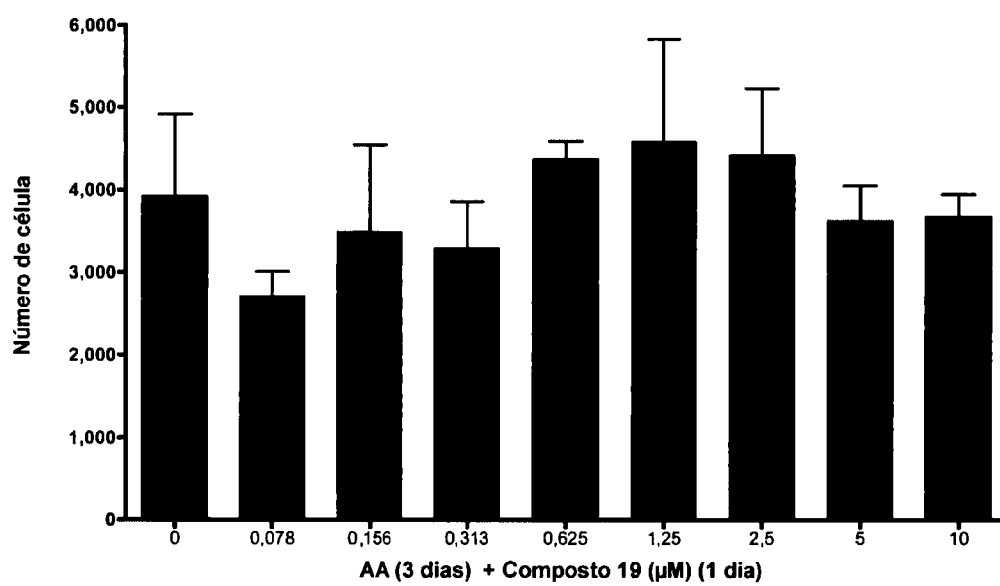


Figura 16D

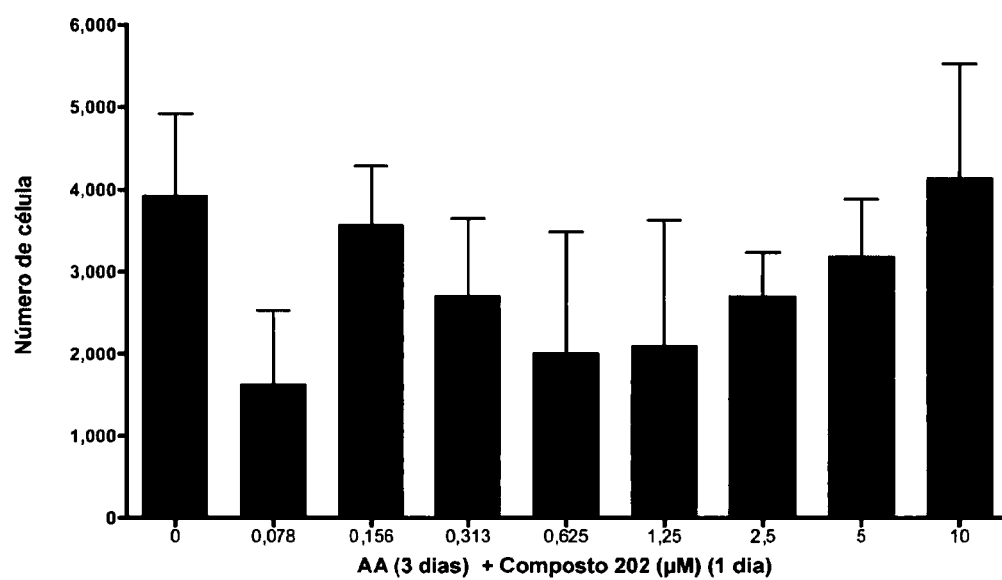


Figura 16E

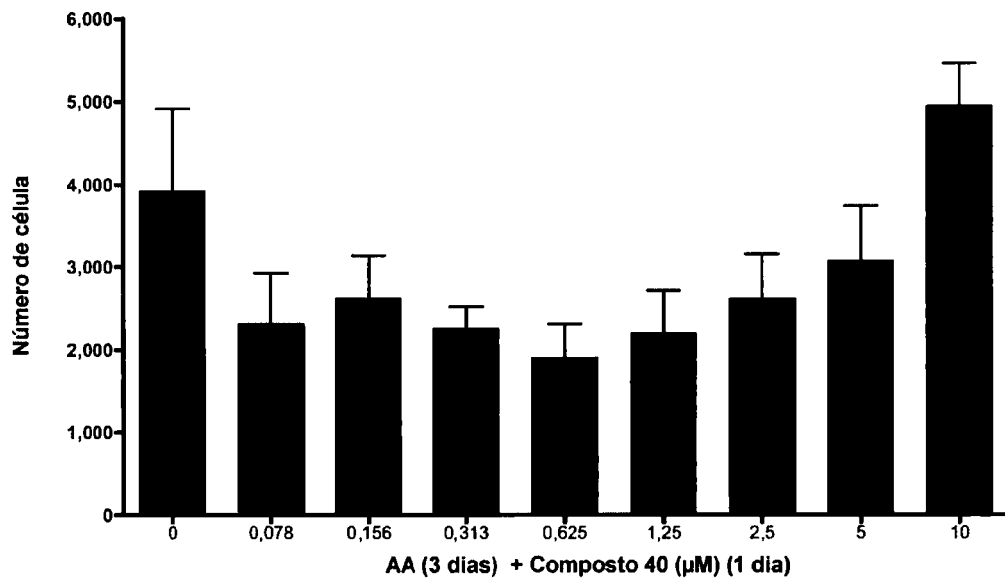


Figura 16F

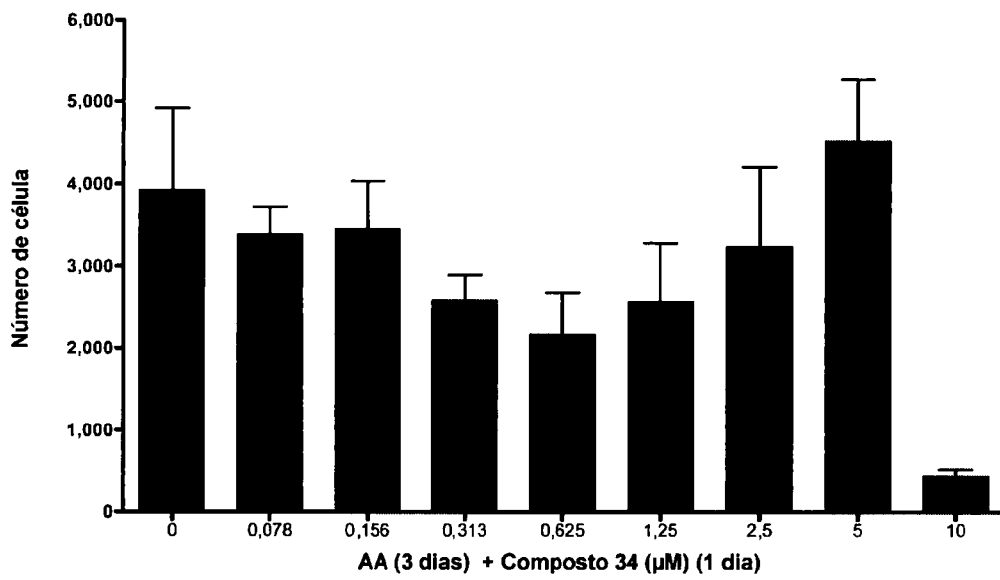


Figura 16G

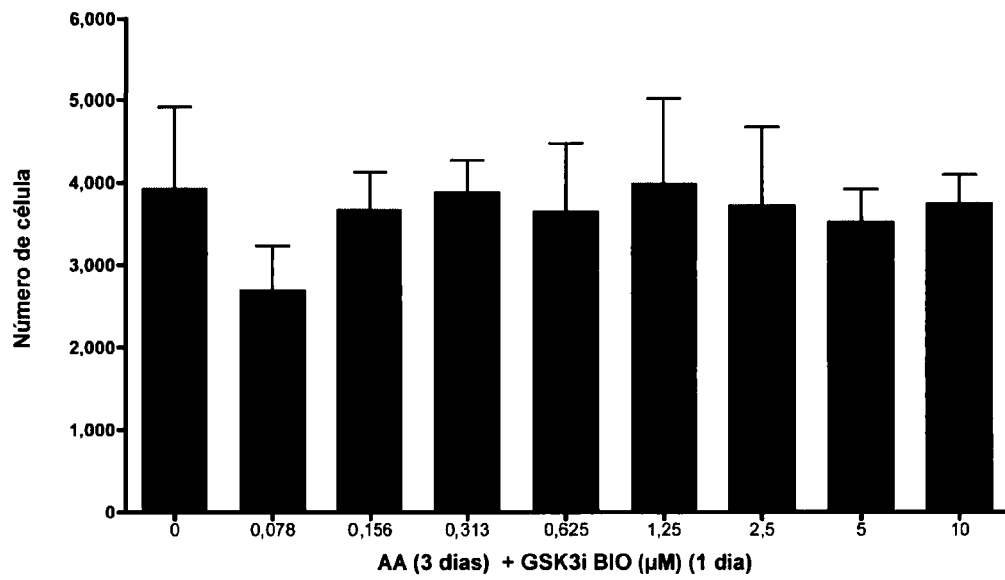


Figura 17A

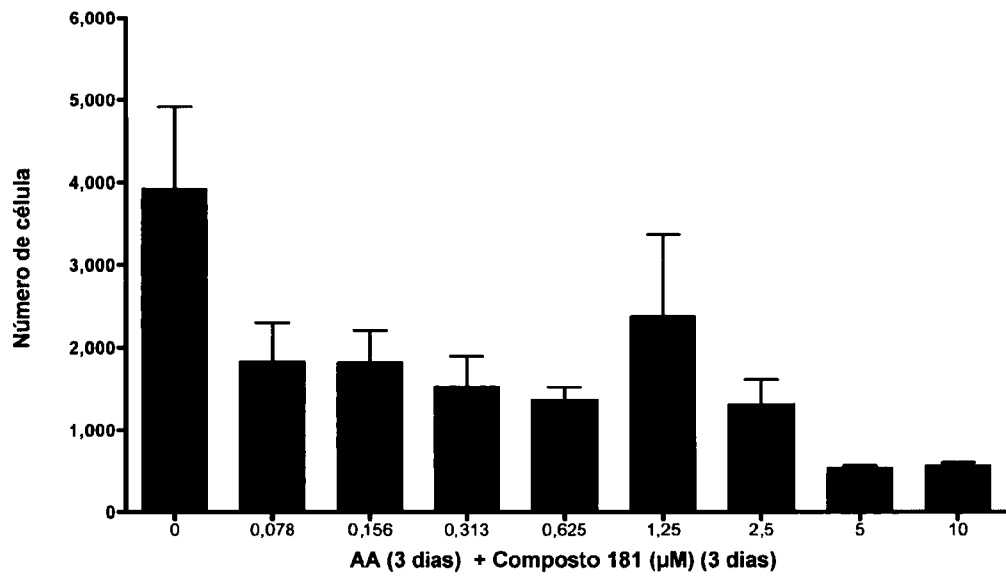


Figura 17B

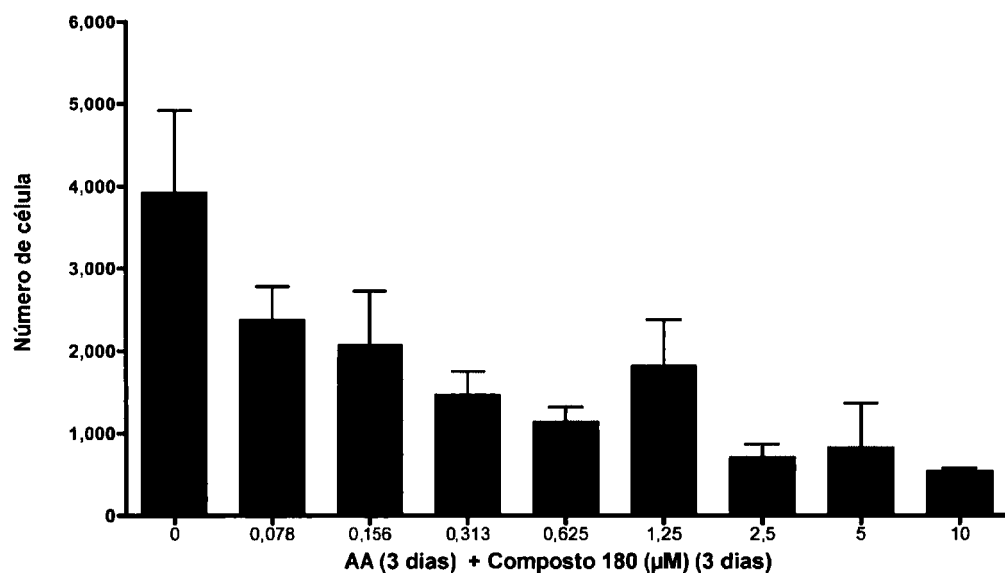


Figura 17C

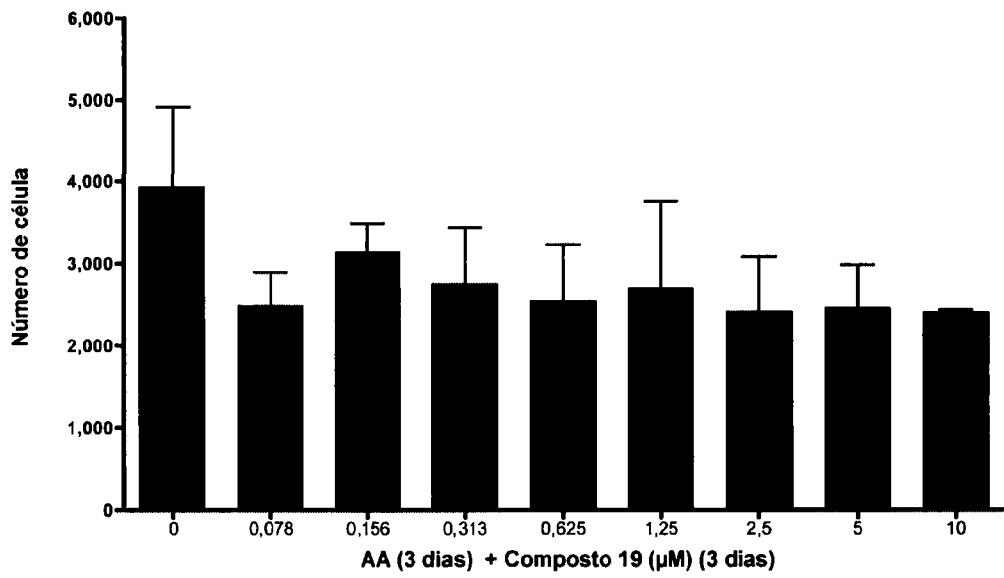


Figura 17D

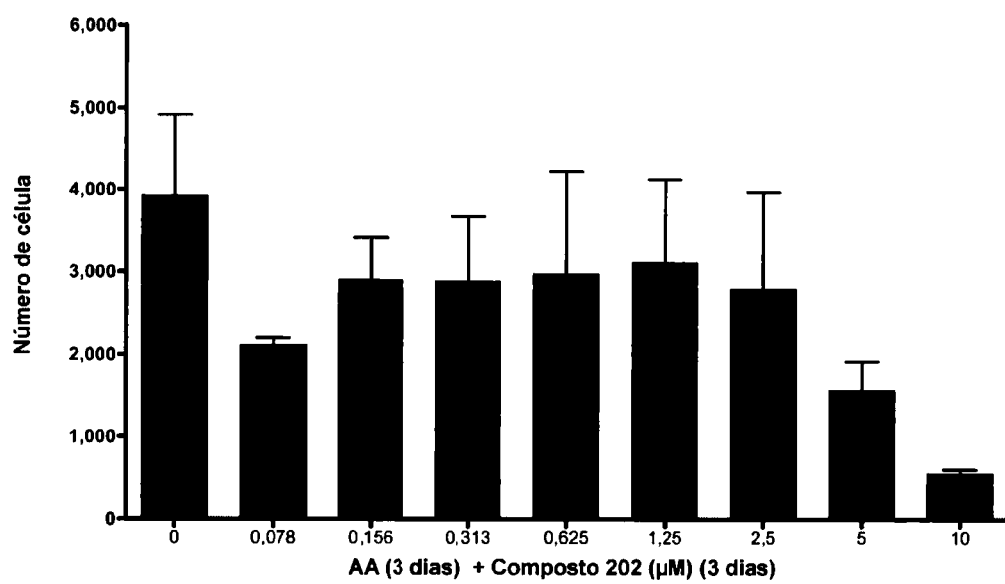


Figura 17E

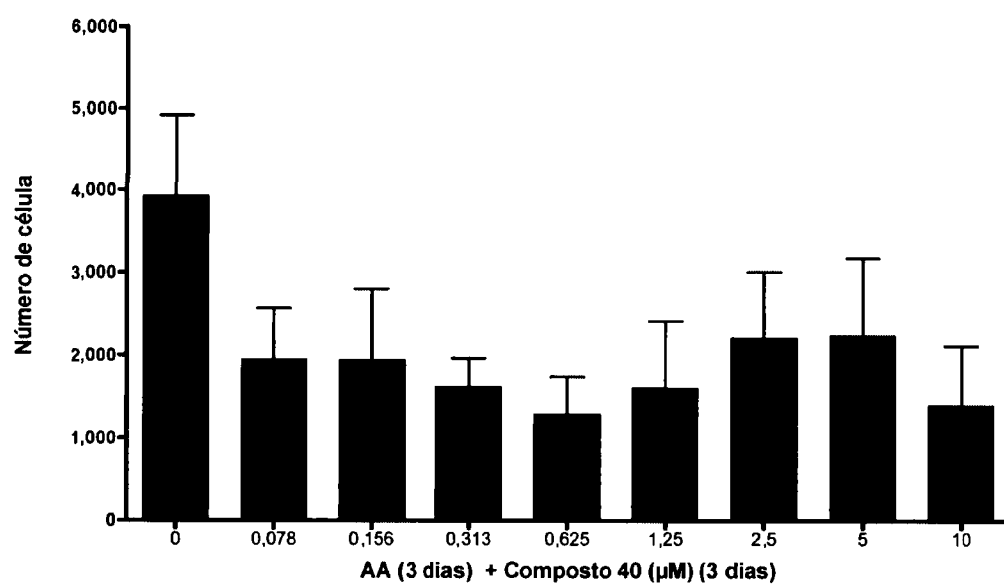


Figura 17F

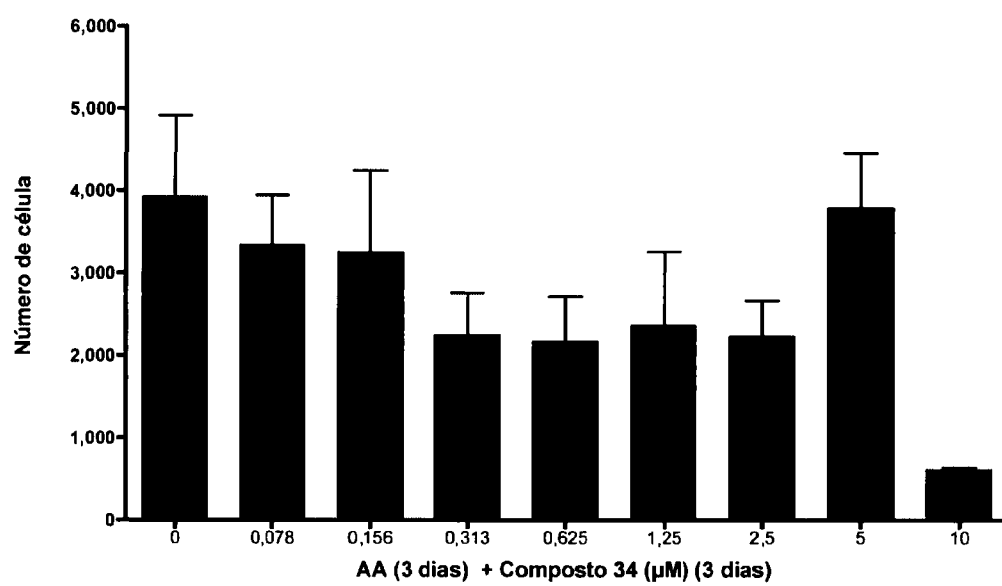


Figura 17G

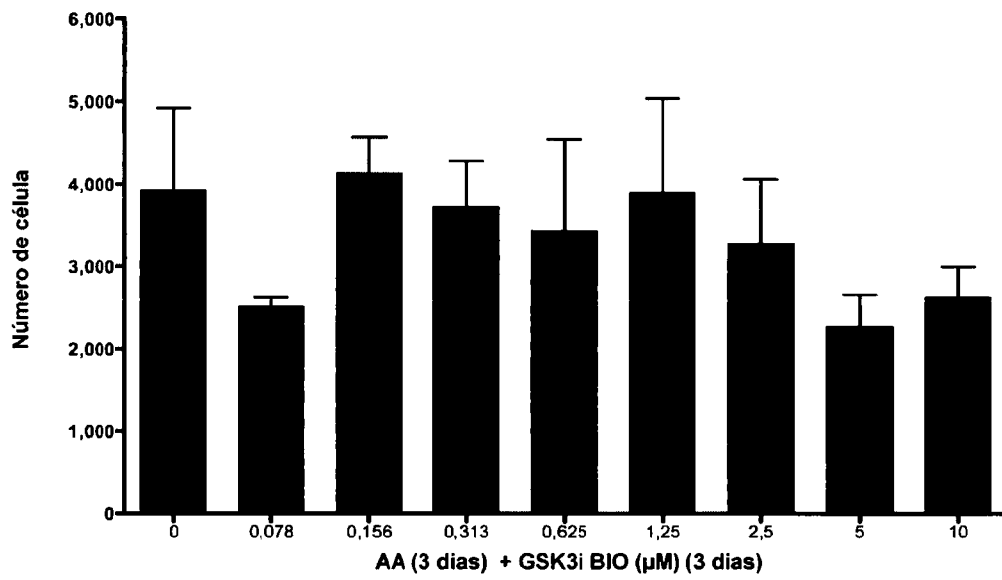


Figura 18A

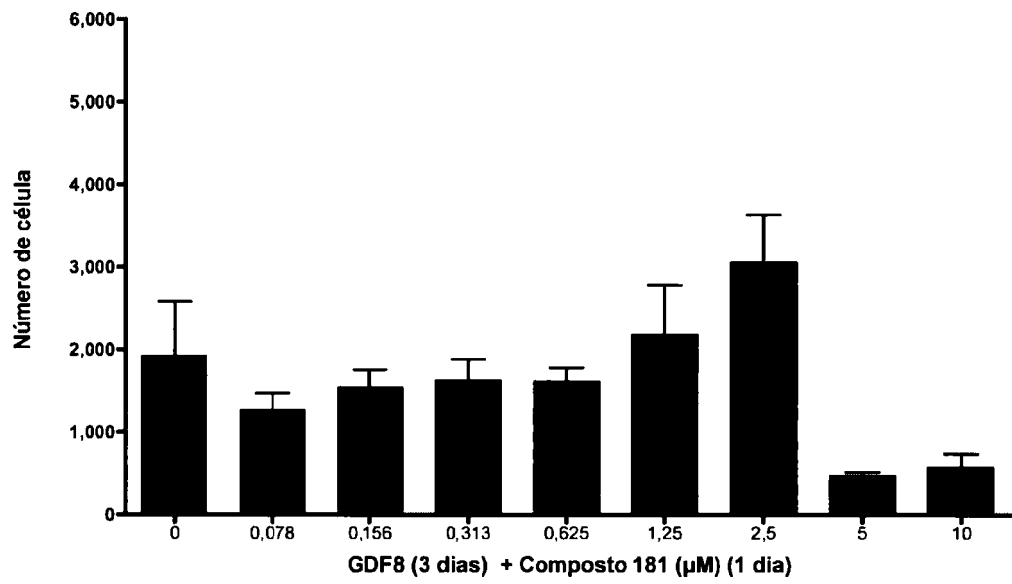


Figura 18B

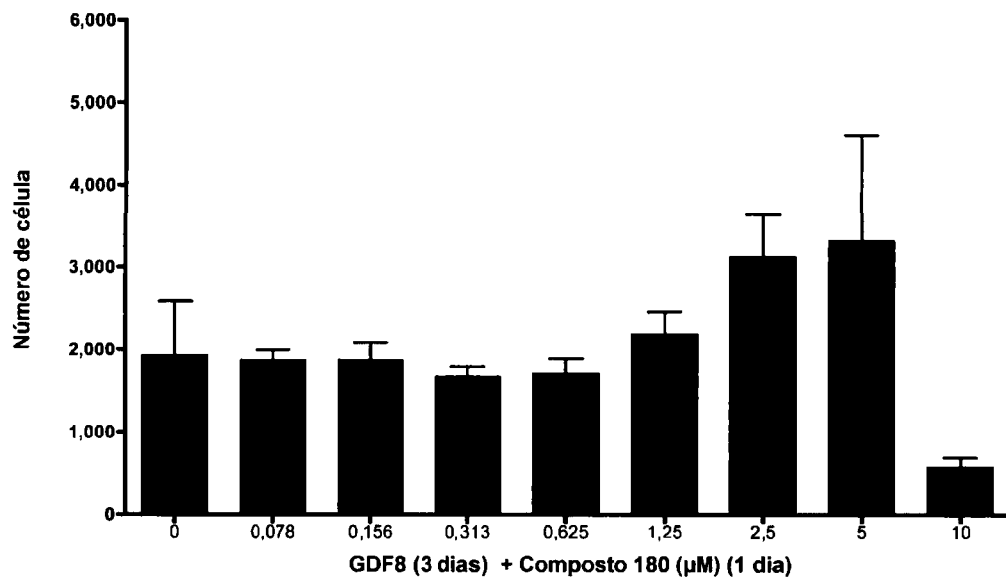


Figura 18C

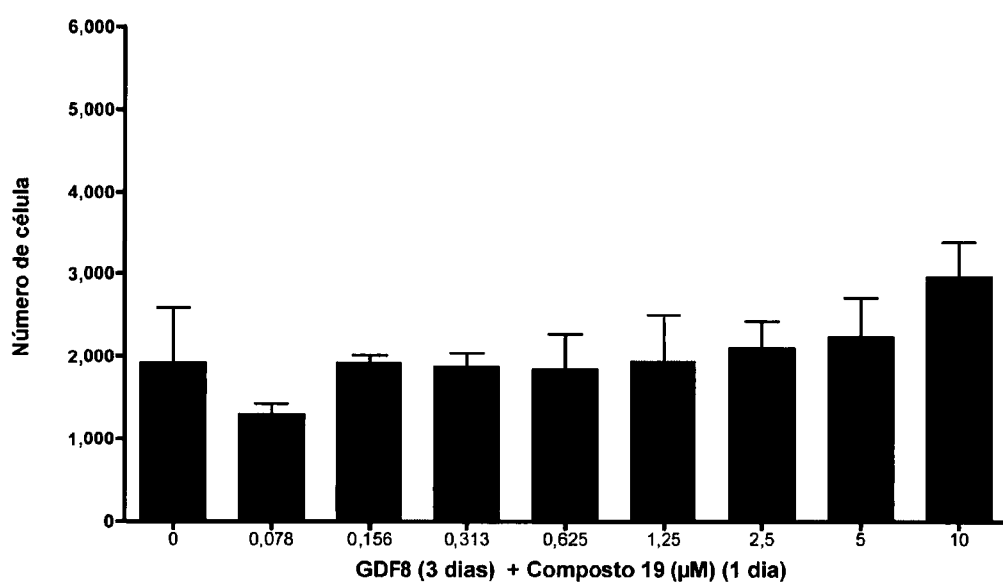


Figura 18D

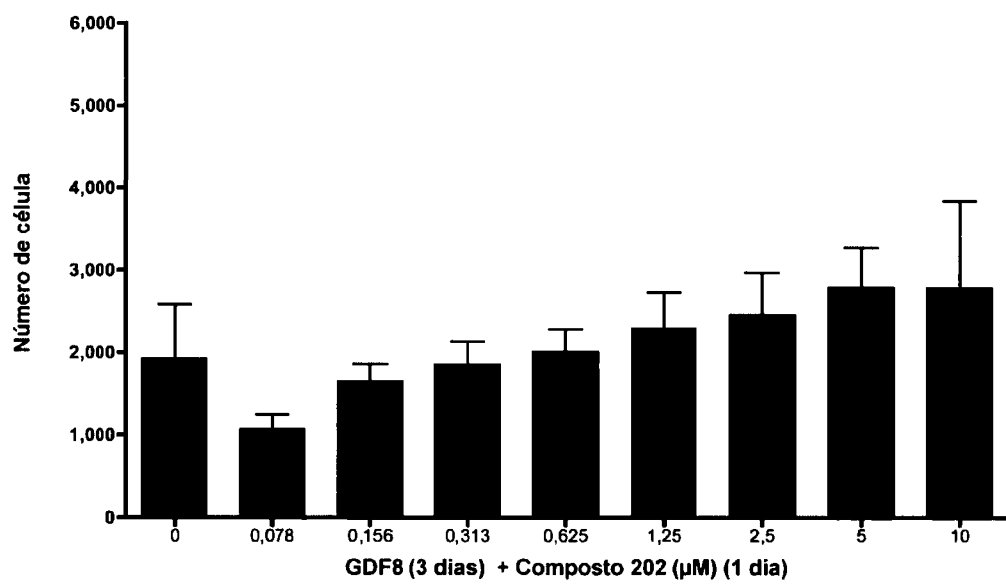


Figura 18E

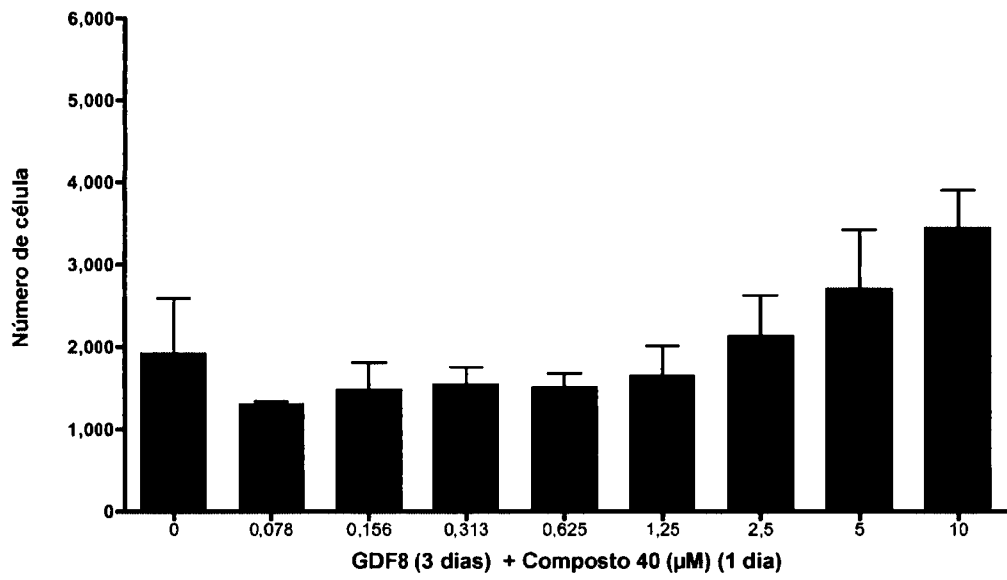


Figura 18F

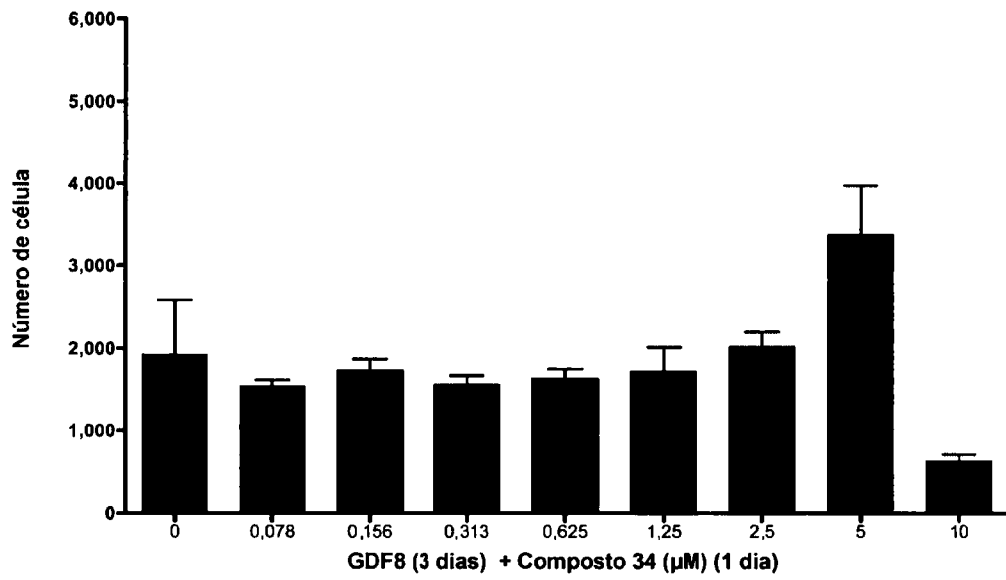


Figura 18G

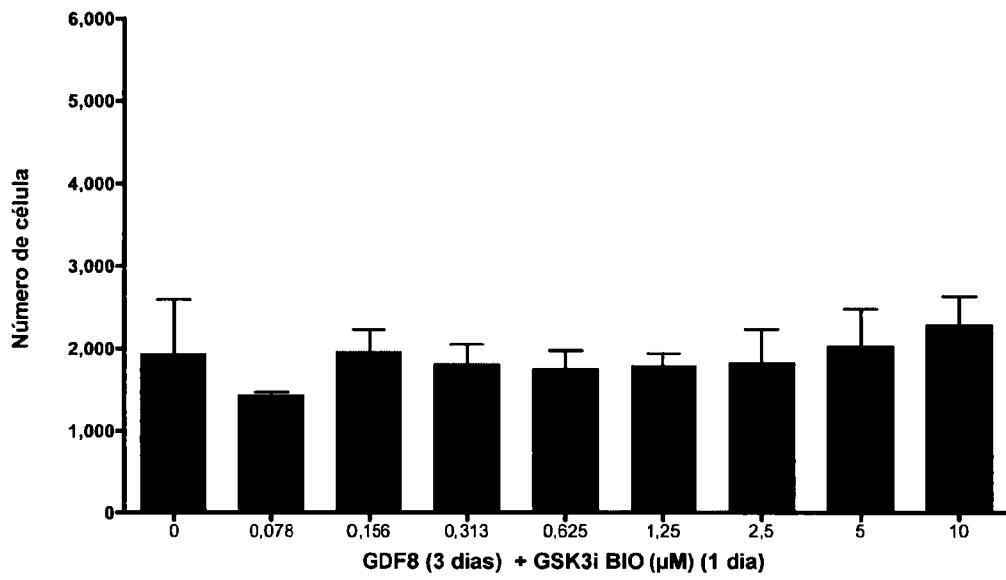


Figura 19A

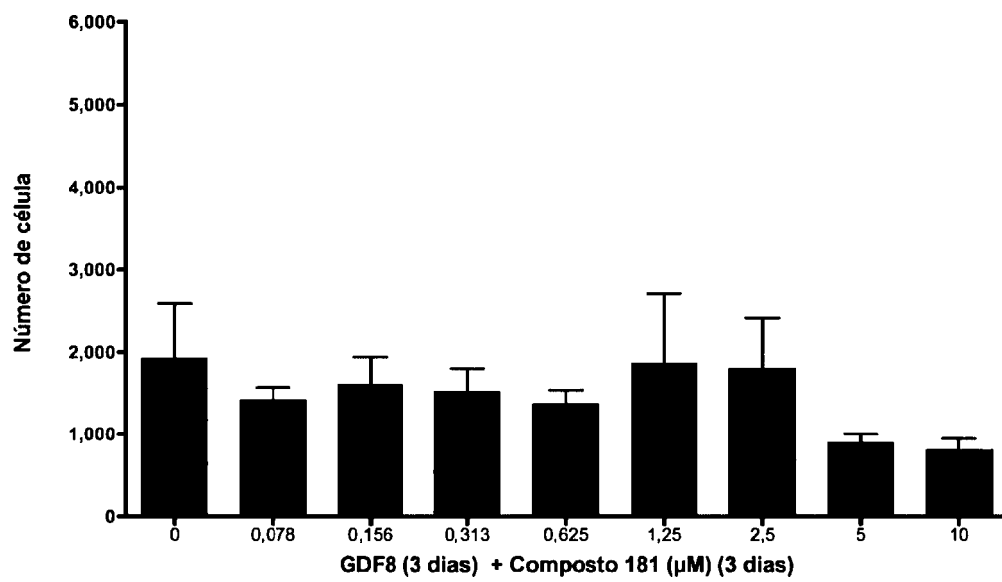


Figura 19B

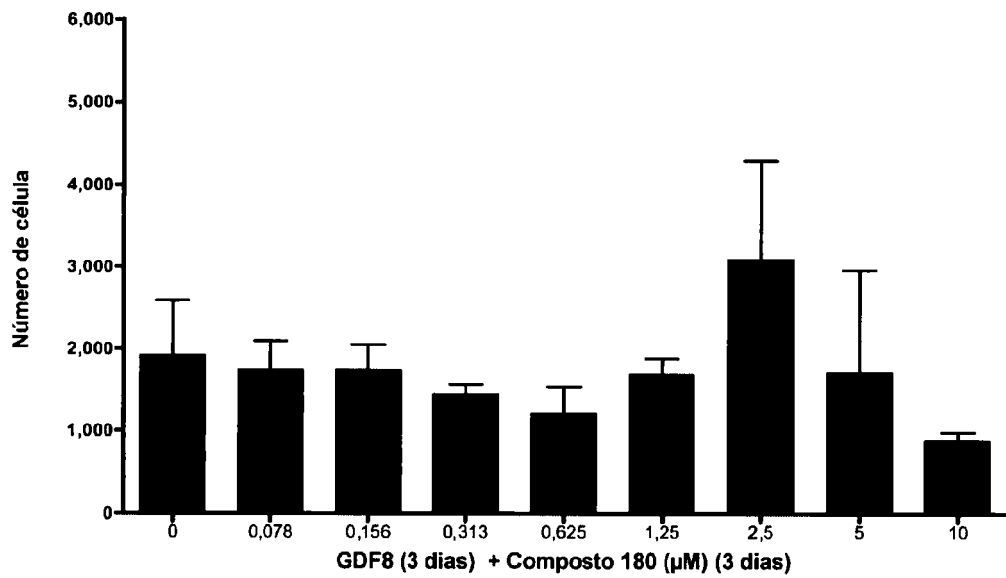


Figura 19C

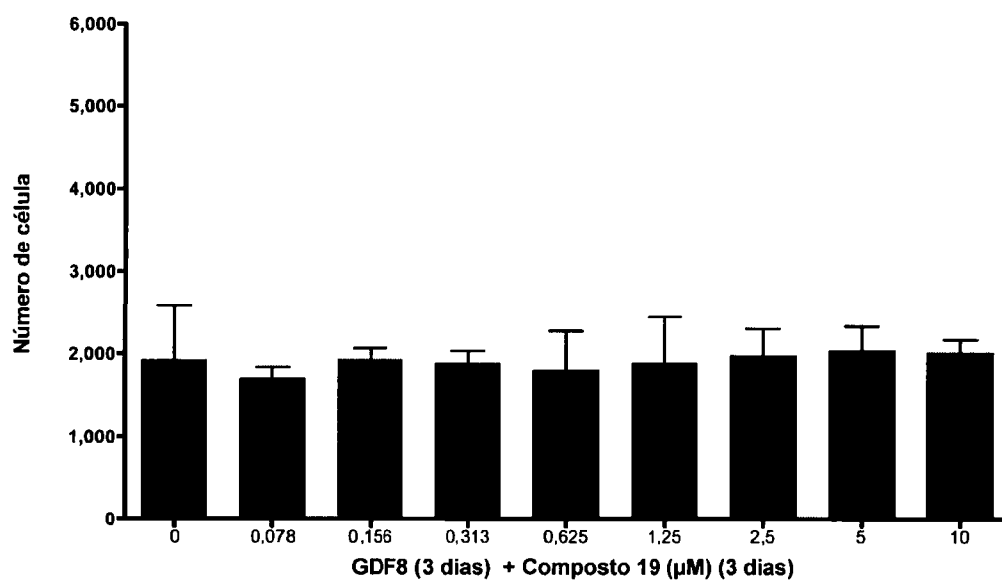


Figura 19D

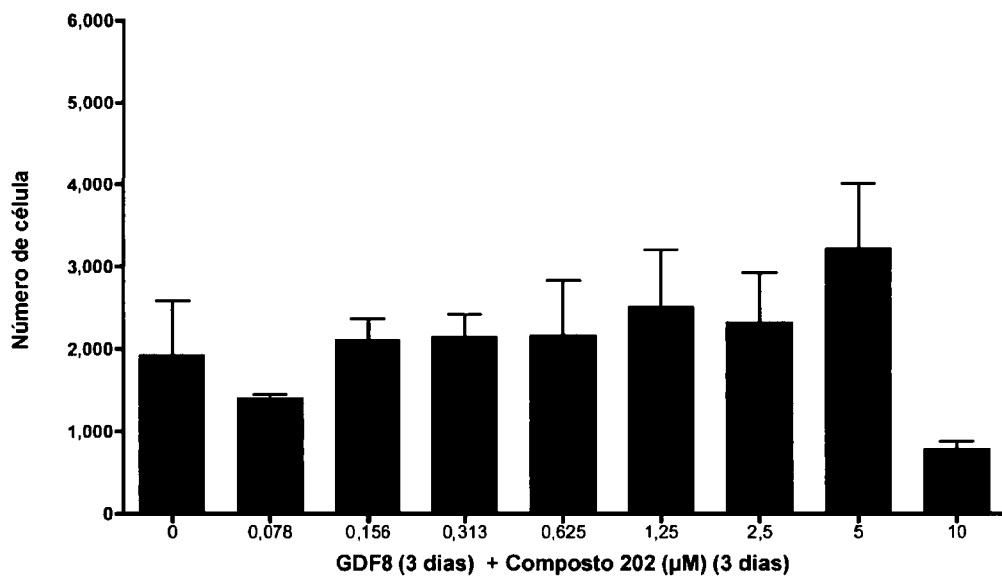


Figura 19E

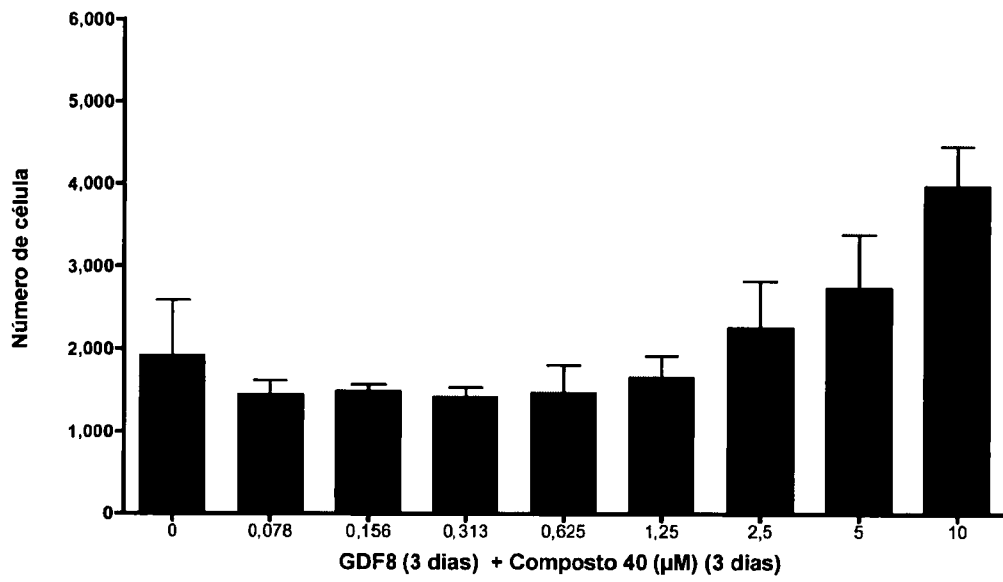


Figura 19F

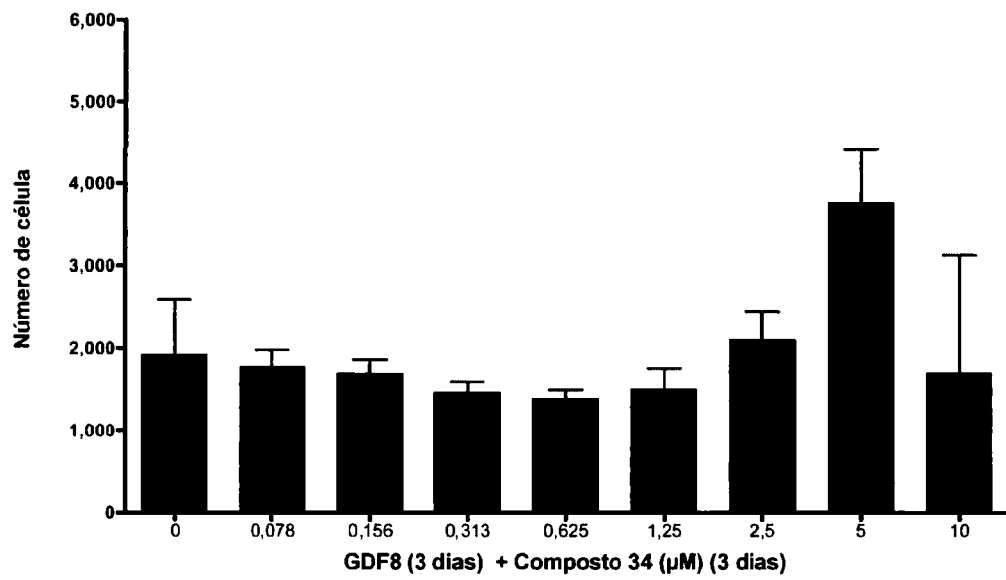


Figura 19G

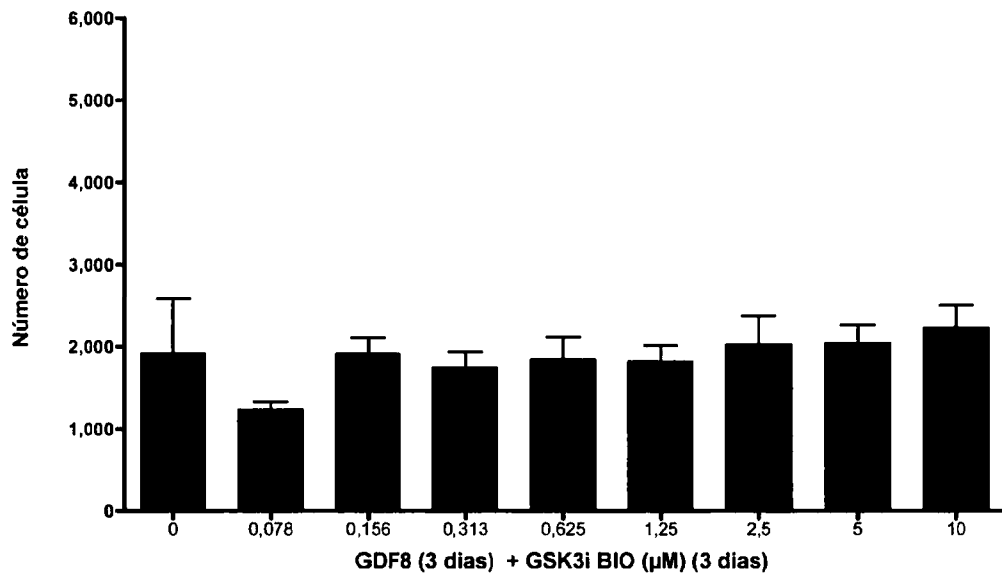


Figura 20A

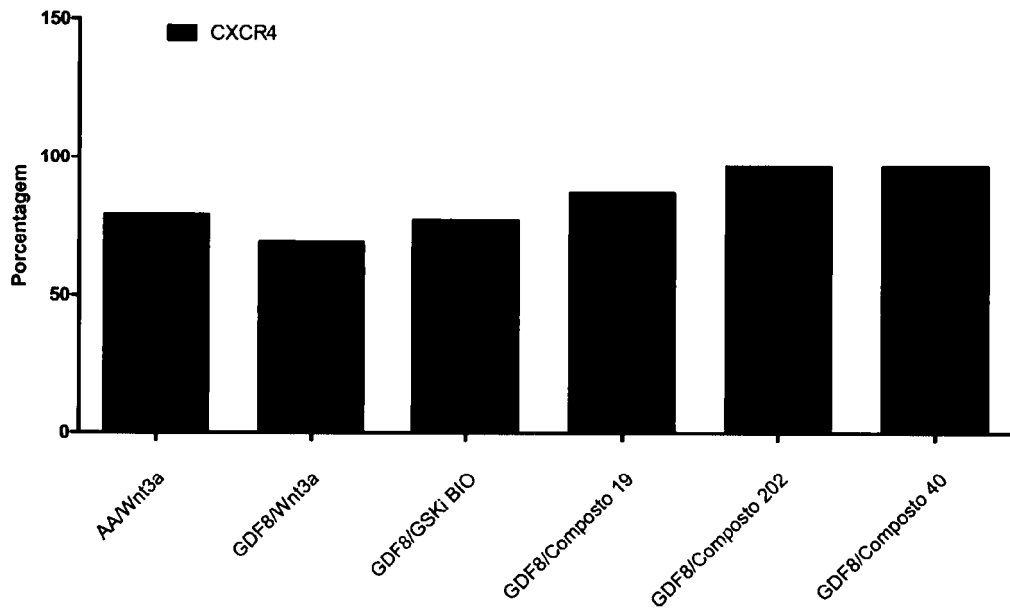


Figura 20B

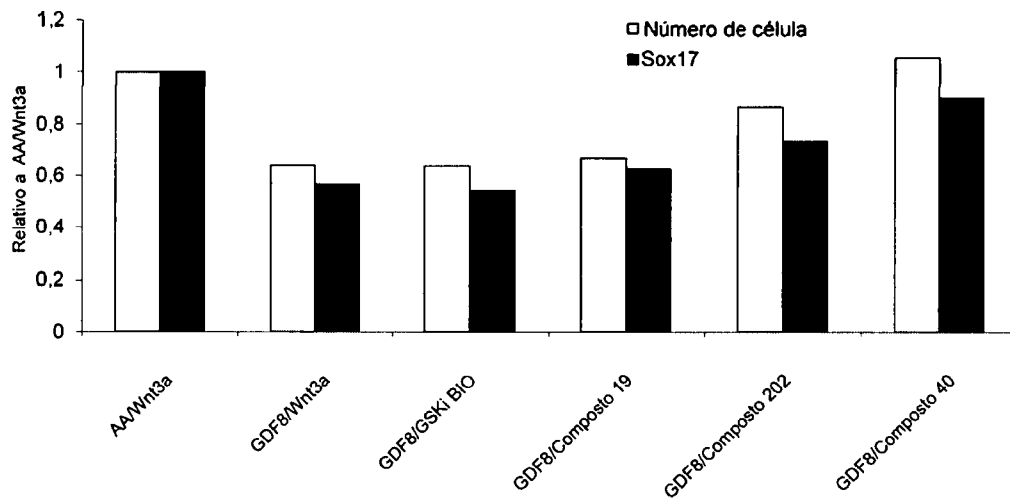


Figura 20C

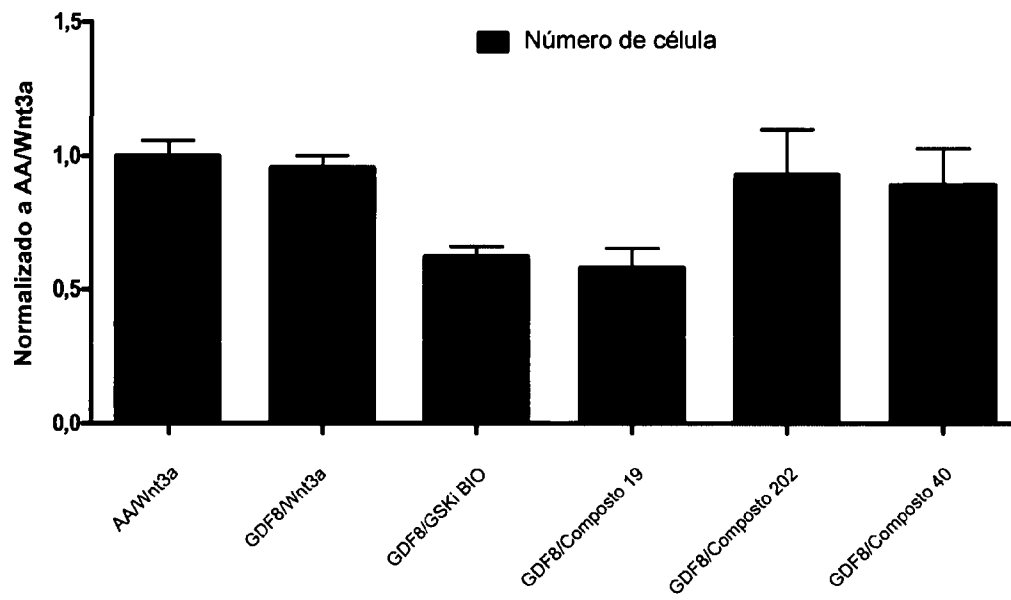


Figura 20D

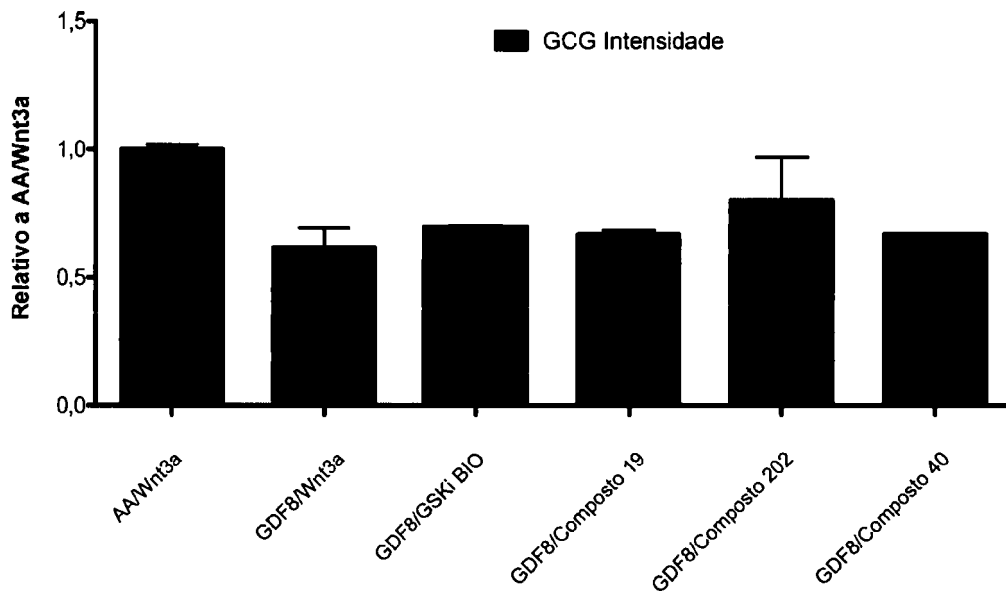


Figura 20E

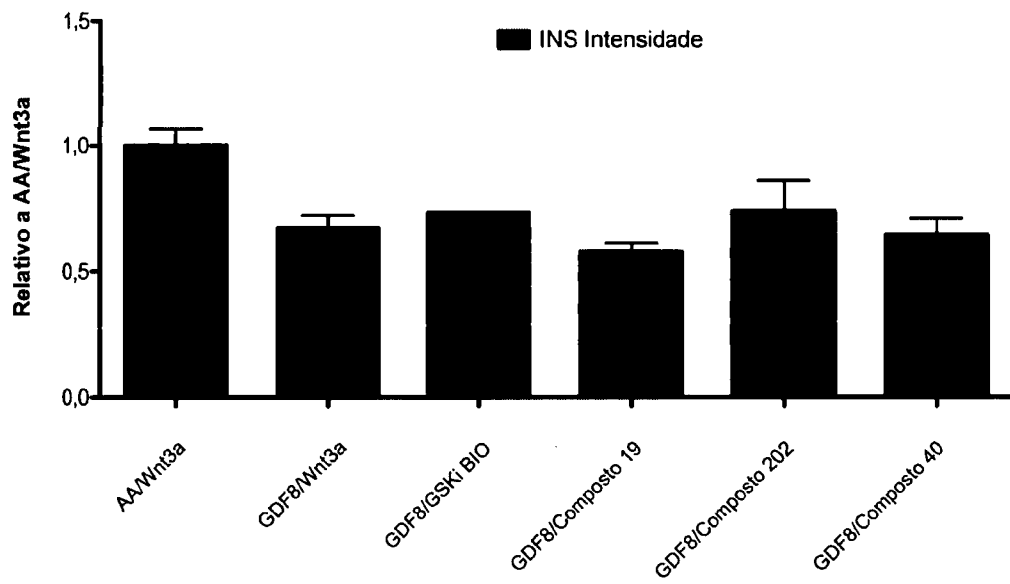


Figura 20F

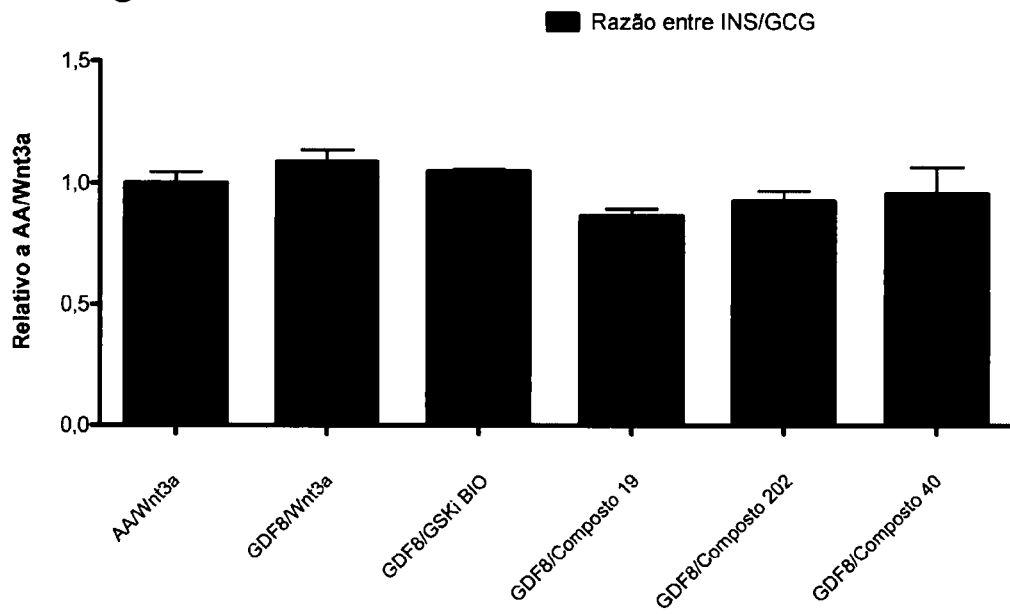


Figura 21A

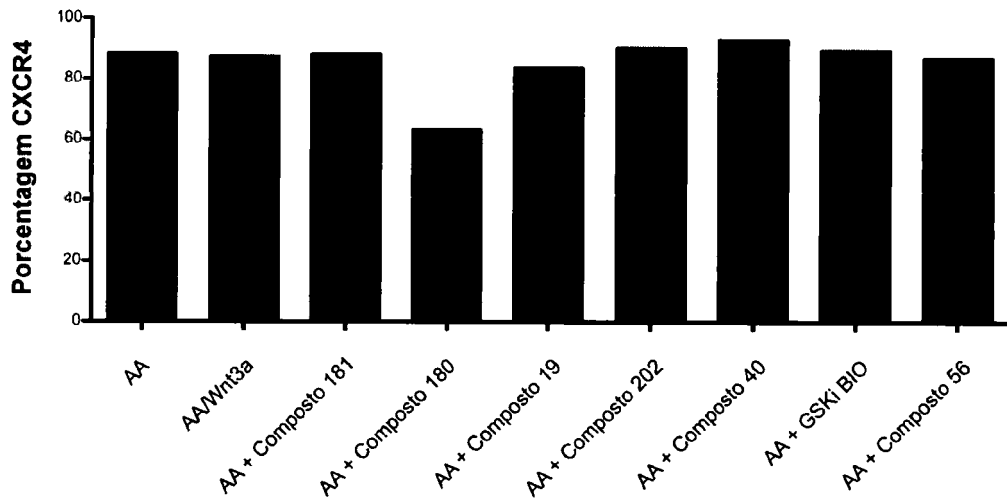


Figura 21B

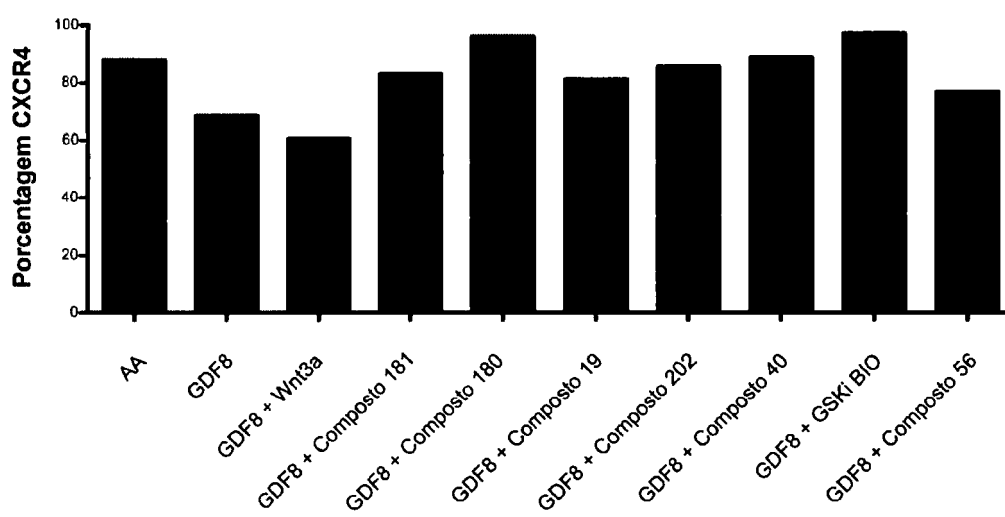
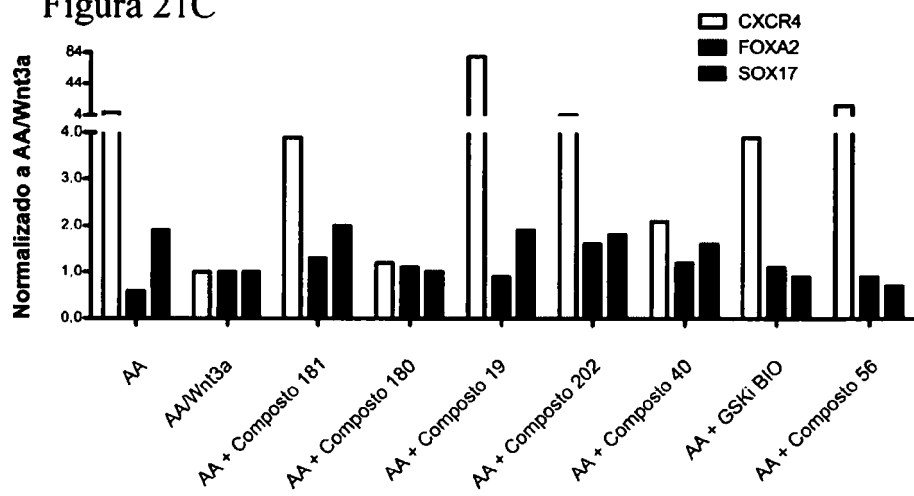
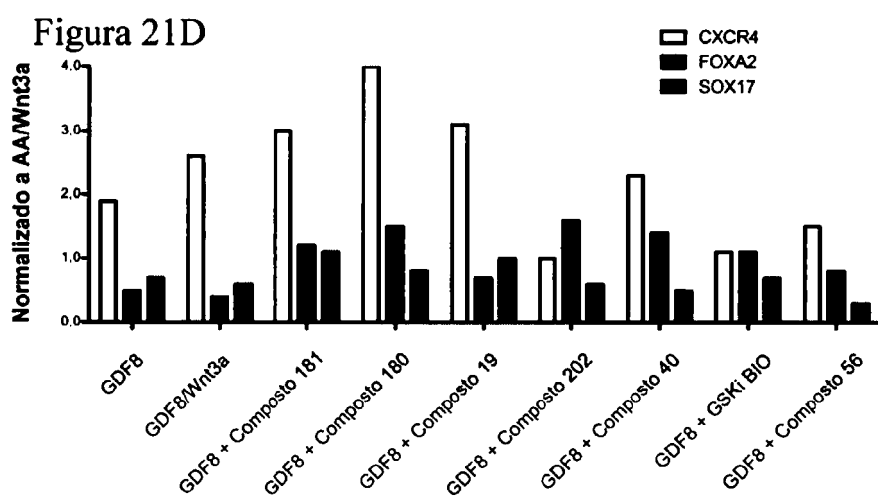


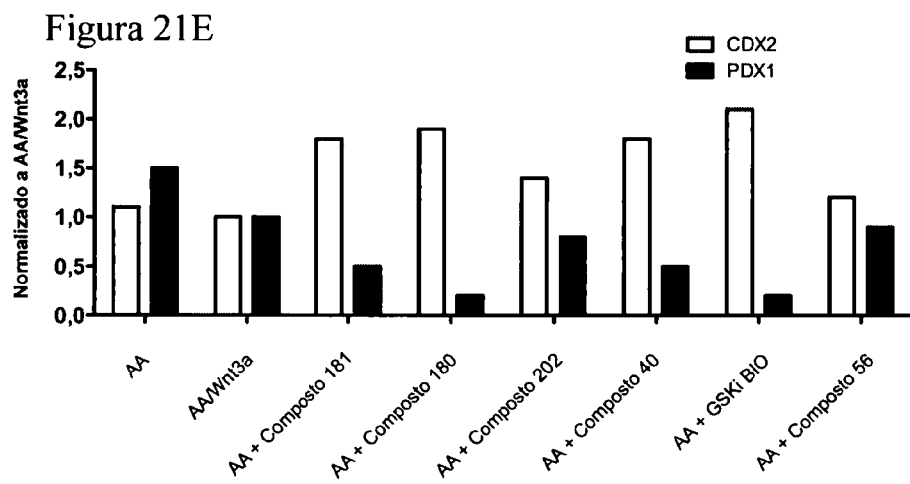
Figura 21C



Composto/CT	GAPDH	CXCR4	FOXA2	SOX17
Nenhum	19,4	20,4	25,1	21,6
Wnt3a	18,2	22,0	22,9	21,2
Composto 181	20,1	22,0	25,6	22,2
Composto 180	18,4	22,0	24,0	21,4
Composto 19	20,1	17,7	25,6	22,3
Composto 202	20,3	22,0	25,7	22,6
Composto 40	19,9	22,7	25,5	22,3
GSK3i IX(bio)	20,2	22,2	25,8	23,4
Composto 56	19,8	19,6	24,4	23,3

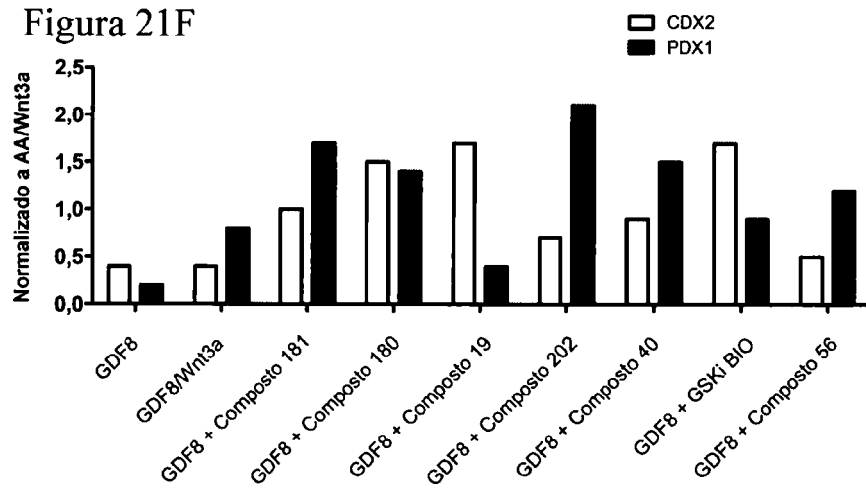


Composto/CT	GAPDH	CXCR4	FOXA2	SOX17
Nenhum	21.6	24.6	25.9	25.2
Wnt3a	21.2	23.6	25.7	25.0
Composto 181	20.7	23.0	25.2	23.7
Composto 180	20.9	22.7	25.0	24.2
Composto 19	19.6	21.8	24.2	22.6
Composto 202	18.5	22.4	23.6	22.3
Composto 40	19.7	22.4	24.9	23.7
GSK3i IX(bio)	19.6	23.3	24.7	23.3
Composto 56	19.7	23.0	25.3	24.4

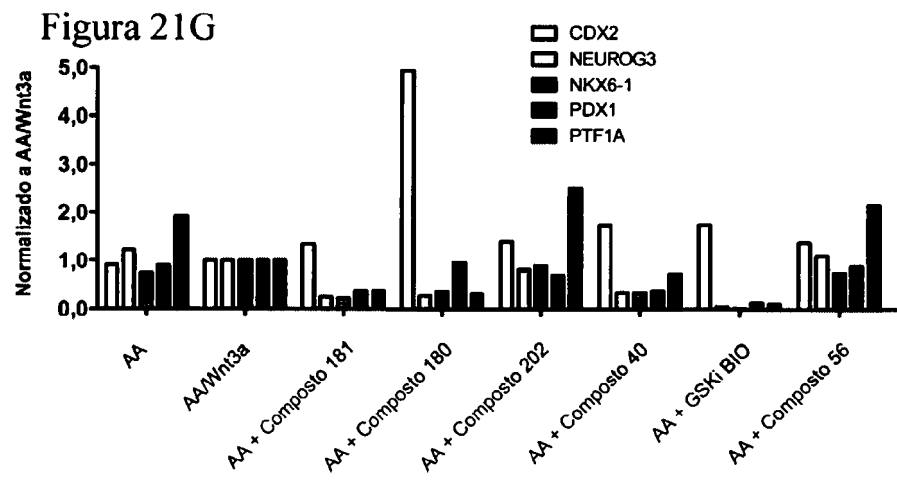


Composto/CT	GAPDH	CDX2	PDX1
Nenhum	18,5	22,9	23,3
Wnt3a	18,4	23,0	23,8
Composto 181	18,6	22,3	25,0
Composto 180	18,8	22,5	26,3
Composto 202	18,5	22,5	24,1
Composto 40	18,5	22,2	24,8
GSK3i IX(bio)	18,5	22,0	26,1
Composto 56	18,3	22,7	23,9

Figura 21F

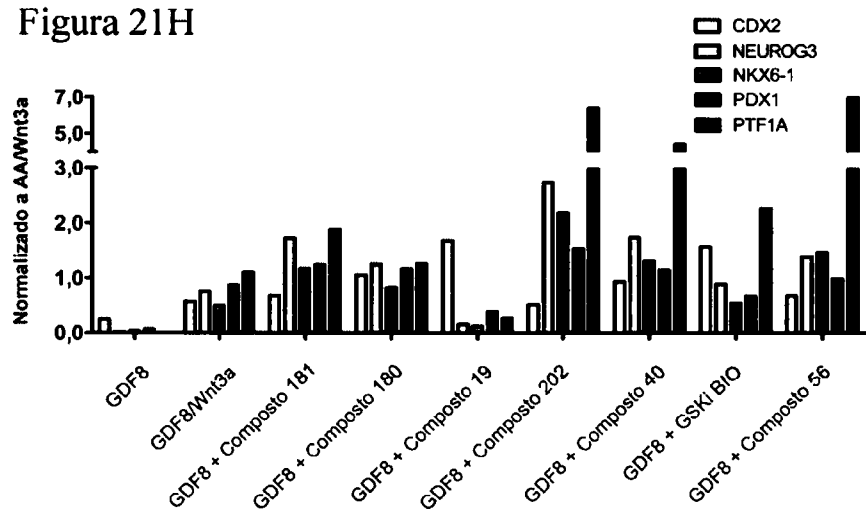


Composto/CT	GAPDH	CDX2	PDX1
Nenhum	18,0	23,8	25,5
Wnt3a	17,4	23,1	23,1
Composto 181	18,8	23,4	23,5
Composto 180	18,8	22,8	23,7
Composto 19	18,3	22,0	25,0
Composto 202	18,7	23,8	23,0
Composto 40	18,4	23,0	23,2
GSK3I IX(bio)	18,4	22,2	24,0
Composto 56	18,2	23,8	23,3

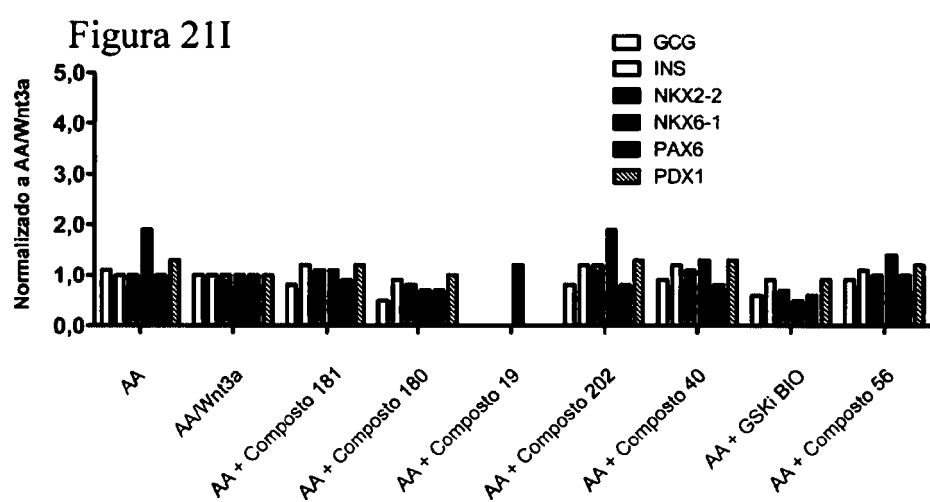


Composto\CT	GAPDH	CDX2	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
Nenhum	19,0	23,7	23,3	27,4	23,7	29,6
Wnt3a	19,5	24,1	24,1	27,5	24,1	31,1
Composto 181	18,0	22,1	24,6	28,1	24,0	31,0
Composto 180	19,4	21,6	25,8	28,9	24,0	32,6
Composto 202	19,2	23,3	24,1	27,4	24,3	29,5
Composto 40	19,2	22,9	25,3	28,7	25,1	31,2
GSK3i IX(bio)	19,0	22,7	27,7	32,9	26,5	33,7
Composto 56	18,8	22,9	23,3	27,2	23,6	29,3

Figura 21H

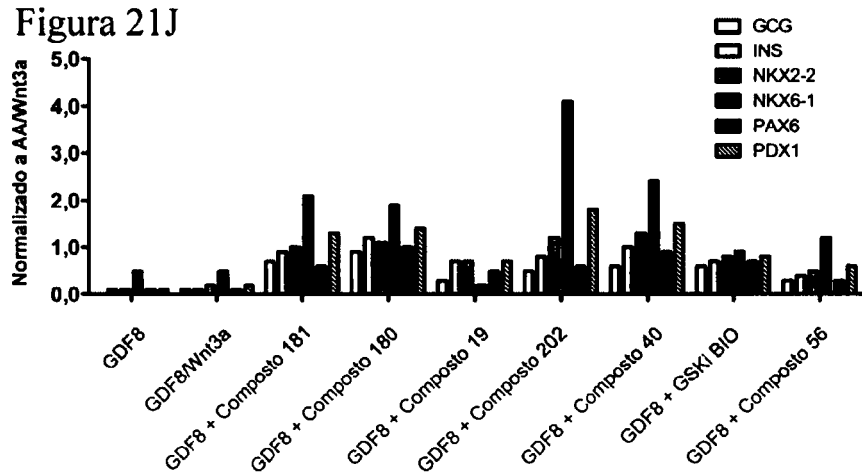


Composto/CT	GAPDH	CDX2	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
Nenhum	18.0	24.6	28.7	31.2	26.5	40.0
Wnt3a	19.0	24.4	24.0	28.0	23.8	30.5
Composto 181	18.0	23.1	21.8	25.7	22.3	28.6
Composto 180	19.5	23.9	23.7	27.7	23.8	30.7
Composto 19	19.1	22.9	26.4	30.2	25.1	32.6
Composto 202	19.0	24.5	22.2	25.9	23.0	27.9
Composto 40	19.0	23.6	22.7	26.6	23.4	28.4
GSK3i IX(bio)	19.1	23.0	23.8	27.9	24.2	29.5
Composto 56	18.9	24.0	23.0	26.3	23.5	27.7



Composto/CT	GAPDH	GCG	INS	NKX2-2	NKX6-1	PAX6	PDX1
Nenhum	18,3	14,1	14,9	23,7	25,5	24,0	23,2
Wnt3a	18,0	14,0	14,6	23,4	26,1	23,7	23,3
Composto 181	18,0	14,3	14,5	23,3	26,1	24,0	23,1
Composto 180	18,0	14,9	14,7	23,8	26,5	24,3	23,2
Composto 19	17,9	27,0	26,9	28,0	25,8	28,6	29,4
Composto 202	18,6	14,9	15,0	23,7	25,8	24,7	23,6
Composto 40	18,3	14,6	14,7	23,5	26,1	24,4	23,2
GSK3i IX(bio)	18,3	15,1	15,1	24,2	27,5	24,9	23,8
Composto 56	18,2	14,4	14,8	23,6	25,9	24,1	23,3

Figura 21J



Composto/CT	GAPDH	GCG	INS	NKX2-2	NKX6-1	PAX6	PDX1
Nenhum	17,4	18,1	17,7	25,9	26,6	26,6	25,6
Wnt3a	17,8	17,7	17,5	25,6	27,0	26,5	25,6
Composto 181	18,0	14,5	14,8	23,4	25,0	24,4	23,0
Composto 180	18,0	14,2	14,4	23,2	25,1	23,8	22,9
Composto 19	18,3	16,2	15,6	24,3	28,6	25,2	24,2
Composto 202	18,7	15,7	15,8	23,8	24,8	25,2	23,2
Composto 40	18,1	14,8	14,8	23,2	25,0	24,1	22,9
GSK3i IX(bio)	18,4	15,2	15,5	24,2	26,7	24,8	24,0
Composto 56	18,0	16,0	16,0	24,4	25,9	25,4	24,0

Figura 21K

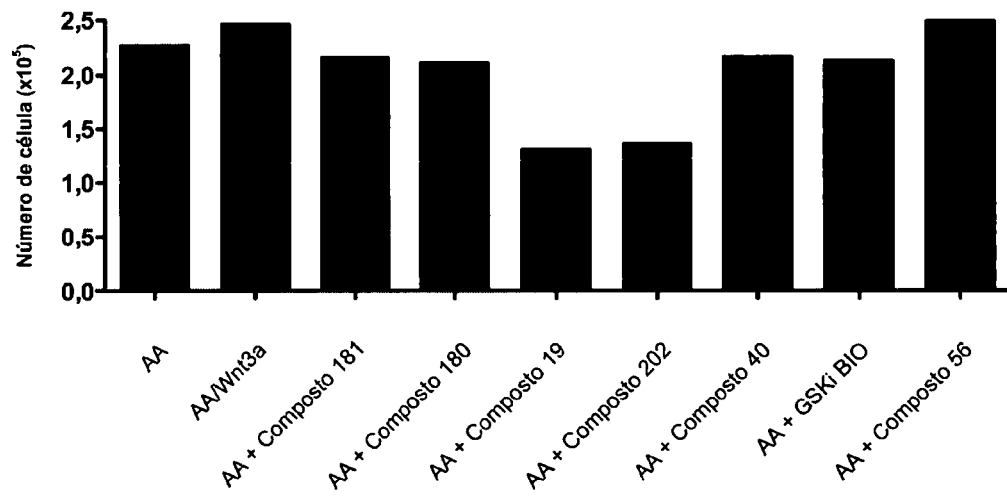


Figura 21L

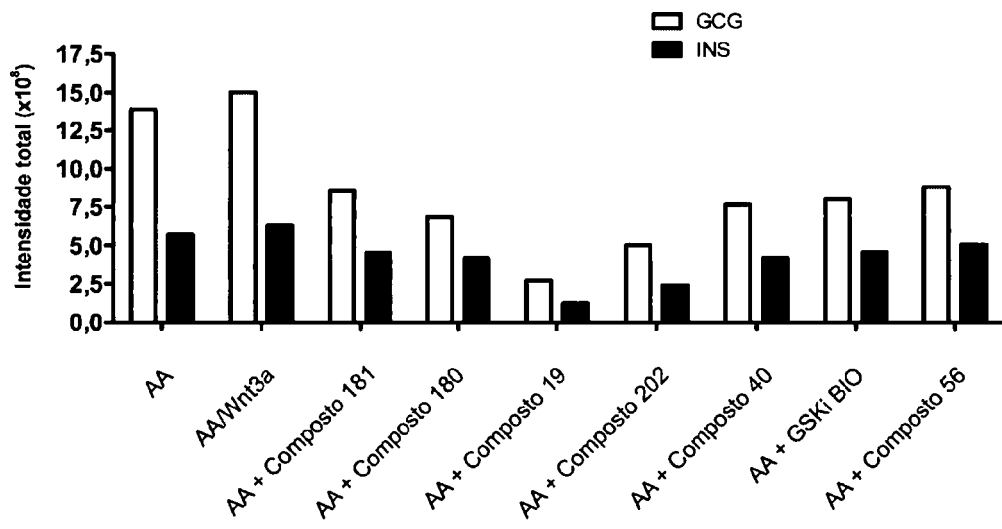


Figura 21M

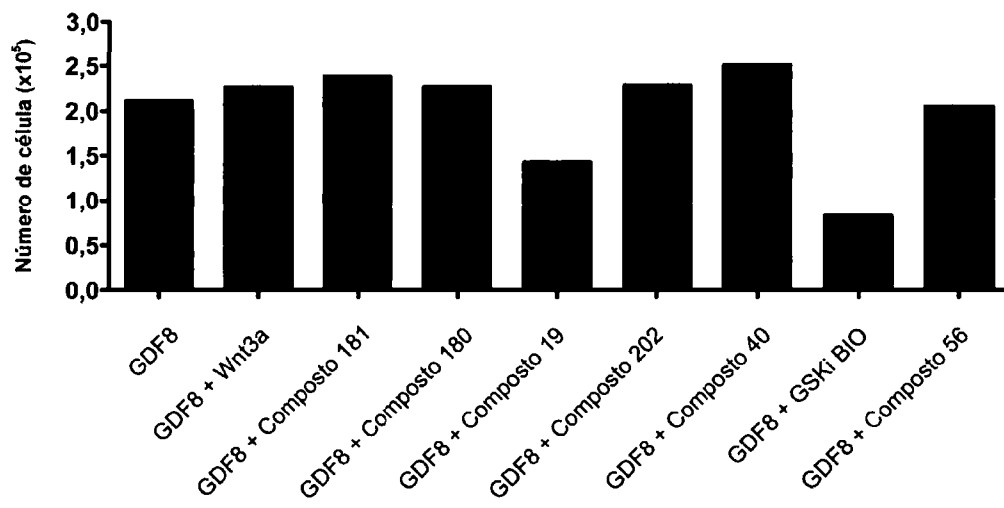


Figura 21N

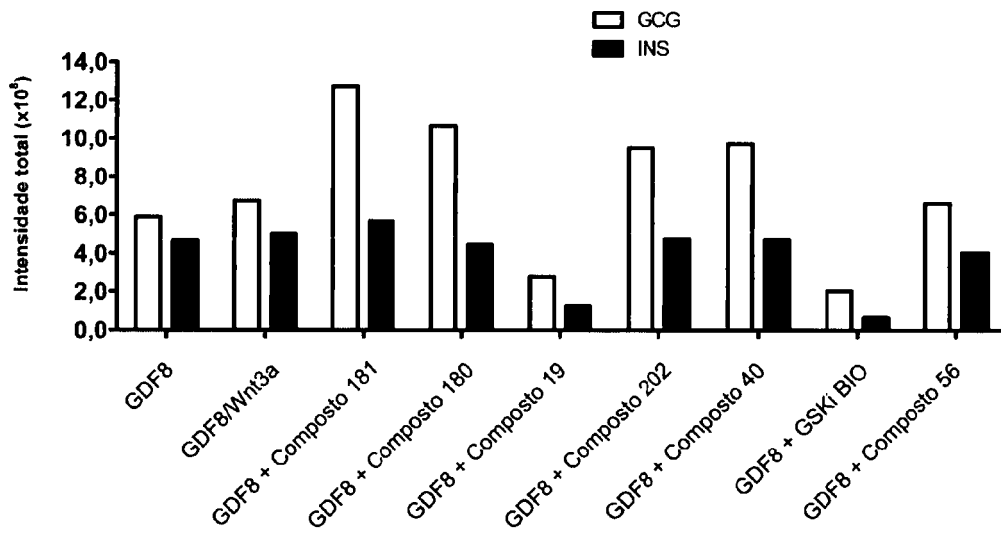


Figura 22A

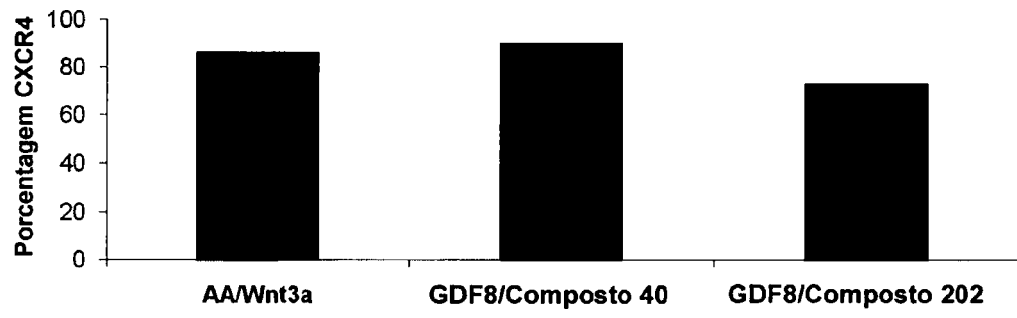


Figura 22B

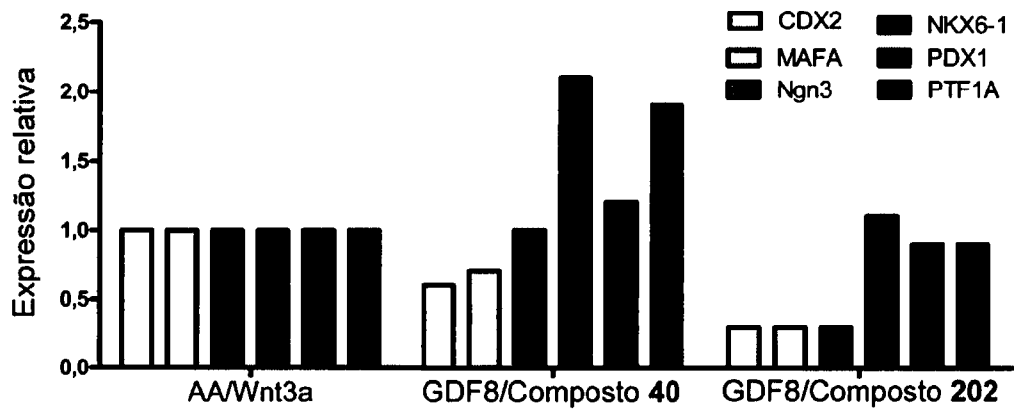


Figura 23A

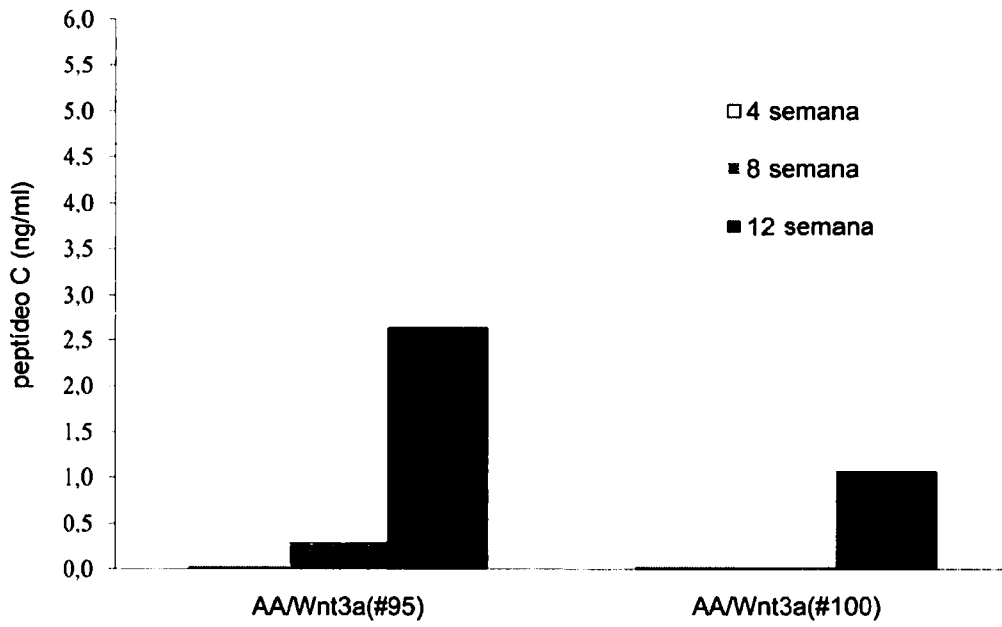


Figura 23B

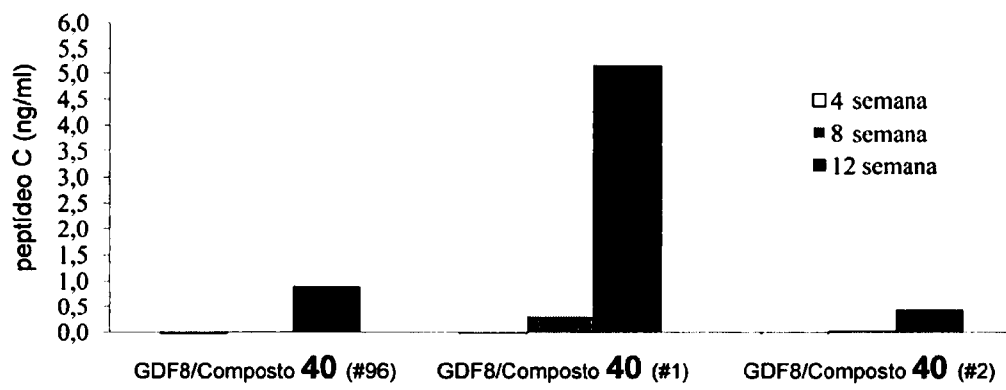


Figura 23C

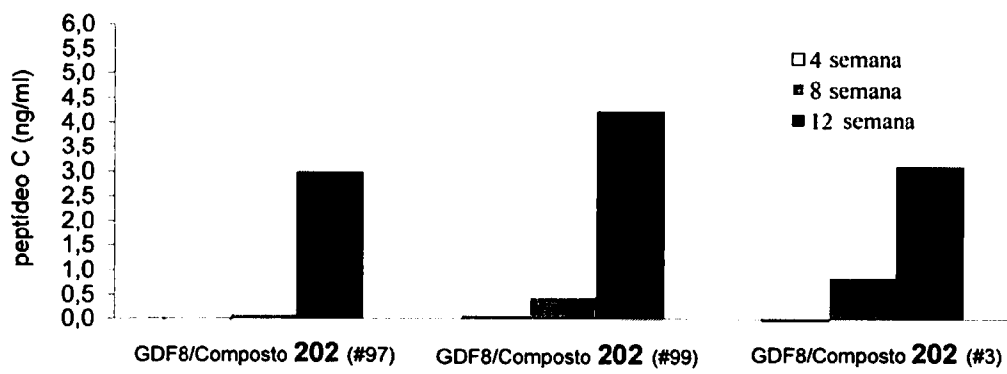


Figura 24A

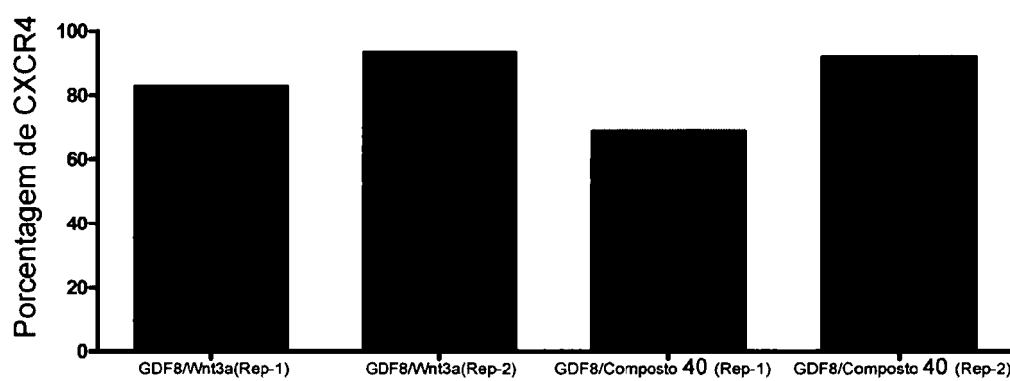
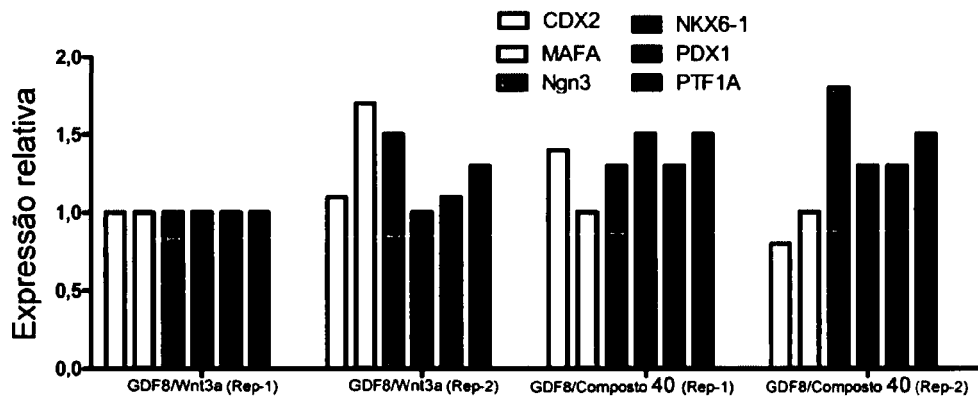


Figura 24B



Tratamento/CTs	GAPDH	CDX2	MAFA	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
GDF8/Wnt3a (réplica 1)	19,0	24,8	31,0	24,1	24,3	22,5	25,4
GDF8/Wnt3a (réplica 1)	18,6	24,3	29,8	23,1	23,9	22,0	24,7
GDF8/Composto 40 (réplica 1)	19,3	24,6	31,3	23,9	24,0	22,3	25,0
GDF8/Composto 40 (réplica 1)	18,7	24,9	30,6	22,9	23,7	21,8	24,5

Figura 24C

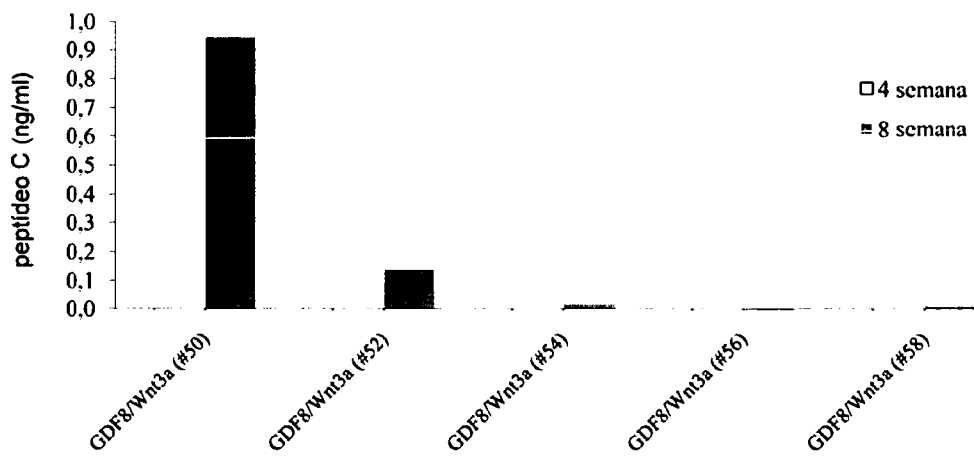


Figura 24D

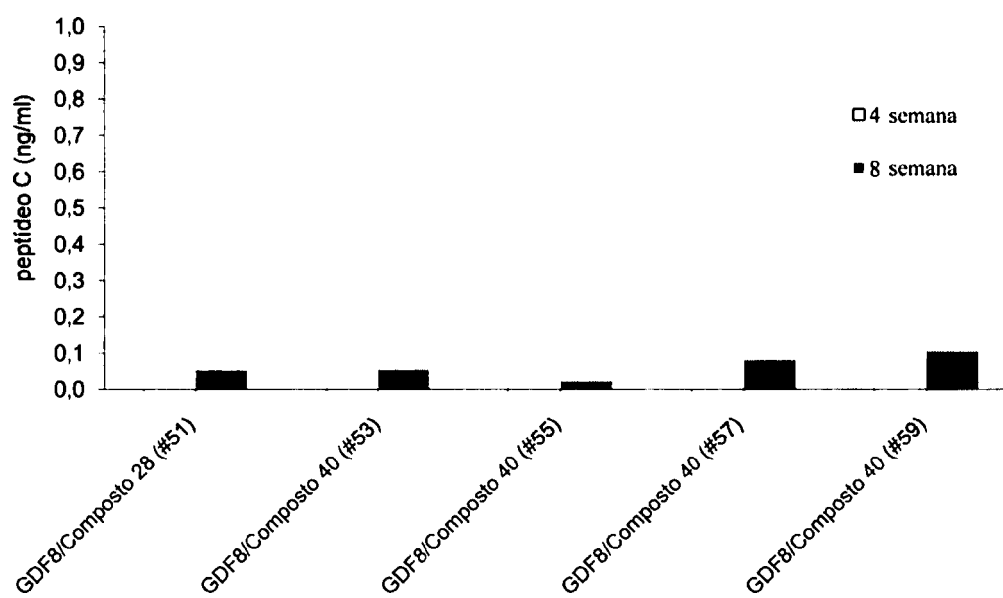


Figura 25A

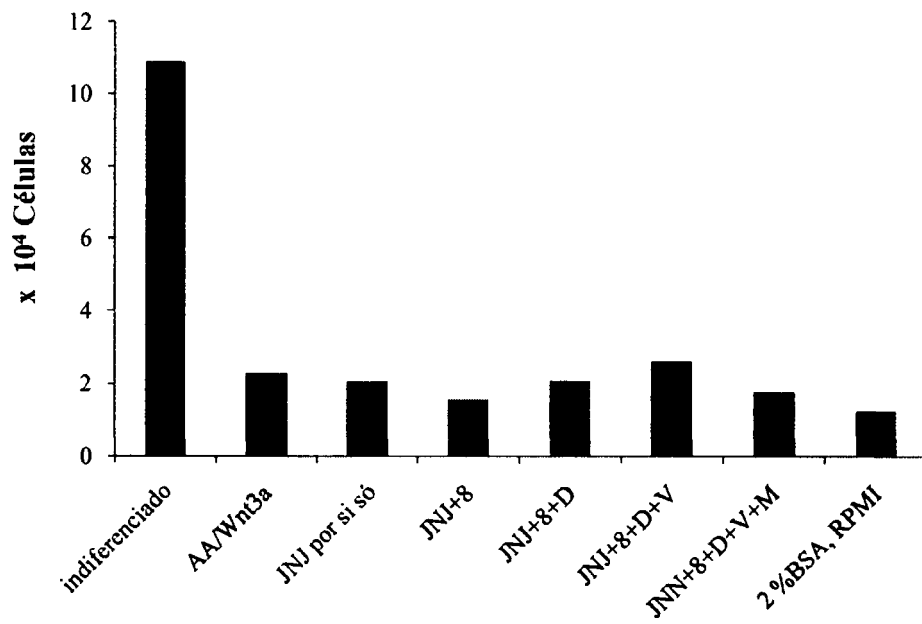


Figura 25B

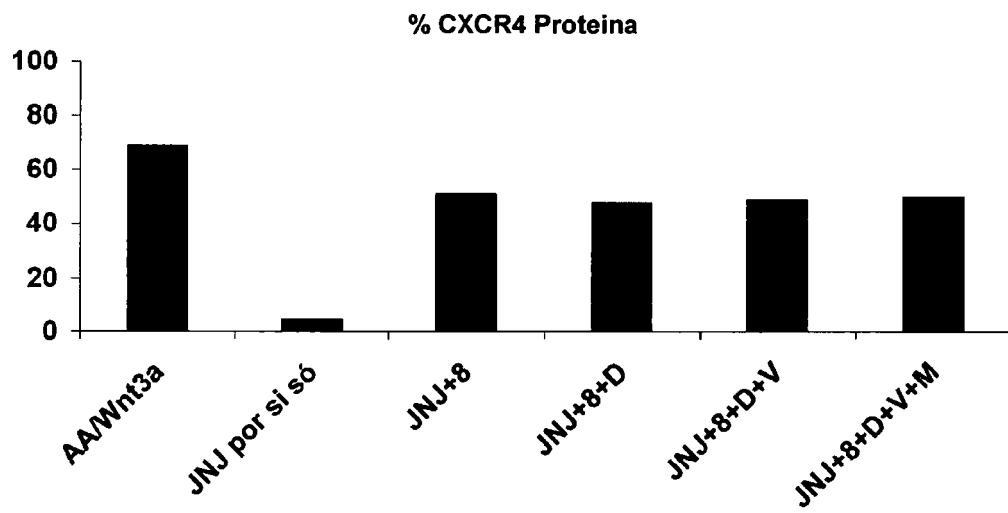


Figura 26A

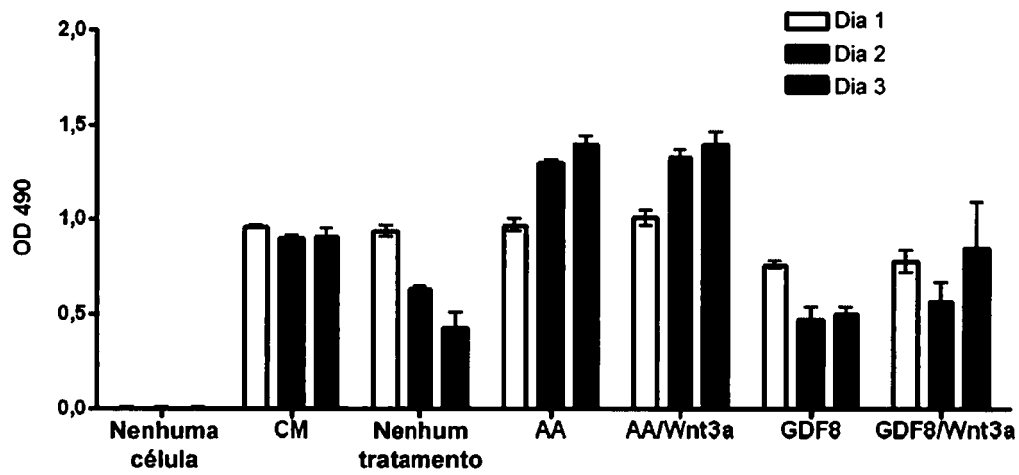


Figura 26B

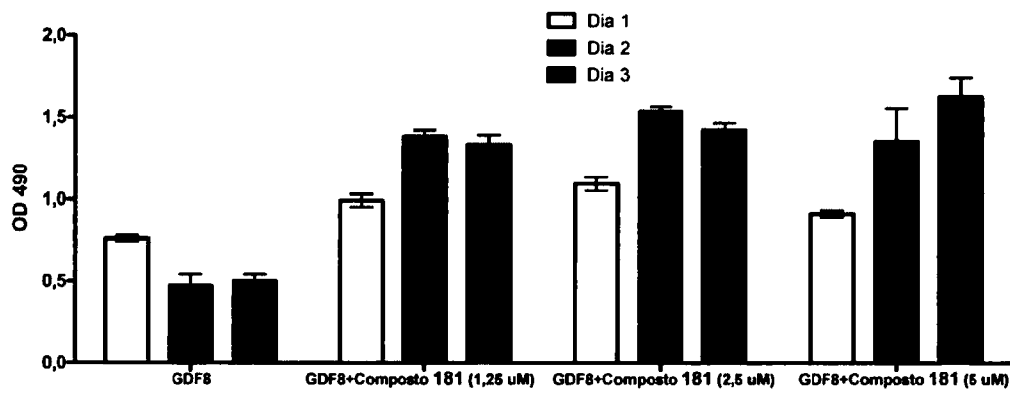


Figura 26C

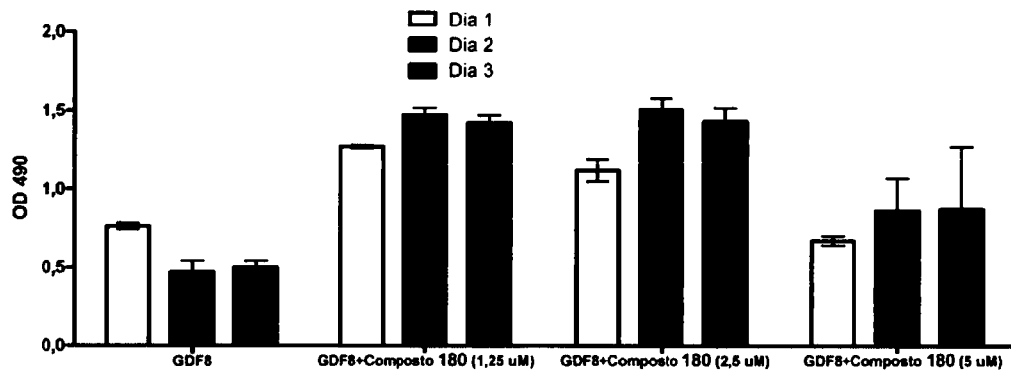


Figura 26D

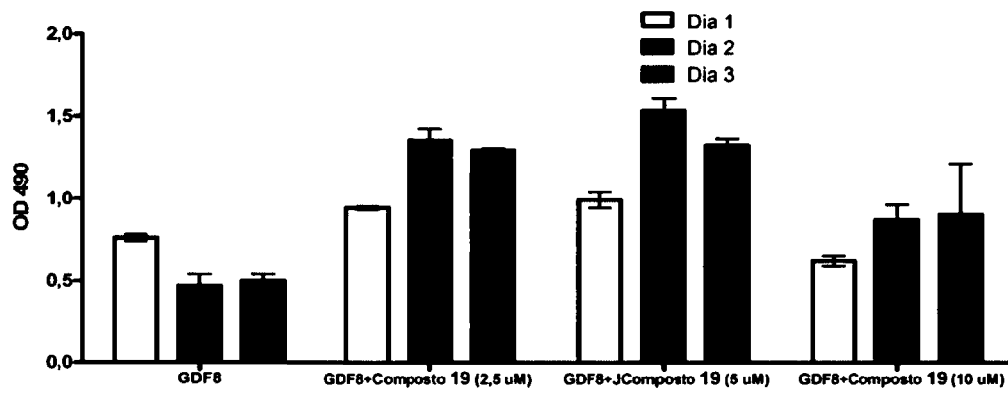


Figura 26E

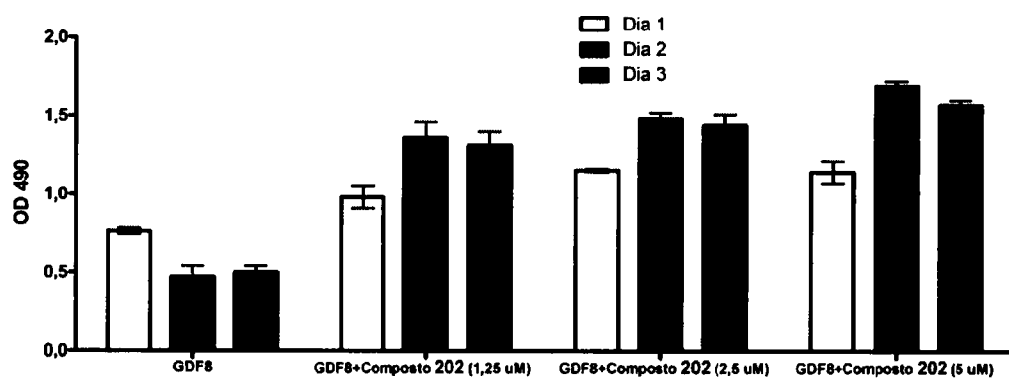


Figura 26F

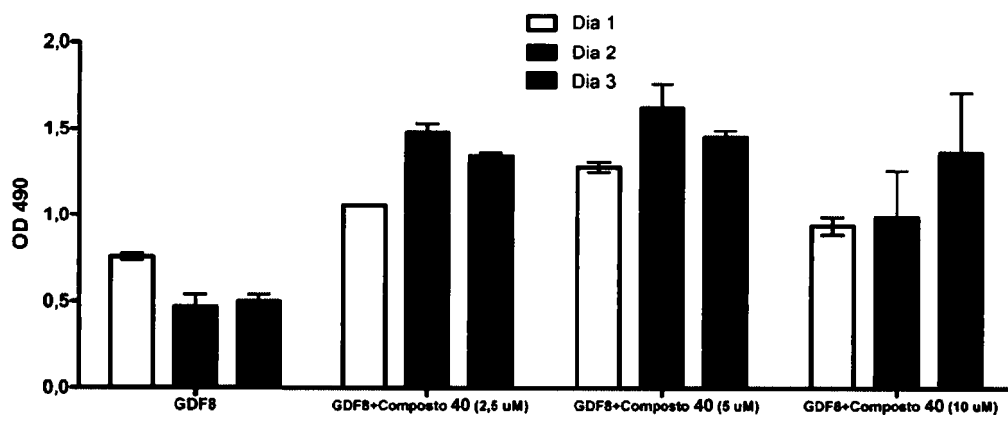


Figura 26G

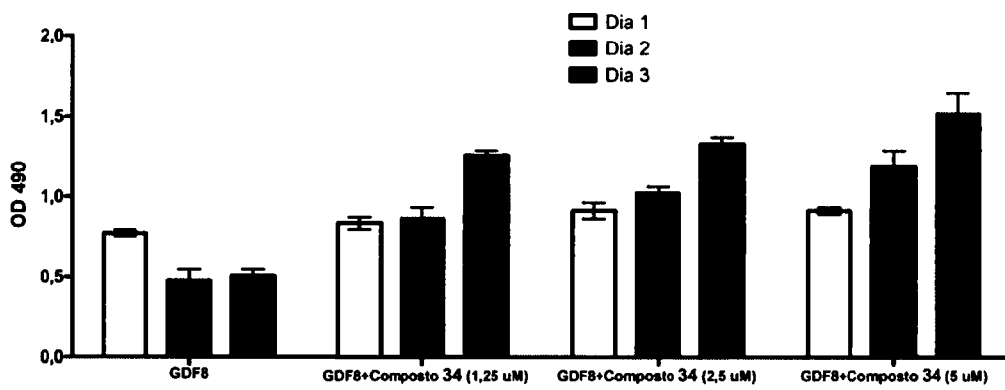


Figura 26H

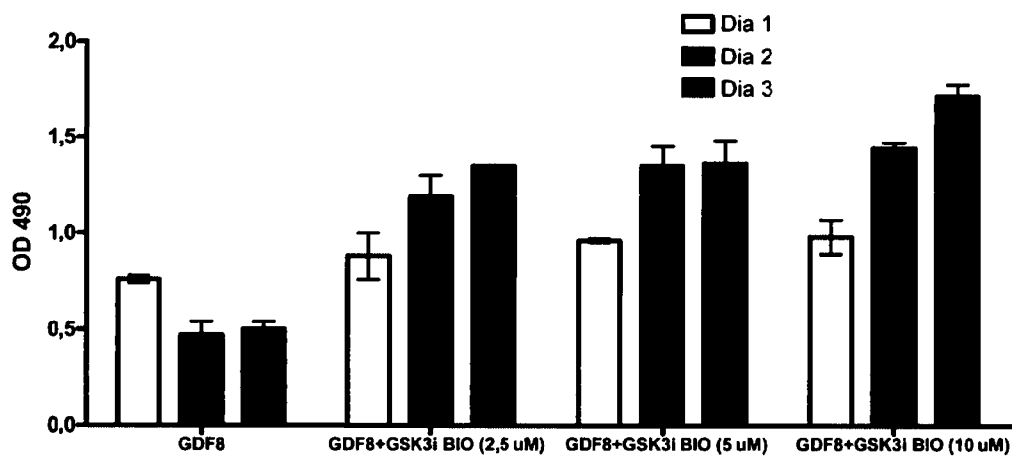


Figura 26I

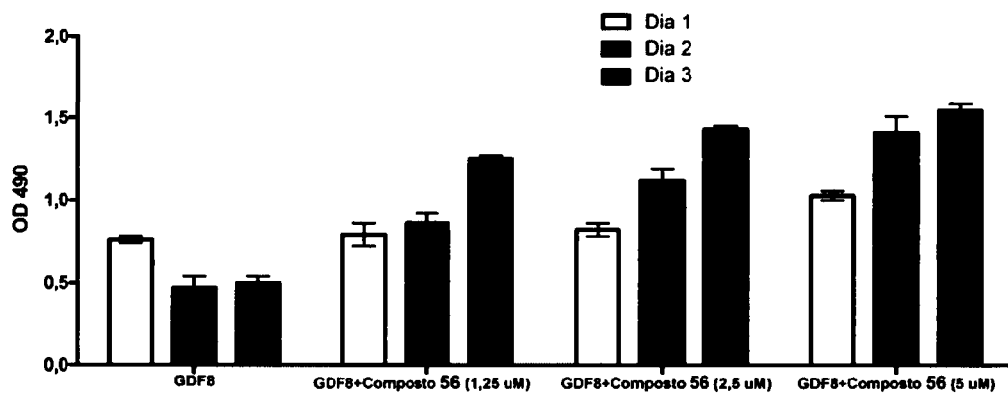


Figura 27A

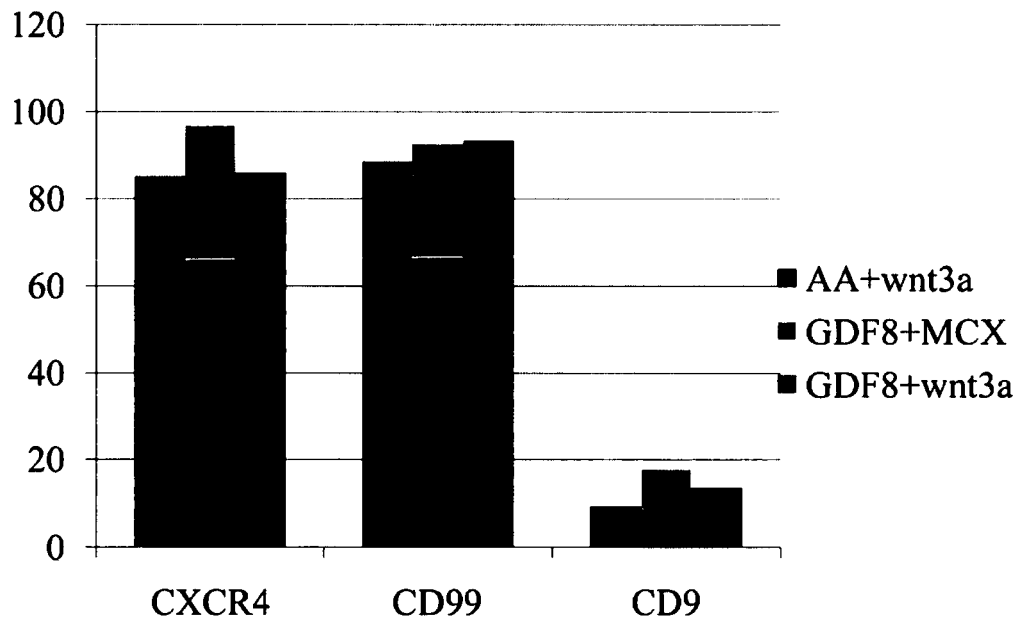


Figura 27B

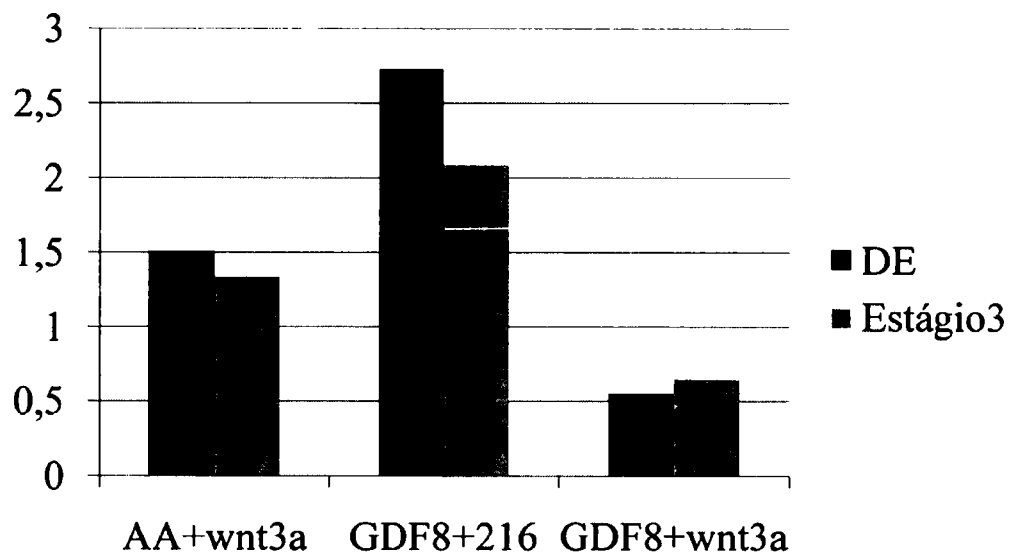


Figura 27C

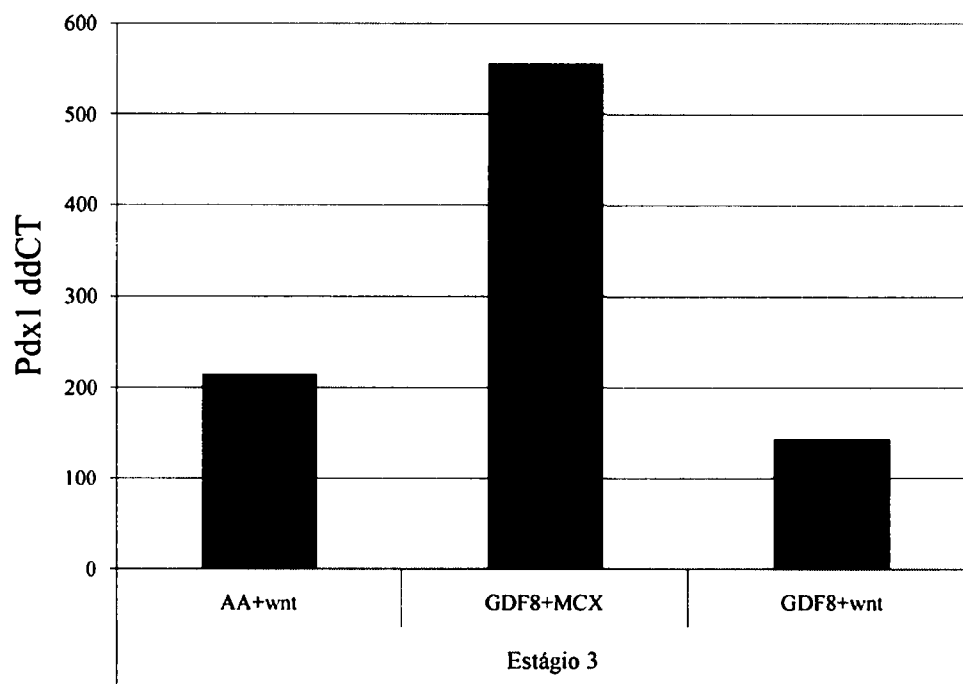


Figura 27D

Estágio 3	AA+wnt	GDF8+MCX	GDF8+wnt
Pdx	215	555	142
Cdx2	1614	1567	965
HNF4a	339	210	267

Figura 27E

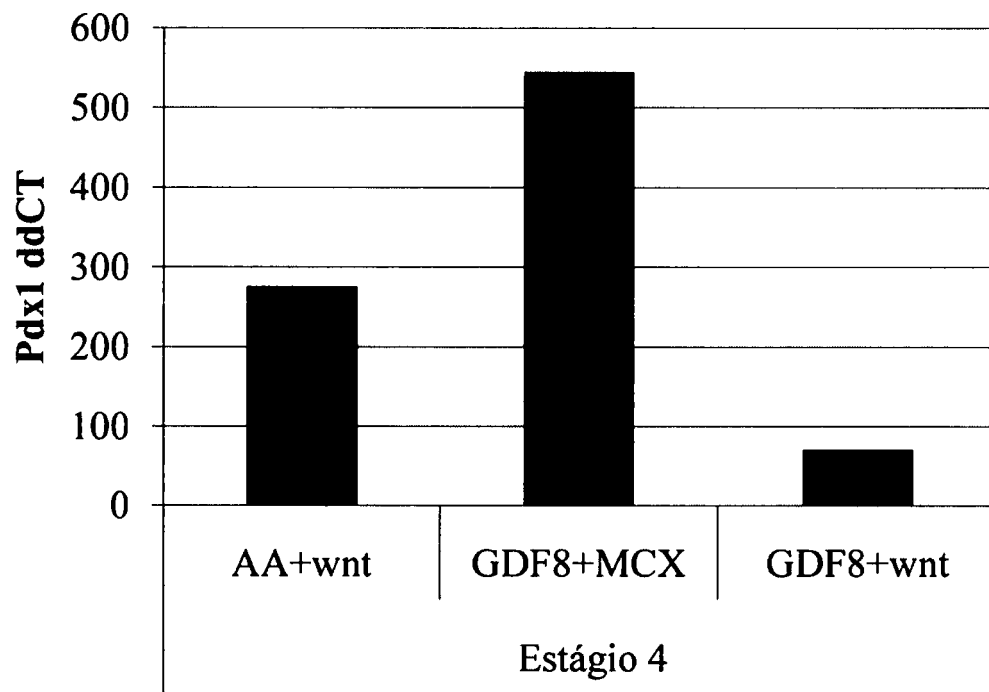


Figura 27F

Estágio 4	AA+wnt	GDF8+MCX	GDF8+wnt
Pdx	276	545	71
Cdx2	1971	2496	983
HNF4a	640	426	609

RESUMO

Patente de Invenção: **"DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES"**.

A presente invenção refere-se a métodos para diferenciar células-tronco pluripotentes. Em particular, a presente invenção refere-se a métodos e composições para diferenciar células-tronco pluripotentes em células que expressam marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo que compreendem o cultivo das células-tronco pluripotentes em meio que compreende uma quantidade suficiente de GDF-8 para ocasionar a diferenciação das células-tronco pluripotentes em células que expressam marcadores característicos da linhagem do endoderma definitivo.