

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0618471-5 A2**

(22) Data de Depósito: 09/11/2006
(43) Data da Publicação: 30/08/2011
(RPI 2121)



(51) *Int.Cl.:*
A01N 1/02
G01N 33/567
C12N 5/00
C12N 5/02

(54) Título: **SELEÇÃO, REPRODUÇÃO E USO DE CÉLULAS-TRONCO ANEUPLÓIDES EM MOSAICO**

(30) Prioridade Unionista: 09/11/2005 US 60/735,715

(73) Titular(es): The Scripps Research Institute

(72) Inventor(es): Jerold Jun Ming Chun, Jurjen Willem Westra, Stevens Kastrup Rehen, Suzanne Earlene Peterson, Yun Chun Yung

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006043794 de 09/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/056572 de 18/05/2007

(57) Resumo: SELEÇÃO, REPRODUÇÃO E USO DE CÉLULAS-TRONCO ANEUPLÓIDES EM MOSAICO. A presente invenção refere-se a disposição de cariótipos de células em uma população celular que pode determinar o fenótipo e capacidade de células-tronco de se diferenciarem nos tipos de células desejados, de forma a funcionarem normalmente, bem como de representarem risco para eventos adversos como câncer. Por conseguinte, a determinação quanto ao status de células aneuplóides em mosaico de uma população celular é útil na identificação e/ou manutenção de traços desejados e na eliminação de traços não desejados em células-tronco e para defini-las em nível de seu complemento cromossômico.

PI- 0612441-3
Pet - 020080094843
Data - 02/02/08

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**SELEÇÃO, REPRODUÇÃO E USO DE CÉLULAS-TRONCO ANEUPLOÍDES EM MO-SAICO**".

Referência Cruzada a Pedidos de Patente Relacionados

5 Este pedido de patente reivindica o benefício de prioridade ao pedido de patente U.S. Serial Nº 60/735 715, depositado em 09 de novembro de 2005, cujo conteúdo é aqui incorporado em sua totalidade por referência neste pedido de patente.

10 Declaração referente a direitos sobre invenções, cuja pesquisa e desenvolvimento foram patrocinados em nível federal.

A presente invenção foi criada com apoio do Governo, sob a Doação Nº K02MH01723, concedida pelo *National Institutes of Health*. O governo possui certos direitos sobre esta invenção.

Antecedentes da Invenção

15 As células-tronco possuem o potencial para evoluírem no corpo em muitos tipos diferentes de células. Teoricamente, elas podem dividir-se ilimitadamente para reporem outras células. Quando uma célula-tronco divide-se, cada nova célula possui o potencial para permanecer como célula-tronco ou para tornar-se um outro tipo de célula com função mais especiali-
20 zada, como, por exemplo, célula muscular, hemácia ou célula cerebral. Uma célula-tronco totipotente possui potencial de diferenciação total, podendo dar origem a todos os diferentes tipos de células no corpo. Uma célula de ovo fertilizado é um exemplo de célula-tronco totipotente. Células-tronco pluripotentes podem dar origem a qualquer tipo celular no corpo, derivado das três
25 principais camadas de células germinativas ou do próprio embrião. Células progenitoras podem diferenciar-se também em células especializadas. No entanto, ao contrário de células-tronco, as células progenitoras não são capazes de se auto-renovarem, dando origem somente a um ou a alguns tipos de células.

30 As células-tronco incluem células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. Células-tronco embrionárias são derivadas de embriões. Para fins de pesquisa, células-tronco embrionárias são obtidas de embriões

que se desenvolveram de ovos fertilizados *in vitro* (como, na fertilização clínica *in vitro*) e que, em seguida, são doadas para finalidades de pesquisa com consentimento livre e informados dos doadores. Os embriões tipicamente obtidos possuem quatro ou cinco dias de vida e são uma esfera microscópica oca denominada de blastócito. O blastócito possui três estruturas: o trofoblasto, que é a camada de células que cerca o blastócito; o blastocele, que é a cavidade oca dentro do blastócito; e a massa interna da célula, constituída por um grupo de aproximadamente 30 células em uma extremidade do blastocele.

10 Células-tronco embrionárias podem ser obtidas, por exemplo, por isolamento da massa interna de células e seu desenvolvimento *in vitro*. A massa interna de células é cultivada geralmente sobre uma camada de células nutritivas, como fibroblastos embrionários de camundongo, que servem como camada de sustentação para a massa interna de células e como fonte
15 de nutrientes. As células-tronco embrionárias são pluripotentes e podem tornar-se qualquer tipo de célula presente no corpo.

Células-tronco adultas, ou células-tronco somáticas, são células não diferenciadas. É freqüentemente possível identificar estas células entre as células diferenciadas em um tecido ou órgão. Uma célula-tronco adulta
20 pode renovar-se e diferenciar-se em tipos de células especializadas do tecido ou órgão.

Células-tronco embrionárias humanas (HESCs) possuem grande potencial para uso em abordagens científicas básicas e terapêuticas, incluindo o transplante em medicina regenerativa (Amit M *et al. Dev Biol* 227:271-278 (2000)). Um desafio para o uso de HESCs é a manutenção de linhagens estáveis de células, especialmente após passagens prolongadas (Amit M *et al. Dev Biol* 227:271-278 (2000); Carpenter MK *et al. Dev Dyn* 229:243-258 (2004); Rosler ES *et al. Dev Dyn* 229:259-274 (2004)). De fato, recentemente foi relatada a instabilidade cromossômica de linhagens de HESC, cultivadas sob auspícios do NIH, como H1, H7 e H9, resultantes de expansão clonal
30 de células-tronco aneuplóides (Draper JS *et al., Nat Biotechnol* 22:53-54 (2004); Lakshmipathy U *et al., Stem Cells* 22:531-543 (2004); Pera MF, *Nat*

Biotechnol 22:42-43 (2004)). As anormalidades cromossômicas mais frequentemente relatadas foram hiperploídia, especialmente trissomias dos cromossomos 12, 17 ou 20 (Draper JS *et al.*, *Nat Biotechnol* 22:53-54 (2004); Lakshmiathy U *et al.*, *Stem Cells* 22:531-543 (2004); Pera MF, *Nat*
5 *Biotechnol* 22:42-43 (2004)), embora a generalidade da instabilidade cromossômica seja incerta (Thomson Ja *et al.*, *Science* 282:114-1147 (1998); Amit M *et al.*, *Dev Biol* 227:271-278 (2000); Reubinoff BE *et al.*, *Nat Biotechnol* 18:399-404 (2000); Thomson Ja *et al.*, *Trends Biotechnol* 18:53-57 (2000); Xu C *et al.*, *Nat Biotechnol* 19:971-974 (2001); Cheng L *et al.*, *Stem*
10 *Cells* 21:131-142 (2003)).

Anteriormente, análises citogenéticas que não identificassem todos os cromossomos eram ignoradas por citogeneticistas porque se acreditava que a falta de cromossomos representasse imprecisões da análise citogenética em vez de uma verdadeira ausência de um cromossomo. De
15 fato, de acordo com as instruções do manual de laboratório da *Association of Genetic Technologist*:

Se menos de 45 cromossomos estiverem presentes na metáfase (esfregaço), pode ser suposto que alguns se perderam no processamento e que a metáfase (esfregado) não é adequada para análise.

20 Vide, Barch *et al.* (1997) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincott: Filadélfia.

A presente invenção trata do papel desempenhado pela aneuploidia em células-tronco e provê ferramentas para o uso e análise de células-tronco, entre outras questões.

25 Breve Sumário da invenção

A presente invenção refere-se métodos para detecção e caracterização do status de aneuploidia em mosaico de uma população de células-tronco ou progenitoras. Em algumas concretizações, os métodos compreendem a detecção da presença de células aneuplóides em mosaico na população, em que, pelo menos, 3 cariótipos diferentes são detectados entre dife-
30 rentes células na população.

Em algumas concretizações, pelo menos 30 células são investi-

gadas na população quanto à aneuploidia.

Em algumas concretizações, a aneuploidia das células é registrada.

Em algumas concretizações, pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 ou mais cariótipos diferentes são detectados em células diferentes na população.

Em algumas concretizações, os métodos compreendem a detecção de células com cariótipo em mosaico com predomínio hipoplóide e a seleção, entre as células com cariótipo em mosaico com predomínio hipoplóide, de uma linhagem de célula-tronco ou de progenitora na qual, pelo menos parte de um cromossomo seja hipoplóide para diferenciação e posterior reprodução ou transplante.

Em algumas concretizações, os métodos compreendem a detecção de células exibindo cariótipo em mosaico com predomínio hipoplóide e seleção, entre as células com cariótipo em mosaico com predomínio hipoplóide, de uma linhagem de célula-tronco ou de progenitora, na qual, pelo menos, parte de um cromossomo é hipoplóide para seleção de fármaco.

Em algumas concretizações, os métodos compreendem a detecção de células com cariótipo em mosaico com predomínio hiperplóide e a seleção, entre as células com cariótipo em mosaico com predomínio hiperplóide, de uma linhagem de célula-tronco ou de progenitora na qual, pelo menos parte de um cromossomo seja hiperplóide para diferenciação e posterior reprodução ou transplante.

Em algumas concretizações, os métodos compreendem a detecção de células exibindo cariótipo em mosaico com predomínio hiperplóide e seleção, entre as células com cariótipo em mosaico com predomínio hiperplóide, de uma linhagem de célula-tronco ou de progenitora, na qual, pelo menos, parte de um cromossomo é hipoplóide para seleção de fármaco (por exemplo, seleção de um fármaco que iniba ou elimine seletivamente as células).

Em algumas concretizações, os métodos compreendem ainda a passagem de células-tronco através de, pelo menos (por exemplo, pelo me-

nos, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 ou mais), um ciclo de divisão celular anteriormente à etapa de detecção.

Em algumas concretizações, o cariótipo de, pelo menos, por exemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% das células, na população de células, é determinado.

Em algumas concretizações, a etapa de detecção compreende hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), incluindo a técnica multiplex-FISH. Em algumas concretizações, a etapa de detecção compreende cariotipagem espectral (SKY). Em algumas concretizações, a etapa de detecção compreende bandeamento G. Em algumas concretizações, a etapa de detecção compreende DAPI ou outras técnicas e corantes para visualização de cromossomos. Em algumas concretizações, a etapa de detecção compreende citometria de fluxo.

A presente invenção provê também métodos de seleção de um agente que iniba, de preferência, células que não são capazes de se diferenciarem, em comparação a células capazes de se diferenciarem no tipo de célula desejado. Em algumas concretizações, os métodos compreendem o contato entre o agente e células que exibem cariótipo em mosaico com predomínio hiperplóide, em que as células são incapazes de diferenciação no tipo de célula desejado; e seleção de um agente que iniba a reprodução das células.

Em algumas concretizações, os métodos compreendem ainda as etapas de: o contato entre o agente e as células que exibem cariótipo hipoplóide, em que as células são capazes de se diferenciarem no tipo de célula desejado; e a seleção de um agente que iniba a reprodução das células hiperplóides, incapazes de diferenciação, porém, que não iniba significativamente a reprodução das células hipoplóides capazes de se diferenciarem no tipo de célula desejado.

A presente invenção provê também métodos para manutenção ou melhora de uma população de células-tronco ou de células progenitoras. Em algumas concretizações, os métodos compreendem a detecção do cariótipo de, pelo menos, um cromossomo ou parte do mesmo, nas células desta

população; e a separação de células com cariótipo euplóide ou hipoplóide em, pelo menos, um cromossomo ou parte do mesmo, presentes nesta população, de células com pelo menos um cromossomo, ou parte do mesmo, hiperplóide e, através disso, mantendo-se e melhorando a população de células-tronco ou de células progenitoras pela remoção de células hiperplóides, enquanto que mantendo as células euplóides e hipoplóides nesta população de células.

Em algumas concretizações, as etapas de detecção e de separação são conduzidas por seleção celular ativada por fluorescência (FACS).

Em algumas concretizações, após a etapa de separação, é promovida a diferenciação das células exibindo cariótipo euplóide ou hipoplóide. Em algumas concretizações, após a etapa de separação, é promovida a reprodução das células exibindo cariótipo euplóide ou hipoplóide. Em algumas concretizações, após a etapa de separação, as células exibindo cariótipo euplóide ou hipoplóide são transplantadas em um indivíduo.

Definições

"Aneuploidia" é utilizada em seu significado convencional, isto é, qualquer desvio de um múltiplo exato do número haplóide de cromossomos, incluindo ganhos e/ou perdas, bem como alterações intracromossômicas. Dessa forma, células exibindo desvios de duas cópias de, pelo menos, parte do genoma haplóide, isto é, a presença de mais de duas cópias de um ou mais cromossomos, ou partes destes, ou ausência de um ou mais cromossomos, ou partes destes, seria considerada aneuplóide. Um termo que, às vezes, é utilizado para descrever aneuploidia é "aneussomia", o qual é incluído na presente definição de aneuploidia. Aneuplóide em mosaico", conforme utilizado no presente, refere-se à presença de, pelo menos, três cariótipos diferentes na população de células, em que, pelo menos, duas destas estão em situação diferente em termos de aneuploidia. Em algumas concretizações, haverá 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais cariótipos diferentes em uma população de células.

"Seleção de fármaco" refere-se à seleção através de múltiplas moléculas (por exemplo, uma biblioteca destas) para identificar uma ou mais

moléculas com um efeito biológico desejado. As moléculas, às vezes, referidas como "agentes" podem incluir, entre outras, pequenas moléculas orgânicas ou moléculas biológicas, como anticorpos, ácidos nucleicos, peptídeos, lipídeos, açúcares ou combinações destes.

5 "Cariótipo", conforme utilizado no presente, refere-se ao número e/ou tipo de cromossomos, presentes em uma célula.

"Célula progenitora" refere-se a uma célula que pode diferenciar-se em um número limitado de tipos de células, porém, que não pode normalmente diferenciar-se em células-tronco. Por exemplo, células progenitoras do sangue, encontradas na medula óssea, estão comprometidas, como
10 parte de sua progressão natural, em produzir células diferenciadas brancas ou vermelhas do sangue em seu estágio terminal.

"Célula-tronco", conforme utilizada no presente, refere-se a uma célula que é totipotente ou pluripotente. Células-tronco totipotentes podem
15 diferenciar-se em qualquer tipo de célula no corpo, junto com a placenta embrionária que sustenta o embrião em desenvolvimento. Células-tronco totipotentes podem dar origem a todos os tipos de células encontrados em um organismo em desenvolvimento, incluindo a placenta. Células-tronco pluripotentes podem desenvolver-se em muitos dos três principais tipos de tecido:
20 endoderma (por exemplo, revestimento interno do intestino), mesoderma (por exemplo, músculo, osso, sangue) e ectoderma (por exemplo, tecidos epidérmicos e sistema nervoso), porém podem exibir restrições ao seu potencial de desenvolvimento (por exemplo, podem não formar tecido placentário ou outros tipos de células de linhagem definida).

25 Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 apresenta gráficos com o percentual de contagens de cromossomos de HESCs H7 de passagem em estágio precoce ou tardio. O asterisco representa a posição esperada de células euplóides (46 cromossomos) no gráfico. Observar que ambas as linhas exibem proporção significativa de células hipoplóides nas populações da passagem em estágio precoce, enquanto que células de passagens em estágio tardio tendem a exibir clones hiperplóides.
30

A figura 2 apresenta gráficos com o percentual de contagens de cromossomos da linhagem de HESC H9 de passagem em estágio precoce ou tardio. O asterisco representa a posição esperada de células euplóides (46 cromossomos) no gráfico. Observar que ambas as linhas exibem proporção significativa de células hipoplóides nas populações da passagem em estágio precoce, enquanto que células de passagem em estágio tardio tendem a exibir clones hiperplóides.

As figuras 3-4 ilustram o efeito de hiperplóidia sobre diferenciação neuronal. ESCs (células-tronco embrionárias) de mamíferos foram cultivados em células PA6 para indução de diferenciação neuronal. As células foram tratadas com ou sem taxol por 6 dias para induzir aneuploidia. As contagens de cromossomos foram determinadas e placas paralelas foram fixadas e coradas para o marcador neuronal tuj1. A figura 3 mostra que tratamento das células com taxol induz à aneuploidia, especificamente hiperplóidia. A figura 4 demonstra que a hiperplóidia induzida por taxol reduz significativamente o potencial de diferenciação neuronal.

Descrição Detalhada da Invenção

I. Introdução

A presente invenção refere-se à descoberta surpreendente da participação de células aneuplóides em mosaico na ocorrência natural e desenvolvimento de células-tronco. Pesquisadores de células-tronco acreditavam até esta data que a aneuploidia era necessariamente uma anormalidade e que, por conseguinte, deveria ser evitada em transplantes e em outros usos terapêuticos. De fato, métodos atuais de isolamento e manutenção de células-tronco realçam a importância essencial da euploidia. Vide, por exemplo, a patente US Nº 6 200 806.

Em contraste, a presente invenção provê métodos para detecção de cariótipos aneuplóides em mosaico em populações de células-tronco e de células progenitoras e provê o uso e análise de células-tronco ou de células progenitoras, selecionadas especialmente para um cariótipo aneuplóide em mosaico. O mosaicismo de células aneuplóides está relacionado à *distribuição* de cariótipos em uma população de células. Conforme é expli-

cado posteriormente no presente, a presença de células aneuplóides em mosaico não é, de fato, uma anormalidade, porém, em vez disso, uma propriedade proeminente de populações normais de células-tronco. No entanto, a configuração exata do mosaico aneuplóide da população de células-tronco afeta o genótipo e pode afetar o fenótipo da população celular, incluindo a capacidade da população de reter a sua capacidade de se diferenciar em múltiplos tipos diferentes de células. Ao contrário do que previamente descrito em relação a células-tronco, os inventores constataram ser a norma a presença de cariótipos diferentes em mosaico em uma população de células-tronco, e de que o mesmo afeta o fenótipo da população de células, incluindo suas propriedades fisiológicas e sua capacidade de funcionar de modo adequado como células-tronco. De acordo com o mesmo, a presente invenção provê a "cariotipagem de uma população" pela qual o cariótipo de um número maior de células em uma população é determinado do que havia sido descrito anteriormente. Ademais, ao contrário do que anteriormente descrito, os resultados da cariotipagem da população permite a seleção de populações de células com aneuploidias específicas (por exemplo, cariótipos hipoplóides), enquanto que células hipoplóides eram previamente ignoradas ou ativamente descartadas. Além disso, a presente invenção permite a seleção de aneuploidias específicas (por exemplo, hiperploídia em um certo cromossomo e/ou euploidia ou hipoploidia em outros cromossomos).

Exemplos de cariótipos diferentes em uma população de células incluem, entre outros, a presença de, pelo menos, uma célula com complemento normal de cromossomos (por exemplo, em seres humanos, pares de 22 cromossomos não sexuais, denominados "autossômicos", acrescidos de dois cromossomos sexuais) com, pelo menos, uma célula aneuplóide. Adicionalmente, em uma população de células aneuplóides em mosaico, é possível haver uma variedade de cariótipos diferentes em uma única população. Por exemplo, uma população de células pode incluir algumas células que são hipoplóides em parte ou em todo um cromossomo em particular e outras células que são hipoplóides em parte ou em todo um cromossomo diferente. Em algumas concretizações, uma população de células pode incluir algumas

células que são hiperplóides em parte ou em todo um cromossomo em particular e outras células que são hiperplóides em parte ou em todo um cromossomo diferente.

5 Em algumas concretizações, pelo menos algumas células, em uma população de células, possui cariótipo em mosaico com predomínio hipoplóide. "Cariótipo em mosaico com predomínio hipoplóide" refere-se a uma população celular em que as células são predominantemente (por exemplo, acima de 50, 60, 70, 80, 90, 95 ou 99%) hipoplóides em um ou mais cromossomos ou partes destes. Em algumas concretizações, a maioria das
10 células são hipoplóides em um cromossomo em particular. Em outras concretizações, células hipoplóides na população são hipoplóides em cromossomos diferentes (por exemplo, pelo menos, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais) ou partes destes. Em alguns casos, células que são hipoplóides em certos cromossomos são euplóides e/ou hiperplóides em outros cromossomos ou partes destes. Entende-se que embora a população de células possa ter cariótipo "com
15 predomínio" hipoplóide, a população pode conter células euplóides e hiperplóides, embora presentes em minoria.

Em algumas concretizações, pelo menos algumas células, em uma população de células, possuem cariótipo em mosaico com predomínio
20 hiperplóide. "Cariótipo em mosaico com predomínio hiperplóide" refere-se a uma população celular em que as células são predominantemente (por exemplo, , acima de 50, 60, 70, 80, 90, 95 ou 99%) hiperplóides em um ou mais cromossomos ou partes destes. Em algumas concretizações, a maioria das células são hiperplóides em um cromossomo em particular. Em outras
25 concretizações, células hiperplóides na população são hiperplóides em cromossomos diferentes (por exemplo, pelo menos, 1, 2, 3, 4, 5 ou mais) ou partes destes. Em alguns casos, células que são hiperplóides em certos cromossomos são euplóides e/ou hipoplóides em outros cromossomos ou partes destes. Entende-se que embora a população de células possa ter ca-
30 riótipo "com predomínio" hiperplóide, a população pode conter células euplóides e hipoplóides, embora presentes em minoria

Em algumas concretizações, a população celular é constituída

por uma população mista de células hipoplóides e hiperplóides e/ou células que contenham cromossomos hipoplóides hiperplóides, ou partes destes. Uma célula que tenha três cópias de, pelo menos, parte de um primeiro cromossomo, porém somente uma cópia de, pelo menos, parte de um segundo cromossomo, é um exemplo desta última característica. Em ainda outro exemplo, pelo menos, algumas células, na população de células, contêm uma translocação cromossômica.

A presente invenção é útil para qualquer tipo de células-tronco ou progenitoras. Tipos exemplares de células-tronco incluem células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. As células-tronco podem provir de qualquer tipo de animal, incluindo mamíferos humanos e não humanos. Por conseguinte, as células-tronco utilizadas na presente invenção incluem células-tronco embrionárias humanas e células-tronco adultas humanas. As células progenitoras incluem todas dos muitos tipos de células progenitoras, presentes em um organismo vivo, incluindo entre outras linhagens de hematopoiese (sangue), sistema nervoso, linfóide, pâncreas, cardíaca, pulmão, músculo, osso, cartilagem, tecido conjuntivo, córnea, cabelo, pele, fígado, intestino, olho, gordura, mama, tiróide, reprodução sexual, etc..

Em algumas concretizações, células-tronco de câncer (ou, de outra forma, neoplásicas) são isoladas por seleção de aneuploidias associadas a fenótipos de câncer. Estas células são úteis como alvos para seleção de fármacos que visa identificar fármacos que inibem ou eliminam especificamente as células-tronco de câncer. Alternativamente, uma população de células-tronco pode ser selecionada de forma a excluir cariótipos associados a câncer e, desse modo, possibilitar o uso das demais células na população em transplante, etc..

Técnicas para isolamento de células-tronco e de células progenitoras são bem-conhecidas e são descritas em, por exemplo, Thomson *et al.*, *Science* 282:1145- (1998); Bodnar *et al.*, *Stem Cells and Development* 13:243- (2004); Li *et al.*, *Current Biology* 8:971- (1998); Schwartz *et al.*, *Journal of Neuroscience Research* 71: 838 (2003).

II. Detecção de linhagem celular aneuplóide em mosaico

Ao contrário de descrições anteriores de células-tronco, os inventores descobriram que não há necessariamente expansão clonal de uma aneuploidia específica. Por conseguinte, um número maior de células é analisado quanto a seu cariótipo de forma que uma distribuição de cariótipos possa ser determinada. Essa análise envolverá tipicamente análise do cariótipo de mais células do que tipicamente analisadas anteriormente por pesquisadores de células-tronco. Versados na técnica apreciarão que o cariótipo de um número significativo de células deve ser determinado individualmente, em uma população de células, para estabelecer com exatidão a *distribuição* de cariótipos (isto é, a "linhagem celular aneuplóide em mosaico"), uma das quais que possa incluir um cariótipo euplóide na população de células. Por conseguinte, em algumas concretizações, o cariótipo de mais do que 30, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 500, 1000 ou mais células, em uma população de células, é determinado individualmente para estabelecer a distribuição exata de diferentes cariótipos na população celular. O número de células analisadas determinará o limite de detecção para a ocorrência de um cariótipo em particular. Por exemplo, para detectar um cariótipo que ocorra em 1% de freqüência, é necessário determinar o cariótipo de, pelo menos, 100, e mais preferencialmente de, por exemplo, 200, 300, 500 ou mais células individualizadas em uma população de células. Em algumas concretizações, os métodos da invenção compreendem a detecção do cariótipo de um número suficiente de células individualizadas para detectar a presença de um cariótipo individualizado que ocorra com freqüência de, por exemplo, 1%, 0,1%, 0,001%, 0,0001%, 0,00001% ou inferior. Em algumas concretizações, o cariótipo de todas, ou substancialmente todas (por exemplo, pelo menos, 80, 90, 95 ou 99%) as células, em uma população de células, é determinado. Em geral, a determinação do cariótipo de células individualizadas compreenderá a determinação de substancialmente todos os cromossomos na célula, em vez de simplesmente a investigação da presença de um cromossomo específico, ou parte de cromossomo. No entanto, em outras concretizações, a presente invenção possibilita também a determinação do número de somente alguns cromossomos de uma célula (por exemplo, 2, 3, 4, 5 ou mais

cromossomos).

Embora qualquer tipo de exibição possa ser utilizado para apresentação dos dados resultantes da detecção de linhagens aneuplóides em mosaico, os inventores constataram ser útil exibir os resultados em formato de histograma e/ou tabular e, desse modo, exibindo visualmente a quantidade de variação de número de diferentes cromossomos, ou partes destes, na população de células. Um exemplo deste tipo de histograma é exibido nas figuras 1-2. Conforme exibido nas figuras 1-2, a análise pode concentrar-se no número total de cada célula analisada. No entanto, é possível uma análise mais detalhada em que o número de cada diferente cromossomo em cada célula pode ser também determinado.

Qualquer método disponível para versados na técnica pode ser utilizado para detectar linhagem celular aneuplóide em mosaico. A cariotipagem pode ser realizada para determinar o número, a identificação e/ou a integridade de cromossomos. A integridade de cromossomos refere-se ao estado de intacto de um cromossomo (conforme seria encontrado normalmente) ou demonstrando evidência de ter sido rompido em virtude de ruptura, eventos de translocação, microeventos que incluem exclusões, translocações, inserções, ampliações, inversões e qualquer outra alteração intra ou intercromossômica.

Em algumas concretizações, métodos de Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH) são empregados para determinar o cariótipo de células. Os métodos de FISH são bem-conhecidos na técnica e são descritos em, por exemplo, a Publicação da Patente U.S. Nº 2005/0214842. Métodos que empregam a técnica de FISH multiplex (M-FISH) são particularmente úteis para cariotipagem de cromossomos múltiplos. Exemplos de métodos que empregam M-FISH incluem, métodos de cariotipagem espectral (SKY). Métodos que empregam a técnica de SKY são descritos em, por exemplo, Schrock E *et al.*, *Science* 273:494 (1996); Speicher MR *et al.*, *Nat Genet* 2:368 (1996); T, Vignon *et al.*, *Nat Genet* 15:406 (1997); Macville, M. *et al.*, *Hist Cell Biol.* 108 (4-5):299-305 (1997). Métodos que empregam a técnica de SKY envolvem o uso de sondas cromossômicas múltiplas, marcadas com

vários marcadores fluorescentes de forma a "pintar" cromossomos com marcadores detectáveis e, desse modo, permitir a determinação e identificação de todo o complemento de um cromossomo.

Em algumas concretizações, é utilizada citometria de fluxo, como Separação Celular Ativada por Fluorescência (FACS) para determinar o cariótipo de células em uma população celular. Por exemplo, podem ser empregados corantes de DNA (por exemplo, iodeto de propídio, brometo de etídio, Hoechst 33342, 33258, DAPI, etc.) para marcar DNA em células, permitindo que as células possam ser separadas em seguida, com base na quantidade de sinal emitido pelo corante. Este método fornece uma estimativa da quantidade global de cromossomos, com base no teor de DNA, porém não fornece informação específica sobre qual cromossomo em particular exibe ganho ou perda. No entanto, a citometria de fluxo empregando corantes não específicos de DNA ou outros marcadores é suficiente para distinguir células predominantemente hipoplóides de células predominantemente hiperplóides. Em alternativa a corantes não específicos de DNA, marcadores identificados específicos para um cromossomo em particular podem ser também empregados. Este último método é mais efetivo quando utilizado em células que não estão se dividindo ativamente e estão, por conseguinte, em interfase. Estas sondas podem ser à base de nucleotídeos ou de moléculas quimicamente distintas que podem ainda parear bases, como ácidos nucléicos peptídicos (que possuem cadeia principal peptídica), etc..

Embora não seja particularmente eficiente, a cariotipagem tradicional em larga escala pode ser aplicada também supondo que um número suficiente de células possa ser analisado, conforme discutido acima. Qualquer coloração ou técnica óptica ou biofísica que detecte cromossomos poderia ser utilizada para cariotipagem. Em algumas concretizações, é utilizada a coloração de cromossomos por DAPI/outras colorações fluorescentes ou colorações de campo iluminado. A cariotipagem tradicional pode ser realizada, por exemplo, em linfócitos e amniócitos, empregados métodos de trabalho intensivo, como coloração por Giemsa (bandeamento G). Em algumas concretizações, a etapa de detecção compreende a amplificação em nível

genômico de células únicas, empregando PCR, opcionalmente em combinação com arranjos de DNA e/ou associados a dados e mapas de polimorfismo de nucleotídeos isolados. Abordagens in vivo, utilizando marcas fluorescentes ou outros métodos podem ser utilizadas também para identificar a ploidia de células-tronco em vivo (por exemplo, Kaushal *et al.*, *J Neurosci.* 23:5599-5606 (2003)).

Uma vez que a expressão de genes provém de cromossomos, será possível identificar algumas formas de aneuploidia de acordo com o nível quantitativo ou qualitativo desta expressão que possa ser detectada, permitindo o uso de um marcador substituto ou correlacionado com aneuploidia. Esta técnica pode ser associada a tecnologias convencionais de separação celular (por exemplo, FACS) possibilitando outros meios de identificação de formas distintas de aneuploidia.

Em algumas concretizações, a invenção provê métodos de seleção ou separação de diferentes células em uma população celular (por exemplo, células-tronco e/ou progenitoras) com base em seu cariótipo, pelos quais, células exibindo cariótipo euplóide ou hipoplóide são selecionadas (ou, de outra forma, separadas) de células com cariótipo hiperplóide. Em algumas concretizações, células selecionadas por hipoploidia (por exemplo, perda de pelo menos um cromossomo 1 ou parte do cromossomo 1) podem ser também hiperplóides em outro cromossomo ou parte deste. No entanto, a seleção e separação ocorrerão para a hipoploidia em particular (por exemplo, no exemplo acima, cromossomo 1). Alternativamente, células exibindo cariótipo euplóide ou hiperplóide são selecionadas (ou, de outra forma, separadas) de células com cariótipo hipoplóide.

Estes métodos de separação podem incluir qualquer método de separação disponível na técnica, incluindo, entre outros, a separação pela técnica FACS. Estes métodos de separação são úteis, por exemplo, para manutenção e controle de qualidade de rotina de populações de células-tronco e de progenitoras, especialmente quando for desejada a retirada de células hiperplóides potencialmente cancerosas.

III. Usos de Células-tronco após Seleção

A presente invenção provê métodos de cultura, crescimento e/ou de seleção de células-tronco ou de células progenitoras ou, de outra forma, o uso de células-tronco ou progenitoras, em que os métodos incluem uma etapa de monitoramento e, opcionalmente, a manutenção de linhagem celular aneuplóide em mosaico. A seleção de uma linhagem celular aneuplóide em mosaico especificada, isto é, uma distribuição especificada de cariótipos em uma população celular, permite o uso mais adequado desta em todos os ensaios, procedimentos e abordagens que empregam células-tronco ou células progenitoras. Este inclui, entre outros, o uso de células-tronco ou de células progenitoras em transplante, produção de agentes biológicos (anticorpos, siRNAs, etc.), seleção de agentes farmacêuticos (por exemplo, moléculas que interfiram ou intensifiquem a proliferação ou diferenciação de células-tronco), a seleção de toxinas e/ou seu efeito, detecção de agentes de biodefesa, através do qual mosaicos definidos tenham propriedades identificadas que permitam a detecção de agentes, a determinação de novos agentes para tratamento de câncer, formação de tecidos, regeneração de tecidos, vacinação, pela qual células-tronco ou progenitoras tenham propriedades que permitam a apresentação apropriada de antígenos ou a promoção/inibição de uma resposta imunológica, a determinação de genótipos de células-tronco ou progenitoras para fins prognósticos e diagnósticos, incluindo espécimes normais e patológicos, tratamento de doenças genéticas, tratamento de doenças não genéticas, biossensores, pelos quais, células-tronco ou progenitores, previamente selecionadas para responderem a estímulos distintos, possam, então, responder a estímulos internos ou externos quando introduzidas em um organismo ou serem utilizadas para monitoramento como agente isolado, tratamento de lesões, cirurgia plástica e/ou produção de fatores de crescimento, de proteínas antiapoptóticas ou outras proteínas.

O tipo específico de mosaico aneuplóide selecionado dependerá do tipo utilizado de célula-tronco ou progenitora. Em algumas concretizações, pode ser desejável selecionar e/ou manter uma população de células em mosaico com predomínio hiperplóide. Em algumas concretizações, pode-

rá ser desejável selecionar e/ou manter uma população celular exibindo uma combinação específica de cariótipos (por exemplo, translocações e/ou mistura de células com padrão diferente de hipoploidia e/ou hiperploidia e/ou euploidia).

5 O tipo específico de mosaico aneuplóide desejado pode ser prontamente determinado por monitoramento da distribuição de cariótipos em uma população de células e identificação de uma associação de fenótipo ou capacidade desejada com a distribuição de um cariótipo específico. Um exemplo desse processo é descrito nos Exemplos. As etapas nos Exemplos
10 incluem a identificação da distribuição de cariótipos de células-tronco, a identificação da diferença de cariótipos entre, pelo menos, duas populações diferentes de células-tronco e, em seguida, a identificação de uma associação de um fenótipo desejado com uma das distribuições de cariótipos (por exemplo, células-tronco com distribuição de predomínio hipoplóide retêm a
15 capacidade de se diferenciarem nos tipos celulares desejados).

As células-tronco têm atraído interesse considerável como tratamento para uma miríade de doenças, condições e deficiências, uma vez que provêm uma fonte renovável de células e tecidos. Células-tronco formadoras de sangue, presentes na medula óssea, denominadas de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) são um tipo comumente utilizado de célula-tronco. As HSCs são atualmente utilizadas para tratamento de leucemia, linfoma e várias doenças sangüíneas hereditárias. No entanto, HSCs e outras células-tronco possuem potencial considerável para tratamento de muitas outras doenças. Alguns relatos sugeriram que certos tipos de células-tronco adultas possuem a capacidade de se diferenciarem em múltiplos tipos de células. Por exemplo, células-tronco hematopoiéticas podem diferenciar-se em células nervosas (neurônios, oligodendrócitos e astrócitos) (Hao *et al.*, *H. Hematother. Stem Cells Res.* 12:23-32 (2003); Zhao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2426-2431 (2003); Bonilla *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* 15:575-
20 582 (2002)), células de músculo esquelético (Ferrari *et al.*, *Science* 279:1528-1530 (1998); Gussoni *et al.*, *Nature* 401:390-394 (1999)), células
25 de músculo cardíaco (Jackson *et al.*, *J. Clin. Invest.* 107:1395-1402 (2001)) e
30

células hepáticas (Lagasse *et al.*, *Nat. Med.* 6:1229-1234, 2000).

Células-tronco podem ser utilizadas no tratamento de problemas orgânicos de qualquer tipo incluindo, entre outros, distúrbios de desenvolvimento, infecções, doença degenerativa, lesão física ou química, incluindo

5 aquelas decorrentes de trauma, nas quais tecidos precisam ser repostos ou regenerados. Exemplos de condições relacionadas com trauma incluem lesões do sistema nervoso central (SNC), incluindo lesões ao cérebro, medula

10 espinhal ou a tecido que cerca o SNC, lesões ao sistema nervoso periférico (SNP) ou lesões a qualquer outra parte do corpo. Este trauma pode ser causado por acidente ou pode ser um desfecho normal ou anormal de um procedimento médico, como cirurgia ou angioplastia. O trauma pode estar relacionado a uma ruptura ou oclusão de vaso sanguíneo, por exemplo, em acidente vascular cerebral ou flebite. Em concretizações específicas, as células

15 podem ser utilizadas em terapias ou protocolos de reposição ou regeneração de tecido autólogo ou heterólogo, incluindo mas não limitando, tratamento de defeitos do epitélio de córnea, reparo de cartilagem, dermoabrasão facial, membranas de mucosas, membranas timpânicas, revestimentos intestinais, estruturas neurológicas (por exemplo, retina, neurônios auditivos em membrana basilar, neurônios olfativos em epitélio olfativo), reparo de queimadura

20 e ferida provocadas por lesões traumáticas da pele ou para reconstrução de outros órgãos ou tecidos danificados ou doentes. As lesões podem ser decorrentes de condições e doenças específicas, incluindo entre outras, infarto do miocárdio, distúrbios convulsivos, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, hipotensão, ataque cardíaco, isquemia, inflamação, perda de função

25 cognitiva relacionada à idade, dano provocado por radiação, paralisia cerebral, doença neurodegenerativa, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Leigh, demência da AIDS, perda de memória, esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença renal isquêmica, trauma cerebral ou da medula espinhal, desvio coração-pulmão, isquemia de retina, trauma de retina,

30 erros congênitos de metabolismo, adrenoleucodistrofia, fibrose cística, doença de armazenamento de glicogênio, hipotireoidismo, anemia por célula falciforme, síndrome de Pearson, doença de Pompe, fenilcetonúria (PKU),

porfirias, doença da urina de xarope de bordo, homocistinúria, mucopolissacarídeos, doença granulomatosa crônica e tirosinemia, doença de Tay-Sachs, câncer, tumores ou outras condições patológicas ou neoplásicas.

As células-tronco podem conter opcionalmente um vetor de ácido nucléico exógeno ou vetor biológico em quantidade suficiente para dire-
5 cionar a expressão de um ou mais genes desejados em um paciente. A construção e expressão de vetores convencionais de ácido nucléico são bem-conhecidas na técnica e incluem aquelas técnicas contidas em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols 1-3 (2ª edição,
10 1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estes vetores de ácido nucléico podem estar contidos em um vetor biológico, como vírus e bactérias, de preferência um microorganismo não patogênico ou atenuado, incluindo vírus, bactérias, parasitas atenuados e partículas semelhantes a vírus.

O vetor de ácido nucléico ou vetor biológico pode ser introduzido
15 nas células de acordo com um protocolo de terapia genética *ex vivo*, o qual compreende a excisão de células ou tecidos de um paciente, a introdução do vetor de ácido nucléico ou vetor biológico nas células ou tecidos excisados e a reimplantação das células ou tecidos no paciente (vide, por exemplo, Knoll *et al.*, *Am. J. Health Syst. Pharm.* 55:899-904 (1998); Raymon *et al.*, *Exp. Neurol.* 144:82-91 (1997); Culver *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 1:399-410 (1990);
20 Kasid *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:473-477 (1990)). O vetor de ácido nucléico ou vetor biológico pode ser introduzido em células ou tecidos excisados, por exemplo, por transfecção mediada por fosfato de cálcio (Wigler *et al.*, *Cell* 14:725 (1978); Corsaro e Pearson, *Somatic Cell Genetics*
25 7:603 (1981); Graham e Van der Eb, *Virology* 52:456 (1973)). Outras técnicas para introdução de vetores de ácido nucléico em células hospedeiras, como eletroporação (Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1:841-845 (1982)), podem ser empregadas também.

As células da invenção podem ser também co-administradas
30 com outros agentes, como outros tipos de células, fatores de crescimento e antibióticos. Outros agentes podem ser determinados por qualquer técnico na técnica.

Tipos específicos de células-tronco podem ser identificados empregando marcadores celulares específicos para um tipo desejado de célula-tronco. Marcadores de células podem ser marcadores de linhagem, marcadores metabólicos, marcadores de comunicação, fatores de crescimento, fatores de transcrição, por exemplo. Em concretizações específicas, marcadores celulares específicos são associados a células-tronco desejadas em particular. Marcadores celulares podem ser detectados por métodos conhecidos na técnica, como por imun química ou citometria de fluxo. A citometria de fluxo permite a medição rápida da dispersão de luz e emissão de fluorescência, produzidas por células ou partículas adequadamente iluminadas. As células ou partículas produzem sinais quando atravessam individualmente um feixe de luz. Cada partícula ou célula é medida separadamente e o resultado representa características citométricas acumuladas individualizadas. Anticorpos específicos contra um marcador celular podem ser marcados com fluorocromo de forma que possam ser detectados pelo aparelho de citometria de fluxo.

Um versado reconhece como determinar um ou mais marcadores celulares adequados. Em concretizações específicas, para células-tronco embrionárias humanas, marcadores adequados incluem Oct4, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-4. Exemplos de marcadores celulares para células-tronco hematopoiéticas incluem CD34+, Sca-1+, AA4.1+ e cKit+, e, em concretizações específicas, estes marcadores denotam células-tronco hematopoiéticas murinas. Em concretizações alternativas, células-tronco hematopoiéticas humanas podem ser CD34+ ou CD34-, CD38+ ou CD38(-), ckit+, Ti 1₁₀, C1FR+ ou uma combinação destes. Exemplos de marcadores de células-tronco nervosas incluem nestina, CD133+, BIM1 e Sox2, por exemplo. Exemplos de marcadores de células-tronco cardíacas incluem antígeno-1 de célula-tronco, CD45(-), CD34(-), Sca1+ ou uma combinação destes, por exemplo. Marcadores de células-tronco intestinais incluem A33+, cFMS+, cmyb+, CD45(-) ou uma combinação destes, por exemplo. Marcadores de células-tronco cutâneas incluem queratina 19.

Em algumas concretizações, células-tronco são investigadas

quanto a um mosaico aneuplóide em particular (por exemplo, distribuição de cariótipo) para confirmar a presença de um mosaico aneuplóide em particular (ou, opcionalmente, selecionadas para um mosaico em particular) e, em seguida, transplantadas em um animal (por exemplo, ser humano ou outro mamífero). Pela manipulação das condições de suas culturas, as células-tronco podem ser induzidas a diferenciarem-se nos tipos celulares desejados (por exemplo, células sanguíneas, neurônios, células musculares ou outros tipos de células), opcionalmente, antes de ser realizado o transplante. Esse processo pode assegurar que ocorra não só a diferenciação, mas também a funcionalidade mais adequada nas células-tronco introduzidas.

Em algumas concretizações, a distribuição de cariótipos é determinada antes, após e/ou durante a proliferação de células. Nestas concretizações, as células-tronco dividem-se antes, após ou tanto antes como depois que o mosaico aneuplóide da população celular é detectado. Em algumas concretizações, a detecção de mosaicos aneuplóides, durante e após a proliferação celular e após depósito, é utilizada para confirmar e/ou selecionar populações celulares que retenham um mosaico aneuplóide desejado que esteja associado com um fenótipo desejado (por exemplo, a capacidade de se diferenciarem em um tipo celular desejado). A proliferação pode incluir 1, 2, 5, 10, 50 ou mais ciclos de divisão celular. O nível e formas do padrão aneuplóide em mosaico podem ser alterados por condições definidas de crescimento que possam ser otimizadas para um tipo celular desejado e desfecho desejado.

Conforme é descrito nos exemplos, a detecção de uma distribuição de cariótipos em uma população celular pode possibilitar a identificação de populações celulares que retenham ou não a capacidade de se diferenciarem. Versado na técnica podem aproveitar esta descoberta para identificar e/ou utilizar populações celulares diferentes com distribuições diferentes de cariótipos para selecionar moléculas que alterem o fenótipo, inibam, eliminem ou induzam a proliferação de uma população de células, de modo preferencial em comparação a uma segunda população de células com distribuição diferente de cariótipo. Sem pretender limitar a invenção a concretiza-

ções específicas, a título de exemplo, uma primeira população de células-tronco que exiba cariótipo em mosaico de predomínio hipoplóide, associada à capacidade de diferenciar-se em tipos desejados de células, e uma segunda população de células-tronco que exiba cariótipo em mosaico de predomínio hiperplóide, associada à incapacidade de diferenciar-se no(s) tipo(s) desejado(s) de células, podem ser investigados contra uma biblioteca de agentes (moléculas orgânicas pequenas ou agentes biológicos, como anticorpos, siRNAs, ácidos nucleicos, peptídeos, etc.), e permitindo a seleção de agentes que inibam o crescimento da população hiperplóide. Uma vez que se acredita que células-tronco existam em populações neoplásicas ou cancerosas, o enfoque na origem da proliferação celular, a célula-tronco cancerosa, é também uma maneira para se identificar agentes anticâncer. Estes agentes podem ser ainda selecionados para identificar aqueles que não inibem significativamente o crescimento da população celular de predomínio hipoplóide e, pelo mesmo, a identificação de um agente que pode ser utilizado na manutenção de células com a capacidade de se diferenciarem conforme desejado. Em uma alternativa, poderiam ser encontradas células-tronco diferentes que retenham capacidade de diferenciarem-se em tipo(s) celular(es) desejado(s) quando exibissem cariótipo em mosaico de predomínio hiperplóide. Em algumas destas concretizações, são identificados agentes que inibem populações celulares de predomínio hipoplóide sem afetar significativamente populações celulares de predomínio hiperplóide.

Exemplo

A instabilidade cromossômica, produzida por passagens prolongadas de células-tronco embrionárias humanas (HESCs), representa um possível problema para o seu uso terapêutico seguro e eficaz. Recentemente, anormalidades de cariótipos, detectadas por técnicas citogenéticas clássicas, foram relatadas em linhagens de HESC. Para determinar a variação de anormalidades em HESCs correntes após passagens prolongadas, utilizou-se a "cariotipagem espectral" (SKY), associada à quantificação de perda e ganho cromossômico, em passagem em estágio inicial e tardio das linhagens H7 e H9 de HESCs, bem como de ESCS murinas. O exame de cada

HESC ou ESC murina, além de H7 e H9, incluindo HESCs não pertencente ao NIH, produziu resultados semelhantes (dados não apresentados). Células de passagens iniciais exibiram hipoploidia, contrastando com células de passagens tardias que exibiram, primariamente, hiperplóideia clonal. Culturas de ESC de mamíferos em mosaico aneuplóide e euplóide foram avaliadas quanto à sua capacidade de se diferenciarem em neurônios, e as células hiperplóide apresentaram redução significativa em potencial de diferenciação. Estes dados identificam conseqüências fisiológicas de ESC aneuplóides de mamíferos e sustentam o monitoramento de rotina de ESCs para formas distintas de aneuploidia.

Introdução:

As linhagens de HESC H7 e H9 (obtidas do WiCell Research Institute, Madison, WI) foram analisadas entre as passagens 36-44 (passagem inicial) e passagens 77-88 (passagem tardia). Foi empregada a técnica SKY para examinar o complemento e organização cromossômica, acoplado a quantificação intensiva de ganho e perda cromossômica. Em vez de identificar e relatar somente formas representativas ou conservadas de células aneuplóides, conforme é atualmente empregado em abordagens citogenéticas clássicas, todos os esfregaços aceitáveis de metáfase foram quantificados em relação ao número de cromossomos perdidos ou ganhos, e esses valores foram inseridos em gráfico. A significância das aneuploidias observadas foi examinada pela avaliação da capacidade das ESCs aneuplóides mamíferas de se diferenciarem em tipos celulares específicos, como neurônios.

Relatou-se aqui que linhagens de HESC podem exibir uma variação de aneuploidias que incluem hiperplóideia, bem como formas não previamente documentadas de hipoploidia.

Resultados:

HESCs exibem ganho e perda aleatórios de cromossomos

Estudos anteriores empregando citogenética clássica relataram que HESCs são essencialmente euplóides em nível baixo de passagens (Thomson *et al.*, 1998; Amit *et al.*, 2000; Draper *et al.*, 2004a, Draper *et al.*,

2004b; Rosler *et al.*, 2004). Recentemente, Draper e colaboradores relataram que após 60 passagens, subclones H1, H1.1A e H1.1B adquiriram mudanças cromossômicas, caracterizadas especificamente por ganho de cromossomo 12 ou 17 (Draper *et al.*, 2004b). Para determinar a conservação deste genótipo aneuplóide após passagens prolongadas, as linhagens celulares H7 e H9 foram cultivadas, conforme previamente descrito (Draper *et al.*, 2004b), e comparadas após passagens diferentes das culturas (figuras 1-2).

Após 87 passagens, células H7 exibiram ganho de cromossomo 1 e 12, de acordo com relatos prévios. A maioria destas células H7 de passagem tardia foi caracterizada por hiperploídia de cromossomos específicos, sugerindo expansão clonal de células aneuplóides *in vitro*. Somente 10% das células eram euplóides, após a quantificação (figura 1). Após 78 passagens, H9 demonstrou ganho de cromossomo 12 em 75% das células.

Por comparação, mais de 75% das células de passagens iniciais, expandidas em apenas 43 passagens, foram numericamente euplóides (figura 1). O restante das populações foi aneuplóide, porém distintamente das células H7 de passagem tardia, consistindo predominantemente em células hipoplóides que não foram obviamente clonais (figura 1). Esse resultado sugeriu que formas distintas de instabilidade cromossômica poderiam ocorrer após passagens repetidas de HESCs, com influências acentuadamente diferentes sobre a subpopulação euplóide. Resultados semelhantes foram observados com todas as outras HESCs examinadas.

A fim de comparar o bandeamento G e técnicas mais detalhadas de análise de cariótipos, utilizou-se tanto o bandeamento G como SKY-PK para analisar duas linhagens de hESC (H7 e H9), as quais são 100% euplóides em passagens iniciais. Comparativamente, células de passagem em nível baixo (passagem 43 para H7 (p43), p37 para H9) e células de passagem em nível alto (p87 para H7, p78 para H9), de cada linhagem, foram cultivadas empregando protocolos convencionais (Barch, 1997). Foram enviadas amostras para um laboratório de citogenética estabelecido para ser efetuada a cariotipagem por bandeamento G. Amostras da mesma partida original de

hESCs foram processadas por SKY-PK em nosso laboratório. Para cada amostra, foram analisados quarenta esfregaços de metáfase por dois observadores independentes. Cariótipos individualizados foram documentados em formato de tabela (Tabela 1).

5 Tabela I

Linagem celular	Bandeamento G	SKY-PK
H9p37	100% 46, XX	72,5% 46, XX 2,5% 40, XX, -2, -4, -7, +11, -14 2,5% 45, XX, -21, 2,5% 46, XX, +3, -10 2,5% 43, XX, -10, -19, -21, 2,5% 41, XX, -1, -3, -7, -16, -17 2,5% 46, XX, +5, -12 2,5% 44, XX, -5, -17 2,5% 45, XX, -20 2,5% 43, XX, -11, -15, -16 2,5% 42, XX, -13, -19, -20, -21 2,5% 45, XX, -19
H9p78	78% 47, XX, +12 22% 46, XX	72,5% 47, XX, +12 20% 46, XX 2,5% 48, XX, +6, +10 2,5% 50, XX, +12, +14, +15, +21 2,5% 47, XX, +1, -2, +12
H7 p43	100% 46, XX	80% 46, XX 2,5% 39, X, -5, -11, -12, -14, -20, -22, -X 2,5% 45, X 2,5% 45, XX, -2 2,5% 42, XX, -14, -17, -20, -22 2,5% 43, XX, -17, -21, -22 2,5% 44, XX, -16, -22 2,5% 42, XX, -6, -11, -14, -17 2,5% 44, XX, -13, -21
H7p87	90% 48, XX, +1, +12 10% 46, XX	77,5% 48, XX, +1, +12 10% 46, XX 2,5% 47, XX, +1, -2, +12 2,5% 47 XX, +1, +12, -21 2,5% 47, XX, +1, -8, +12 5% 49, XX, +1, +11, +12

Para amostras de passagens iniciais, os estudos de bandejamento G relataram sempre uma taxa uniforme de 100% euplóide. Em con-

traste nítido, entre 72,5-80% das hESCs foram identificadas como euplóides por SKY-PK. A população de células aneuplóides em mosaico das passagens iniciais, revelada por SKY-PK, não foi clonal e em grande parte, porém não exclusivamente, hipoplóide (vide a Tabela I para obter os cariótipos exatos). Por outro lado, a técnica de bandeamento G e de SKY-PK produziram resultados semelhantes, porém não idênticos, para hESCs de passagem tardia, com a maioria das células exibindo ganhos cromossômicos clonais, juntamente com um componente menor aneuplóide em mosaico, identificado por SKY-PK.

10 A perda observada de cromossomos, responsável pela maior parte do padrão em mosaico, não é decorrente de artefato técnico por vários motivos: 1) nível semelhante de perda aleatória de cromossomo não é observado em linhagens de hESC de passagem tardia; 2) linfócitos humanos, analisados em paralelo, foram >97% euplóides por SKY-PK, compatível com
15 análises anteriores (Rehen *et al.*, 2001, 2005); 3) hiperploídias foram também detectadas aqui e em estudos anteriores. Além disso, nossos dados de hESCs são compatíveis com a extensão variada de aneuploidia, observada em ESCs de camundongo (Eggan, 2002).

Ganho de cromossomo correlaciona-se com inibição de diferenciação neuronal
20

Um atributo fundamental de HESCs é a sua capacidade em última instância de se diferenciarem em células normais maduras. Há amplas evidências de que a diferenciação de células ES pode ser manipulada para dar origem a populações com alto teor de células neuronais. Células estromais PA6, quando utilizadas como nutriente, promove a diferenciação nervosa pela indução de colônias de ES de camundongos para que se tornem Tuj-1 positivas e com neuritogênese robusta (Kawasaki *et al.*, 2000). Para
25 examinar o potencial de diferenciação de células aneuplóides *versus* euplóides, ESCs de mamíferos foram tratadas com taxol (aneuplóide) ou sem taxol (euplóide), e foram examinadas quanto a sua capacidade de se diferenciarem em neurônios quando cultivadas em conjunto com células PA6. Após 1
30 semana de diferenciação, 55% das células tratadas com taxol tinham ga-

nhado cromossomos (figura 3). Ademais, quando as células foram fixadas e coradas pelo tuj1, houve uma diminuição significativa no número de colônias diferenciadas em nível neuronal nas células tratadas com taxol. Estes resultados demonstram que níveis e formas diferentes de aneuploidia podem alterar o potencial de diferenciação neuronal de ESCs em cultura.

Discussão:

Um objetivo em longo prazo da pesquisa com células-tronco é o de desenvolver novas terapias para o tratamento de doenças debilitantes. A fim de este objetivo ser atingido, será necessário obter linhagens de HESC que demonstrem conseguirem reproduzir-se mesmo após passagens prolongadas. A existência de instabilidade cromossômica em linhagens de HESC poderia alterar as propriedades fisiológicas das HESCs. Empregando a técnica SKY, acoplada com quantificação das formas de aneuploidia em HESCs, foi observada aneuploidia predominante de muitas formas distintas. As conseqüências funcionais de aneuploidia em ESCs de mamíferos não tinham sido previamente examinadas e, surpreendentemente, pelo menos duas formas de aneuploidia – hiperversus hipoploidia – não são equivalentes: hiperploidia, porém não hipoploidia, correlaciona-se com inibição de diferenciação, pelo menos ao longo de linhagens neuronais.

O uso de SKY para identificar formas de aneuploidia não tinha sido amplamente relatado anteriormente em HESCs, contrastando com técnicas citogenéticas clássicas de estudos passados. A técnica SKY permite a identificação inequívoca não só da identificação de cromossomos, mas também de translocações, e tem sido amplamente utilizada no estudo de câncer (Schrock *et al.*, 1996; Difilippantonio *et al.*, 2000). Além da técnica SKY, a quantificação de escores de esfregaços de metáfase, em vez de alguns esfregaços comparativos de amostra (Amit *et al.*, 2000; Buzzard *et al.*, 2004; Draper *et al.*, 2004b; Mitalipova *et al.*, 2005) identificou uma variação surpreendentemente grande e diversa de ganhos e perdas cromossômicas em HESCs e distinguiu diferenças gerais entre passagens iniciais e tardias (hipoploidia *versus* hiperploidia).

Essas abordagens técnicas revelaram que a instabilidade cro-

mossômica não produz necessariamente um padrão conservado de aneuploidia em HESCs. Após 87 passagens, 90% das células H7 eram aneuplóides, com a maioria das células exibindo ganhos de cromossomos 1 e 12. A tendência de ganhar cromossomos foi observada em todas as ESCs de mamíferos de passagens tardias e, especialmente, de HESCs que examinados, incluindo HESCs de origens diferentes do NIH.

Qual a significância fisiológica ou risco terapêutico associado a aneuploidia de HESC? A aneuploidia – especialmente a hiperploideia – foi vinculada à formação de câncer (Lengauer *et al.*, 1997, 1998; Rajagopalan *et al.*, 2003; Lengauer e Wang, 2004; Rajagopalan e Lengauer, 2004), a qual permanece um possível fator de risco, associado ao uso de HESCs. Outras possibilidades incluem anormalidades cariotípicas que possivelmente interferem com a transmissão de linhagem germinativa de mutações direcionadas (Liu *et al.*, 1997) e são uma das principais causas de insucesso em se obter contribuições para todos os tecidos da quimera adulta de camundongo (Longo *et al.*, 1997). Estes últimos resultados em camundongo sugeriram que a instabilidade cromossômica, especialmente hiperploideia e translocações, poderia levar a reduções em pluripotencialidade das HESC. De acordo com esse ponto de vista, células ESCs hiperplóides não eram capazes de se diferenciarem significativamente ao longo de linhagens neuronais.

Por comparação, a hipoploidia é compatível com níveis normais de diferenciação. Ela é remanescente da aneuploidia de desenvolvimento normal, observada em células neuroprogenitoras de camundongos (Rehen *et al.*, 2001; Kaushal *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; McConnell *et al.*, 2004; Kingsbury *et al.*, 2005) e células ES de camundongos (Eggan *et al.*, 2002). A presença de hipoploidia em células nervosas foi demonstrada ser compatível com diferenciação normal em neurônios de camundongos e de seres humanos (Kaushal *et al.*, 2003; Rehen *et al.*, 2005). Ainda parece possível haver outras diferenças fenotípicas ou funcionais em neurônios aneuplóides, no entanto, estas diferenças podem bem representar o observado no sistema nervoso normal (Kingsbury *et al.*, 2005).

No geral, estes resultados distinguem hiperploideias como um

genótipo indesejável para diferenciação normal de ESCs de mamíferos, embora estas células possam ter outras propriedades vantajosas. Por comparação, a hipoploidia não interferiu com diferenciação normal e a sua existência parece refletir o que é observado normalmente em tecidos em desenvolvimento. É importante observar que essas distinções foram identificadas pelo uso de técnicas sensíveis como SKY, e a quantificação de perda e ganho de cromossomos que é distinta dos padrões atuais de amostragem limitada empregada pela maioria dos laboratórios clínicos de citogenética. Recentemente, foi demonstrado que linhagens atuais de HESC, patrocinadas pelo NIH, estão contaminadas com Neu5Gc, contra o qual muitos seres humanos possuem anticorpos circulantes (Martin et al., 2005). A aneuploidia não fisiológica poderia representar outra variável a ser considerada na avaliação da utilidade terapêutica de uma linhagem de HESC. A introdução de cariotipagem sensível de rotina, tanto de linhagens atuais e novas de HESC, aumentar a probabilidade de êxito no uso de HESCs, ao serem definidas linhagens desejáveis com base em seu padrão de mosaico cromossômico para uso em pesquisa e terapias com HESC.

Métodos:

Cultura de HESC

As HESCs da linhagem H7 (WiCell Research Institute, Inc., Madison, WI) foram cultivadas sobre fibroblastos de embriões de camundongos (MEF, Speciality media, Phillipsburg, NJ), inativados para mitoses (tratados com mitomicina C), em DMEM/F12 Glutamax (Gibco, Carlsbad, CA), 20% de soro de reposição "KNOCKOUT" (Gibco) e 4 ng/ml de FGF-2 (R&D systems, Minneapolis, MN). As colônias foram submetidas a passagens com colagenase/tripsina (Gibco) a cada 5-6 dias. As células eram imunoreativas para marcadores não diferenciados, incluindo Oct4, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81. Ademais, mais de 90% das colônias exibiram atividade de fosfatase alcalina. As células eram imunonegativas para o marcador embrionário murino SSEA-1 e marcadores neurais, como Nestina, um marcador de precursor neural, Tuj-1 e Map2 (a + b), marcadores de neurônio imaturo, NewN, marcador de neurônio adulto, GAFFP e s100- β , marcadores de astrócito e 04,

GST π e RIP, marcadores de oligodendrócito.

Diferenciação Neuronal de ESC:

ESC de camundongo foi cultivada junto com células PA6 (Kawasaki et al., 2002), por 1 semana sob condições de diferenciação (DMEM/F12
5 Glutamax (Gibco, Carlsbad, CA), 10% de soro de reposição "KNOCKOUT" (Gibco), 0,1 mM de aminoácidos não essenciais (Gibco) e 0,1 mM de β -mercaptoetanol (Gibco)). As células foram tratadas com taxol (Sigma) em concentração de 2,5 nM.

Coloração de Imunofluorescência:

10 A coloração de imunofluorescência foi realizada conforme descrito previamente (Gate et al, 1995), utilizando α - β -tubulina III (Tuj-1; 1/1000, Covance). Anticorpos secundários foram adquiridos do Jackson ImmunoResearch.

Cariotipagem Espectral (SKY) de HESC:

15 Foram obtidos esfregaços cromossômicos de HESC por protocolos convencionais (Barch et al., 1997; Rehen et al, 2001). 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma) e o kit H-10 de SKY (Applied Spectral Imaging, Inc., Carlsbad, CA) foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

Análise de Dados:

20 Para cada amostra, foram capturados 40 esfregaços de metáfase, e analisados por SKY, e 70 esfregados de metáfase, submetidos a contraste por coloração com DAPI, foram capturados para quantificação de aneuploidia.

Referências citadas em Exemplo:

- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227:271-278.
- Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL (1997) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincott: Philadelphia.
- Buzzard JJ, Gough NM, Crook JM, Colman A (2004) Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat Biotechnol* 22:381-382; author reply 382.
- Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, Lucero M, Rao MS (2004) Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn* 229:243-258.
- 25

- Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G (2003) Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* 21:131-142.
- Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, Ried T, Nussenzweig A (2000) DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 404:510-514.
- Draper JS, Moore HD, Ruban LN, Gokhale PJ, Andrews PW (2004a) Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 13:325-336.
- Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, Meisner L, Zwaka TP, Thomson JA, Andrews PW (2004b) Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22:53-54.
- Eggan K, Rode A, Jentsch I, Samuel C, Hennek T, Tintrup H, Zevnik B, Erwin J, Loring J, Jackson-Grusby L, Speicher MR, Kuehn R, Jaenisch R (2002) Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. *Nat Biotechnol* 20:455-459.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J (1995) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11879-11883.
- Kaushal D, Contos JJ, Treuner K, Yang AH, Kingsbury MA, Rehen SK, McConnell MJ, Okabe M, Barlow C, Chun J (2003) Alteration of gene expression by chromosome loss in the postnatal mouse brain. *J Neurosci* 23:5599-5606.
- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28:31-40.
- Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M, Yoshikawa K, Nishikawa S, Nakatsuji N, Sasai Y (2002) Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1580-1585.
- Kingsbury et al., (2005) Aneuploid neurons are functionally active and integrated into brain circuitry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press.*
- Lakshmipathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Kaufman DS, Verfaillie CM (2004) Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells* 22:531-543.
- Lengauer C, Wang Z (2004) From spindle checkpoint to cancer. *Nat Genet* 36:1144-1145.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386:623-627.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649.
- Liu X, Wu H, Loring J, Hormuzdi S, Distèche CM, Bornstein P, Jaenisch R (1997) Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn* 209:85-91.
- Longo L, Bygrave A, Grosveld FG, Pandolfi PP (1997) The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res* 6:321-328.
- Martin MJ, Muotri A, Gage FH, Varki A (2005) Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature Medicine* 11:228-232.
- McConnell MJ, Kaushal D, Yang AH, Kingsbury MA, Rehen SK, Treuner K, Helton R, Annas EG, Chun J, Barlow C (2004) Failed Clearance of Aneuploid Embryonic

- Neural Progenitor Cells Leads to Excess Aneuploidy in the *Atm*-Deficient But Not the *Trp53*-Deficient Adult Cerebral Cortex. *J Neurosci* 24:8090-8096.
- Mitalipova MM, Rao RR, Hoyer DM, Johnson JA, Meisner LF, Jones KL, Dalton S, Stice SL (2005) Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23:19-20.
- Pera MF (2004) Unnatural selection of cultured human ES cells? *Nat Biotechnol* 22:42-43.
- Rajagopalan H, Lengauer C (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature* 432:338-341.
- Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C (2003) The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 3:695-701.
- Rehen SK, McConnell MJ, Kaushal D, Kingsbury MA, Yang AH, Chun J (2001) Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13361-13366.
- Rehen SK, Yung YC, McCreight MP, Kaushal D, Yang AH, Almeida BS, Kingsbury MA, Cabral KM, McConnell MJ, Anliker B, Fontanoz M, Chun J (2005) Constitutional aneuploidy in the normal human brain. *J Neurosci* 25:2176-2180.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18:399-404.
- Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, Carpenter MK (2004) Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 229:259-274.
- Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497.
- Thomson JA, Odorico JS (2000) Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol* 18:53-57.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19:971-974.
- Yang AH, Kaushal D, Rehen SK, Kriedt K, Kingsbury MA, McConnell MJ, Chun J (2003) Chromosome segregation defects contribute to aneuploidy in normal neural progenitor cells. *J Neurosci* 23:10454-10462.
- Zeng X, Cai J, Chen J, Luo Y, You ZB, Fötter E, Wang Y, Harvey B, Miura T, Backman C, Chen GJ, Rao MS, Freed WJ (2004) Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22:925-940.

O exemplo acima é fornecido para ilustrar a invenção, sem ter como intenção a limitação do seu escopo. Outras variantes da invenção serão facilmente notadas por aqueles versados na técnica, estando compreendidas nas reivindicações anexas. Todas as publicações, base de dados, sequências do banco de genes, patentes e pedidos de patentes citados estão

5 incorporados aqui como referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detecção e definição quanto ao status de células aneuplóides em mosaico de uma população de células-tronco ou progenitoras, o método compreendendo,

5 a detecção da presença de células aneuplóides em mosaico na população, em que pelo menos, 3 tipos diferentes de cariótipos são detectados entre células diferentes na população.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que, pelo menos, 30 células, na população, são selecionadas quanto aneuploidia.

10 3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que é registrada a aneuploidia das células.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que, pelo menos, 5 cariótipos diferentes são detectados em células diferentes na população.

15 5. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo a detecção de células exibindo cariótipo hipoplóide em mosaico em rede; e a seleção, entre as células com cariótipo hipoplóide em mosaico em rede, de uma linhagem de células-tronco ou progenitoras, na qual, pelo menos parte de um cromossomo seja hipoplóide para diferenciação e posterior propagação ou transplante.

20 6. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo a detecção de células exibindo cariótipo hipoplóide em mosaico em rede e a seleção entre as células com cariótipo hipoplóide em mosaico em rede, de uma linhagem de células-tronco ou progenitoras, na qual, pelo menos, parte de um cromossomo é hipoplóide para a seleção de um fármaco.

25 7. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo a detecção de células exibindo cariótipo hiperplóide em mosaico em rede e a seleção, entre as células com cariótipo hiperplóide em mosaico em rede, de uma linhagem de células-tronco ou progenitoras, na qual, pelo menos, parte de um cromossomo é hiperplóide para diferenciação, posterior propagação ou transplante.

30 8. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo a

detecção de células exibindo cariótico hiperplóide em mosaico em rede e a seleção entre as células com cariótico hiperplóide em mosaico em rede, de uma linhagem de células-tronco ou progenitoras, na qual pelo menos parte de um cromossomo é hiperplóide para a seleção de um fármaco.

5 9. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda a passagem de células-tronco por, pelo menos, um ciclo de divisão celular, anteriormente à etapa de detecção.

 10. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o cariótipo de, pelo menos, 80% das células, na população celular, é determinado.

10 11. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa de detecção compreende hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), incluindo a técnica multiplex-FISH.

 12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa de detecção compreende cariotipagem espectral (SKY).

15 13. O método da reivindicação 1, em que a etapa de detecção compreende bandeamento G, DAPI ou citometria.

 14. Método de seleção de um agente que iniba, de preferência, células que não são capazes de se diferenciarem, em comparação a células capazes de se diferenciarem no tipo de célula desejado, o método compreendendo, o contato entre o agente e células que exibem cariótipo hiperplóide em mosaico em rede, em que as células não são capazes de se diferenciarem no tipo de célula desejado; e seleção de um agente que iniba a reprodução das células.

25 15. Método de acordo com a reivindicação 14, compreendendo ainda as etapas de:

 o contato entre o agente e as células que exibem cariótipo hipoplóide, em que as células são capazes de se diferenciarem no tipo de célula desejado; e

30 a seleção de um agente que iniba a reprodução das células hiperplóides, incapazes de diferenciação, porém, que não iniba significativamente a reprodução das células hipoplóides capazes de se diferenciarem no tipo de célula desejado.

16. Método para manutenção ou melhora de uma população de células-tronco ou de células progenitoras, o método compreendendo, a detecção do cariótipo de, pelo menos, um cromossomo ou parte do mesmo, nas células desta população; e

5 a separação de células com cariótipo euplóide ou hipoplóide em, pelo menos, um cromossomo ou parte do mesmo, presentes nesta população, de células com pelo menos um cromossomo, ou parte, hiperplóide e, através disso, mantendo-se e melhorando a população de células-tronco ou de células progenitoras pela remoção de células hiperplóides, embora sendo
10 mantidas as células euplóides e hipoplóides nesta população de células.

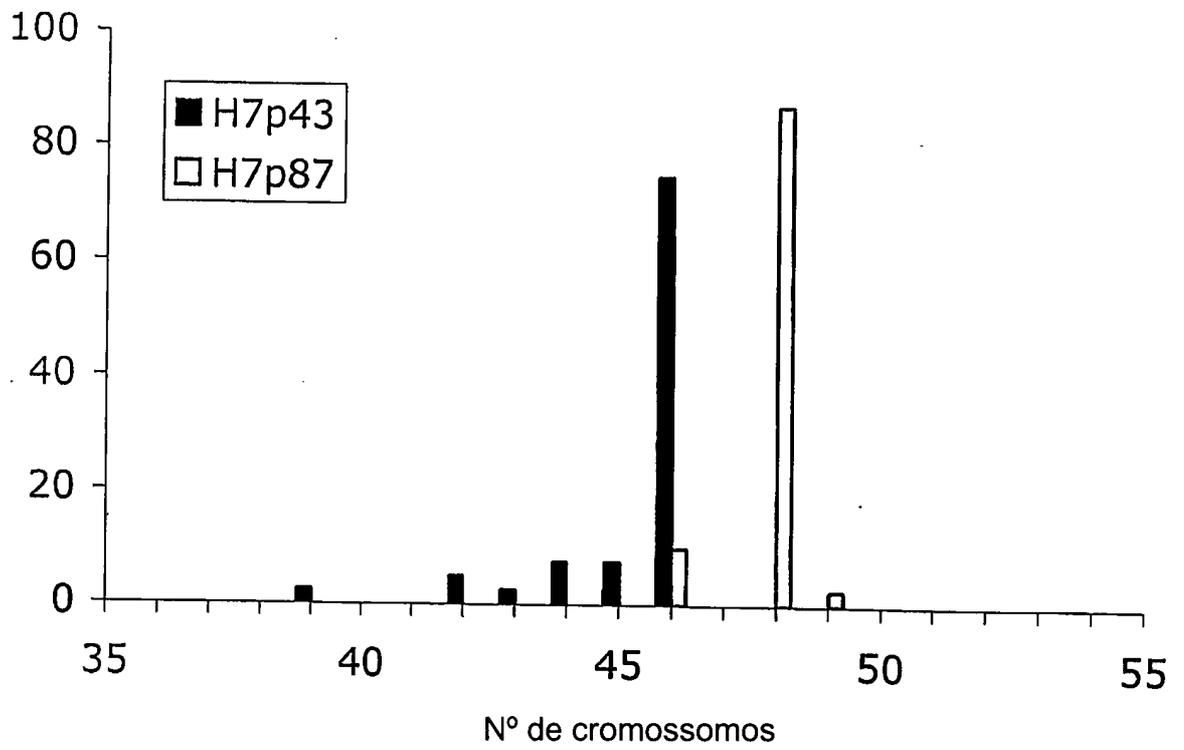
17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que as etapas de detecção e de separação são conduzidas por seleção celular ativada por fluorescência (FACS).

18. Método de acordo com a reivindicação 16, em que após a
15 etapa de separação, é promovida a diferenciação das células exibindo cariótipo euplóide ou hipoplóide.

19. Método de acordo com a reivindicação 16, em que após a etapa de separação, é promovida a reprodução das células exibindo cariótipo euplóide ou hipoplóide.

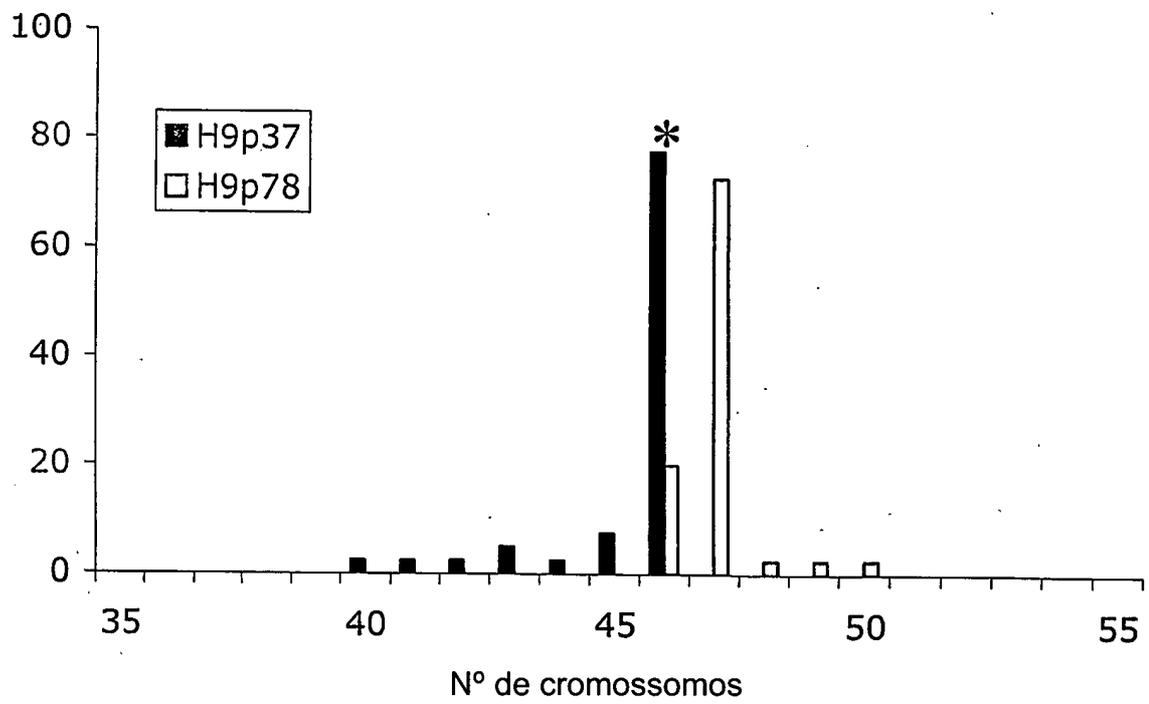
20 20. Método de acordo com a reivindicação 16, em que após a etapa de separação, as células exibindo cariótipo euplóide ou hipoplóide são transplantadas em um indivíduo.

FIG 1



*Denota o número euplóide de cromossomos (46)

FIG 2



*Denota o número euplóide de cromossomos (46)

FIG 3

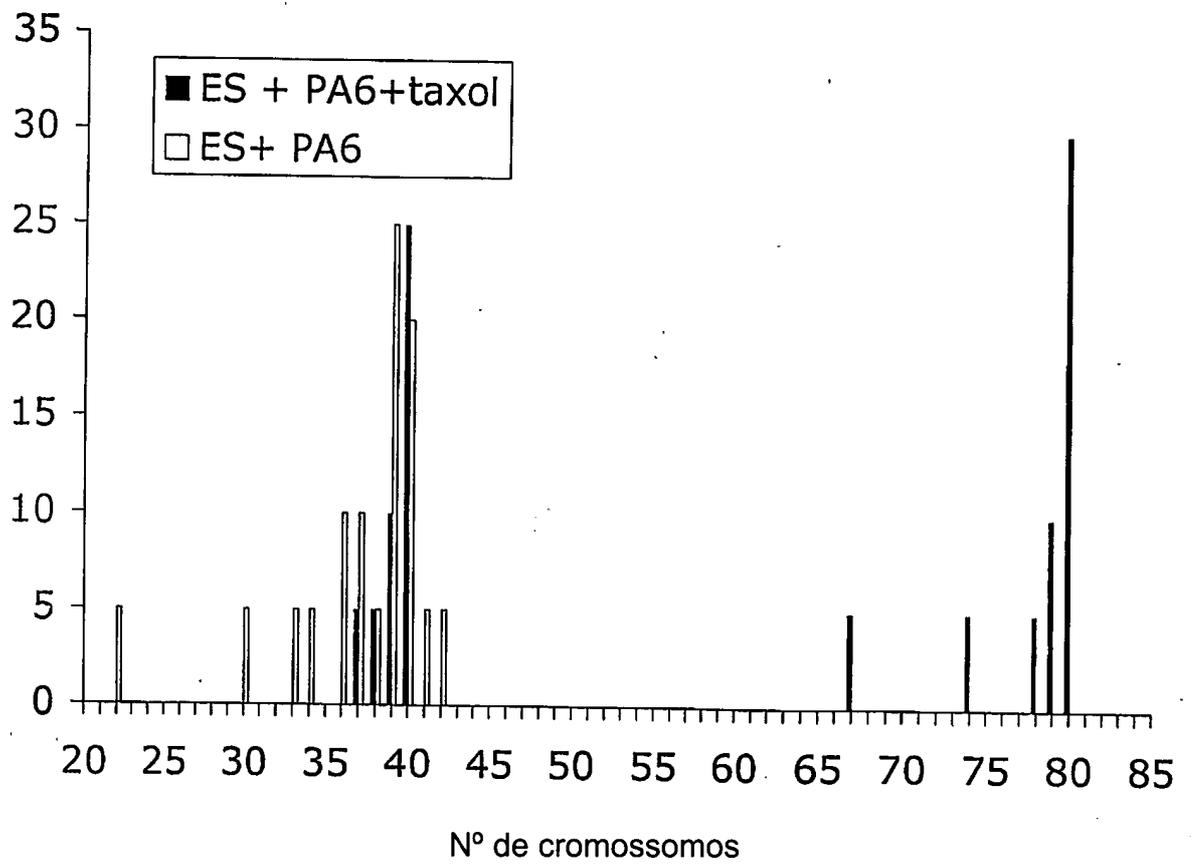
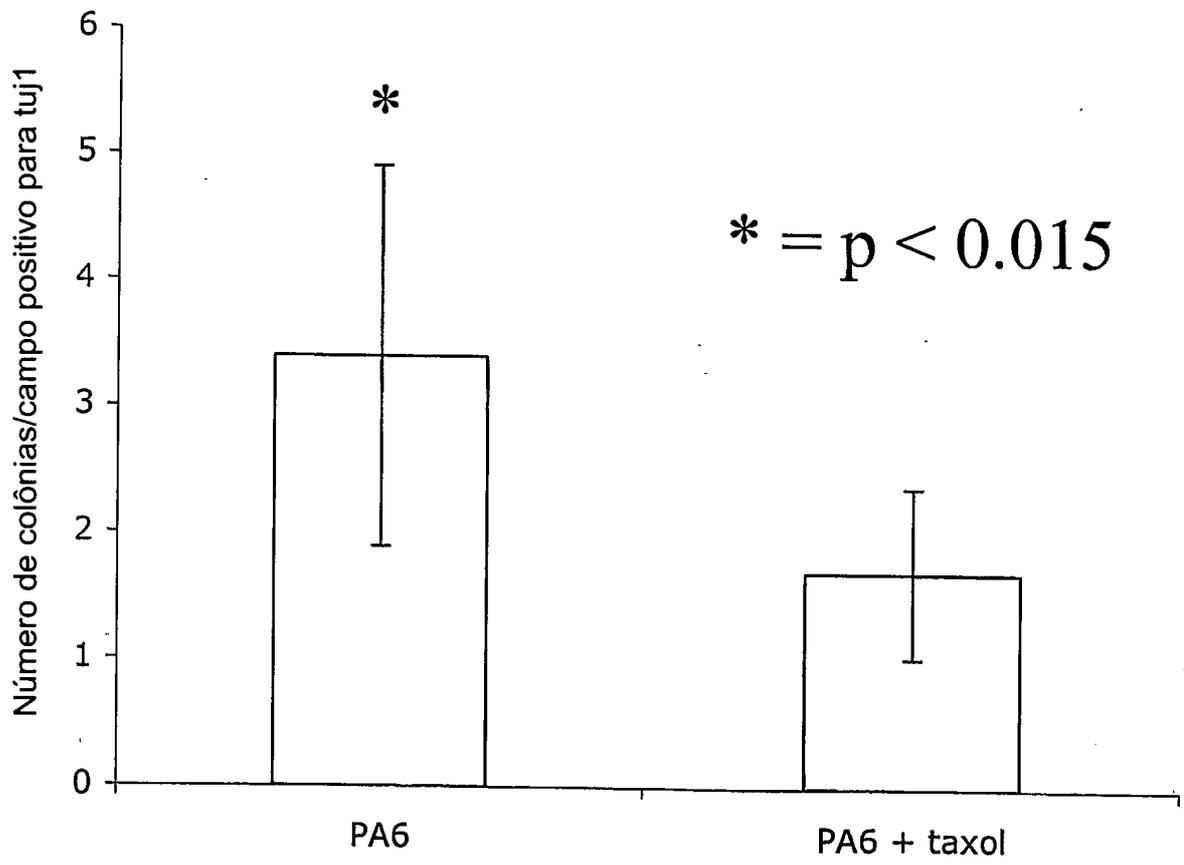


FIG 4



RESUMO

Patente de Invenção: **"SELEÇÃO, REPRODUÇÃO E USO DE CÉLULAS-TRONCO ANEUPLÓIDES EM MOSAICO"**.

5 A presente invenção refere-se a disposição de cariótipos de células em uma população celular que pode determinar o fenótipo e capacidade de células-tronco de se diferenciarem nos tipos de células desejados, de forma a funcionarem normalmente, bem como de representarem risco para eventos adversos como câncer. Por conseguinte, a determinação quanto ao status de células aneuplóides em mosaico de uma população celular é útil
10 na identificação e/ou manutenção de traços desejados e na eliminação de traços não desejados em células-tronco e para defini-las em nível de seu complemento cromossômico.