

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2007.11.15</b>	(73) Titular(es): <b>GENERAL ELECTRIC COMPANY</b> <b>1 RIVER ROAD SCHENECTADY, NY 12345</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2006.11.16 US 560599</b> <b>2007.09.28 US 864093</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2009.07.29</b>	(72) Inventor(es): <b>ZHENG YU PANG</b> <b>US</b> <b>MICHAEL CHRISTOPHER MONTALTO</b> <b>US</b> <b>FIONA GINTY</b> <b>US</b> <b>MICHAEL J. GERDES</b> <b>US</b> <b>ANUP SOOD</b> <b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.09.14</b> <b>243/2011</b>	(74) Mandatário: <b>PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA</b> <b>RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **ANÁLISE SEQUENCIAL DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS COM DESCOLORAÇÃO DE SINAIS FLUORESCENTES INTERMÉDIOS**

(57) Resumo:

SÃO PROPORCIONADOS MÉTODOS PARA SONDAR MÚLTIPLOS ALVOS NUMA AMOSTRA BIOLÓGICA. OS MÉTODOS INCLUEM COLOCAR A AMOSTRA EM CONTACTO COM UMA PRIMEIRA SONDA; LIGAR FISICAMENTE A PRIMEIRA SONDA A UM PRIMEIRO ALVO; OBSERVAR UM PRIMEIRO SINAL DA PRIMEIRA SONDA; APLICAR UM AGENTE QUÍMICO PARA MODIFICAR O PRIMEIRO SINAL; COLOCAR A AMOSTRA EM CONTACTO COM UMA SEGUNDA SONDA; LIGAR FISICAMENTE A SEGUNDA SONDA A UM SEGUNDO ALVO; E OBSERVAR UM SEGUNDO SINAL DA SEGUNDA SONDA. OS MÉTODOS AQUI DIVULGADOS TAMBÉM PROPORCIONAM ITERAÇÕES MÚLTIPLAS DE LIGAÇÃO, OBSERVAÇÃO, MODIFICAÇÃO DE SINAL PARA DERIVAR INFORMAÇÃO SOBRE MÚLTIPLOS ALVOS NUMA ÚNICA AMOSTRA. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS UM DISPOSITIVO E KIT ASSOCIADOS.

## **RESUMO**

### **"ANÁLISE SEQUENCIAL DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS COM DESCOLORAÇÃO DE SINAIS FLUORESCENTES INTERMÉDIOS"**

São proporcionados métodos para sondar múltiplos alvos numa amostra biológica. Os métodos incluem colocar a amostra em contacto com uma primeira sonda; ligar fisicamente a primeira sonda a um primeiro alvo; observar um primeiro sinal da primeira sonda; aplicar um agente químico para modificar o primeiro sinal; colocar a amostra em contacto com uma segunda sonda; ligar fisicamente a segunda sonda a um segundo alvo; e observar um segundo sinal da segunda sonda. Os métodos aqui divulgados também proporcionam iterações múltiplas de ligação, observação, modificação de sinal para derivar informação sobre múltiplos alvos numa única amostra. São também proporcionados um dispositivo e kit associados.

## DESCRIÇÃO

### "ANÁLISE SEQUENCIAL DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS COM DESCOLORAÇÃO DE SINAIS FLUORESCENTES INTERMÉDIOS"

#### ANTECEDENTES

São aqui divulgados métodos para analisar sequencialmente uma amostra biológica para discriminar, *inter alia*, a presença, ausência, concentração e/ou distribuição espacial de múltiplos alvos biológicos numa amostra biológica.

Em biologia e medicina podem ser utilizados vários métodos para observar diferentes alvos numa amostra biológica. Por exemplo, a análise de proteínas em secções histológicas e noutras preparações citológicas pode ser realizada utilizando as técnicas de histoquímica, imuno-histoquímica (IHC) ou imunofluorescência. A análise de proteínas em amostras biológicas pode também ser realizada utilizando imunoensaios de estado sólido, por exemplo, utilizando técnicas de transferência de Western.

Muitas das técnicas actuais podem detectar apenas alguns alvos num determinado instante (tais como IHC ou transferências de Western baseadas em fluorescência, em que o número de alvos detectáveis está limitado pelo sistema de detecção baseado em fluorescência) numa única amostra. Uma análise adicional de alvos pode requerer a utilização de amostras biológicas adicionais a partir da fonte, limitando a capacidade para determinar características relativas dos alvos, tais como

presença, ausência, concentração e/ou distribuição espacial de múltiplos alvos biológicos na amostra biológica. Além disso, em determinados casos, pode estar disponível uma quantidade limitada de amostra para análise ou a amostra individual pode requerer uma análise adicional. Desta forma, são necessários métodos, agentes e dispositivos capazes de analisar iterativamente uma amostra individual.

#### BREVE DESCRIÇÃO

Em algumas formas de realização, são proporcionados métodos de detecção de múltiplos alvos numa amostra biológica. Os métodos incluem os passos de proporcionar uma amostra biológica contendo múltiplos alvos aderidos a um suporte sólido, ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na amostra e observar um sinal da sonda fluorescente. O método inclui ainda os passos de oxidar a sonda fluorescente ligada com uma solução contendo um agente oxidante que inativa substancialmente a sonda fluorescente, ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na amostra e observar um sinal da sonda fluorescente. O processo de ligar, observar e oxidar pode ser repetido iterativamente.

Em algumas formas de realização, os métodos incluem os passos de proporcionar uma amostra biológica contendo múltiplos alvos aderidos a uma membrana, ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na amostra e observar um sinal da sonda fluorescente. O método inclui ainda os passos de oxidar a sonda fluorescente ligada com uma solução contendo agente oxidante que inativa substancialmente a sonda fluorescente, ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na amostra e observar um sinal da sonda

fluorescente. O processo de ligar, observar e oxidar, pode ser repetido iterativamente.

Em algumas formas de realização, são proporcionados kits para a detecção de múltiplos alvos numa amostra biológica. Os kits incluem múltiplas sondas que têm um ligante acoplado a um gerador de sinal fluorescente. Um agente oxidante, quando aplicado à amostra, inactiva substancialmente o gerador de sinal fluorescente.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Fig. 1 mostra o espectro de absorção da Amostra 1 em função do comprimento de onda, após 10 minutos e 15 minutos.

A Fig. 2 mostra o espectro de absorção para as Amostras 1, 2 e 3 em função do comprimento de onda.

A Fig. 3 mostra o espectro de absorção da Amostra 4 em função do comprimento de onda, após 30 minutos e 140 minutos.

A Fig. 4 mostra o espectro de absorção da Amostra 5 em função do comprimento de onda, após 20 minutos, 60 minutos e 210 minutos.

A Fig. 5 mostra o espectro de absorção da Amostra 6 em função do comprimento de onda, após 12 minutos e 16 minutos.

A Fig. 6 mostra o espectro de absorção da Amostra 8 em função do comprimento de onda, após 22 minutos, 70 minutos e 210 minutos.

A Fig. 7 mostra o espectro de absorção das Amostras 9a, 10a e 11a em função do comprimento de onda.

A Fig. 8 mostra o espectro de absorção das Amostras 9b e 10b em função do comprimento de onda.

A Fig. 9 mostra o espectro de absorção das Amostras 12a e 12b em função do comprimento de onda.

A Fig. 10 mostra o espectro de absorção das Amostras 13, 14, e 15 em função do comprimento de onda.

A Fig. 11 mostra o espectro de absorção das Amostras 16 e 17 em função do comprimento de onda.

A Fig. 12 mostra as micrografias (ampliação de 10x) da Amostra 18A (antes da modificação de sinal) e da Amostra 18B (após modificação de sinal).

A Fig. 13 mostra as micrografias (ampliação de 10x) da Amostra 19A (antes da modificação de sinal) e da Amostra 19B (após modificação de sinal).

A Fig. 14 mostra as micrografias da Amostra 20A (antes da modificação de sinal) e da Amostra 20B (após modificação de sinal).

A Fig. 15 mostra as micrografias das Amostras 21A e 21B (antes da modificação de sinal) e da Amostra 21C (após modificação de sinal).

A Fig. 16 mostra as micrografias das Amostras 22A e 22B (antes da modificação de sinal) e da Amostra 22C (após modificação de sinal).

A Fig. 17 mostra as micrografias das Amostras 23A-E.

A Fig. 18 mostra as micrografias da Amostra 24A (antes da modificação de sinal) e da Amostra 24B (após modificação de sinal).

A Fig. 19 mostra as micrografias da Amostra 25A (canais Cy3 e Cy5), da amostra 25B (canais Cy3 e Cy5) e das Amostras 25C-25J.

A Fig. 20 mostra as micrografias das Amostras 26A-H.

A Fig. 21 mostra as micrografias das Amostras 27A-C.

A Fig. 22 mostra uma representação gráfica da intensidade média de pixel do fundo para cada ciclo de captura de imagem no Exemplo 20.

A Fig. 23 mostra a comparação entre micrografias das Amostras 28A-C e 29A-C.

A Figura 24 mostra as micrografias das Amostras 30A-D.

A Figura 25 mostra as micrografias das Amostras 30C-F.

A Figura 26 mostra uma representação gráfica da intensidade média de pixel do fundo de cada ciclo para as Amostras 30C e 30D.

A Figura 27 mostra as micrografias das Amostras 31A, 31B e 31C.

A Figura 28 mostra as micrografias das Amostras 32A, 32B e 32C.

A Figura 29 mostra as micrografias das Amostras 33, 34, 35 e 36.

A Figura 30 mostra as transferências por gota das Amostras 37, 38, 39 e 40.

A Figura 31 mostra um gráfico de barras das intensidades relativas de sinais de gotas, para as Amostras 37, 38, 39 e 40.

A Figura 32 mostra o perfil temporal de espectros de Cy3 e Cy5.

A Figura 33 mostra os valores de absorvência de Cy3 em função do tempo para concentrações diferentes de  $H_2O_2$ .

A Figura 34 mostra os valores de absorvência em função do tempo para fluoróforos diferentes.

A Figura 35 mostra os valores de absorvência a 655 de QD em função do tempo para  $H_2O_2$ .

A Figura 36 mostra os espectros de absorção para fluoresceína utilizando  $H_2O_2$ .



## DESCRIÇÃO DETALHADA

Para descrever mais clara e concisamente e indicar o objecto da invenção reivindicada, as seguintes definições são proporcionadas para termos específicos que são utilizados na seguinte descrição e nas reivindicações anexas.

As formas singulares “um”, “uma”, “o” e “a” incluem referentes plurais, salvo indicação clara em contrário do contexto. A terminologia aproximada, como aqui utilizada ao longo da descrição e reivindicações, pode ser aplicada para modificar qualquer representação quantitativa que pode permissivamente variar sem resultar numa alteração na função básica com a qual está relacionada. Desta forma, um valor modificado por uma expressão como “cerca de” não é para estar limitado ao valor preciso especificado. Salvo indicação em contrário, todos os números que expressam quantidades de ingredientes, propriedades, tal como peso molecular, condições reaccionais, etc., utilizados na descrição e reivindicações, devem ser entendidos como estando modificados em todos os casos pela expressão “cerca de”. Desta forma, salvo indicação em contrário, os parâmetros numéricos apresentados na seguinte descrição e nas reivindicações anexas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas que se pretendem obter pela presente invenção. No mínimo, cada parâmetro numérico deve, pelo menos, ser interpretado à luz do número de algarismos significativos descritos e por aplicação de técnicas comuns de arredondamento.

## DEFINIÇÕES

Para descrever mais clara e concisamente e indicar o objecto da invenção reivindicada, as seguintes definições são proporcionadas para termos específicos que são utilizados na seguinte descrição e nas reivindicações aqui anexas.

Como aqui utilizado, o termo “anticorpo” refere-se a uma imunoglobulina que se liga especificamente e é, desse modo, definida como complementar a uma organização espacial e polar particular de outra molécula. O anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal e pode ser preparado por técnicas que são bem conhecidas no campo técnico, tais como imunização de um hospedeiro e recolha dos soros (policlonal) ou através de preparação de linhas celulares híbridas contínuas e recolha da proteína segregada (monoclonal) ou por clonagem e expressão de sequências nucleotídicas ou das suas versões mutagenizadas que codificam, pelo menos, as sequências de aminoácidos requeridas para ligação específica de anticorpos naturais. Os anticorpos podem incluir uma imunoglobulina completa ou os seus fragmentos, cujas imunoglobulinas incluem várias classes e isotipos, tais como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM. Os fragmentos funcionais de anticorpos podem incluir porções de um anticorpo capazes de reter ligação com afinidade semelhante aos anticorpos de tamanho total (por exemplo, Fab, Fv e F(ab')<sub>2</sub> ou Fab'). Além disso, sempre que apropriado, podem ser utilizados agregados, polímeros e conjugados de imunoglobulinas ou dos seus fragmentos, desde que a afinidade de ligação para uma molécula particular seja substancialmente mantida.

Como aqui utilizado, o termo “ligante” refere-se a uma molécula biológica que se pode ligar a um ou mais alvos na amostra biológica. Um ligante pode-se ligar especificamente a um

alvo. Os ligantes adequados podem incluir um ou mais péptidos naturais ou modificados, proteínas (e. g., anticorpos, aficorpos ou aptâmeros), ácidos nucleicos (e. g., polinucleótidos, ADN, ARN ou aptâmeros); polissacáridos (e. g., lectinas, açúcares), lípidos, enzimas, substratos enzimáticos ou inibidores, ligandos, receptores, antigénios ou haptenos. Um ligante adequado pode ser seleccionado dependendo da amostra a ser analisada e dos alvos disponíveis para a detecção. Por exemplo, um alvo na amostra pode incluir um ligando e o ligante pode incluir um receptor, ou um alvo pode incluir um receptor e a sonda pode incluir um ligando. De um modo semelhante, um alvo pode incluir um antigénio e o ligante pode incluir um anticorpo ou fragmento de anticorpo, ou vice-versa. Em algumas formas de realização, um alvo pode incluir um ácido nucleico e o ligante pode incluir um ácido nucleico complementar. Em algumas formas de realização, o alvo e o ligante podem incluir proteínas capazes de se ligarem uma à outra.

Como aqui utilizada, a expressão “amostra biológica” refere-se a uma amostra obtida a partir de um indivíduo biológico, incluindo uma amostra de tecido ou fluido de origem biológica obtida *in vivo* ou *in vitro*. Tais amostras podem ser, mas não estão limitadas a, fluido corporal (e. g., sangue, plasma sanguíneo, soro ou urina), órgãos, tecidos, fracções e células isoladas a partir de mamíferos, incluindo humanos. As amostras biológicas também podem incluir secções da amostra biológica, incluindo tecidos (e. g., porções seccionais de um órgão ou tecido). As amostras biológicas podem também incluir extractos de uma amostra biológica, por exemplo, um antigénio de um fluido biológico (e. g., sangue ou urina).

Uma amostra biológica pode ser de origem procariótica ou de origem eucariótica (e. g., insectos, protozoários, pássaros,

peixe, répteis). Em algumas formas de realização, a amostra biológica é de mamífero (e. g., rato, murganho, vaca, cão, burro, cobaio ou coelho). Em determinadas formas de realização, a amostra biológica é de origem primata (e. g., chimpanzé ou humano).

Como aqui utilizada, a expressão “sonda de controlo” refere-se a um agente que tem um ligante acoplado a um gerador de sinal ou a um gerador de sinal capaz de corar directamente, de modo que o gerador de sinal retenha, pelo menos, 80 por cento do sinal após contacto com uma solução de um agente oxidante utilizado para inactivar a sonda fluorescente. Um gerador de sinal adequado numa sonda de controlo não é substancialmente oxidada ou substancialmente inactivada quando colocada em contacto com o agente oxidante. Os exemplos adequados de geradores de sinal podem incluir um marcador radioactivo ou um fluoróforo não oxidável (e. g., DAPI).

Como aqui utilizado, o termo “enzima” refere-se a uma molécula proteica que pode catalisar uma reacção química de um substrato. Em algumas formas de realização, uma enzima adequada catalisa uma reacção química do substrato para formar um produto de reacção que se pode ligar a um receptor (e. g., grupos fenólicos) presente na amostra ou num suporte sólido a que a amostra esteja ligada. Um receptor pode ser exógeno (isto é, um receptor aderido extrinsecamente à amostra ou ao suporte sólido) ou endógeno (receptores presentes intrinsecamente na amostra ou no suporte sólido). Os exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidases, oxidases, fosfatases, esterases e glicosidases. Os exemplos específicos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina,  $\beta$ -D-galactosidase, lipase e glucose oxidase.

Como aqui utilizada, a expressão “substrato enzimático” refere-se a um composto químico que é quimicamente catalisado por uma enzima para formar um produto de reacção. Em algumas formas de realização, o produto de reacção é capaz de se ligar a um receptor presente na amostra ou a um suporte sólido a que a amostra esteja ligada. Em algumas formas de realização, os substratos enzimáticos, aqui utilizados nos métodos, podem incluir substratos não cromogénicos ou não quimioluminescentes. Um gerador de sinal pode ser ligado ao substrato enzimático como um marcador.

Como aqui utilizados, o termo “fluoróforo” ou a expressão “gerador de sinal fluorescente” referem-se a um composto químico que, quando excitado por exposição a um comprimento de onda particular de luz, emite luz a um comprimento de onda diferente. Os fluoróforos pode ser descritos em termos do seu perfil de emissão ou “cor”. Os fluoróforos verdes (por exemplo, Cy3, FITC e Verde Oregon) podem ser caracterizados pela sua emissão a comprimentos de onda geralmente na gama de 515-540 nanómetros. Os fluoróforos vermelhos (por exemplo, Vermelho Texas, Cy5 e tetrametilrodamina) podem ser caracterizados pela sua emissão a comprimentos de onda geralmente na gama de 590-690 nanómetros. Os exemplos de fluoróforos incluem, mas não estão limitados a, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-dissulfónico, acridina, derivados de acridina e de isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), dissulfonato de 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 (Amarelo Lucifer VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Amarelo Brilhante, cumarina, derivados de cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), 7-amino-trifluorometilculuarina (Coumaran 151), cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindole (DAPI), 5',5''-dibromopirogalol-sulfonoftaleína (Vermelho Bromopirogalol), 7-dietilamino-3-(4'-

isotiocianatofenil)4-metilcumarina, ácido 4,4'-diisotiocianato-di-hidro-estilbeno-2,2'-dissulfónico, ácido 4,4'-diisotiocianato-estilbeno-2,2'-dissulfónico, cloreto de 5-[dimetilamino]-naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloreto de dansilo), eosina, derivados de eosina, tal como isotiocianato de eosina, eritrosina, derivados de eritrosina, tais como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etídio; fluoresceína e derivados, tais como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2'7'-dimetoxi-4'5'-2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxi-fluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), QFITC (XRITC); derivado de fluorescamina (fluorescente após reacção com amina); IR144; IR1446; isotiocianato de Verde Malaquite; 4-metilumbeliferona; cresolftaleína orto; nitrotirosina; pararosanilina; Vermelho de Fenol, B-ficoeritrina; derivados de o-ftaldialdeído (fluorescente após reacção com amina); pireno e derivados, tais como pireno, butirato de pireno e butirato de succinimidil-1-pireno; Vermelho Reactivo 4 (Cibacron RTM. Vermelho Brilhante 3B-A), rodamina e derivados, tais como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), sulfonilcloreto de lissamina rodamina B, isotiocianato de rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, rodamina X, sulforrodamina B, sulforrodamina 101 e derivados de sulfonilcloreto de sulforrodamina 101 (Vermelho Texas); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); tetrametilrrodamina, isotiocianato de tetrametilrrodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico e derivados de quelato de lantanídeos, *quantum dots*, cianinas e esquaraínas.

Como aqui utilizada, a expressão "*in situ*" refere-se genericamente a um evento que ocorre na posição original, por exemplo, no órgão ou tecido intacto ou num segmento representativo de um órgão ou tecido. Em algumas formas de

realização, pode ser realizada análise *in situ* de alvos em células derivadas de uma variedade de fontes, incluindo um organismo, um órgão, amostra de tecido ou uma cultura de células. A análise *in situ* proporciona informação contextual que pode ser perdida quando o alvo é removido do seu local de origem. Desta forma, a análise *in situ* de alvos descreve a análise de sonda ligada a alvo, localizada dentro de uma célula inteira ou numa amostra de tecido, esteja a membrana celular totalmente intacta ou parcialmente intacta no caso em que a sonda ligada ao alvo permanece dentro da célula. Além disso, os métodos aqui divulgados podem ser utilizados para analisar alvos *in situ* em amostras de célula ou tecido que estão fixas ou não fixas.

Como aqui utilizado, o termo “peroxidase” refere-se a uma classe de enzimas que catalisa uma reacção de oxidação de um substrato enzimático juntamente com um dador de electrões. Os exemplos de enzimas peroxidase incluem peroxidase de rábano, citocromo C peroxidase, glutathione peroxidase, microperoxidase, mieloperoxidase, lactoperoxidase ou peroxidase de soja.

Como aqui utilizada, a expressão “substrato de peroxidase” refere-se a um composto químico que é quimicamente catalisado por peroxidase para formar um produto de reacção. Em algumas formas de realização, os substratos de peroxidase aqui utilizados nos métodos, podem incluir substratos não cromogénicos ou não quimioluminescentes. Um gerador de sinal fluorescente pode ser ligado ao substrato de peroxidase como um marcador.

Como aqui utilizado, o termo “sonda” refere-se a um agente que tem um ligante e um marcador, tais como um gerador de sinal ou uma enzima. Em algumas formas de realização, o ligante e o

marcador (gerador de sinal ou a enzima) estão corporizados numa única entidade. O ligante e o marcador podem estar ligados directamente (e. g., através de uma molécula fluorescente incorporada no ligante) ou indirectamente (e. g., através de um ligador que pode incluir um local de clivagem) e aplicados na amostra biológica num passo único. Em formas de realização alternativas, o ligante e o marcador estão corporizados em entidades discretas (e. g., um anticorpo primário capaz de ligação ao alvo e uma enzima ou um anticorpo secundário marcado com gerador de sinal, capaz de ligação ao anticorpo primário). Quando o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são entidades separadas, estes podem ser aplicados numa amostra biológica num passo único ou em múltiplos passos. Como aqui utilizada, a expressão “sonda fluorescente” refere-se a um agente que tem um ligante acoplado a um gerador de sinal fluorescente.

Como aqui utilizada, a expressão “gerador de sinal” refere-se a uma molécula capaz de proporcionar um sinal detectável utilizando um ou mais técnicas de detecção (e. g., espectrometria, calorimetria, espectroscopia ou inspecção visual). Os exemplos adequados de um sinal detectável podem incluir um sinal óptico, um sinal eléctrico ou um sinal radioactivo. Os exemplos de geradores de sinal incluem um ou mais de um cromóforo, um fluoróforo, um marcador activo em Raman ou um marcador radioactivo. Como referido acima, no que se refere à sonda, o gerador de sinal e o ligante podem estar presentes numa única entidade (e. g., uma proteína de ligação ao alvo com um marcador fluorescente) em algumas formas de realização. Alternativamente, o ligante e o gerador de sinal podem ser entidades discretas (e. g., proteína receptora e um anticorpo marcado contra essa proteína receptora particular) que se associam uma à outra, antes ou após a introdução da amostra.



Como aqui utilizada, a expressão “suporte sólido” refere-se a um artigo no qual os alvos presentes na amostra biológica podem ser imobilizados e subsequentemente detectados através dos métodos aqui divulgados. Os alvos podem ser imobilizados no suporte sólido por adsorção física, por formação de ligação covalente ou as suas combinações. Um suporte sólido pode incluir um material polimérico, de vidro ou metálico. Os exemplos de suportes sólidos incluem uma membrana, uma placa de microtitulação, uma esfera, um filtro, uma tira de teste, uma lâmina, uma lamela e um tubo de ensaio.

Como aqui utilizada, a expressão “ligação específica” refere-se ao reconhecimento específico de uma de duas moléculas diferentes para a outra, comparativamente a substancialmente menos reconhecimento de outras moléculas. As moléculas podem ter áreas nas suas superfícies ou em cavidades que originam reconhecimento específico entre as duas moléculas que surge de uma ou mais interações electrostáticas, pontes de hidrogénio ou interações hidrófobas. Os exemplos de ligação específica incluem, mas não estão limitados a, interações anticorpo-antigénio, interações enzima-substrato, interações polinucleotídicas e semelhantes. Em algumas formas de realização, uma molécula de ligante pode ter uma constante de equilíbrio de associação intrínseca ( $K_A$ ) para o alvo não menor do que cerca de  $10^5 \text{ M}^{-1}$  sob condições ambientais, tais como, um pH de cerca de 6 até cerca de 8 e uma temperatura que varia desde cerca de 0 °C até cerca de 37 °C.

Como aqui utilizado, o termo “alvo” refere-se ao componente de uma amostra biológica que pode ser detectado quando presente na amostra biológica. O alvo pode ser qualquer substância para a qual existe um ligante específico de ocorrência natural (e. g.,

um anticorpo) ou para a qual pode ser preparado um ligante específico (e. g., uma pequena molécula ligante). Em geral, a porção ligante da sonda pode ligar-se ao alvo através de uma ou mais unidades químicas discretas do alvo ou de um componente estrutural tridimensional do alvo (e. g., estruturas 3D resultantes do enrolamento peptídico). O alvo pode incluir um ou mais péptidos naturais ou modificados, proteínas (e. g., anticorpos, aficorpos ou aptâmeros), ácidos nucleicos (e. g., polinucleótidos, ADN, ARN ou aptâmeros); polissacáridos (e. g., lectinas ou açúcares), lípidos, enzimas, substratos enzimáticos, ligandos, receptores, antigénios ou haptenos. Em algumas formas de realização, os alvos podem incluir proteínas ou ácidos nucleicos.

A invenção inclui formas de realização que se referem genericamente a métodos aplicáveis em aplicações analíticas, de diagnóstico ou prognóstico, tais como a detecção de analito, histoquímica, imuno-histoquímica ou imunofluorescência. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ser particularmente aplicáveis a histoquímica, imunocoloração, imuno-histoquímica, imunoensaios ou imunofluorescência. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ser particularmente aplicáveis em técnicas de imunotransferência, por exemplo, transferências de Western ou imunoensaios, tal como imunoensaios de adsorção ligados à enzima (ELISA).

Os métodos divulgados relacionam-se genericamente com a detecção de múltiplos alvos numa única amostra biológica. Em algumas formas de realização, são divulgados métodos de detecção de múltiplos alvos numa única amostra biológica utilizando o mesmo canal de detecção. Os alvos podem estar presentes na superfície de células em suspensão, na superfície de esfregaços

citológicos, na superfície de secções histológicas, na superfície de micromatrizes de ADN, na superfície de micromatrizes de proteína ou na superfície de suportes sólidos (tais como géis, membranas de transferência, lâminas, esferas ou placas de ELISA).

Os métodos aqui divulgados podem permitir a detecção de uma pluralidade de alvos na mesma amostra biológica, com pouco ou nenhum efeito na integridade da amostra biológica. A detecção de alvos na mesma amostra biológica pode proporcionar adicionalmente informação espacial sobre os alvos na amostra biológica. Os métodos aqui divulgados também podem ser aplicáveis em aplicações analíticas onde uma quantidade limitada de amostra biológica pode estar disponível para análise e a mesma amostra poderá que ser processada para análises múltiplas. Os métodos aqui divulgados podem também facilitar análises múltiplas de amostras de estado sólido (e. g., secções de tecido) ou de amostras aderidas a um suporte sólido (e. g., transferências) sem remover substancialmente as sondas e os alvos. Além disso, o mesmo canal de detecção pode ser utilizado para a detecção de alvos diferentes na amostra, permitindo menos requisitos químicos para análises de alvos múltiplos. Os métodos podem ainda facilitar análises baseadas em métodos de detecção que podem ser limitados no número de alvos simultaneamente detectáveis, por causa de limitações de sinais resolúveis. Por exemplo, utilizando detecção baseada em fluorescência, o número de alvos que pode ser detectado simultaneamente pode estar limitado a cerca de quatro, uma vez que apenas cerca de quatro sinais fluorescentes podem ser resolvidos com base nas suas propriedades de comprimento de onda de excitação e emissão. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem permitir a detecção de mais do que quatro alvos, utilizando um sistema de detecção baseado em fluorescência.

Em algumas formas de realização, o método de detecção de múltiplos alvos numa amostra biológica inclui a detecção sequencial de alvos na amostra biológica. O método inclui genericamente os passos de detectar um primeiro alvo na amostra biológica, modificar o sinal do primeiro alvo utilizando um agente químico e detectar um segundo alvo na amostra biológica. O método pode ainda incluir a repetição do passo de modificação de sinal do segundo alvo, seguida por detecção de um terceiro alvo na amostra biológica e assim por diante.

Em algumas formas de realização, o método inclui os passos de colocar uma amostra biológica em contacto com uma primeira sonda e ligar fisicamente uma primeira sonda a um primeiro alvo. O método inclui ainda observar um primeiro sinal da primeira sonda. Um agente químico é aplicado à sonda para modificar o primeiro sinal. O método inclui ainda colocar a amostra biológica em contacto com uma segunda sonda e ligar fisicamente a segunda sonda a um segundo alvo na amostra biológica, seguido por observação de um segundo sinal da segunda sonda.

Noutras formas de realização, o método inclui os passos de proporcionar uma amostra contendo alvos múltiplos e ligar, pelo menos, uma sonda que tem um ligante acoplado a uma enzima a um ou mais alvos presentes na amostra. O método inclui ainda fazer reagir a sonda ligada com um substrato enzimático acoplado a um gerador de sinal fluorescente e observar um sinal do gerador de sinal fluorescente. É aplicada à amostra uma solução incluindo um agente oxidante que substancialmente inactiva o gerador de sinal fluorescente e a enzima. O método inclui ainda ligar, pelo menos, uma sonda subsequente que tem um ligante acoplado a uma enzima a um ou mais alvos presentes na amostra. O método inclui ainda fazer reagir a sonda ligada com um substrato enzimático

acoplado a um gerador de sinal fluorescente e observar um sinal do gerador de sinal fluorescente.

Ainda noutras formas de realização, o método inclui os passos de proporcionar uma amostra biológica contendo alvos múltiplos aderidos a um suporte sólido e ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na amostra. O método inclui ainda observar um sinal da sonda fluorescente ligada. A sonda fluorescente ligada é oxidada com um agente oxidante que substancialmente inactiva a sonda fluorescente. O método inclui ainda ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente subsequente a um ou mais alvos presentes na amostra, seguida por observação de um sinal da sonda fluorescente ligada subsequente.

Ainda noutras formas de realização, o método inclui os passos de proporcionar uma amostra biológica contendo alvos múltiplos aderidos a um suporte sólido e ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na amostra. O método inclui ainda ligar, pelo menos, uma sonda de controlo a um ou mais alvos na amostra. O método inclui ainda observar um sinal da sonda fluorescente ligada e um sinal de controlo da sonda de controlo. A sonda fluorescente ligada é oxidada com um agente oxidante que inactiva substancialmente a sonda fluorescente e não a sonda de controlo. O método inclui ainda ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente subsequente a um ou mais alvos presentes na amostra, seguida por observação de um sinal da sonda fluorescente ligada subsequente.

#### Amostras Biológicas

Uma amostra biológica de acordo com uma forma de realização da invenção pode ser sólida ou fluida. Os exemplos adequados de

amostras biológicas podem incluir, mas não estão limitados a, culturas, sangue, plasma, soro, saliva, fluido cefalorraquidiano, fluido pleural, leite, linfa, expectoração, sémen, urina, fezes, lágrimas, saliva, aspirados de agulha, secções externas da pele, tractos respiratórios, intestinais e genito-urinários, tumores, órgãos, culturas de células ou constituintes de culturas de células ou secções de tecido sólido. Em algumas formas de realização, a amostra biológica pode ser analisada tal como está, isto é, sem recolha e/ou isolamento do alvo de interesse. Numa forma de realização alternativa, a recolha e isolamento de alvos podem ser realizadas antes da análise. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ser particularmente adequados para análise *in vitro* de amostras biológicas.

Uma amostra biológica pode incluir qualquer das amostras acima mencionadas, independentemente do seu estado físico, tais como, mas não limitada a, estar congelada ou corada ou, caso contrário, tratada. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir compostos que não estão naturalmente misturados com a amostra na natureza, tais como conservantes, anticoagulantes, tampões, fixadores, nutrientes, antibióticos, ou semelhantes.

Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma amostra de tecido, uma célula inteira, um constituinte celular, um *cytospin* ou um esfregaço celular. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica inclui essencialmente uma amostra de tecido. Uma amostra de tecido pode incluir uma colecção de células semelhantes obtidas a partir de um tecido de um indivíduo biológico que pode ter uma função semelhante. Em algumas formas de realização, uma amostra de tecido pode incluir uma colecção de células semelhantes obtidas

a partir de um tecido de um humano. Os exemplos adequados de tecidos humanos incluem, mas não estão limitados a, (1) epitélio; (2) os tecidos conjuntivos, incluindo vasos sanguíneos, osso e cartilagem; (3) tecido muscular; e (4) tecido nervoso. A fonte da amostra de tecido pode ser tecido sólido obtido a partir de uma amostra de tecido ou órgão ou uma biopsia ou aspirado, fresco, congelado e/ou preservado; sangue ou quaisquer constituintes do sangue; fluidos corporais, tais como líquido cefalorraquidiano, fluido amniótico, fluido peritoneal ou fluido intersticial; ou células de qualquer momento da gestação ou desenvolvimento do indivíduo. Em algumas formas de realização, a amostra de tecido pode incluir células ou linhas celulares primárias ou cultivadas.

Em algumas formas de realização, uma amostra biológica inclui secções de tecido de amostras de tecido doente ou saudável (e. g., secção de tecido do cólon, tecido mamário, próstata). Uma secção de tecido pode incluir uma única parte ou peça de uma amostra de tecido, por exemplo, uma fatia fina de tecido ou células cortada a partir de uma amostra de tecido. Em algumas formas de realização, podem ser retiradas secções múltiplas de amostras de tecido e submetidas a análise, desde que os métodos aqui divulgados possam ser utilizados para a análise da mesma secção da amostra de tecido relativamente a, pelo menos, dois alvos diferentes (a nível morfológico ou molecular). Em algumas formas de realização, a mesma secção da amostra de tecido pode ser analisada relativamente a, pelo menos, quatro alvos diferentes (a nível morfológico ou molecular). Em algumas formas de realização, a mesma secção da amostra de tecido pode ser analisada relativamente a mais do que quatro alvos diferentes (a nível morfológico ou molecular). Em algumas formas de realização, a mesma secção da amostra de tecido pode ser analisada a níveis morfológicos e moleculares.

Uma secção de tecido, se utilizada como uma amostra biológica, pode ter uma espessura numa gama que é menos do que cerca de 100 micrómetros, numa gama que é menos do que cerca de 50 micrómetros, numa gama que é menos do que cerca de 25 micrómetros ou numa gama que é menos do que cerca de 10 micrómetros.

Em algumas formas de realização, uma amostra biológica ou os alvos na amostra biológica podem ser aderidos a um suporte sólido. Um suporte sólido pode incluir micromatrizes (e. g., micromatrizes de ADN ou ARN), géis, membranas de transferência, lâminas de vidro, esferas ou placas de ELISA. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica ou os alvos na amostra biológica podem ser aderidos a uma membrana seleccionada de nylon, nitrocelulose e difluoreto de polivinilideno. Em algumas formas de realização, o suporte sólido pode incluir uma superfície plástica seleccionada de poliestireno, policarbonato e polipropileno.

#### Alvos

Um alvo pode estar presente na superfície de uma amostra biológica (por exemplo, um antigénio na superfície de uma secção de tecido) ou presente no volume da amostra (por exemplo, um anticorpo numa solução tampão). Em algumas formas de realização, um alvo pode não estar inerentemente presente na superfície de uma amostra biológica e a amostra biológica pode ter que ser processada para tornar o alvo disponível na superfície (e. g., recuperação de antigénio, digestão enzimática, recuperação de epitopo ou bloqueamento). Em algumas formas de realização, o alvo pode estar presente num fluido corporal, tais como sangue,



plasma sanguíneo, soro ou urina. Em algumas formas de realização, o alvo pode estar fixo num tecido, numa superfície celular ou dentro de uma célula.

A adequabilidade dos alvos a serem analisados pode ser determinada pelo tipo e natureza da análise requerida para a amostra biológica. Em algumas formas de realização, um alvo pode proporcionar informação sobre a presença ou ausência de um analito na amostra biológica. Noutra forma de realização, um alvo pode proporcionar informação sobre o estado de uma amostra biológica. Por exemplo, se a amostra biológica incluir uma amostra de tecido, os métodos aqui divulgados podem ser utilizados para detectar alvos que podem ajudar na comparação de diferentes tipos de células ou tecidos, comparando diferentes fases de desenvolvimento, detectando a presença de uma doença ou anomalia, ou determinando o tipo de doença ou anomalia.

Os alvos podem incluir um ou mais de péptidos, proteínas (e. g., anticorpos, aficorpos ou aptâmeros), ácidos nucleicos (e. g., polinucleótidos, ADN, ARN ou aptâmeros); polissacáridos (e. g., lectinas ou açúcares), lípidos, enzimas, substratos enzimáticos, ligandos, receptores, antigénios ou haptenos. Em algumas formas de realização, os alvos podem essencialmente incluir proteínas ou ácidos nucleicos. Um ou mais dos alvos acima mencionados podem ser característicos de células particulares, enquanto que outros alvos podem estar associados a uma doença ou estado particular. Em algumas formas de realização, os alvos que podem ser detectados e analisados utilizando os métodos aqui divulgados, podem incluir, mas não estão limitados a, alvos de prognóstico, alvos hormonais ou de receptores de hormonas, alvos linfóides, alvos tumorais, alvos associados ao ciclo celular, alvos de tecido e tumor neural, ou alvos de diferenciação de aglomerados.

Os exemplos adequados de alvos de prognóstico podem incluir alvos enzimáticos, tais como galactosil transferase II, enolase específica de neurónio, ATPase-2 de protões ou fosfatase ácida.

Os exemplos adequados de alvos hormonais ou de receptores de hormonas podem incluir a gonadotrofina coriónica humana (HCG), hormona adrenocorticotrófica, antigénio carcinoembriónico (CEA), antigénio específico da próstata (PSA), receptor de estrogénio, receptor de progesterona, receptor de androgénios, receptor do complemento gC1q-R/p33, receptor de IL-2, receptor de neurotrofina p75, receptor de PTH, receptor da hormona tiroideia ou receptor de insulina.

Os exemplos adequados de alvos linfóides podem incluir alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, alvo de célula B, bcl-2, bcl-6, antigénio do linfócito B de 36 kD, BM1 (alvo mielóide), BM2 (alvo mielóide), galectina-3, granzima B, antigénio da classe I de HLA, antigénio da classe II de HLA (DP), antigénio da classe II de HLA (DQ), antigénio da classe II de HLA (DR), defensinas de neutrófilo humano, imunoglobulina A, imunoglobulina D, imunoglobulina G, imunoglobulina M, cadeia leve capá, cadeia leve capá, cadeia leve lambda, antigénio de linfócito/histócito, alvo macrófago, muramidase (lisozima), cinase de linfoma anaplásico p80, alvo de célula plasmática, inibidor de protease de leucócito secretor, receptor do antigénio da célula T (JOVI 1), receptor do antigénio da célula T (JOVI 3), transferase do desoxinucleotidilo terminal ou alvo de célula B não aglomerada.

Os exemplos adequados de alvos tumorais podem incluir alfa fetoproteína, apolipoproteína D, BAG-1 (proteína RAP46), CA19-9 (sialil lewisa), CA50 (antigénio de mucina associado a

carcinoma), CA125 (antigénio de cancro do ovário), CA242 (antigénio de mucina associado a tumor), cromogranina A, clusterina (apolipoproteína J), antigénio da membrana epitelial, antigénio relacionado ao epitélio, antigénio específico epitelial, proteína-15 do fluido da doença cística, antigénio específico do hepatócito, heregulina, mucina gástrica humana, glóbulo da gordura do leite humano, MAGE-1, metaloproteínases de matriz, melan A, alvo de melanoma (HMB45), mesotelina, metalotioneína, factor de transcrição da microftalmia (MITF), glicoproteína do núcleo de Muc-1, glicoproteína Muc-1, glicoproteína Muc-2, glicoproteína Muc-5AC, glicoproteína Muc-6, mieloperoxidase, Myf-3 (alvo de Rabdomiossarcoma), Myf-4 (alvo de Rabdomiossarcoma), MyoD1 (alvo de Rabdomiossarcoma), mioglobina, proteína nm23, fosfatase alcalina da placenta, pré-albumina, antigénio específico da próstata, fosfatase ácida da próstata, péptido inibidor da próstata, PTEN, alvo do carcinoma da célula renal, antigénio mucinoso do intestino grosso, tetranectina, factor-1 de transcrição da tiróide, inibidor de tecido da metaloproteinase 1 de matriz, inibidor de tecido da metaloproteinase 2 de matriz, tirosinase, proteína-1 relacionada com a tirosinase, vilina ou factor de von Willebrand.

Os exemplos adequados de alvos associados ao ciclo celular podem incluir factor-1 activador da protease de apoptose, bcl-w, bcl-x, bromodesoxiuridina, CAK (cinase activadora de cdk), proteína de susceptibilidade a apoptose celular (CAS), caspase 2, caspase 8, CPP32 (caspase-3), CPP32 (caspase-3), cinases dependentes de ciclina, ciclina A, ciclina B1, ciclina D1, ciclina D2, ciclina D3, ciclina E, ciclina G, factor de fragmentação do ADN (N-terminal), Fas (CD95), proteína de domínio de morte associada a Fas, ligando Fas, Fen-1, IPO-38, Mcl-1, proteínas de manutenção de minicromossoma, proteína

reparadora de desemparelhamento (MSH2), poli(ADP-Ribose)polimerase, antigénio nuclear de célula proliferadora, proteína p16, proteína p27, p34cdc2, proteína p57 (Kip2), proteína p105, Stat 1 alfa, topoisomerase I, topoisomerase II, topoisomerase III alfa ou topoisomerase II beta.

Os exemplos adequados de alvos de tecido e tumor neural podem incluir alfa B cristalina, alfa-internexina, alfa sinucleína, proteína precursora de amilóide, beta amilóide, calbindina, colina acetiltransferase, transportador 1 de aminoácido excitatório, GAP43, proteína acídica fibrilar glial, receptor 2 de glutamato, proteína básica de mielina, receptor do factor de crescimento do nervo (gp75), alvo de neuroblastoma, neurofilamento de 68 kD, neurofilamento de 160 kD, neurofilamento de 200 kD, enolase específica de neurónio, receptor alfa4 nicotínico de acetilcolina, receptor beta2 nicotínico de acetilcolina, periferina, produto génico 9 proteico, proteína S-100, serotonina, SNAP-25, sinapsina I, sinaptofisina, tau, triptofano hidroxilase, tirosina hidroxilase ou ubiquitina.

Os exemplos adequados de alvos de diferenciação de aglomerado podem incluir CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3delta, CD3epsilon, CD3gamma, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8alfa, CD8beta, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c,

CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CDw93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CD109, CD114, CD115, CD116, CD117, CDw119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CDw125, CD126, CD127, CDw128a, CDw128b, CD130, CDw131, CD132, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CDw150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, GD166 e TCR-zeta.

Outros alvos de prognóstico, alvos hormonais ou de receptores de hormonas, alvos linfóides, alvos tumorais, alvos associados ao ciclo celular e alvos de tecido e tumor neural incluem proteína-F do centrómero (CENP-F), giantina, involucrina, lamina A&C (XB 10), LAP-70, mucina, proteínas do complexo do poro nuclear, proteína do corpo lamelar p180, ran, catepsina D, proteína Ps2, Her2-neu, P53, S100, antígeno do alvo epitelial (EMA), TdT, MB2, MB3, PCNA ou Ki67.

#### Sondas

Em algumas formas de realização, um ligante e um marcador (gerador de sinal ou uma enzima) podem ser acoplados um ao outro directamente (isto é, sem quaisquer ligadores). Noutras formas de realização, um ligante e um marcador (gerador de sinal ou uma enzima) podem ser acoplados um ao outro através de um ligador. Como aqui utilizado, “acoplado” refere-se genericamente a duas entidades (por exemplo, ligante e gerador de sinal) estavelmente ligados um ao outro por qualquer meio físico-químico. A natureza

do acoplamento pode ser tal que não danifica substancialmente a eficácia de qualquer uma das entidades. Um ligante e um marcador podem estar acoplados um ao outro através de interações covalentes ou não covalentes. As interações não covalentes podem incluir, mas não estão limitadas a, interações hidrófobas, interações iónicas, interações de pontes de hidrogénio, interações de elevada afinidade (tais como complexação de biotina-avidina ou biotina-estreptavidina) ou outras interações de afinidade.

Um ligador pode incluir uma forma de estrutura de ligação ou uma sequência formada devido à formação da ligação não covalente ou covalente. Em algumas formas de realização, o ligador pode ser quimicamente estável, isto é, pode manter a sua integridade na presença de um agente químico. Em algumas formas de realização, o ligador pode ser susceptível a agentes químicos, isto é, pode ser capaz de dissociar, clivar ou hidrolisar na presença de um agente químico. Os exemplos adequados de ligadores podem incluir ligações dissulfureto (e. g., SPDP ou SMPT), estruturas/sequências sensíveis ao pH, estruturas/sequências que podem ser reduzidas na presença de um agente redutor, estruturas/sequências que podem ser oxidadas na presença de um agente oxidante ou qualquer outra ligação química ou física que pode ser facilmente manipulada (dissociada, clivada ou hidrolisada) na presença de um agente químico.

Em algumas formas de realização, um ligante e um marcador (gerador de sinal ou uma enzima) podem ser ligados quimicamente um ao outro através de grupos funcionais capazes de reagir e formar uma ligação sob condições adequadas. Os exemplos adequados de combinações de grupos funcionais podem incluir, mas não estão limitados a, éster de amina e aminas ou anilinas; acilazida e aminas ou anilinas; halogenetos de acilo e aminas,

anilinas, álcoois ou fenóis; acilnitrilo e álcoois ou fenóis; aldeído e aminas ou anilinas; halogeneto de alquilo e aminas, anilinas, álcoois, fenóis ou tióis; sulfonato de alquilo e tióis, álcoois ou fenóis; anidrido e álcoois, fenóis, aminas ou anilinas; halogeneto de arilo e tióis; aziridina e tióis ou tioéteres; ácido carboxílico e aminas, anilinas, álcoois ou halogenetos de alquilo; diazoalcano e ácidos carboxílicos; epóxido e tióis; haloacetamida e tióis; halotriazina e aminas, anilinas ou fenóis; hidrazina e aldeídos ou cetonas; hidroxiamina e aldeídos ou cetonas; éster de imido e aminas ou anilinas; isocianato e aminas ou anilinas; e isotiocianato e aminas ou anilinas. Um grupo funcional, num par de grupos funcionais acima mencionados, pode estar presente num ligante e um grupo funcional correspondente pode estar presente no gerador de sinal ou na enzima. Por exemplo, um ligante pode incluir um ácido carboxílico e o gerador de sinal ou a enzima pode incluir uma amina, anilina, álcool ou halogeneto de acilo, ou vice-versa. A conjugação entre o ligante e o gerador de sinal ou a enzima pode ser efectuada, neste caso, através da formação de uma amida ou uma ligação éster.

Em algumas formas de realização, o ligante pode ser marcado intrinsecamente com um gerador de sinal (por exemplo, se o ligante for uma proteína, durante a síntese utilizando um aminoácido marcado de forma detectável) ou uma enzima (por exemplo, se o ligante for uma enzima). Um ligante que seja marcado intrinsecamente pode não requerer um gerador de sinal ou uma enzima separada de modo a ser detectado. De facto, o marcador intrínseco pode ser suficiente para tornar a sonda detectável. Em formas de realização alternativas, o ligante pode ser marcado por ligação a um gerador de sinal específico ou a uma enzima (*i. e.*, marcado extrinsecamente).

Em algumas formas de realização, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são corporizados numa única entidade. Em formas de realização alternativas, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são corporizados em entidades discretas (e. g., um anticorpo primário capaz de ligar um alvo e uma enzima ou um anticorpo secundário marcado com gerador de sinal capaz de ligar o anticorpo primário ou um anticorpo primário marcado com hapteno capaz de ligar um alvo e uma enzima ou um anticorpo anti-hapteno marcado com gerador de sinal capaz de ligar o anticorpo primário marcado com hapteno). Quando o ligante e o gerador de sinal ou a enzima forem entidades separadas, estes podem ser aplicados a uma amostra biológica num único passo ou em passos múltiplos. Em algumas formas de realização, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são entidades separadas que são pré-ligadas antes da aplicação à amostra biológica e aplicadas à amostra biológica num único passo. Ainda noutras formas de realização, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou a enzima) são entidades separadas que são aplicadas à amostra biológica independentemente e se combinam após a aplicação.

### Ligantes

Os métodos aqui divulgados envolvem a utilização de ligantes que se ligam fisicamente ao alvo de um modo específico. Em algumas formas de realização, um ligante pode-se ligar a um alvo com especificidade suficiente, isto é, um ligante pode-se ligar a um alvo com maior afinidade do que com qualquer outra molécula. Em algumas formas de realização, o ligante pode-se ligar a outras moléculas, mas a ligação pode ser tal que a ligação não específica pode ter níveis de fundo ou perto deles. Em algumas formas de realização, a afinidade do ligante para o



alvo de interesse pode estar numa gama que é, pelo menos, 2 vezes, pelo menos, 5 vezes, pelo menos, 10 vezes ou mais do que a sua afinidade para outras moléculas. Em algumas formas de realização, podem ser utilizados ligantes com a maior afinidade diferencial, embora possam não ser aqueles com a maior afinidade para o alvo.

Em algumas formas de realização, a ligação entre o alvo e o ligante pode ser efectuada por ligação física. A ligação física pode incluir ligação efectuada utilizando interacções não covalentes. As interacções não covalentes podem incluir, mas não estão limitadas a, interacções hidrófobas, interacções iónicas, interacções por ponte de hidrogénio ou interacções de afinidade (tais como complexação de biotina-avidina ou biotina-estreptavidina). Em algumas formas de realização, o alvo e o ligante podem ter áreas nas suas superfícies ou em cavidades que originam reconhecimento específico entre os dois que resultam em ligação física. Em algumas formas de realização, um ligante pode-se ligar a um alvo biológico com base no ajuste recíproco de uma porção das suas formas moleculares.

Os ligantes e os seus alvos correspondentes podem ser considerados como pares de ligação, cujos exemplos não limitativos incluem pares de ligação de tipo imune, tais como antigénio/anticorpo, antigénio/fragmento de anticorpo ou hapteno/anti-hapteno; pares de ligação de tipo não imune, tais como biotina/avidina, biotina/estreptavidina, proteína de ligação a ácido fólico/folato, hormona/receptor de hormona, lectina/hidrato de carbono específico, enzima/enzima, enzima/substrato, enzima/análogo de substrato, enzima/pseudo-substrato (análogos de substrato que não podem ser catalizados pela actividade enzimática), enzima/cofactor, enzima/modulador, enzima/inibidor ou vitamina B12/factor

intrínseco. Outros exemplos adequados de pares de ligação podem incluir fragmentos de ácidos nucleicos complementares (incluindo sequências de ADN, sequências de ARN, sequências de ALN e sequências de APN); Proteína A/anticorpo; Proteína G/anticorpo; ácido nucleico/proteína de ligação a ácido nucleico; ou polinucleótido/proteína de ligação a polinucleótido.

Em algumas formas de realização, o ligante pode ser um ligante específico de estrutura ou de sequência, em que a sequência ou a estrutura de um alvo reconhecida e ligada pelo ligante pode ser suficientemente única para esse alvo.

Em algumas formas de realização, o ligante pode ser específico de estrutura e pode reconhecer uma estrutura primária, secundária ou terciária de um alvo. Uma estrutura primária de um alvo pode incluir a especificação da sua composição atómica e as ligações químicas que ligam esses átomos (incluindo estereoquímica), por exemplo, o tipo e a natureza da organização linear dos aminoácidos numa proteína. Uma estrutura secundária de um alvo pode referir-se à forma tridimensional geral de segmentos de biomoléculas, por exemplo, para uma proteína a estrutura secundária pode referir-se ao enrolamento da cadeia peptídica "estrutural" em várias conformações que podem resultar em aminoácidos distantes serem colocados na proximidade uns dos outros. Os exemplos adequados de estruturas secundárias podem incluir, mas não estão limitadas a, hélices alfa, folhas beta ou hélices aleatórias. Uma estrutura terciária de um alvo pode ser a sua estrutura tridimensional global. Uma estrutura quaternária de um alvo pode ser a estrutura formada pela sua interacção não covalente com um ou mais outros alvos ou macromoléculas (tal como interacções proteicas). Um exemplo de uma estrutura quaternária pode ser a estrutura formada pelas quatro subunidades proteicas da globina para fazer a

hemoglobina. Um ligante de acordo com as formas de realização da invenção pode ser específico para qualquer das estruturas acima mencionadas.

Um exemplo de um ligante específico de estrutura pode incluir uma molécula específica de proteína que se pode ligar a um alvo proteico. Os exemplos de moléculas específicas de proteína adequadas podem incluir anticorpos e fragmentos de anticorpos, ácidos nucleicos (por exemplo, aptâmeros que reconhecem alvos proteicos) ou substratos proteicos (não catalizáveis).

Em algumas formas de realização, um alvo pode incluir um antígeno e um ligante pode incluir um anticorpo. Um anticorpo adequado pode incluir anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) ou fragmentos de anticorpos, desde que se liguem especificamente a um antígeno alvo.

Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma célula ou uma amostra de tecido e os métodos aqui divulgados podem ser utilizados em imuno-histoquímica (IHC). A imunoquímica pode envolver ligação de um antígeno alvo a um ligante baseado em anticorpo para proporcionar informação sobre os tecidos ou células (por exemplo, células doentes *versus* normais). Os exemplos de anticorpos (e as correspondentes doenças/células doentes) adequados como ligantes para métodos aqui divulgados incluem, mas não estão limitados a, anticorpo anti-receptor de estrogénio (cancro da mama), anticorpo anti-receptor da progesterona (cancro da mama), anticorpo anti-p53 (cancros múltiplos), anticorpo anti-Her-2/neu (cancros múltiplos), anticorpo anti-EGFR (factor de crescimento epidérmico, cancros múltiplos), anticorpo anti-catepsina D (mama

e outros cancros), anticorpo anti-Bcl-2 (célula apoptótica), anticorpo anti-E-caderina, anticorpo anti-CA125 (ovário e outros cancros), anticorpo anti-CA15-3 (cancro da mama), anticorpo anti-CA19-9 (cancro do cólon), anticorpo anti-c-erbB-2, anticorpo anti-glicoproteína-P (MDR, resistência a multi-fármacos), anticorpo anti-CEA (antigénio carcinoembriónico), anticorpo anti-proteína do retinoblastoma (Rb), anticorpo anti-oncoproteína ras (p21), anticorpo anti-Lewis X (também denominado CD15), anticorpo anti-Ki-67 (proliferação celular), anticorpo anti-PCNA (cancros múltiplos), anticorpo anti-CD3 (células T), anticorpo anti-CD4 (células auxiliares T), anticorpo anti-CD5 (células T), anticorpo anti-CD7 (timócitos, célula T imaturas, células assassinas NK), anticorpo anti-CD8 (células T supressoras), anticorpo anti-CD9/p24 (ALL), anticorpo anti-CD10 (também denominado CALLA) (leucemia linfoblástica aguda comum), anticorpo anti-CD11 (monócitos, granulócitos, AML), anticorpo anti-CD13 (células mielomonocíticas, AML), anticorpo anti-CD14 (monócitos maduros, granulócitos), anticorpo anti-CD15 (doença de Hodgkin), anticorpo anti-CD19 (células B), anticorpo anti-CD20 (células B), anticorpo anti-CD22 (células B), anticorpo anti-CD23 (células B activadas, CLL), anticorpo anti-CD30 (células B e T activadas, doença de Hodgkin), anticorpo anti-CD31 (marcador de angiogénese), anticorpo anti-CD33 (célula mielóide, AML), anticorpo anti-CD34 (células estaminais endoteliais, tumores estromais), anticorpo anti-CD35 (células dendríticas), anticorpo anti-CD38 (células plasmáticas, células T, B e mielóides activadas), anticorpo anti-CD41 (plaquetas, megacariócitos), anticorpo anti-LCA/CD45 (antigénio comum do leucócito), anticorpo anti-CD45RO (células T indutoras, auxiliares), anticorpo anti-CD45RA (células B), anti-CD39, anticorpo CD100, anticorpo anti-CD95/Fas (apoptose), anticorpo anti-CD99 (marcador do sarcoma de Ewing, produto do gene MIC2),

anticorpo anti-CD106 (VCAM-1; células endoteliais activadas), anticorpo anti-ubiquitina (doença de Alzheimer), anticorpo anti-CD71 (receptor de transferrina), anticorpo anti-myc-c (oncoproteína e um hapteno), anticorpo anti-citoqueratinas (receptor de transferrina), anticorpo anti-vimentinas (células endoteliais) (células B e T), anticorpo anti-proteína HPV (papilomavírus humano), anticorpo anti-cadeias leves capa (células B), anticorpo anti-cadeias leves lambda (células B), anticorpo anti-melanossomas (HMB45) (melanoma), anticorpo anti-antigénio específico da próstata (PSA) (cancro da próstata), anticorpo anti-S-100 (melanoma, células gliais, salivares), anticorpo anti-antigénio tau (doença associada a amilóide), anticorpo anti-fibrina (células epiteliais), anticorpo anti-queratinas, anticorpo anti-citoqueratina (tumor), anticorpo anti-alfa-catenina (membrana celular) ou anti-antigénio-Tn (carcinoma do cólon, adenocarcinomas e cancro pancreático).

Outros exemplos específicos de anticorpos adequados podem incluir, mas não estão limitados a, anti-antigénio nuclear da célula proliferativa, clone pc10 (sigma Aldrich, P8825); anti-alfa actina de músculo (SmA), clone 1A4 (sigma, A2547); anti-beta catenina de coelho (sigma, C2206); anti-pancitoqueratina de murganho, clone PCK-26 (sigma, C1801); anti-receptor alfa de estrogénio de murganho, clone 1D5 (DAKO, M7047); anticorpo de beta catenina, clone 15B8 (sigma, C7738); anti-vimentina de cabra (sigma, V4630); clone AR441 do receptor de androgénio do ciclo (DAKO, M3562); Factor 7 de Von Willebrand, queratina 5, queratina 8/18, e-caderina, Her2/neu, receptor de estrogénio, p53, receptor de progesterona, beta catenina; anti-murganho de burro (Jackson ImmunoResearch, 715-166-150); ou anti-coelho de burro (Jackson ImmunoResearch, 711-166-152).

Em algumas formas de realização, um ligante pode ser específico de sequência. Um ligante específico de sequência pode incluir um ácido nucleico e o ligante pode ser capaz de reconhecer uma organização linear particular de nucleótidos ou dos seus derivados no alvo. Em algumas formas de realização, a organização linear pode incluir nucleótidos contíguos ou os seus derivados que podem, cada, ligar-se a um nucleótido complementar correspondente no ligante. Numa forma de realização alternativa, a sequência pode não ser contígua uma vez que um, dois ou mais nucleótidos podem não ter resíduos complementares correspondentes na sonda. Os exemplos adequados de ligantes baseados em ácido nucleico podem incluir, mas não estão limitados a, oligonucleótidos ou polinucleótidos de ADN ou ARN. Em algumas formas de realização, os ácidos nucleicos adequados podem incluir análogos de ácidos nucleicos, tais como dioxigenina dCTP, 7-azaguanosina de biotina dcTP, azidotimidina, inosina ou uridina.

Em determinadas formas de realização, o ligante e o alvo podem incluir ácidos nucleicos. Em algumas formas de realização, um ligante baseado em ácido nucleico pode formar uma ligação de Watson-Crick com o alvo de ácido nucleico. Noutra forma de realização, o ligante de ácido nucleico pode formar uma ligação de Hoogsteen com o alvo de ácido nucleico, formando assim uma triplex. Um ligante de ácido nucleico que se liga por ligação de Hoogsteen pode entrar o sulco maior de um ácido nucleico de um alvo e hibridar com as bases aí localizadas. Os exemplos adequados dos ligantes acima, podem incluir moléculas que reconhecem e se ligam aos sulcos maiores e menores de ácidos nucleicos (por exemplo, algumas formas de antibióticos). Em determinadas formas de realização, os ligantes de ácido nucleico podem formar ligações de Watson-Crick e Hoogsteen com o alvo de

ácido nucleico (por exemplo, sondas de bis APN são capazes de ligação de Watson-Crick e Hoogsteen a um ácido nucleico).

O comprimento do ligante de ácido nucleico pode também determinar a especificidade da ligação. O custo energético de um único desemparelhamento entre o ligante e o alvo de ácido nucleico pode ser relativamente superior para sequências mais curtas do que para mais longas. Em algumas formas de realização, a hibridação de ligantes de ácido nucleico mais curtos pode ser mais específica do que a hibridação de sondas de ácido nucleico mais longas, uma vez que as sondas mais longas podem ser mais susceptíveis a desemparelhamentos e podem continuar a ligar-se ao ácido nucleico dependendo das condições. Em determinadas formas de realização, os ligantes mais curtos podem apresentar uma estabilidade de ligação mais baixa a uma determinada temperatura e sal. Os ligantes que podem apresentar uma estabilidade maior para ligar sequências mais curtas, podem ser utilizados neste caso (por exemplo, bis APN). Em algumas formas de realização, o ligante de ácido nucleico pode ter um comprimento na gama desde cerca de 4 nucleótidos até cerca de 12 nucleótidos, desde cerca de 12 nucleótidos até cerca de 25 nucleótidos, desde cerca de 25 nucleótidos até cerca de 50 nucleótidos, desde cerca de 50 nucleótidos até cerca de 100 nucleótidos, desde cerca de 100 nucleótidos até cerca de 250 nucleótidos, desde cerca de 250 nucleótidos até cerca de 500 nucleótidos ou desde cerca de 500 nucleótidos até cerca de 1000 nucleótidos. Em algumas formas de realização, o ligante de ácido nucleico pode ter um comprimento numa gama que é maior do que cerca de 1000 nucleótidos. Apesar do comprimento do ligante de ácido nucleico, todos os resíduos nucleotídicos do ligante podem não hibridar com os nucleótidos complementares no alvo de ácido nucleico. Por exemplo, o ligante pode incluir 50 resíduos nucleotídicos de comprimento e apenas 25 desses resíduos

nucleotídicos podem hibridar com o alvo de ácido nucleico. Em algumas formas de realização, os resíduos nucleotídicos que podem hibridar podem estar contíguos entre si. Os ligantes de ácido nucleico podem ser de cadeia simples ou podem incluir uma estrutura secundária. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma célula ou uma amostra de tecido e a amostra biológica pode ser submetida a hibridação *in situ* (ISH), utilizando um ligante de ácido nucleico. Em algumas formas de realização, uma amostra de tecido pode ser submetida a hibridação *in situ* para além de imuno-histoquímica (IHC), para obter informação desejada relativamente à amostra de tecido.

Independentemente do tipo de ligante e do alvo, a especificidade de ligação entre o ligante e o alvo também pode ser afectada dependendo das condições de ligação (por exemplo, as condições de hibridação no caso de ácidos nucleicos complementares). As condições de ligação adequadas podem ser realizadas por modulação de um ou mais de pH, temperatura ou concentração salina.

Um ligante pode ser marcado intrinsecamente (gerador de sinal ou enzima ligada durante a síntese do ligante) ou marcado extrinsecamente (gerador de sinal ou enzima ligada durante um passo posterior). Por exemplo, para um ligante baseado em proteína, um ligante marcado intrinsecamente pode ser preparado utilizando aminoácidos marcados. De um modo semelhante, um ácido nucleico marcado intrinsecamente pode ser sintetizado utilizando métodos que incorporam nucleótidos marcados com gerador de sinal directamente no ácido nucleico crescente. Em algumas formas de realização, um ligante pode ser sintetizado de um modo que os geradores de sinal possam ser incorporados posteriormente. Por exemplo, esta última marcação pode ser realizada por meios



químicos através da introdução de grupos amino ou tiol, activos em ácidos nucleicos de cadeias peptídicas. Em algumas formas de realização, um ligante, tais como uma proteína (por exemplo, um anticorpo) ou um ácido nucleico (por exemplo, um ADN), pode ser marcado quimicamente directamente utilizando químicas apropriadas.

Em algumas formas de realização, podem ser utilizadas combinações de ligantes que podem proporcionar uma maior especificidade ou, em determinadas formas de realização, amplificação do sinal. Assim, em algumas formas de realização, pode ser utilizada uma sanduíche de ligantes, em que o primeiro ligante pode ligar-se ao alvo e servir para proporcionar uma ligação secundária, em que o ligante secundário pode ou não incluir um marcador, o qual pode ainda proporcionar uma ligação terciária (se requerida), em que o elemento de ligação terciária pode incluir um marcador.

Os exemplos adequados de combinações de ligante podem incluir anticorpo primário-anticorpo secundário, ácidos nucleicos complementares ou outros pares ligando-receptor (tal como biotina-estreptavidina). Alguns exemplos específicos de pares de ligantes adequados podem incluir anti-myc de murganho para proteínas expressas recombinantes com epitopo c-myc; anti-HisG de murganho para proteína recombinante com epitopo His-Tag, anti-xpress de murganho para proteína recombinante com epitopo-marcador, anti-cabra de coelho para moléculas primárias de IgG de cabra, sequência de ácido nucleico complementar para um ácido nucleico; anti-tio de murganho para proteínas de fusão de tiorredoxina, anti-GFP de coelho para proteína de fusão, jacalina para  $\alpha$ -D-galactose; e melibiose para proteínas de ligação a hidratos de carbono, açúcares, matriz de acoplamento de níquel ou heparina.

Em algumas formas de realização, uma combinação de um anticorpo primário e um anticorpo secundário pode ser utilizada como um ligante. Um anticorpo primário pode ser capaz de ligar uma região específica do alvo e o anticorpo secundário pode ser capaz de se ligar ao anticorpo primário. Um anticorpo secundário pode ser ligado a um gerador de sinal ou uma enzima antes de ser ligado ao anticorpo primário ou pode ser capaz de se ligar a um gerador de sinal ou uma enzima num passo posterior. Numa forma de realização alternativa, podem ser utilizados um anticorpo primário e pares de ligação ligando-receptor específicos (tal como biotina-estreptavidina). O anticorpo primário pode ser ligado a um elemento do par (por exemplo, biotina) e o outro elemento (por exemplo, estreptavidina) pode ser marcado com um gerador de sinal ou uma enzima. O anticorpo, avidina, estreptavidina ou biotina secundária pode ser, cada, independentemente marcado com um gerador de sinal ou uma enzima.

Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ser utilizados num processo imuno-histoquímico e um anticorpo primário pode ser utilizado para ligar especificamente a proteína alvo. Um anticorpo secundário pode ser utilizado para se ligar especificamente ao anticorpo primário, formando assim uma ponte entre o anticorpo primário e um reagente subsequente (por exemplo, um gerador de sinal ou enzima), se existir. Por exemplo, um anticorpo primário pode ser uma IgG de murganho (um anticorpo produzido em murganho) e o anticorpo secundário correspondente pode ser um anti-murganho de cabra (anticorpo produzido em cabra) que tem regiões capazes de se ligarem a uma região na IgG de murganho.

Em algumas formas de realização, pode ser obtida amplificação do sinal quando vários anticorpos secundários se

podem ligar a epitopos no anticorpo primário. Num processo imuno-histoquímico, um anticorpo primário pode ser o primeiro anticorpo utilizado no processo e o anticorpo secundário pode ser o segundo anticorpo utilizado no processo. Em algumas formas de realização, um anticorpo primário pode ser único anticorpo utilizado num processo de imunocoloração.

### Geradores de Sinal

O tipo de gerador de sinal adequado para os métodos aqui divulgados pode depender de uma variedade de factores, incluindo a natureza da análise a ser conduzida, o tipo da fonte de energia e do detector utilizado, o tipo de agente oxidante utilizado, o tipo de ligante, o tipo de alvo ou o modo de ligação entre o ligante e o gerador de sinal (e. g., clivável ou não clivável).

Um gerador de sinal adequado pode incluir uma molécula ou um composto capaz de proporcionar um sinal detectável. Um gerador de sinal pode proporcionar um sinal característico após interacção com uma fonte de energia ou uma corrente. Uma fonte de energia pode incluir uma fonte de radiação electromagnética e uma fonte da excitação de fluorescência. A fonte de radiação electromagnética pode ser capaz de proporcionar a energia electromagnética de qualquer comprimento de onda, incluindo visível, infravermelho e ultravioleta. A radiação electromagnética pode ser na forma de uma fonte de luz directa ou pode ser emitida por um composto emissor de luz, tal como um fluoróforo dador. Uma fonte de excitação de fluorescência pode ser capaz de fazer uma fonte fluorescer ou pode originar emissões fotónicas (isto é, radiação electromagnética, campo eléctrico dirigido, temperatura, contacto físico ou interrupção

mecânica). Os geradores de sinal adequados podem proporcionar um sinal capaz de ser detectado através de uma variedade de métodos incluindo medições ópticas (por exemplo, fluorescência), condutividade eléctrica ou radioactividade. Os geradores de sinal adequados podem ser, por exemplo, emissores de luz, aceitadores de energia, fluorescentes, radioactivos ou desactivadores.

Um gerador de sinal adequado pode ser química e estericamente compatível com os constituintes aos quais está ligado, por exemplo, um ligante. Adicionalmente, um gerador de sinal adequado não pode interferir com a ligação do ligante ao alvo, nem pode afectar a especificidade de ligação do ligante. Um gerador de sinal adequado pode ser de natureza orgânica ou inorgânica. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode ser de natureza química, peptídica ou ácido nucleico.

Um gerador de sinal adequado pode ser directamente detectável. Uma unidade directamente detectável pode ser tal que pode ser detectada directamente através da sua capacidade para emitir um sinal, tal como, por exemplo, um marcador fluorescente que emite luz de um comprimento de onda particular após excitação por luz de um outro comprimento de onda mais baixo característico e/ou absorve luz de um comprimento de onda particular.

Um gerador de sinal, adequado de acordo com os métodos aqui divulgados, pode ser susceptível a manipulação aquando da aplicação de um agente químico. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode ser capaz de ser destruído quimicamente após exposição a um agente oxidante. A destruição química pode incluir desintegração completa do gerador de sinal ou modificação do componente que produz o sinal do gerador de

sinal. A modificação do componente que produz o sinal pode incluir qualquer modificação química (tais como adição, substituição ou remoção) que puder resultar na modificação das propriedades geradoras de sinal. Por exemplo, a desconjugação de um gerador de sinal conjugado pode resultar na destruição de propriedades cromogénicas do gerador de sinal. De um modo semelhante, a substituição de um grupo funcional inibidor de fluorescência num gerador de sinal fluorescente pode resultar na modificação das suas propriedades fluorescentes. Em algumas formas de realização, um ou mais geradores de sinal substancialmente resistentes a inactivação por um agente químico específico podem ser utilizados como uma sonda de controlo nos métodos proporcionados.

Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode ser seleccionado de uma molécula emissora de luz, um radioisótopo (e. g.,  $P^{32}$  ou  $H^3$ ,  $^{14}C$ ,  $^{125}I$  e  $^{131}I$ ), um marcador óptico ou marcador de densidade electrónica, um marcador activo em Raman, uma enzima, um substrato enzimático (por exemplo, um substrato cromogénico), uma molécula com ressonância electrónica de spin (tal como, por exemplo, radicais nitroxilo), uma molécula transferidora de carga eléctrica (i. e., uma molécula de transdutora de carga eléctrica), um nanocristal semiconductor, uma nanopartícula semicondutora, um nanocristal de ouro colóide, uma microesfera, uma esfera magnética, uma partícula paramagnética ou um *quantum dot*.

Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode incluir uma molécula emissora de luz. Uma molécula emissora de luz pode emitir luz em resposta a irradiação com luz de um comprimento de onda particular. As moléculas emissoras de luz podem ser capazes de absorver e emitir luz através de luminescência (emissão não térmica de radiação electromagnética

por um material após excitação), fosforescência (luminescência retardada como resultado da absorção de radiação), quimioluminescência (luminescência devido a uma reação química), fluorescência ou fluorescência polarizada.

Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode essencialmente incluir um fluoróforo. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode essencialmente incluir um fluoróforo que possa ser ligado a um anticorpo, por exemplo, numa análise de imuno-histoquímica. Os fluoróforos adequados que podem ser conjugados a um anticorpo primário incluem, mas não estão limitados a, fluoresceína, rodamina, Vermelho Texas, Cy2, Cy3, Cy5, Vermelho VECTOR, ELF (Fluorescência Marcada Enzimaticamente), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy7, FluorX, calceína, Calceína-AM, Laranja (42 kDa), Tangerina (35 kDa), Ouro (31 kDa), Vermelho (42 kDa) e Carmesim (40 kDa) da CRYPTOFLUOR, BHMP, BHDMP, Br-Oregon, Amarelo Lucifer, família do corante Alexa, N-[6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino]caproil] (NBD), BODIPY, diflureto de dipirrometeno de boro, Verde Oregon, Vermelho MITOTRACKER, ficoeritrina, Ficobiliproteínas BPE (240 kDa), RPE (240 kDa), CPC (264 kDa), APC (104 kDa), Azul Espectral, Água Espectral, Verde Espectral, Ouro Espectral, Laranja Espectral, Vermelho Espectral, corantes de infravermelho (IV), GDP-Ribose Cíclico (cGDPR), Branco Calcofluor, Lissamina, Umbeliferona, tirosina ou triptofano. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode essencialmente incluir um corante de cianina. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode essencialmente incluir um ou mais de corante Cy3, corante Cy5 ou corante Cy7.

Em algumas formas de realização, o gerador de sinal pode ser parte de um par FRET. O par FRET inclui dois fluoróforos que são capazes de realizar FRET para produzir ou eliminar um sinal

detectável, quando posicionados na proximidade um do outro. Alguns exemplos de dadores podem incluir Alexa 488, Alexa 546, BODIPY 493, Oyster 556, Flúor (FAM), Cy3 ou TTR (Tamra). Alguns exemplos de aceitadores podem incluir Cy5, Alexa 594, Alexa 647 ou Oyster 656.

Com aqui descrito acima, uma ou mais das moléculas acima mencionadas, podem ser utilizadas como um gerador de sinal. Em algumas formas de realização, um ou mais dos geradores de sinal acima mencionados podem não ser susceptíveis a destruição química e pode ser utilizado um ligador clivável para associar o gerador de sinal e o ligante. Em algumas formas de realização, um ou mais dos geradores de sinal acima mencionados, podem ser susceptíveis a destruição do sinal e o gerador de sinal pode essencialmente incluir uma molécula capaz de ser destruída quimicamente. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode incluir um fluoróforo capaz de ser destruído quimicamente por um agente oxidante. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode essencialmente incluir cianina, cumarina, BODIPY, ATTO 658 ou ATTO 634, capaz de ser destruído quimicamente por um agente oxidante. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal pode incluir um ou mais de um corante Cy3, um corante Cy5 ou um corante Cy7, capaz de ser destruído ou desactivado.

#### Enzima e Substratos Enzimáticos

Em algumas formas de realização, uma sonda pode incluir um ligante acoplado a uma enzima. Em algumas formas de realização, uma enzima adequada catalisa uma reacção química do substrato para formar um produto de reacção que se pode ligar a um receptor (e. g., grupos fenólicos) presente na amostra ou a um

suporte sólido ao qual a amostra esteja ligada. Um receptor pode ser exógeno (isto é, um receptor aderido extrinsecamente à amostra ou ao suporte sólido) ou endógeno (receptores presentes intrinsecamente na amostra ou no suporte sólido). A amplificação do sinal pode ser efectuada, uma vez que uma única enzima pode catalisar uma reacção química do substrato para ligar covalentemente múltiplos geradores de sinal perto do alvo.

Em algumas formas de realização, uma enzima adequada pode ser também capaz de ser inactivada por um agente oxidante. Os exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidases, oxidases, fosfatases, esterases e glicosidases. Os exemplos específicos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina,  $\beta$ -D-galactosidase, lipase e glucose oxidase. Em algumas formas de realização, a enzima é uma peroxidase seleccionada de peroxidase de rábano, citocromo C peroxidase, glutathione peroxidase, microperoxidase, mieloperoxidase, lactoperoxidase e peroxidase de soja.

Em algumas formas de realização, um ligante e uma enzima podem ser corporizados numa única entidade, por exemplo, uma molécula proteica capaz de se ligar a um alvo e também catalisar uma reacção química de substrato. Noutras formas de realização, um ligante e uma enzima podem ser corporizados em entidades separadas e podem ser acoplados por formação de ligação covalente ou por utilização de pares conjugados ligando-receptor (e. g., estreptavidina e biotina).

Um substrato enzimático pode ser seleccionado dependendo da enzima utilizada e do alvo disponível para ligação na amostra ou no suporte sólido. Por exemplo, em formas de realização que incluem HRP como uma enzima, um substrato pode incluir um fenol substituído (e. g., tiramina). A reacção da HRP na tiramina pode



produzir um substrato fenólico activado que se pode ligar a receptores endógenos como unidades ricas em electrões (tais como tirosina ou triptofano) ou grupos fenólicos presentes na superfície de proteínas de uma amostra biológica. Em formas de realização alternativas, nos casos em que pode ser utilizado cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) como um substrato conjuntamente com uma enzima HRP, os receptores exógenos como p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) pode ser aderidos ao suporte sólido ou à amostra biológica antes de reagir com o substrato.

Em algumas formas de realização, um substrato enzimático pode ser desfosforilado após reacção com a enzima. O produto de reacção desfosforilado pode ser capaz de se ligar a receptores endógenos ou exógenos (e. g., anticorpos) na amostra ou no suporte sólido. Por exemplo, uma enzima pode incluir fosfatase alcalina (AP) e um substrato pode incluir NADP, fosfatos substituídos (e. g., nitrofenilfosfato) ou biotina fosforilada. Os receptores podem incluir, de um modo adequado, proteínas de ligação a NAD, anticorpos para o produto de reacção desfosforilado (e. g., anti nitro-fenol), avidina ou estreptavidina.

Em algumas formas de realização, uma enzima pode incluir  $\beta$ -galactosidase e um substrato pode incluir  $\beta$ -galactoprianosil-glicósido de fluoresceína ou cumarina. Os receptores podem incluir anticorpos para unidades desglicosiladas (e. g., anti-fluoresceína ou anti-cumarina). Em algumas formas de realização, combinações de múltiplas enzimas como HRP/AP podem ser utilizadas como uma enzima. Um substrato pode incluir fenol substituído fosforilado, e. g., fosfato de tirosina, que pode ser desfosforilado pela AP antes de reagir com a HRP para formar um produto de reacção capaz de ligar grupos fenólicos ou

receptores baseados em unidades ricas em electrões.

Um produto de reacção do substrato enzimático pode ser ainda capaz de proporcionar um sinal detectável. Em algumas formas de realização, os substratos enzimáticos utilizados nos métodos aqui divulgados podem incluir substratos não cromogénicos ou não quimioluminescentes, isto é, uma reacção da enzima e do substrato enzimático pode, ela própria, não produzir um sinal detectável. Os substratos enzimáticos utilizados nos métodos aqui divulgados podem incluir um gerador de sinal extrínscico (e. g., um fluoróforo) como um marcador. O gerador de sinal e o substrato enzimático podem ser ligados directamente (e. g., um substrato enzimático com um marcador fluorescente) ou indirectamente (e. g., através de um par conjugado ligando-receptor). Em algumas formas de realização, um substrato pode incluir grupos funcionais protegidos (e. g., grupos sulfidrílicos). Após ligação do substrato activado aos receptores, o grupo funcional pode ser desprotegido e efectuada a conjugação a um gerador de sinal, utilizando um gerador de sinal que tem um grupo tiol reactivo (e. g., maleimida ou iodoacetilo).

Em algumas formas de realização, uma sonda pode incluir peroxidase de rábano e o substrato é seleccionado de fenóis substituídos (e. g., tiramina). Em algumas formas de realização, a peroxidase de rábano provoca a ligação covalente do substrato fenólico activado a grupos fenólicos presentes na amostra ou num suporte sólido a que a amostra esteja ligada. Em algumas formas de realização, uma sonda pode incluir um ligante acoplado a HRP e um substrato pode incluir tiramina acoplada a um fluoróforo.

## Agentes Químicos

Um agente químico pode incluir um ou mais químicos capazes de modificar o gerador de sinal, a enzima ou o ligador clivável (se presente) entre o gerador de sinal e o ligante ou o substrato enzimático. Um agente químico pode ser colocado em contacto com a amostra na forma de um sólido, uma solução, um gel ou uma suspensão.

Em algumas formas de realização, um agente químico pode incluir agentes oxidantes, por exemplo, espécies activas de oxigénio, radicais hidroxilo, oxigénio singuleto, peróxido de hidrogénio ou ozono. Em algumas formas de realização, um agente químico pode incluir peróxido de hidrogénio, permanganato de potássio, dicromato de sódio, bromo aquoso, iodo-iodeto de potássio ou hidroperóxido de t-butilo.

Um ou mais dos agentes químicos acima mencionados podem ser utilizados nos métodos aqui divulgados, dependendo da susceptibilidade do gerador de sinal, da enzima, do ligante, do alvo ou da amostra biológica ao agente químico. Em algumas formas de realização, pode ser utilizado um agente químico que essencialmente não afecta a integridade do ligante, do alvo e da amostra biológica. Em algumas formas de realização, pode ser utilizado um agente químico que não afecta a especificidade de ligação entre o ligante e o alvo.

Em algumas formas de realização, em que dois ou mais (até quatro) geradores de sinal podem ser utilizados simultaneamente, um agente químico pode ser capaz de modificar selectivamente um ou mais geradores de sinal. A susceptibilidade de diferentes geradores de sinal a um agente químico pode depender, em parte, da concentração do gerador de sinal, temperatura ou pH. Por

exemplo, dois fluoróforos diferentes podem ter susceptibilidade diferente a um agente oxidante, dependendo da concentração do agente oxidante.

Em algumas formas de realização, um agente químico pode incluir essencialmente um agente oxidante. Noutras formas de realização, um agente químico pode essencialmente incluir uma solução básica de um agente oxidante. Em algumas formas de realização específicas, uma solução básica pode ter um pH na gama desde cerca de 8 até cerca de 10. Em algumas formas de realização, uma solução básica (e. g., bicarbonato de sódio) pode ter pH de cerca de 10.

Um agente oxidante adequado pode ser seleccionado de peróxido, periodato de sódio ou ozono. Em algumas formas de realização, um agente oxidante adequado pode incluir peróxido ou uma fonte de peróxido e a solução básica pode incluir peróxido de hidrogénio. A concentração de peróxido de hidrogénio na solução básica pode ser seleccionada para oxidar substancialmente o gerador de sinal fluorescente num período de tempo predeterminado. Em algumas formas de realização, a concentração de peróxido de hidrogénio na solução básica pode ser seleccionada para inactivar substancialmente o gerador de sinal fluorescente e a enzima num determinado período de tempo. A concentração de peróxido de hidrogénio na solução básica pode ser seleccionada de modo que a integridade da amostra, dos alvos, do ligante ou da especificidade alvo-ligante possa ser mantida.

Em algumas formas de realização, uma solução básica pode incluir peróxido de hidrogénio numa quantidade que seja numa gama desde cerca de 0,5 por cento em volume até cerca de 5 por cento em volume, numa gama desde cerca de 1 por cento em

volume até de cerca de 4 por cento em volume ou numa gama de cerca de 1,5 por cento em volume até cerca de 3,5 por cento em volume. Em algumas formas de realização específicas, uma solução básica pode incluir peróxido de hidrogénio numa quantidade que seja numa gama de cerca de 3 por cento em volume.

Em algumas formas de realização, a solução básica pode não incluir reagentes que removam os ligantes, os alvos ou ambos os ligantes e os alvos a partir da amostra, tais como agentes redutores ou agentes tensioactivos.

Análise Sequencial de uma Amostra Biológica, Colocação em Contacto e Ligação da Sonda

Uma amostra biológica pode ser colocada em contacto com uma sonda para ligar fisicamente a sonda a um alvo na amostra biológica. Em algumas formas de realização, um alvo pode não estar facilmente acessível para ligação da sonda e uma amostra biológica pode ser adicionalmente processada para facilitar a ligação entre o alvo e o ligante na sonda, por exemplo, através de recuperação de antigénio, digestão enzimática, recuperação de epitopo ou bloqueamento.

Em algumas formas de realização, uma sonda pode ser colocada em contacto com a amostra biológica na forma de uma solução. Em algumas formas de realização, uma sonda pode incluir um ligante acoplado a um marcador (gerador de sinal fluorescente ou uma enzima). O ligante e o marcador (gerador de sinal ou enzima) podem ser incorporizados numa única molécula e a solução da sonda podem ser aplicada num único passo. Alternativamente, o ligante e o marcador (gerador de sinal ou enzima) podem ser entidades distintas e a solução da sonda pode ser aplicada num único passo

ou múltiplos passos. Em todas as formas de realização, uma sonda de controlo pode ser ainda ligada a um ou mais alvos na amostra.

Dependendo da natureza do ligante, do alvo e da ligação entre os dois, pode ser permitido tempo suficiente de contacto. Em algumas formas de realização, pode ser utilizado um excesso de moléculas de sonda (e, desta forma, moléculas ligantes) para assegurar que todos os alvos na amostra biológica estão ligados. Após ter sido proporcionado um tempo suficiente para a acção de ligação, a amostra pode ser colocada em contacto com uma solução de lavagem (por exemplo, uma solução tampão apropriada) para remover quaisquer sondas não ligadas. Dependendo da concentração e do tipo de sonda utilizadas, uma amostra biológica pode ser submetida a uma variedade de passos de lavagem, sendo utilizadas soluções de lavagem iguais ou diferentes em cada passo.

Em algumas formas de realização, a amostra biológica pode ser colocada em contacto com mais do que uma sonda no primeiro passo de contacto. A pluralidade de sondas pode ser capaz de ligação a diferentes alvos na amostra biológica. Por exemplo, uma amostra biológica pode incluir dois alvos: alvo1 e alvo2 e podem ser utilizados dois conjuntos de sondas neste caso: sonda1 (sendo o ligante1 capaz de ligação ao alvo1) e sonda2 (sendo o ligante2 capaz de ligação ao alvo2). Uma pluralidade de sondas pode ser colocada em contacto com a amostra biológica simultaneamente (por exemplo, como uma única mistura) ou sequencialmente (por exemplo, uma sonda pode ser colocada em contacto com a amostra biológica, seguida por passo de lavagem, para remover qualquer sonda1 não ligada, seguida por colocação em contacto de uma sonda2 com a amostra biológica e assim por diante).

O número de sondas que podem ser simultaneamente ligadas ao alvo pode depender do tipo de detecção utilizado, isto é, a definição espectral realizável. Por exemplo, para geradores de sinal baseados em fluorescência, podem ser utilizadas quatro sondas diferentes (proporcionando quatro sinais fluorescentes espectralmente resolúveis) de acordo com os métodos divulgados. Espectralmente resolúveis, em referência a um pluralidade de geradores de sinal fluorescentes, indica que as bandas de emissão de fluorescência dos geradores de sinal são suficientemente distintos, isto é, suficientemente não sobrepostos, de modo que os ligantes, aos quais os respectivos geradores de sinal estão ligados, possam ser distinguidos com base no sinal fluorescente produzido pelos respectivos geradores de sinal, utilizando sistemas padrão de fotodetecção.

Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode ser essencialmente colocada em contacto com quatro ou menos sondas no primeiro passo de colocação em contacto. Em formas de realização que utilizam sondas baseadas em enzima, o número de sondas que podem ser simultaneamente ligadas ao alvo também pode depender do número de enzimas diferentes e dos seus substratos correspondentes disponíveis.

Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma célula inteira, uma amostra de tecido ou a amostra biológica pode estar aderida a uma micromatriz, um gel ou uma membrana. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma amostra de tecido. A amostra de tecido pode ser obtida através de uma variedade de processos incluindo, mas não limitados a, excisão, aspiração ou biopsia cirúrgica. O tecido pode ser fresco ou congelado. Em algumas formas de realização, a amostra de tecido pode ser fixa e impregnada em parafina. A amostra de tecido pode ser fixa ou, caso contrário, preservada

através de metodologia convencional; a escolha de um fixador pode ser determinada pelo objectivo para o qual o tecido é corado histologicamente ou, caso contrário, analisado. A duração da fixação pode depender do tamanho da amostra de tecido e do fixador utilizado. Por exemplo, pode ser utilizada formalina tamponada a pH neutro, solução de Bouin ou paraformaldeído, para fixar ou preservar uma amostra de tecido.

Em algumas formas de realização, a amostra de tecido pode ser primeiro fixa e depois desidratada com uma série crescente de álcoois, infiltrada e impregnada com parafina ou outros meios de seccionamento, de modo que a amostra de tecido possa ser seccionada. Numa forma de realização alternativa, uma amostra de tecido pode ser seccionada e subsequentemente fixa. Em algumas formas de realização, a amostra de tecido pode ser impregnada e processada em parafina. Os exemplos de parafina que podem ser utilizados incluem, mas não estão limitados a, Paraplast, Broloid e Tissuemay. Assim que a amostra de tecido está impregnada, a amostra pode ser seccionada por um micrótomo em secções que podem ter uma espessura numa gama desde cerca de três micrones até cerca de cinco micrones. Uma vez seccionadas, as secções podem ser ligadas a lâminas utilizando agentes de adesão. Os exemplos de agentes de adesão de lâmina podem incluir, mas não estão limitados a, silano, gelatina, poli-L-lisina. Em formas de realização, se for utilizada parafina como o material de impregnação, as secções de tecido podem ser desparafinizadas e reidratadas em água. As secções de tecido podem ser desparafinizadas, por exemplo, através de utilização de agentes orgânicos (tais como xilenos ou séries gradualmente decrescentes de álcoois).

Em algumas formas de realização, além dos processos de preparação da amostra discutidos acima, a secção de tecido pode



ser submetida a um tratamento adicional antes, durante ou depois da imuno-histoquímica. Por exemplo, em algumas formas de realização, a secção de tecido pode ser submetida a métodos de recuperação de epitopo, tal como aquecimento da amostra de tecido em tampão citrato. Em algumas formas de realização, uma secção de tecido pode ser opcionalmente submetida a um passo de bloqueamento para minimizar quaisquer ligações não específicas.

Em algumas formas de realização, a amostra biológica ou uma porção da amostra biológica, ou alvos presentes na amostra biológica, podem ser aderidos na superfície de micromatrizes de ADN, na superfície de micromatrizes de proteína ou na superfície de suportes sólidos (tais como géis, membranas de transferência, lâminas de vidro, esferas, ou placas de ELISA). Em algumas formas de realização, os alvos presentes na amostra biológica podem ser aderidos na superfície de suportes sólidos. Os alvos na amostra biológica podem ser aderidos no suporte sólido por formação de ligação física, por formação de ligação covalente, ou ambas.

Em algumas formas de realização, os alvos na amostra biológica podem ser aderidos a membranas e sondados sequencialmente utilizando métodos aqui divulgados. Em algumas formas de realização, os alvos na amostra biológica podem ser processados antes de contactarem a amostra com a membrana. Por exemplo, as formas de realização que envolvem métodos para sondar alvos proteicos numa amostra de tecido podem incluir o passo de extrair as proteínas alvo de uma amostra biológica de um homogenato de tecido ou um extracto. Os tecidos sólidos ou as células inteiras podem ser primeiro quebradas mecanicamente utilizando um liquidificador (para maiores volumes de amostra), utilizando um homogeneizador (volumes menores) ou por sonicação. Os diferentes compartimentos e organelos celulares podem ser

separados utilizando técnicas de filtração e centrifugação. Podem também ser utilizados detergentes, sais e tampões para ajudar a lise celular e para solubilizar proteínas. De um modo semelhante, as formas de realização que envolvem métodos para sondar ácidos nucleicos, podem incluir o passo de preparação de fragmentos de ADN ou ARN, por exemplo, utilizando endonucleases de restrição (para ADN).

Em algumas formas de realização, os alvos extraídos da amostra biológica podem ser ainda separados por electroforese em gel. A separação dos alvos pode ser por ponto isoeléctrico (pI), peso molecular, carga eléctrica ou uma combinação destes factores. A natureza da separação pode depender do tratamento da amostra e da natureza do gel. Um gel adequado pode ser seleccionado de um gel de poliacrilamida, um gel de SDS-poliacrilamida ou um gel de agarose.

Uma membrana adequada pode ser seleccionada de modo que a membrana tenha propriedades não específicas de ligação ao alvo. Em algumas formas de realização, uma membrana adequada pode ser seleccionada de uma membrana de fluoreto de polivinilideno, uma membrana de nitrocelulose ou uma membrana de nylon. Em algumas formas de realização, uma membrana adequada pode ser seleccionada de modo que a membrana possa ser substancialmente estável para múltiplas sondagens. Em formas de realização que envolvem sondar os alvos utilizando sondas proteicas, as membranas podem ser bloqueadas utilizando uma solução de bloqueamento para evitar a ligação não específica de sondas proteicas às membranas. Em formas de realização que envolvem a sondagem de fragmentos de ADN, o gel de ADN pode ser tratado com uma solução diluída de HCl ou uma solução alcalina para facilitar a transferência mais eficiente de ADN do gel para a membrana.

Em algumas formas de realização, a membrana pode ser submetida a temperaturas numa gama de cerca de 60 °C até cerca de 100 °C para ligar covalentemente os alvos à membrana, por exemplo, alvos de ADN a uma membrana de nitrocelulose. Em algumas formas de realização, a membrana pode ser exposta a radiação ultravioleta para ligar covalentemente os alvos à membrana, por exemplo, alvos de ADN a uma membrana de nylon. Em algumas formas de realização, os alvos na amostra biológica podem não ser separados por electroforese antes da transferência para uma membrana e podem ser sondados directamente numa membrana, por exemplo, através de técnicas de transferência por gota.

Após a preparação da amostra de tecido ou a membrana, uma solução de sonda (e. g., solução marcada com anticorpo) pode ser colocada em contacto com a secção de tecido ou a membrana durante um período do tempo suficiente e sob condições adequadas para ligação do ligante ao alvo (e. g., antigénio). Como anteriormente descrito, podem ser utilizados dois métodos de detecção: directo ou indirecto. Numa detecção directa, um anticorpo primário marcado com gerador de sinal (e. g., anticorpo primário marcado com fluoróforo ou anticorpo primário marcado com enzima) pode ser incubado com um antigénio na amostra de tecido ou na membrana que pode ser visualizado sem interacção adicional de anticorpo. Numa detecção indirecta, um anticorpo primário não conjugado pode ser incubado com um antigénio e depois um anticorpo secundário marcado, pode-se ligar ao anticorpo primário. Pode ocorrer amplificação de sinal uma vez que diversos anticorpos secundários podem reagir com diferentes epitopos no anticorpo primário. Em algumas formas de realização, dois ou mais (no máximo quatro) anticorpos primários (marcados ou não marcados) podem ser colocados em contacto com a

amostra de tecido. Os anticorpos não marcados podem ser depois colocados em contacto com os correspondentes anticorpos secundários marcados. Em formas de realização alternativas, podem ser utilizados um anticorpo primário e pares ligando-receptor de ligação específica (tais como biotina-estreptavidina). O anticorpo primário pode ser ligado a um elemento do par (por exemplo, biotina) e o outro elemento (por exemplo, estreptavidina) pode ser marcado com um gerador de sinal ou uma enzima. O anticorpo secundário, avidina, estreptavidina ou biotina podem ser, cada, marcados independentemente com um gerador de sinal ou uma enzima.

Em formas de realização em que o anticorpo primário ou o anticorpo secundário podem ser conjugados a um marcador enzimático, pode ser adicionado um substrato acoplado a gerador de sinal fluorescente para proporcionar visualização do antigénio. Em algumas formas de realização, o substrato e o gerador de sinal fluorescente podem ser incorporizados numa única molécula e podem ser aplicados num único passo. Noutras formas de realização, o substrato e o gerador de sinal fluorescente podem ser entidades distintas e podem ser aplicados num único passo ou múltiplos passos.

Uma enzima acoplada ao ligante pode reagir com o substrato para catalizar uma reacção química do substrato para ligar covalentemente o substrato acoplado ao gerador de sinal fluorescente, a amostra biológica ou o suporte sólido ao qual a amostra esteja ligada. Em algumas formas de realização, uma enzima pode incluir peroxidase de rábano e o substrato pode incluir tiramina. A reacção da peroxidase de rábano (HRP) com o substrato de tiramina pode causar a ligação covalente do substrato de tiramina a grupos fenólicos presentes na amostra ou a um suporte sólido ao qual a amostra esteja ligada. Em formas

de realização que utilizam conjugados enzima-substrato, a amplificação de sinal pode ser alcançada uma vez que uma enzima pode catalizar múltiplas moléculas de substrato. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ser utilizados para detectar alvos de baixa abundância utilizando métodos de detecção indirecta (e. g., utilizando anticorpos primários-secundários), utilizando métodos de amplificação de sinal de HRP-tiramida, ou combinações de ambos (e. g., métodos indirectos de amplificação de sinal de HRP-tiramida). A incorporação de técnicas de amplificação de sinal nos métodos aqui divulgados e correspondentemente o tipo de técnicas de amplificação de sinal incorporadas, pode depender da sensibilidade requerida para um alvo particular e do número de passos envolvidos no protocolo.

#### Observação de um Sinal a partir da Sonda

Um sinal a partir do gerador de sinal pode ser detectado utilizando um sistema de detecção. A natureza do sistema de detecção utilizado pode depender da natureza dos geradores de sinal utilizados. O sistema de detecção pode incluir um sistema de detecção de ressonância electrónica de spin (ESR), um sistema de detecção de dispositivo acoplado de carga (CCD) (e. g., para radioisótopos), um sistema de detecção de fluorescência, um sistema de detecção eléctrico, um sistema de detecção de filme fotográfico, um sistema de detecção quimioluminescente, um sistema de detecção enzimático, um sistema de detecção de microscopia de força atómica (AFM) (para a detecção de microesferas), um sistema de detecção de microscopia de túnel de varrimento (STM) (para a detecção de microesferas), um sistema de detecção óptica, um sistema de detecção de campo próximo ou um sistema de detecção de reflexão interna total (TIR).

Uma ou mais das técnicas acima mencionadas podem ser utilizadas para observar uma ou mais características de um sinal a partir de um gerador de sinal (acoplado com um ligante ou acoplado com um substrato enzimático). Em algumas formas de realização, a intensidade do sinal, comprimento de onda do sinal, posição do sinal, frequência do sinal ou deslocamento do sinal, podem ser determinados utilizando uma ou mais das técnicas acima mencionadas. Em algumas formas de realização, uma ou mais características acima mencionadas do sinal podem ser observadas, medidas e registadas.

Em algumas formas de realização, um gerador de sinal (acoplado com um ligante ou acoplado com um substrato enzimático) pode incluir um fluoróforo e o comprimento de onda de fluorescência ou a intensidade de fluorescência podem ser determinados utilizando um sistema de detecção de fluorescência. Em algumas formas de realização, um sinal pode ser observado *in situ*, isto é, um sinal pode ser observado directamente a partir do gerador de sinal associado através do ligante ao alvo na amostra biológica. Em algumas formas de realização, um sinal a partir do gerador de sinal pode ser analisado na amostra biológica, obviando a necessidade de sistemas de detecção separados baseados em matriz.

Em algumas formas de realização, a observação de um sinal pode incluir a captura de uma imagem da amostra biológica. Em algumas formas de realização, pode ser utilizado um microscópio ligado a um dispositivo de captura de imagem, como um sistema de detecção, de acordo com os métodos aqui divulgados. Em algumas formas de realização, um gerador de sinal (tal como fluoróforo) pode ser excitado e o sinal (tal como o sinal de fluorescência) obtido pode ser observado e registado na forma de um sinal

digital (por exemplo, uma imagem digitalizada). O mesmo processo pode ser repetido para diferentes geradores de sinal (se presentes) que estão ligados na amostra, utilizando os filtros de fluorescência apropriados.

#### Aplicação de um Agente Químico para Modificar o Sinal

Um agente químico pode ser aplicado à amostra para modificar o sinal. Em algumas formas de realização, a modificação de sinal pode incluir uma ou mais de uma alteração na característica do sinal, por exemplo, uma diminuição na intensidade do sinal, um deslocamento no pico do sinal, uma alteração na frequência de ressonância ou clivagem (remoção) do gerador de sinal resultando na remoção do sinal. Em algumas formas de realização, um agente químico pode ser aplicado para modificar o sinal por inativação substancial do gerador de sinal fluorescente e da enzima (se utilizada). Em algumas formas de realização, um agente químico pode incluir um agente oxidante que pode substancialmente oxidar o gerador de sinal fluorescente. Em algumas formas de realização, um agente químico pode ser aplicado para modificar o sinal por oxidação substancial da ligação clivável para remover o gerador de sinal por clivagem.

Em algumas formas de realização, um agente químico pode estar na forma de uma solução e a amostra pode ser colocada em contacto com a solução de agente químico durante uma quantidade de tempo predeterminada. Em algumas formas de realização, um agente químico pode ser uma solução básica que tem um agente oxidante. A concentração da solução básica e o tempo de contacto pode ser o dependente do tipo de modificação de sinal desejado. Em algumas formas de realização, uma solução de agente químico pode ser colocada em contacto com a amostra e o passo de

oxidação pode ser realizado durante menos de 30 minutos. Em algumas formas de realização, o passo de oxidação pode ser realizado durante menos de 15 minutos. Em algumas formas de realização, o passo de oxidação pode ser realizado durante cerca de 30 segundos a cerca de 15 minutos. Em algumas formas de realização, o passo de oxidação pode ser realizado durante cerca de 5 minutos. Em algumas formas de realização, o passo de oxidação pode ser realizado à temperatura ambiente.

Em algumas formas de realização, as condições de contacto para o agente químico podem ser seleccionadas de modo que o ligante, o alvo, a amostra biológica e a ligação entre o ligante e o alvo possam não ser afectadas. Em algumas formas de realização, um agente químico pode afectar apenas o gerador de sinal e a enzima (se utilizada) e o agente oxidante pode não afectar a ligação de alvo/ligante ou a integridade do ligante. Assim, a título de exemplo, um ligante pode incluir um anticorpo primário ou uma combinação de anticorpo primário/secundário. Um agente oxidante, de acordo com os métodos aqui divulgados, pode afectar apenas o gerador de sinal, e o anticorpo primário ou a combinação de anticorpo primário/anticorpo secundário pode permanecer essencialmente não afectado. Em algumas formas de realização, um ligante (tais como um anticorpo primário ou uma combinação de anticorpo primário/anticorpo secundário) pode permanecer ligado ao alvo na amostra biológica, após contacto da amostra com o agente oxidante.

Em algumas formas de realização, um ligante pode permanecer ligado ao alvo na amostra biológica após ter contactado a amostra com o agente oxidante e a integridade do ligante pode permanecer essencialmente não afectada (por exemplo, um anticorpo pode não substancialmente desnaturar ou eluir na presença de um agente químico). Em algumas formas de realização,



após aplicação do agente oxidante à amostra, menos de 25 por cento dos ligantes podem ser removidos dos alvos na amostra biológica. Em algumas formas de realização, após aplicação do agente oxidante à amostra, menos de 20 por cento, menos de 15 por cento, menos de 10 por cento ou menos de 5 por cento dos ligantes podem ser removidos dos alvos na amostra biológica.

Em algumas formas de realização, pode ser observada uma característica do sinal após contacto da amostra com um agente oxidante, para determinar a eficácia da modificação de sinal. Por exemplo, uma cor pode ser observada antes de aplicação do agente oxidante e a cor pode estar ausente após aplicação do agente oxidante. Num outro exemplo, a intensidade de fluorescência a partir de um gerador de sinal fluorescente pode ser observada antes do contacto com o agente oxidante e após contacto com o agente oxidante. Em algumas formas de realização, uma diminuição na intensidade do sinal por uma quantidade predeterminada pode ser referida como uma modificação de sinal. Em algumas formas de realização, a modificação de sinal pode-se referir a uma diminuição na intensidade do sinal por uma quantidade numa gama maior que cerca de 50 por cento. Em algumas formas de realização, a modificação de sinal pode-se referir a uma diminuição na intensidade do sinal por uma quantidade numa gama maior do que cerca de 60 por cento. Em algumas formas de realização, a modificação de sinal pode-se referir a uma diminuição na intensidade do sinal por uma quantidade numa gama maior do que cerca de 80 por cento.

## Colocação em Contacto da Amostra com uma Sonda Subsequente e Ligação a um Alvo Subsequente

A amostra biológica ou a amostra ligada a um suporte sólido pode ser colocada em contacto com uma sonda subsequente utilizando um ou mais processos aqui descritos acima para a primeira sonda. A sonda subsequente pode ser capaz de ligar alvos diferentes do alvo ligado nos passos anteriores. Em formas de realização em que uma pluralidade de sondas pode ser colocada em contacto com a amostra biológica nos passos de contacto da sonda anterior, a sonda subsequente pode ser capaz de ligar um alvo diferente dos alvos ligados pelo conjunto anterior de sondas. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode ser colocada em contacto com uma pluralidade de sondas no passo subsequente de contacto da sonda. Em formas de realização em que podem ser utilizados ligantes acoplados a enzimas como sondas, os passos de ligação podem ainda incluir passos reaccionais envolvendo reacção da enzima com um substrato enzimático acoplado ao gerador de sinal fluorescente.

Em algumas formas de realização, o gerador de sinal (e. g., um gerador de sinal fluorescente) utilizado nos diferentes passos de ligação pode ser o mesmo, isto é, detectável no mesmo canal de detecção. Os métodos que utilizam o mesmo gerador de sinal em diferentes passos de ligação podem permitir a detecção de múltiplos alvos quando está disponível um número limitado de canais de detecção. Em algumas formas de realização, em que pode ser utilizado um conjunto de sondas (2 a 4 sondas) no primeiro passo de ligação, as sondas subseqüentes podem incluir os mesmos geradores de sinal que nos passos anteriores de ligação. Por exemplo, um primeiro passo de ligação pode incluir diferentes ligantes conjugados com Cy3, Cy5 e Cy7. Em algumas formas de realização, os passos subseqüentes de ligação podem também

incluir o mesmo conjunto de corantes, isto é, Cy3, Cy5 e Cy7.

Em algumas formas de realização, o gerador de sinal (e. g., um gerador de sinal fluorescente) utilizado nos diferentes passos de ligação pode ser diferente, isto é, independentemente detectável nos diferentes canais de detecção. Por exemplo, em algumas formas de realização, uma primeira sonda pode incluir uma corante Cy3, que tem um comprimento de onda de emissão fluorescente na região verde e uma sonda subsequente pode incluir um corante Cy7 que tem um comprimento de onda de emissão fluorescente na região vermelha.

Em formas de realização que utilizam enzimas acopladas a ligante como sondas, as enzimas e os substratos utilizados nos diferentes passos de ligação e reacção podem ser os mesmos. Um agente oxidante pode inactivar a enzima anterior antes de ligar a amostra a uma enzima subsequente, para prevenir reacção cruzada da enzima anterior com o substrato subsequente. Por exemplo, um primeiro passo de ligação e reacção pode incluir ligante acoplado a HRP e tiramina acoplada a um primeiro fluoróforo. O passo de oxidação pode envolver os passos de oxidar substancialmente o fluoróforo e inactivar substancialmente a HRP. Em algumas formas de realização, os passos de oxidação e inactivação podem ocorrer simultaneamente. Em algumas formas de realização, os passos de oxidação e inactivação podem ocorrer sequencialmente. Após os passos de oxidação e inactivação, a amostra pode ser colocada em contacto com um subsequente ligante acoplado a HRP, que pode ser ainda feita reagir com tiramina acoplada a um segundo fluoróforo. De um modo semelhante, os passos subsequentes de ligação e reacção podem ser realizados utilizando múltiplas iterações de HRP-tiramina como conjugados enzima substrato, cada passo de ligação e reacção seguido pelo passo de oxidação e inactivação. O

primeiro fluoróforo e os fluoróforos subsequentes podem ser iguais ou diferentes dependendo do número de canais de detecção disponíveis para detecção.

Em algumas formas de realização, o primeiro passo de ligação pode incluir um conjunto de sondas (e. g., 2 a 4 sondas), cada sonda incluindo um ligante capaz de ligação a um alvo diferente e cada enzima capaz de catalizar uma reacção química de um substrato diferente. Por exemplo, numa forma de realização, o primeiro conjunto de sonda pode incluir um ligante<sub>1</sub> acoplado a HRP e um ligante<sub>2</sub> acoplado a AP. O passo de reacção pode incluir colocar a amostra em contacto com tiramina acoplada a Cy3 e NADP acoplado a Cy7. Após reacção das enzimas com os seus substratos correspondentes e observação dos sinais, os corantes de cianina podem ser oxidados e as enzimas inactivadas por adição de um agente oxidante adequado. Os passos subsequentes de sondagem podem incluir o mesmo conjunto de pares ligante-enzima e substrato-fluoróforo ou diferentes conjuntos de pares ligante-enzima e substrato-fluoróforo. A pluralidade de sondas e o substrato-gerador de signal podem ser colocados em contacto com a amostra biológica simultaneamente (por exemplo, como uma única mistura) ou sequencialmente (por exemplo, uma sonda<sub>1</sub> pode ser colocada em contacto com a amostra biológica, seguida pelo passo de lavagem para remover qualquer sonda<sub>1</sub> não ligada, seguida pela colocação de uma sonda<sub>2</sub> em contacto com a amostra biológica e assim por diante).

Observação de um Sinal Subsequente a partir de uma Sonda Subsequente.

Um ou mais métodos de detecção, aqui descritos acima, podem ser utilizados para observar uma ou mais características de um

sinal subsequente (e. g., segundo, terceiro, etc.) a partir de um gerador de sinal subsequente (presente na sonda subsequente). Em algumas formas de realização, a intensidade de sinal, comprimento de onda do sinal, posição do sinal, frequência do sinal ou deslocamento do sinal podem ser determinados utilizando uma ou mais das técnicas acima mencionadas. Semelhante ao primeiro sinal, um sinal subsequente obtido (por exemplo, um sinal de fluorescência) pode ser registado na forma de um sinal digital (por exemplo, uma imagem digitalizada). Em algumas formas de realização, a observação de um sinal subsequente pode também incluir a captura de uma imagem óptica da amostra biológica.

#### Reiteração dos Passos de Colocação em Contacto, Ligação e Observação

Em algumas formas de realização, após colocar a amostra em contacto com uma sonda subsequente (e. g., segunda, terceira, etc.), a oxidação do gerador de sinal e a subsequente administração de sonda podem ser repetidas múltiplas vezes. Em algumas formas de realização, após observação de um segundo sinal a partir da segunda sonda, a amostra biológica pode ser colocada em contacto com um agente oxidante para modificar o sinal da segunda sonda. Além disso, uma terceira sonda pode ser colocada em contacto com a amostra biológica, em que a terceira sonda pode ser capaz de ligação a um alvo diferente da primeira e segunda sondas. Do mesmo modo, um sinal da terceira sonda pode ser observado seguido por aplicação de agente oxidante para modificar o sinal. Os passos de ligação, observação e oxidação podem ser repetidos iterativamente múltiplas vezes, utilizando uma n-ésima sonda capaz de ligação a alvos adicionais para proporcionar ao utilizador informação sobre uma variedade de

alvos, utilizando uma variedade de sondas e/ou geradores de sinal. Em formas de realização em que podem ser utilizados ligantes acoplados a enzimas como sondas, os passos de ligação podem ainda incluir passos reaccionais que envolvem reacção da enzima com um substrato enzimático acoplado ao gerador de sinal fluorescente. Em algumas formas de realização, os passos de oxidação, ligação, reacção (se aplicável) e observação podem ser repetidos uma ou mais vezes. Em algumas formas de realização, os passos de oxidação, ligação, reacção (se aplicável) e observação podem ser repetidos, pelo menos, 5, pelo menos 10 ou, pelo menos, 20 vezes.

Em algumas formas de realização, uma série de sondas pode ser colocada em contacto com a amostra biológica de um modo sequencial para obter uma análise multiplexada da amostra biológica. Em algumas formas de realização, uma série de conjuntos de sonda (incluindo no máximo 4 sondas num conjunto) podem ser colocados em contacto com a amostra biológica, de um modo sequencial, para obter uma análise multiplexada da amostra biológica. A análise multiplexada refere-se genericamente à análise de múltiplos alvos numa amostra biológica utilizando o mesmo mecanismo de detecção.

Colocação em Contacto da Amostra com um ou mais Corantes Morfológicos

Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode incluir uma célula ou um tecido, e a amostra pode ser colocada em contacto com um corante morfológico antes, durante ou após o passo de contacto com a primeira sonda ou com a sonda subsequente. Um corante morfológico pode incluir um pigmento que pode corar diferentes componentes celulares, de modo a facilitar

a identificação do tipo de célula ou do estado da doença. Em algumas formas de realização, a corante morfológico pode ser prontamente distinguido dos geradores de sinal nas sondas, isto é, o corante não pode emitir sinal que possa sobrepor-se ao sinal da sonda. Por exemplo, para um corante morfológico fluorescente, o sinal do corante morfológico não pode auto-fluorescer no mesmo comprimento de onda que os fluoróforos utilizados nas sondas.

Um corante morfológico pode ser colocado em contacto com a amostra biológica antes, durante ou após qualquer um dos passos acima mencionados. Em algumas formas de realização, um corante morfológico pode ser colocado em contacto com a amostra biológica juntamente com o passo de contacto da primeira sonda. Em algumas formas de realização, um corante morfológico pode ser colocado em contacto com a amostra biológica antes de colocar a amostra em contacto com um agente químico e após ligar fisicamente a primeira sonda ao alvo. Em algumas formas de realização, um corante morfológico pode ser colocado em contacto com uma amostra biológica após se ter colocado a amostra em contacto com um agente químico e se ter modificado o sinal. Em algumas formas de realização, um corante morfológico pode ser colocado em contacto com uma amostra biológica juntamente com o passo de colocar em contacto a segunda sonda. Em algumas formas de realização, uma amostra biológica pode ser colocada em contacto com o corante morfológico após ligação da segunda sonda ao alvo. Em algumas formas de realização em que os corantes morfológicos podem resultar em ruído de fundo para o sinal fluorescente do gerador de sinal, os corantes morfológicos podem ser colocados em contacto com a amostra biológica após os passos de sondar, oxidar e sondar de novo. Por exemplo, corantes morfológicos como H&E podem ser sequencialmente representados por imagem e registados após os métodos aqui divulgados.

Em algumas formas de realização, podem ser utilizados cromóforos, fluoróforos ou enzimas/substratos enzimáticos como corantes morfológicos. Os exemplos adequados de cromóforos que podem ser utilizados como corantes morfológicos (e as suas células, compartimentos subcelulares ou componentes celulares alvo) podem incluir, mas não estão limitados a, Eosina (componentes celulares alcalinos, citoplasma), Hematoxilina (ácidos nucleicos), Laranja G (glóbulos vermelhos, células pancreáticas e hipofisárias), Verde-claro SF (colagénio), Romanowsky-Giemsa (morfologia celular global), May-Grunwald (células sanguíneas), Contra-corante Azul (Trevigen), Verde Etilo (CAS) (amilóide), Amarelo S Feulgen-Naftol (ADN), Giemsa (cora diferencialmente vários compartimentos celulares), Verde Metilo (amilóide), pironina (ácidos nucleicos), Naftol-Amarelo (glóbulos vermelhos), Vermelho Neutro (núcleos), corante Papanicolaou (uma mistura de Hematoxilina, Eosina Y, Laranja G e mistura de Castanho Bismarck (morfologia celular global)), Contra-corante Vermelho B (Trevigen), Contra-corante Vermelho C (Trevigen), Vermelho da Síria (amilóide), reagente de Feulgen (pararosanilina) (ADN), cromo-alúmen de Galocianina (ADN), cromo-alúmen de Galocianina e Amarelo S naftol (ADN), Verde Metilo-Pironina Y (ADN), Tionina-reagente de Feulgen (ADN), Laranja Acridina (ADN), Azul de Metileno (ARN e ADN), Azul de Toluidina (ARN e ADN), Azul Alciano (hidratos de carbono), Vermelho Ruténio (hidratos de carbono), Preto do Sudão (lípidos), Sudão IV (lípidos), óleo de Vermelho-O (lípidos), corante tricromático de Van Gieson (mistura de ácido fucsínico e ácido pícrico) (células musculares), corante tricromático de Masson (mistura de hematoxilina, ácido fucsínico e Verde-Claro) (cora diferencialmente colagénio, citoplasma, nucléolos), Aldeído de Fucsina (fibras de elastina) ou corante de Weigert (diferencia fibras reticulares e colagénias).



Os exemplos de corantes morfológicos fluorescentes adequados (e as suas células, compartimentos subcelulares ou componentes celulares alvo, se aplicável) podem incluir, mas não estão limitados a: 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (ácidos nucleicos), Eosina (componentes celulares alcalinos, citoplasma), Hoechst 33258 e Hoechst 33342 (duas bisbenzimidazóis) (ácidos nucleicos), Iodeto de propídio (ácidos nucleicos), Laranja Espectral (ácidos nucleicos), Verde Espectral (ácidos nucleicos), Quinacrina (ácidos nucleicos), fluoresceína-faloidina (fibras de actina), Cromomicina A3 (ácidos nucleicos), reacção de Acriflavina-Feulgen (ácido nucleico), reacção de Auramina O-Feulgen (ácidos nucleicos) Brometo de etídio (ácidos nucleicos), corantes Nissl (neurónios), fluoróforos de ADN de elevada afinidade, tais como POPO, BOBO, YOYO e TOTO e outros, e Proteína Verde Fluorescente fundida com proteínas de ligação a ADN (e. g., histonas), ACMA, Quinacrina e Laranja Acridina.

Os exemplos de enzimas adequadas (e as suas posições ou actividades celulares primárias) podem incluir, mas não estão limitadas a, ATPases (fibras musculares), succinato desidrogenase (mitocôndria), citocromo c oxidases (mitocôndria), fosforilases (mitocôndria), fosfofrutocinases (mitocôndria), acetil colinasterases (células nervosas), lactases (intestino delgado), fosfatases ácidas (lisossomas), leucina aminopeptidases (células hepáticas), desidrogenases (mitocôndria), miodenilato desaminases (célula muscular), NADH diaforases (eritrócitos) e sacarases (intestino delgado).

Em algumas formas de realização, um corante morfológico pode ser estável para um agente oxidante, isto é, as propriedades geradoras de sinal do corante morfológico podem não ser

substancialmente afectadas pelo agente oxidante. Em algumas formas de realização, em que uma amostra biológica pode ser corada com uma sonda e um corante morfológico ao mesmo tempo, a aplicação do agente oxidante para modificar o sinal da sonda pode não modificar o sinal do corante morfológico. Em algumas formas de realização, um corante morfológico pode ser utilizado como um controlo para co-registar a informação molecular (obtida através dos passos iterativos de sondagem) e a informação morfológica (obtida através dos corantes morfológicos).

#### Colocar em Contacto a Amostra com uma ou mais Sondas de Controlo

Em algumas formas de realização, uma sonda de controlo pode ser ligada a um ou mais alvos na amostra biológica. Em algumas formas de realização, uma sonda de controlo pode ser ligada aos alvos conjuntamente com o passo de contacto da primeira sonda. Em algumas formas de realização, uma sonda de controlo pode ser aplicada à amostra biológica simultaneamente com a primeira sonda. Em algumas formas de realização, uma sonda de controlo pode ser aplicada à amostra biológica sequencialmente, isto é, antes ou depois da aplicação da primeira sonda, mas antes da aplicação do agente oxidante.

Uma sonda de controlo pode incluir um gerador de sinal que é estável para um agente oxidante ou as propriedades geradoras de sinal do gerador de sinal não são substancialmente afectadas quando colocadas em contacto com o agente oxidante. Um gerador de sinal pode incluir um radioisótopo que seja estável ao agente oxidante ou um fluoróforo que seja estável ao agente oxidante. Um radioisótopo adequado pode incluir  $P^{32}$  ou  $H^3$ ,  $^{14}C$ ,  $^{125}I$  ou  $^{131}I$ . Um fluoróforo adequado pode incluir DAPI.

Em algumas formas de realização, um gerador de sinal adequado pode ser acoplado a um ligante para formar uma sonda de controlo. Por exemplo, um marcador radioactivo pode ser acoplado a um anticorpo para formar uma sonda de controlo e o anticorpo pode-se ligar a um ou mais antigénios alvo presentes na amostra biológica. Noutras formas de realização, um gerador de sinal adequado pode ser capaz de ligar um ou mais alvos na amostra e também proporcionar um sinal detectável que é estável na presença do agente oxidante. Por exemplo, uma sonda de controlo adequada pode ser DAPI que é capaz de ligar a ácidos nucleicos na amostra e também capaz de proporcionar um sinal fluorescente que é estável ao agente oxidante.

Em algumas formas de realização, uma sonda de controlo pode ser utilizada nos métodos aqui divulgados para proporcionar uma indicação da estabilidade dos alvos aos passos iterativos de coloração. Por exemplo, uma sonda de controlo pode ser ligada a um alvo conhecido na amostra e um sinal do controlo observado e quantificado. O sinal de controlo pode ser depois monitorizado durante os passos iterativos de coloração, para proporcionar uma indicação da estabilidade dos alvos ou ligantes aos agentes oxidantes. Em algumas formas de realização, uma medida quantitativa (por exemplo, intensidade de sinal) do sinal de controlo pode ser monitorizada para quantificar a quantidade de alvos presentes na amostra após os passos iterativos de sondagem.

Em algumas formas de realização, uma sonda de controlo pode ser utilizada para obter informação quantitativa da amostra de interesse, por exemplo, a concentração dos alvos na amostra ou o peso molecular dos alvos na amostra. Por exemplo, um alvo de controlo (tendo concentração conhecida ou peso molecular

conhecido) pode ser carregado conjuntamente com a amostra de interesse numa técnica de transferência. Uma sonda de controlo pode ser ligada ao alvo de controlo e um sinal de controlo observado. O sinal de controlo pode ser depois correlacionado com os sinais observados a partir da amostra de interesse, utilizando os métodos aqui descritos abaixo.

Em algumas formas de realização, uma sonda de controlo pode ser utilizada nos métodos aqui divulgados para proporcionar o co-registo de múltipla informação molecular (obtida através dos passos iterativos de sondagem) e informação morfológica (obtida, e. g., utilizando DAPI). Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem incluir o co-registo de múltiplas imagens fluorescentes com as imagens morfológicas de campo claro obtidas, e. g., utilizando H&E. Em algumas formas de realização, as sondas utilizadas nos passos iterativos de sondagem podem não ter qualquer informação compartimental comum que possa ser utilizada para registar as imagens de H&E. Uma sonda de controlo, como um corante nuclear DAPI, pode ser utilizada para co-registar o núcleo corado com hematoxilina nas imagens de campo claro com as imagens fluorescentes. As imagens fluorescentes e as imagens de campo claro podem ser co-registadas utilizando algoritmos de registo de imagem que podem ser agrupados em duas categorias: técnicas baseadas em intensidade e baseadas em característica.

#### Correlação do Primeiro Sinal e dos Sinais Subsequentes

Em algumas formas de realização, um primeiro sinal, um subsequente sinal ou o primeiro sinal e os subsequentes sinais, podem ser analisados para obter informação relativamente à amostra biológica. Por exemplo, em algumas formas de realização,

uma presença ou ausência de um primeiro sinal pode indicar a presença ou ausência do primeiro alvo (capaz de ligação ao primeiro ligante) na amostra biológica. De um modo semelhante, a presença ou ausência de um segundo sinal pode indicar a presença ou ausência do segundo alvo (capaz de ligação ao segundo ligante na amostra biológica). Em formas de realização em que podem ser analisados alvos múltiplos utilizando uma pluralidade de sondas, a presença ou ausência de um sinal particular pode indicar a presença ou ausência do correspondente alvo na amostra biológica.

Em algumas formas de realização, os passos de observação podem incluir uma medida quantitativa de, pelo menos, um alvo na amostra. Em algumas formas de realização, um valor de intensidade de um sinal (por exemplo, intensidade de fluorescência) pode ser medido e pode ser correlacionado com a quantidade de alvo na amostra biológica. Uma correlação entre a quantidade de alvo e a intensidade do sinal pode ser determinada utilizando padrões de calibração. Em alguma forma de realização, os valores de intensidade dos primeiro e segundo sinais podem ser medidos e correlacionados com as respectivas quantidades do alvo. Em algumas formas de realização, através da comparação das duas intensidades do sinal, podem ser verificadas as quantidades relativas do primeiro alvo e do segundo alvo (relativamente um ao outro ou relativamente a um controlo). De um modo semelhante, nos casos em que podem ser analisados alvos múltiplos utilizando sondas múltiplas, podem ser determinadas as quantidades relativas de alvos diferentes na amostra biológica, por medição de diferentes intensidades do sinal. Em algumas formas de realização, uma ou mais amostras de controlo podem ser utilizadas, como aqui descrito acima. Por observação de uma presença ou ausência de um sinal nas amostras (amostra biológica de interesse versus um controlo), pode ser obtida informação

relativamente à amostra biológica. Por exemplo, através da comparação de uma amostra de tecido doente *versus* uma amostra normal, pode ser obtida informação relativamente aos alvos presentes na amostra de tecido doente. De um modo semelhante, através da comparação de intensidades do sinal entre as amostras (*i. e.*, amostra de interesse e um ou mais controlos), pode ser obtida informação relativamente à expressão de alvos na amostra.

Em algumas formas de realização, pode ser observada uma posição do sinal na amostra biológica. Em algumas formas de realização, pode ser observada uma localização do sinal, no sinal biológico, utilizando corantes morfológicos. Em algumas formas de realização, podem ser observadas posições relativas de dois ou mais sinais. Uma posição do sinal pode ser correlacionada com uma posição do alvo na amostra biológica, proporcionando informação relativamente à localização de alvos diferentes na amostra biológica. Em algumas formas de realização, um valor de intensidade do sinal e uma posição do sinal podem ser correlacionados para obter informação relativamente à localização de alvos diferentes na amostra biológica. Por exemplo, determinados alvos podem ser expressos mais no citoplasma relativamente ao núcleo, ou vice-versa. Em algumas formas de realização, a informação relativamente à localização relativa de alvos pode ser obtida por comparação de valores de posição e intensidade de dois ou mais sinais.

Em formas de realização que utilizam técnicas de transferência, os passos de observação podem incluir a observação de uma posição do sinal na transferência. A posição do sinal na transferência pode ser depois correlacionada com os padrões de calibração carregados conjuntamente com a amostra no gel, para obter a informação relativamente ao peso molecular dos alvos nas diferentes pistas. Em algumas formas de realização,

uma posição do sinal na transferência pode ser correlacionada com um peso molecular do alvo e o ponto isoelétrico do alvo, e. g., em 2D-PAGE. Em algumas formas de realização, proteínas estruturais, tais como actina ou tubulina, podem ser sondadas utilizando sondas de controlo em transferências de Western, para quantificar a quantidade de alvos na amostra.

Em algumas formas de realização, um ou mais dos passos de observação ou correlação podem ser realizados utilizando meios auxiliados por computador. Em formas de realização em que o sinal ou sinais do gerador de sinal podem ser armazenados na forma de imagem ou imagens digitais, pode ser conduzida análise auxiliada por computador da(s) imagem(s). Em algumas formas de realização, as imagens (e. g., sinais a partir da(s) sonda(s) e dos corantes morfológicos) podem ser sobrepostas utilizando superimposição auxiliada por computador para obter informação completa da amostra biológica, por exemplo, informação topológica e de correlação.

Em algumas formas de realização, um ou mais dos acima mencionados podem ser automatizados e podem ser realizados utilizando sistemas automatizados. Em algumas formas de realização, todos os passos podem ser realizados utilizando sistemas automatizados.

Os métodos aqui divulgados podem ter aplicações analíticas, de diagnóstico e terapêuticas, em biologia e medicina. Em algumas formas de realização, os métodos aqui divulgados podem ter aplicação em histoquímica, particularmente, imuno-histoquímica. A análise de amostras de células ou tecidos de um doente, de acordo com os métodos aqui descritos, pode ser utilizada diagnosticamente (e. g., para identificar doentes que têm uma doença particular, que estiveram expostos a um toxina

particular ou estão a responder bem a uma terapêutica ou transplante de órgão particular) e prognosticamente (e. g., para identificar doentes que irão provavelmente desenvolver uma doença particular que respondem bem a uma terapêutica particular ou que aceitam um transplante de órgão particular). Os métodos aqui divulgados, podem facilitar uma análise exacta e de confiança de uma pluralidade (e. g., potencialmente um número infinito) de alvos (e. g., marcadores de doença) a partir da mesma amostra biológica.

EXEMPLO 1 Oxidação selectiva de corantes de cianina utilizando peróxido de hidrogénio sem afectar DAPI.

Uma solução de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) foi preparada num tampão de bicarbonato de sódio por mistura de 1 volume de biocarbonato de sódio 1 molar (1 M), 3 volumes de água e 1 volume de 30 por cento (v/v) de peróxido de hidrogénio. o pH do bicarbonato de sódio foi ajustado a um pH 10 utilizando hidróxido de sódio, antes de misturar com peróxido de hidrogénio.

Três soluções separadas de corantes de cianina: Cy3, Cy5 e Cy7 foram preparadas em água a uma concentração de cerca de 2  $\mu$ M. Uma fracção de uma solução de corante de cianina foi misturada com uma fracção da solução de  $H_2O_2$  para preparar uma solução de amostra com uma concentração final de cerca de 3 volumes percentuais de  $H_2O_2$  e 1 micromolar (1  $\mu$ M) de corante de cianina (amostras 1 (Cy3), 2 (Cy5) e 3 (Cy7)). Uma solução de corante de cianina 1  $\mu$ M em água (sem  $H_2O_2$ ) foi utilizada como um controlo.



A reacção de oxidação do corante de cianina foi monitorizada através da medição do espectro de absorção do corante num espectrofotómetro de ultravioleta/visível (UV/Vis) em função do tempo. A Fig. 1 mostra o espectro de absorção da Amostra 1 em função do comprimento de onda, após uma duração de 10 minutos e 15 minutos. O valor da absorvência diminuiu consideravelmente quando comparado com o controlo. A Fig. 2 mostra os valores de absorvência para as Amostras 1, 2 e 3 em função do comprimento de onda. A absorvência das Amostras 1, 2 e 3 foi reduzida a zero após a duração do tempo, apresentando destruição química do corante por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A duração do tempo para as Amostras 1, 2 e 3 foi diferente para o diferente corante: 19 minutos para a Amostra 1, 15 minutos para a Amostra 2 e 3 minutos para a Amostra 3.

Uma solução de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) foi preparada em água a uma concentração de cerca de 57  $\mu\text{M}$ . Uma fracção da solução de DAPI foi misturada com uma fracção da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para preparar uma solução com uma concentração final de cerca de 3 volumes percentuais de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 10  $\mu\text{g/mL}$  de DAPI (Amostra 4). Uma solução de DAPI a 10  $\mu\text{g/mL}$  em água (sem  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi utilizada como um controlo.

A reacção de oxidação de DAPI foi monitorizada através da medição do espectro de absorção da Amostra 4 em função do tempo. A Fig. 3 mostra o espectro de absorção da Amostra 4 em função do comprimento de onda, após uma duração de 30 minutos e 140 minutos. O valor da absorvência da Amostra 4 não variou muito mesmo depois de um período de 140 minutos e foi na mesma gama que o controlo, não apresentando efeito significativo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em DAPI.

EXEMPLO 2 Oxidação selectiva de corantes de cianina utilizando periodato de sódio sem afectar DAPI.

Uma solução de periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) foi preparada por mistura de uma solução 0,2 molar de  $\text{NaIO}_4$  em soro fisiológico tamponado com fosfato 0,1X (PBS). Três soluções separadas de corantes de cianina, Cy3, Cy5 e Cy7 foram preparadas em água a uma concentração de cerca de 2  $\mu\text{M}$ . Uma fracção de uma solução de corante de cianina foi misturada com uma fracção da solução de  $\text{NaIO}_4$  para preparar uma solução com uma concentração final de cerca de 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaIO}_4$  e 1  $\mu\text{M}$  de corante de cianina (Amostras 5 (Cy3), 6 (Cy5) e 7 (Cy7)). Uma solução de corante de cianina com 1  $\mu\text{M}$  em água (sem  $\text{NaIO}_4$ ) foi utilizada como um controlo.

A reacção de oxidação do corante de cianina foi monitorizada através da medição do espectro de absorção do corante num espectrofotómetro de ultravioleta/visível (UV/Vis) em função do tempo. A Fig. 4 mostra o espectro de absorção da Amostra 5 em função do comprimento de onda, após uma duração de 20 minutos, 60 minutos e 210 minutos. O valor da absorvência diminuiu em função do tempo quando comparado com o controlo. A perda completa da absorvência foi observada após 210 minutos para a Amostra 5. A Fig. 5 mostra o espectro de absorção da Amostra 6 em função do comprimento de onda, após uma duração de 12 minutos e 16 minutos. O valor da absorvência diminuiu em função do tempo quando comparado com o controlo. A perda completa da absorvência foi observada rapidamente, após 16 minutos.

Uma solução de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) foi preparada em água a uma concentração de cerca de 57  $\mu\text{M}$ . Uma fracção da solução de DAPI foi misturada com uma fracção da solução de  $\text{NaIO}_4$  para preparar uma solução com uma concentração

final de cerca de 0,1 M de  $\text{NaIO}_4$  e 10  $\mu\text{g/mL}$  de DAPI (Amostra 8). Uma solução de DAPI a 10  $\mu\text{g/mL}$  em água (sem  $\text{NaIO}_4$ ) foi utilizada como um controlo.

A reacção de oxidação de DAPI foi monitorizada através da medição do espectro de absorção da Amostra 8 em função do tempo. A Fig. 6 mostra o espectro de absorção da Amostra 8 em função do comprimento de onda, após uma duração de 22 minutos, 70 minutos e 210 minutos. O valor da absorvência da Amostra 8 não variou muito, mesmo após um período de 210 minutos e uma quantidade significativa de DAPI permaneceu intacta quando comparada ao controlo.

EXEMPLO 3 Destruição selectiva de corantes de cianina utilizando base de hidróxido de sódio sem afectar DAPI.

Uma solução de NaOH foi preparada a uma concentração de 0,1 M e 1 M. Três soluções separadas de corantes de cianina, Cy3, Cy5 e Cy7 foram preparadas em água a uma concentração de 2  $\mu\text{M}$ . Uma fracção de uma solução de corante de cianina foi misturada com uma fracção da solução de NaOH de duas concentrações diferentes de NaOH: NaOH a 0,1 M (Amostras 9a, 10a e 11a) e NaOH a 1 M (Amostras 9b, 10b e 11b). Uma solução de corante de cianina a 1  $\mu\text{M}$  em água (sem NaOH) foi utilizada como um controlo.

A destruição com base do corante foi monitorizada através da medição do espectro de absorção das amostras em função do tempo. A Fig. 7 mostra os espectros de absorção das Amostras 9a, 10a e 11a em função do comprimento de onda, após duração de menos de 5 minutos. O valor da absorvência da Amostra 9a não variou muito e uma quantidade significativa de Cy3 permaneceu intacta quando

comparada ao controlo. A Amostra 10a mostrou uma decomposição de 20 por cento do corante Cy5, enquanto a Amostra 11a mostrou uma decomposição de 70 por cento do corante Cy7 utilizando NaOH a 0,1 M. A Fig. 8 mostra os espectros de absorção das Amostras 9b e 10b em função do comprimento de onda, após duração de menos de 5 minutos. A Amostra 9b mostrou uma decomposição de 50 por cento do corante Cy3, enquanto a Amostra 10b mostrou uma decomposição de 80 por cento do corante Cy5 utilizando NaOH a 1 M.

Uma solução de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) foi preparada em água, a uma concentração de cerca de 57  $\mu$ M. Uma fracção da solução de DAPI foi misturada com uma fracção da solução de NaOH de duas concentrações diferentes de NaOH a 0,1 M (Amostras 12a) e NaOH a 1 M (Amostras 12b). Uma solução de corante de DAPI de 10  $\mu$ g/mL em água (sem NaOH) foi utilizada como um controlo. A destruição com base de DAPI foi monitorizada através da medição do espectro de absorção das Amostras 12a e 12b em função do tempo. A Fig. 9 mostra os espectros de absorção das Amostras 12a e 12b em função do comprimento de onda. O valor da absorvência das amostras não variou muito e uma quantidade significativa de DAPI permaneceu intacta quando comparada ao controlo.

EXEMPLO 4 Destruição selectiva dos corante Cy5 e Cy7 sem afectar Cy3

Uma solução de 5 por cento (p/v) de um nucleófilo foi preparada por mistura de cloridrato de tris[2-carboxietil]-fosfina (TCEP.HCl) em tampão de biocarbonato de sódio a 1 M (pH final 7,7). Três soluções separadas de corantes de cianina, Cy3, Cy5 e Cy7 foram preparadas em água a uma concentração de cerca de 2  $\mu$ M. Uma fracção de uma solução de corante de cianina

foi misturada com uma fracção da solução de TCEP.HCl para preparar as Amostras 13 (Cy3), 14 (Cy5) e 15 (Cy7). Uma solução de corante de cianina a 1  $\mu$ M em água (sem TCEP.HCl) foi utilizada como um controlo.

A destruição do corante foi monitorizada através da medição do espectro de absorção das amostras em função do tempo. A Fig. 10 mostra os espectros de absorção das Amostras 13, 14 e 15 em função do comprimento de onda. O valor da absorvência da Amostra 13 não variou muito e uma quantidade significativa de Cy3 permaneceu intacta quando comparada ao controlo, após uma duração de 60 minutos. As Amostras 14 e 15 mostraram uma decomposição significativa dos corantes Cy5 e Cy7 após uma duração de 0,5 minutos.

EXEMPLO 5 Destruição selectiva do corante Cy7 sem afectar Cy3

Uma solução de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) foi preparada numa solução de soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) por mistura de uma solução a 6 por cento (v/v) de  $H_2O_2$  em PBS 0,8X (pH final 6,6). Duas soluções separadas de corantes de cianina, Cy3 e Cy7 foram preparadas em água a uma concentração de cerca de 2  $\mu$ M. Uma fracção de uma solução de corante de cianina foi misturada com uma fracção da solução de  $H_2O_2$  para preparar as Amostras 16 (Cy3) e 17 (Cy7)). Uma solução de corante de cianina 1  $\mu$ M em água (sem  $H_2O_2$ ) foi utilizada como um controlo.

A destruição do corante foi monitorizada através da medição do espectro de absorção das amostras em função do tempo. A Fig. 11 mostra os espectros de absorção das Amostras 16 e 17 em função do comprimento de onda. O valor da absorvência da

Amostra 16 não variou muito e uma quantidade significativa de Cy3 permaneceu intacta quando comparada ao controle, após uma duração de 60 minutos. A Amostra 17 mostrou uma decomposição significativa do corante Cy7 após uma duração de 60 minutos.

Os seguintes exemplos 6-21 ilustram formas de realização da invenção de acordo com as quais são conduzidas múltiplas capturas de imagem de amostras de tecido. A coloração múltipla é obtida por coloração, captura de imagem, destruição química do corante, recoloração, captura de imagem e repetição dos passos.

#### EXEMPLO 6 Preparação de Amostras de Tecido para Coloração

As amostras de tecido humano adulto foram obtidas como lâminas de tecido impregnadas em parafina. As amostras de tecido incluíram lâminas de cólon (Biochain, T2234090), tecido mamário normal (Biochain, T2234086), cancro da próstata (Biochain, T2235201-1), adenocarcinoma de cólon (Biochain, T2235090-1), micromatriz de tecido mamário (Imgenex, IMH 367, p61), TMA da mama (Imegenex IMH 367, p32) e próstata normal (Biochain, T2234201). As lâminas impregnadas em parafina de tecido humano adulto foram submetidas a um protocolo de imuno-histoquímica para as preparar para coloração. O protocolo incluiu desparafinização, reidratação, incubação e lavagem. A desparafinização foi realizada através de lavagem das lâminas com Histochoice (ou tolueno) durante um período de 10 minutos e com agitação frequente. Após desparafinização, a amostra de tecido foi reidratada por lavagem da lâmina com solução de etanol. A lavagem foi realizada com três soluções diferentes de etanol com concentrações decrescentes. As concentrações de etanol utilizadas foram 90 por cento em volume, 70 por cento em volume e 50 por cento em volume. A lâmina foi depois lavada com

soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS, pH 7,4). A permeabilização membranar do tecido foi realizada por lavagem da lâmina com uma solução de 0,1 por cento em peso de Triton TX-100. Foi utilizado tampão de citrato a pH 6,0 (Solução de Exposição do Vector) para recuperação do antigénio. As lâminas foram expostas ao tampão num panela de pressão durante um período de 15 minutos, seguido por arrefecimento à temperatura ambiente durante um período de 20 minutos. A lâmina foi depois bloqueada contra ligação não específica, por lavagem com PBS e 900 µL de 3 por cento, em volume, de albumina de soro bovino (BSA) durante 45 minutos a 37 °C. Para a coloração com anticorpos secundários (opcional), a lâmina foi também bloqueada com 100 µL de soro da espécie hospedeira do anticorpo secundário.

#### EXEMPLO 7 Conjugação de anticorpos com um corante

Os anticorpos conjugados com corante foram preparados de acordo com o seguinte processo. Os anticorpos utilizados para conjugação e coloração incluíram anti-antigénio nuclear de célula proliferativa, clone PC 10 (sigma Aldrich, P8825); anti-alfa actina do músculo liso (SmA), clone 1A4 (sigma, A2547); anti-beta catenina de coelho (sigma, C2206); anti-pancitoqueratina de murganho, clone PCK-26 (sigma, C1801); anti-receptor alfa de estrogénio de murganho, clone 1D5 (DAKO, M7047); anticorpo de beta catenina, clone 15B8 (sigma, C7738); anti-vimentina de cabra (sigma, V4630); clone AR441 do receptor de androgénio do ciclo (DAKO, M3562); Factor 7 de Von Willebrand, queratina 5, queratina 8/18, e-caderina, Her2/neu, receptor de estrogénio, p53, receptor de progesterona, beta catenina; anti-murganho de burro (Jackson ImmunoResearch, 715-166-150); e anti-coelho de burro (Jackson ImmunoResearch, 711-166-152).

Uma coluna de centrifugação YM-10 Micron foi molhada com 250 mL de PBS e a coluna foi centrifugada durante 15 minutos. Foram pipetados 500 mL do anticorpo (200 µg/mL) na coluna molhada. A coluna foi centrifugada durante 30 minutos a 11000 rpm, a 4 °C. O anticorpo/proteína concentrado foi depois transferido para um tubo novo e centrifugado durante 30 segundos para remover a proteína concentrada. Uma solução de tampão de acoplamento foi depois misturada com a solução concentrada de anticorpo. A solução tampão de acoplamento incluiu carbonato de sódio a 1 M (pH entre 8-9) e foram utilizados 5 µL do tampão por 100 µL da solução de anticorpo. A solução de anticorpo e tampão foi adicionada a 0,01-0,1 mg do corante de cianina. O corante foi reconstituído em DMSO a uma concentração de 10-20-mg/mL antes de incubar com o anticorpo. A solução resultante foi misturada exaustivamente por pipetagem e quaisquer bolhas formadas foram removidas através de centrifugação do tubo. A solução foi coberta com uma folha de alumínio e incubada à temperatura ambiente durante um período de cerca de 30-45 minutos. Após a incubação, a solução foi adicionada à coluna de centrifugação YM-10 e centrifugada durante 30 minutos a 4 °C, a 11000 rpm. A solução foi lavada com PBS e centrifugada para remover qualquer corante não conjugado ou anticorpo. A solução de anticorpo conjugado com corante foi depois diluída com 50 por cento de glicerol e armazenada num congelador a -20 °C.

#### EXEMPLO 8 Coloração e captura de imagem de tecido com corantes

Uma lâmina preparada no Exemplo 6 foi incubada com um anticorpo conjugado com corante preparado no Exemplo 7. A



incubação foi conduzida em 3 por cento BSA durante 45 minutos em 37 °C. Após incubação, a lâmina foi submetida a uma série extensa de lavagens com PBS. Quando foram utilizados anticorpos secundários (opcionais), a lâmina foi incubada com um anticorpo secundário em BSA durante 45 minutos, a 37 °C. Após incubação, a lâmina foi submetida a uma série extensa de lavagens com PBS. Uma lâmina corada com anticorpo primário ou anticorpo secundário (opcional) foi opcionalmente contra-corada com o corante morfológico DAPI e foi coberta com uma lamela.

Uma lâmina coberta com lamela foi submetida a captura de imagem utilizando uma câmara. A câmara utilizada foi uma câmara de elevada resolução monocromática Leica DFC 350FX montada num microscópio de fluorescência Leica DMRA2. A ampliação utilizada foi 20x, salvo indicação em contrário. Após aquisição da imagem, a lamela foi removida e a lâmina foi lavada com PBS para a preparação da destruição de sinal.

#### EXEMPLO 9 Destruição do corante, coloração e captura de imagem

Uma solução de NaOH e uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram utilizadas para a destruição de sinal. Uma solução de NaOH foi preparada utilizando 500 µL de NaOH a 50 por cento em volume e 49,5 mL de PBS. O pH final da solução de NaOH foi de cerca de 11,9-12,5. Uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi preparada por mistura de 10 mL de carbonato de sódio a 0,5 M (pH 10), 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 por cento em volume e 35 mL de água. Uma lâmina foi colocada na solução de NaOH ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 minutos com agitação suave. Após 15 minutos, a lâmina foi lavada novamente com PBS, coberta com uma lamela e representada novamente por imagem (opcional), para verificar a eficácia da destruição do corante, ou corada

novamente e representada por imagem. A recoloração e os passos de recaptura de imagem foram realizados utilizando o processo descrito no Exemplo 8. Depois da captura de imagem, uma lâmina foi submetida a destruição de sinal, coloração e ciclos de captura de imagem, e o processo foi repetido múltiplas vezes. As Amostras de tecido foram representadas por imagem utilizando 1-9 anticorpos diferentes. Após a captura de imagem com a série de cianina, a lâmina foi opcionalmente corada e representada por imagem com corantes morfológicos H&E.

EXEMPLO 10 Coloração de canal único e captura de imagem de um tecido normal do cólon utilizando NaOH

Uma lâmina com cólon normal foi corada com um anticorpo primário anti-antigénio nuclear de célula proliferativa de murganho (PCNA) clone PC 10 e visada com um anti-murganho conjugado com Cy3 de burro, para formar a Amostra 18a. A Amostra 18a foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH para formar a Amostra 18b que foi novamente representada por imagem. Os passos de coloração, captura de imagem e destruição do corante foram realizados de acordo com os processos aqui descritos acima nos Exemplos 8 e 9. A Fig. 12 mostra micrografias (ampliação de 10x) da Amostra 18a (antes da destruição do corante) e da Amostra 18b (após destruição do corante). Após tratamento com NaOH, permaneceu pouco ou nenhum sinal de Cy3.

EXEMPLO 11 Coloração de canal único e captura de imagem de um tecido normal do cólon utilizando NaOH

Uma lâmina com cólon normal foi corada com um anticorpo primário anti-alfa actina do músculo liso de murganho (SmA) clone 1A4 e visada com um anti-murganho conjugado com Cy3 de burro, para formar a Amostra 19a. A Amostra 19a foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH para formar a Amostra 19b que foi novamente representada por imagem. Os passos de coloração, captura de imagem e destruição do corante foram realizados de acordo com os processos aqui descritos acima nos Exemplos 8 e 9. A Fig. 13 mostra micrografias (ampliação de 10x) da Amostra 19a (antes da destruição do corante) e da Amostra 19b (após destruição do corante). Após tratamento com NaOH, permaneceu pouco ou nenhum sinal de Cy3.

EXEMPLO 12 Coloração de dois canais e captura de imagem de um tecido normal da mama utilizando NaOH

Um tecido normal da mama foi corado com um anticorpo primário SmA, visado com um anti-murganho conjugado com Cy3 de burro e contra-corado com DAPI para formar a Amostra 20a. A Amostra 20a foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH para formar a Amostra 20b que foi novamente representada por imagem. Os passos de coloração, captura de imagem e destruição do corante foram realizados de acordo com os processos aqui descritos acima nos Exemplos 8 e 9. A Amostra 21b foi corada novamente com um anticorpo primário de anti-beta catenina de coelho e visada com um anti-coelho conjugado com Cy3 para formar a Amostra 20c. A Amostra 20c foi representada por imagem e depois contra-corada com H&E para formar a Amostra 20d e representada novamente por imagem.

A Fig. 14 mostra micrografias da Amostra 20a (antes da destruição do corante) e da Amostra 20b (após destruição do corante). Após tratamento com NaOH, permaneceu pouco ou nenhum sinal de Cy3 e foi observado apenas DAPI. A micrografia da Amostra 20c mostrou que a captura de imagem no mesmo canal Cy3 foi possível por coloração com um anticorpo diferente. Foi obtida informação morfológica sobre o tecido através de coloração adicional com H&E (Amostra 20d).

EXEMPLO 13 Coloração de dois canais e captura de imagem de tecido de cancro da próstata utilizando NaOH

Um tecido de cancro da próstata foi corado com um anticorpo primário anti-pancitoqueratina de murganho clone PCK-26 e visado com um anti-murganho conjugado com Cy3 de burro, para formar a Amostra 21a. A Amostra 21a foi representada por imagem e depois contra-corada com DAPI para formar a Amostra 21b. A Amostra 21b foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH para formar a Amostra 21c que foi novamente representada por imagem. Os passos de coloração, captura de imagem e destruição do corante foram realizados de acordo com os processos aqui descritos acima nos Exemplos 8 e 9. A Amostra 21c foi corada novamente com um anticorpo primário SmA e visada com um anti-coelho conjugado com Cy3 para formar a Amostra 21d e representada novamente por imagem.

A Fig. 15 mostra micrografias da Amostra 21a e b (antes da destruição do corante) e da Amostra 21c (após destruição do corante). Após tratamento com NaOH, permaneceu pouco ou nenhum sinal de Cy3 e foi observado apenas DAPI. A micrografia da Amostra 21d mostrou que a captura de imagem no mesmo canal Cy3

foi possível por coloração com um anticorpo diferente. Foi obtida informação nuclear sobre o tecido através de coloração com DAPI (Amostra 21b).

EXEMPLO 14 Coloração de dois canais e captura de imagem de um adenocarcionoma do cólon utilizando NaOH

Uma lâmina de adenocarcionoma do cólon foi corada com um anticorpo primário anti-pancitoqueratina de murganho clone PCK-26 e visada com um anti-murganho conjugado com Cy3 de burro, para formar a Amostra 22a. A Amostra 22a foi representada por imagem e depois contra-corada com DAPI para formar a Amostra 22b. A Amostra 22b foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH para formar a Amostra 22c que foi novamente representada por imagem. Os passos de coloração, captura de imagem e destruição do corante foram realizados de acordo com os processos aqui descritos acima nos Exemplos 8 e 9. A Amostra 22c foi corada novamente com um anticorpo primário SmA e visada com um anti-coelho conjugado com Cy3 para formar a Amostra 22d e representada novamente por imagem.

A Fig. 16 mostra micrografias da Amostra 22a e b (antes da destruição do corante) e da Amostra 22c (após destruição do corante). Após tratamento com NaOH, permaneceu pouco ou nenhum sinal de Cy3 e foi observado apenas DAPI. A micrografia da Amostra 22d mostrou que a captura de imagem no mesmo canal Cy3 foi possível por coloração com um anticorpo diferente. Foi obtida informação nuclear sobre o tecido através de coloração com DAPI (Amostra 22b).

EXEMPLO 15 Coloração de dois canais e captura de imagem de uma micromatriz de tecido mamário com medição de linha de base utilizando o NaOH

Uma micromatriz de tecido mamário (Amostra 23a) foi representada por imagem no canal DAPI e Cy3 para medir a autofluorescência do tecido. A Amostra 23a foi depois corada com DAPI para formar a Amostra 23b, representada por imagem e depois tratada com NaOH para formar a Amostra 23c e representada novamente por imagem. A Amostra 23a foi também corada com um anticorpo primário anti-receptor alfa de estrogênio de murganho clone 1D5 e visada com um anti-murganho conjugado com Cy3 de burro, para formar a Amostra 23d. A Amostra 23d foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH para formar a Amostra 23e que foi novamente representada por imagem. Os passos de coloração, captura de imagem e destruição do corante foram realizados de acordo com os processos aqui descritos acima nos Exemplos 8 e 9.

A Fig. 17 mostra micrografias das Amostras 23a-e. As micrografias das Amostras 23c e 23e foram comparadas à autofluorescência (linha de base) observada na Amostra 23a. Ambas as Amostras mostraram redução de sinal. A amostra corada com DAPI mostrou redução de sinal possivelmente devido à destruição dos ácidos nucleicos aos quais se liga DAPI.

EXEMPLO 16 Coloração de três canais e captura de imagem de TMA da mama utilizando NaOH

Uma lâmina de TMA da mama foi corada com um anticorpo primário anti-pancitoqueratina de murganho clone PCK-26, visada com um anti-murganho conjugado com Cy3 de burro e contra-corada

com DAPI para formar a Amostra 24A. A Amostra 24A foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH para formar a Amostra 24b que foi novamente representada por imagem. Os passos de coloração, captura de imagem e destruição do corante foram realizados de acordo com os processos aqui descritos acima nos Exemplos 8 e 9. A Amostra 24b foi novamente corada com um anticorpo beta catenina conjugado directamente com Cy3 para formar a Amostra 24c e novamente representada por imagem. A matriz foi novamente tratada com NaOH e marcada com anticorpo SmA conjugado directamente com Cy3 para formar a Amostra 24d e novamente representada por imagem. As imagens obtidas foram registadas, pseudo-coradas e sobrepostas (Amostra 24e) para produzir informação espacial da expressão do antigénio. A Amostra 24d foi corada adicionalmente com H&E para formar a Amostra 24f.

A Fig. 18 mostra micrografias da Amostra 24A (antes da destruição do corante) e da Amostra 24b (após destruição do corante). Após tratamento com NaOH, permaneceu pouco ou nenhum sinal de Cy3 e apenas foi observado DAPI. As micrografias das Amostras 24c e 24d mostraram que a captura de imagem no mesmo canal Cy3 foi possível através de coloração com anticorpos diferentes. Foi obtida informação morfológica sobre o tecido por coloração com H&E (Amostra 24f).

EXEMPLO 17 Coloração de doze canais e captura de imagem da próstata normal utilizando NaOH

Foram capturadas imagens antes da coloração para definir a linha de base da autofluorescência proveniente de cada canal. Uma lâmina de próstata normal foi corada com uma mistura de anticorpos primários: clone de anti-pancitoqueratina de murganho

e anti-vimentina de cabra. Os dois anticorpos primários foram visados com uma segunda mistura de anticorpos secundários anti-murganho conjugado com Cy3 de burro e anti-cabra conjugado com Cy5 de burro para formar a Amostra 25a. A Amostra 25a foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH. O tecido foi depois corado com uma segunda mistura de anticorpos primários: clone do receptor de androgénio e alfa catenina. Os dois anticorpos primários foram visados com uma outra mistura de anticorpos secundários conjugados com Cy3 e Cy5 para formar a Amostra 25b. A Amostra 25b foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH. Isto foi seguido por passos de coloração-captura de imagem-tratamento com NaOH-coloração utilizando sete anticorpos directamente conjugados com Cy- (Amostras 25c-25i). Os anticorpos utilizados foram: alfa actina do músculo liso, beta catenina, pancaderina, factor 7 de Von Willebrand, queratina 5, queratina 8/18 e e-caderina. Cada passo de coloração incluiu contra-coloração com DAPI (Amostra 25j).

A Fig. 19 mostra micrografias da Amostra 25a (canais Cy3 e Cy5), Amostra 25b (canais Cy3 e Cy5) e Amostras 25c-25j. A Fig. 19 mostra a captura múltipla de imagem no mesmo canal Cy3 foi possível através de coloração com anticorpos diferentes. A captura de múltipla imagem de 12 canais foi possível com 9 dos canais a serem canais Cy3.

EXEMPLO 18 Coloração de quatro canais e captura de imagem da próstata normal utilizando  $H_2O_2$

Foram capturadas imagens antes da coloração para definir a linha de base da autofluorescência proveniente de cada canal. Uma lâmina da próstata normal foi corada com uma pancaderina



conjugada directamente com Cy3 para formar a Amostra 26a. A lâmina foi representada por imagem e tratada com  $H_2O_2$  (Amostra 26b), corada novamente com SmA conjugado com Cy3 (Amostra 26c), tratada com  $H_2O_2$  (Amostra 26d), corada novamente com pancitoqueratina conjugada com Cy3 (Amostra 26e), tratada com  $H_2O_2$  (Amostra 26f), corada novamente com vimentina conjugada com Cy (Amostra 26g) e tratada com  $H_2O_2$  (Amostra 26g).

A Fig. 20 mostra micrografias das Amostras 26a-g. A Fig. 20 mostra que a captura múltipla de imagem no mesmo canal Cy3 foi possível através de coloração com anticorpos diferentes e destruindo o sinal utilizando  $H_2O_2$ .

EXEMPLO 19 Corante residual após coloração para proteínas abundantes utilizando NaOH.

Uma próstata normal (Amostra 27a) foi representada por imagem no canal Cy3 para medir a autofluorescência do tecido. A Amostra 27a foi depois corada com SmA conjugado com Cy3 para formar a Amostra 27b, representada por imagem e depois tratada com NaOH para formar a Amostra 27c, e novamente representada por imagem. Os passos de coloração, captura de imagem e destruição do corante foram realizados de acordo com os processos aqui descritos acima nos Exemplos 8 e 9. A Fig. 21 mostra as micrografias das Amostras 27a-c. Foi observado corante residual após tratamento com NaOH.

Os valores de corante residual foram também monitorizados durante a captura múltipla de imagem de doze canais descrita no Exemplo 17. Utilizando Gimp 2.2, as intensidades médias de pixel foram recolhidas para cada fundo e imagem tratada com NaOH, e dispostas em tabelas. A Fig. 22 mostra uma representação gráfica

da intensidade média de pixel do fundo para cada ciclo na captura de imagem, assim como uma pequena imagem de como era o fundo antes da coloração. Um grande pico na intensidade de corante residual foi observado no ciclo 4 como SmA, uma proteína abundantemente expressa foi corada no ciclo 3.

EXEMPLO 20 Corante residual após coloração para proteínas abundantes utilizando NaOH e tratamento com  $H_2O_2$ .

Duas lâminas de próstata foram coradas com SmA conjugado directamente com Cy3 (Amostras 28a e 28b). A ambas as lâminas foram dados passos de pré-tratamento, concentração, recuperação de antigénio idênticos e a única diferença foi o método de destruição de sinal: sendo o primeiro método com NaOH (Amostra 28c) e o outro com  $H_2O_2$  (Amostra 28d). Outras duas lâminas de próstata foram coradas com pancaderina conjugada directamente com Cy3 (Amostras 29a e 29b). A ambas as lâminas foram dados passos de pré-tratamento, concentração, recuperação de antigénio idênticos e a única diferença foi o método de destruição de sinal: sendo o primeiro método com NaOH (Amostra 29c) e o outro com  $H_2O_2$  (Amostra 29d).

A Fig. 23 mostra micrografias lado a lado de coloração SmA e pancaderina e remoção de sinal. O  $H_2O_2$  mostrou remoção mais eficiente do corante para SmA e pancaderina, quando comparado a NaOH.

EXEMPLO 21 Corante residual após coloração de múltiplos ciclos para proteínas abundantes utilizando NaOH e tratamento com  $H_2O_2$ .

Duas lâminas da próstata foram coradas com SmA conjugado directamente com Cy3 (Amostras 30a e 30b). A ambas as lâminas foram dados passos de pré-tratamento, concentração, recuperação de antigénio idênticos e a única diferença foi o método de destruição de sinal: sendo o primeiro método com NaOH (Amostra 30c) e o outro com  $H_2O_2$  (Amostra 30d). As lâminas foram submetidas a 9 ciclos de coloração e destruição de sinal, antes da coloração com pancitoqueratina conjugada com Cy3.

A Figura 24 compara a coloração do primeiro ciclo de coloração com pancaderina ao 9º ciclo da pancitoqueratina utilizando NaOH e  $H_2O_2$  para destruir o sinal, após cada coloração. O  $H_2O_2$  mostrou uma remoção mais eficiente do corante após 9 ciclos quando comparado ao NaOH. A Figura 25 compara o fundo de amostras não coradas (Amostras 30e e 30f) e após 9 ciclos de tratamento com NaOH e  $H_2O_2$  (Amostras 30c e 30d). O  $H_2O_2$  mostrou remoção mais eficiente do corante para SmA e pancaderina quando comparado ao NaOH. A Figura 26 é uma matriz de intensidades médias de pixel para o fundo de cada ciclo, para as lâminas de NaOH e  $H_2O_2$ . O fundo para a lâmina de  $H_2O_2$  foi significativamente menor para cada ciclo, após a linha de base inicial. Abaixo de cada ciclo está também uma pequena imagem de cada fundo, estando a imagem de fundo de NaOH no cimo e a imagem de fundo de  $H_2O_2$  em baixo.

## EXEMPLO 22 Estabilidade do anticorpo a agentes químicos

Uma lâmina de tecido de cólon foi corada com um anticorpo primário anti-beta catenina de coelho e visada com um anticorpo secundário anti-coelho de burro conjugado com Cy3, para formar a Amostra 31a. A Amostra 31a foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH para formar a Amostra 31b que foi novamente representada por imagem. Os passos de coloração, captura de imagem e destruição do corante foram realizados de acordo com os processos aqui descritos acima nos Exemplos 8 e 9. A Amostra 31b foi corada novamente com um anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Cy3 para formar a Amostra 31c e novamente representada por imagem. A Fig. 27 mostra micrografias das Amostras 31a-c. A Fig. 27 mostra que o anticorpo primário permanece ligado à amostra após tratamento com NaOH.

Uma lâmina de tecido de cólon foi corada com um anticorpo primário anti-PCNA de murganho e visada com um anticorpo secundário anti-murganho de burro conjugado com Cy3 para formar a Amostra 31a. A Amostra 31a foi representada por imagem e depois tratada com uma solução de NaOH para formar a Amostra 32b que foi novamente representada por imagem. Os passos de coloração, captura de imagem e destruição do corante foram realizados de acordo com os processos aqui descritos acima nos Exemplos 8 e 9. A Amostra 32b foi corada novamente com um anticorpo secundário anti-murganho conjugado com Cy3 para formar a Amostra 32c e novamente representada por imagem. A Fig. 28 mostra que o anticorpo primário ainda está ligado à amostra após tratamento com NaOH.

Os seguintes exemplos 23-26 ilustram formas de realização da invenção de acordo com as quais são conduzidas múltiplas capturas de imagem de amostras de tecido utilizando conjugados

enzima-substrato-fluoróforo. A coloração múltipla é obtida por coloração, captura de imagem, destruição química do fluoróforo, recoloração, captura de imagem e repetição dos passos.

#### EXEMPLO 23 Conjugação de anticorpos com uma enzima

Os anticorpos utilizados foram anti- $\beta$ -catenina de coelho directamente conjugado com a enzima peroxidase de rábano (HRP), anti-queratina 5 de murganho e anti-murganho de burro conjugado com anticorpo de HRP. O substrato para a enzima HRP foi substrato de tiramida conjugado com Cy5.

#### EXEMPLO 24 Coloração e captura de imagem de tecido com HRP

Uma lâmina preparada como no Exemplo 6 foi incubada com anticorpo anti- $\beta$ -catenina conjugado com HRP preparado no Exemplo 23. A incubação do anticorpo primário foi conduzida em 3 por cento de BSA durante 45 minutos a 37 °C. Após incubação, a lâmina foi submetida a uma série extensa de lavagens com PBS. A lâmina corada com HRP foi incubada com substrato de tiramida conjugada com Cy5 em PBS/0,1% de Triton X-100 durante 10 minutos. Após incubação, a lâmina foi submetida a uma série extensa de lavagens com PBS. O substrato de tiramida Cy5 foi depois submetido a captura de imagem com um gerador de imagens Zeiss Axio. A ampliação utilizada foi 20x, salvo indicação em contrário. A FIG. 29 mostra uma micrografia da Amostra 33 após coloração para  $\beta$ -catenina. Após a aquisição de imagem, a lâmina foi lavada com PBS para preparar a destruição de sinal.

#### EXEMPLO 25 Modificação de sinal, coloração e captura de imagem

Foi utilizada uma solução de  $H_2O_2$  para a destruição de sinal. Uma solução de  $H_2O_2$  foi preparada por mistura da 10 mL de carbonato de sódio a 0,5 M (pH 10), 5 mL de  $H_2O_2$  a 30 por cento em volume e 35 mL de água. Uma lâmina foi colocada na solução de  $H_2O_2$  durante 15 minutos com agitação suave. Após 15 minutos, a lâmina foi lavada novamente com PBS (Amostra 34), coberta com uma lamela e submetida novamente a captura de imagem para verificar a eficácia da destruição do corante. O passo de recaptura de imagem foi realizado utilizando o processo acima descrito no Exemplo 24. A FIG. 29 mostra uma micrografia da Amostra 34 após modificação de sinal que mostra a remoção substancial do sinal após destruição de sinal. A Amostra 34 foi depois reincubada com tiramida Cy5 para determinar a actividade residual da enzima HRP e submetida a captura de imagem, como acima. A FIG. 29 mostra uma micrografia da Amostra 35 e não mais Cy5 e enzima HRP são quimicamente inactivados por solução de  $H_2O_2$ , de modo que não ocorre mais reacção enzima-substrato.

#### EXEMPLO 26 Recoloração e recaptura de imagem de tecido com corante

A lâmina (Amostra 35) do Exemplo 25 foi incubada com anticorpo anti-queratina 5 de murganho. A incubação foi conduzida em 3 por cento de BSA durante 45 minutos a 37 °C. Após incubação, a lâmina foi submetida a uma série extensa de lavagens com PBS. O anticorpo de queratina 5 foi depois detectado com um anticorpo anti-murganho de burro conjugado com HRP, em BSA durante 45 minutos a 37 °C. A lâmina corada com HRP foi incubada com substrato de tiramida conjugada com Cy5, como

no Exemplo 25. Após incubação, a lâmina foi submetida a uma série extensa de lavagens com PBS. A lâmina corada novamente com Cy5 (Amostra 36) foi contra-corada com o corante morfológico, DAPI, e coberta com uma lamela. A lâmina coberta com lamela foi re-submetida a captura de imagem utilizando o processo acima descrito no Exemplo 24. A FIG. 29 mostra uma micrografia da Amostra 36 após coloração para a proteína k5.

Os seguintes exemplos 27-31 ilustram formas de realização da invenção de acordo com as quais são conduzidas múltiplas capturas de imagem de transferências por gota. A coloração múltipla é obtida por coloração, captura de imagem, destruição química do fluoróforo, recoloração, captura de imagem e repetição dos passos.

EXEMPLO 27 Imobilização de alvos numa membrana de transferência

As proteínas alvo, péptido  $\beta$ -catenina (Sigma 26561-1, lote R1078-005) e antigénio CEA foram aplicados numa membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) a três concentrações diferentes: 1 micrograma, 100 nanogramas e 10 nanogramas. A membrana foi bloqueada utilizando 5% de leite em 1xTBS-T (tampão de soro fisiológico tamponado com Tris mais Tween 20) durante 1 hora à temperatura ambiente.

EXEMPLO 28 Coloração de  $\beta$ -catenina e captura de imagem das transferências

Uma membrana de transferência preparada no Exemplo 27 foi incubada com um anticorpo primário, anticorpo anti- $\beta$ -catenina de

coelho (Sigma, C7738). A incubação foi conduzida a uma diluição de 1:200 de anticorpo, utilizando 1 por cento de leite em 1xTBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente (t.a.). Após incubação, a membrana de transferência foi submetida a uma série extensa de lavagens. A membrana de transferência foi depois incubada com um anticorpo secundário anti-coelho de burro conjugado com Cy5 (preparado como no Exemplo 6) à diluição de 1:500, utilizando 1 por cento de leite em 1xTBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente (t.a.). Após incubação, a membrana de transferência (Amostra 37) foi lavada com 1xTBS-T. As imagens da membrana de transferência (Amostra 37) foram capturadas no gerador de imagem Typhoon (GE Healthcare) utilizando o canal Cy5 e uma voltagem de 450 V. A FIG. 30 mostra uma imagem da Amostra 37. Como mostrado na FIG. 30, são observados pontos de intensidades de sinal variáveis para as três concentrações diferentes de proteína alvo  $\beta$ -catenina.

#### EXEMPLO 29 Destruição do corante e captura de imagem

Foi utilizada uma solução de  $H_2O_2$  para a destruição de sinal. Uma solução de  $H_2O_2$  foi preparada por mistura de 10 mL de carbonato de sódio a 0,5 M (pH 10), 5 mL de  $H_2O_2$  a 30 por cento em volume e 35 mL de água. A membrana de transferência preparada no Exemplo 28 foi colocada na solução de  $H_2O_2$  durante 15 minutos à temperatura ambiente com agitação suave. Após 15 minutos, a membrana foi lavada três vezes utilizando 1xTBS-T durante 5 minutos, para formar a Amostra 38. A membrana de transferência (Amostra 38) foi submetida novamente a captura de imagem e as imagens de transferência foram capturadas no gerador de imagem Typhoon (GE Healthcare) utilizando o canal Cy5 e uma voltagem de 450 V. A FIG. 30 mostra uma imagem da Amostra 38. Como mostrado na FIG. 30, não foram observados pontos após o passo de



destruição do corante, indicando destruição substancialmente completa de Cy5.

#### EXEMPLO 30 Coloração do antigénio CEA e captura de imagem da transferência

A membrana de transferência do Exemplo 29 foi incubada com um anticorpo primário, anticorpo anti-CEA de murganho. A incubação foi conduzida à diluição de 1:200 utilizando 1 por cento de leite em 1xTBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente (t.a.). Após incubação, a membrana de transferência foi submetida a uma série extensa de lavagens. A membrana de transferência foi depois incubada com um anticorpo secundário anti-murganho de burro conjugado com Cy5 (preparado no Exemplo 6) à diluição de 1:500, utilizando 1 por cento de leite em 1xTBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente (t.a.). Após incubação, a membrana de transferência (Amostra 39) foi submetida a uma série extensa das lavagens. As imagens da transferência (Amostra 39) foram capturadas no Typhoon utilizando o canal Cy5 e uma voltagem de 450 V. A FIG. 30 mostra uma imagem da Amostra 39. Como mostrado na FIG. 30, são observados pontos de intensidades de sinal variáveis para as três concentrações diferentes do antigénio CEA. O Exemplo ilustra que dois alvos diferentes podem ser detectados utilizando um único gerador de sinal.

#### EXEMPLO 31 Quantificação do sinal após cada passo

As amostras 37, 38, 39 e 40 foram ainda analisadas para quantificar os sinais nos três pontos detectados para cada péptido (um exemplo representativo de regiões escolhidas para a

análise é mostrado na FIG. 30, com regiões assinaladas com um quadrado numerado de 4-9 na FIG 30). Os sinais de cada amostra, cada um dos pontos do péptido, foram normalizados a uma média de três pontos 1, 2 e 3 de fundo, como mostrado na FIG. 30. A FIG. 31 é uma representação gráfica de intensidades de sinal relativas dos pontos para as Amostras 37, 38, 39 e 40, mostrando que as intensidades de sinal reduzem 10 vezes após o passo de destruição do corante (Amostra 38).

Os seguintes exemplos 32-34 ilustram formas de realização da invenção de acordo com as quais o fluoróforo é destruído por um agente oxidante, sem remover significativamente a sonda (anticorpo primário) do suporte sólido.

#### EXEMPLO 32 Preparação das Culturas Celulares

Alexa 488, BODIPY FL C5 (D6184), hidroxycumarina (H 1193) foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA); ATTO 495, ATTO 635 e ATTO 655 foram obtidos da ATTO-TEC (Siegen, Alemanha); DY-734-NHS foi obtido da Dyomics (Jena, Alemanha); A cadaverina de fluoresceína foi obtida da Biotium Inc. (Hayward, CA). IgG-Cy3 anti-murganho de cabra e IgG-Cy5 anti-murganho de cabra foram obtidos da Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA). DPBS e PBS foram obtidos da Invitrogen; 16% de PFA foi obtida da Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA). O soro de cabra foi obtido da Vector Laboratories (Burlingame, CA). Todos os restantes reagentes foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO).

As células LS174T (ATCC, CL-188) que expressam antigénio carcino-embriónico (CEA) foram cultivadas em EMEM (ATCC, N° cat. 30-2003) suplementado com 10% de FBS. As células foram

incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> . Após confluência de 90%, foram sub-cultivadas ou inoculadas em placas de 96 poços e mantidas a crescer durante mais dois dias.

As células confluentes em placas de 96 poços foram lavadas duas vezes com DPBS (com cálcio) e depois foi adicionado 2% de PFA (concentração final) para fixar as células durante 10 minutos, seguida de permeabilização utilizando 0,1% de Triton X-100 em PBS durante 5 minutos. Em seguida, as células foram incubadas numa tampão de bloqueamento (10% de soro de cabra + 3% de BSA) durante 1 hora à temperatura ambiente. O anti-CEA de murganho (concentração final de 10 µg/mL em 3% de BSA) foi adicionado imediatamente após o passo de bloqueamento e incubado de um dia para o outro.

#### EXEMPLO 33 Colocação em contacto do anticorpo primário com agentes oxidantes

Para investigar o efeito de agentes oxidantes no anticorpo primário, diversas soluções de agentes oxidantes (como descritas na Tabela 1) foram adicionadas a metade da placa, durante 30 minutos e depois exaustivamente lavadas com PBS. Os agentes oxidantes utilizadas foram peróxido de hidrogénio, bromo aquoso, permanganato de potássio, dicromato de sódio, solução de I<sub>2</sub>/KI, peróxido de *t*-butilo e hidroperóxido de *t*-butilo. A outra metade da placa foi utilizada como controlo, com incubações de PBS e lavagens paralelas e não foram aplicadas soluções de agentes oxidantes. Para testar o efeito de uma base na sonda, diferentes bases, tais como NaOH, DBU aquoso (diazobiciclo-undeceno) e butilamina aquosa, foram também colocadas em contacto com a placa. O PBS foi aplicado como um agente de controlo.

Todos os poços foram incubados com 50 µL/poço de IgG-Cy3 anti-murganho de cabra ou IgG-Cy5 anti-murganho de cabra (diluição 1:200). Toda a placa foi digitalizada, utilizando o espectrofotómetro Gemini M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Foi digitalizado um total de cinco pontos em cada poço e, depois, calculada a média para obter uma leitura para cada poço. Para o corante Cy3, a fluorescência foi lida a um comprimento de onda de excitação a 544 nm, 580 nm de emissão e 570 nm de exclusão. Para Cy5, 640 nm de Excitação, 675 de Emissão e 665 de exclusão.

A Tabela 1 mostra os valores de fluorescência medidos após aplicação do agente oxidante ao anticorpo primário, como mostrado nas colunas 2 (Cy3) e 4 (Cy5). Os valores na Tabela são intensidade de fluorescência normalizada, isto é, uma razão da intensidade de fluorescência medida para poços colocados em contacto com o agente oxidante, relativamente à intensidade de fluorescência medida para os poços de controlo (sem solução oxidante aplicada), multiplicada por 100. deste modo, um valor próximo de 100% significa que a solução oxidante não tem efeito sobre o anticorpo primário, quando comparada com o seu controlo (sem solução oxidante aplicada).

A Tabela 1 mostra que algum agente oxidante (e. g., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) não tem quase efeito no anticorpo primário ( $P > 0,1$ ), ao passo que noutros casos, a concentração do agente oxidante pode ser variada (e. g., para I<sub>2</sub>/KI), de modo a que o anticorpo primário não seja substancialmente afectado. As bases utilizadas (NaOH e butilamina) apresentaram destruição substancial dos anticorpos primários ao longo de numa variedade de concentrações utilizadas. O PBS não mostrou efeito no anticorpo primário.

#### EXEMPLO 34 Colocação em contacto dos fluoróforos com agentes oxidantes

Para testar o efeito do agente oxidante em células marcadas com fluoróforo, foram adicionadas diversas soluções de agentes oxidantes (como descritas na Tabela 1) a diferentes filas (parte de controlo da placa) durante 30 minutos. A placa foi lida novamente após lavagem exaustiva, como descrito no Exemplo 33.

A Tabela 1 mostra que algum agente oxidante (e. g.,  $H_2O_2$ ) não tem quase efeito no anticorpo primário, mas resulta em perda substancial de propriedades de fluorescência para o corante de cianina. Os dados referidos na Tabela 1 mostram ainda que a destruição de sinal fluorescente funcionou melhor a pH elevado para soluções de  $H_2O_2$ . Como aqui descrito, noutros casos, a concentração do agente oxidante pode ser variada (e. g., para  $I_2/KI$ ), de modo a que o anticorpo primário não seja substancialmente afectado, mas que o seja o corante de cianina. As bases utilizadas (NaOH e butilamina) apresentaram perda substancial de sinal do corante de cianina, mas esta pode ser devida à destruição (ou remoção) do anticorpo primário pela base. O PBS não mostrou efeito no anticorpo primário e no corante de cianina.

Tabela 1 Intensidade de fluorescência normalizada medida após colocação em contacto da placa com diferentes agentes oxidantes.

Solução de Descoloração	Em Cy3 primário (até 6 conjuntos)	Descoloração de Cy3 (até 4 conjuntos)	Em Cy Primário (2 conjuntos)	Descoloração de Cy5 (1 conjunto)
Agentes oxidantes				
3% de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , pH 10	105%	11%	124%	0%
3% de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , pH 5	99%	73%		
Bromo Aquoso	100%	14%		
4% de permanganato de potássio	0%	0%	1%	0%
1% de permanganato de potássio	80%	4%		
4% de dicromato de sódio.2H <sub>2</sub> O	111%	69%	88%	25%
4% de dicromato de sódio.2H <sub>2</sub> O em Ácido acético	213%	10%		
5% de I <sub>2</sub> , 10% de KI	9%	0%	7%	4%
0,5% de I <sub>2</sub> , 1% de KI	82%	10%		
0,05% de I <sub>2</sub> , 0,1% de KI	101%	72%		
3,5% de peróxido de <i>t</i> -butilo em Acetonitrilo	45%	103%	49%	84%

(continuação)

<b>Solução de Descoloração</b>	<b>Em Cy3 primário (até 6 conjuntos)</b>	<b>Descoloração de Cy3 (até 4 conjuntos)</b>	<b>Em Cy Primário (2 conjuntos)</b>	<b>Descoloração de Cy5 (1 conjunto)</b>
3,5% de hidroperóxido de <i>t</i> -butilo	166%	65%	107%	44%
Bases				
NaOH a 0,35 N	17%	11%	14%	
NaOH a 0,1 N	37%	13%	34%	
5% de DBU	40%	12%	40%	
1% de DBU	38%		41%	
5% de Butilaminina	20%	13%	38%	
Controlo				
PBS	108%	79%	91%	96%

#### EXEMPLO 35 Medição do espectro de descoloração de corante

A densidade óptica (D.O.) foi utilizada para monitorizar a destruição de corante. Foram misturados 10 µL de corante com volume igual de solução oxidante e, depois, foram aplicados 2 µL da solução mista no Espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE). A densidade óptica (D.O.) foi lida num gama de espectro variando entre 200 nm e 750 nm. Para o estudo cinético, as medições foram tomadas no tempo 0, 5 min, 15 min e 30 min.

#### EXEMPLO 36 Estudo cinético de destruição de Cy3 e Cy5 com $\text{H}_2\text{O}_2$

Para estudar a cinética de destruição de corante, foi utilizado peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$  a 1,5%, a pH 10) como um agente oxidante e Cy3 e Cy5 como corantes representativos, utilizando o método descrito no Exemplo 36. O espectro de fluorescência da mistura de solução oxidante-corante foi monitorizado, durante um período de 30 minutos. A FIG. 32 mostra o perfil temporal dos espectros de Cy3 e Cy5. Foi observada uma diminuição rápida na D.O., indicando destruição de corante. Em ambos os casos, a incubação de 15 minutos, em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 1,5%, podia praticamente destruir os corantes. Os valores de D.O. no pico de excitação reduziram para 2%, para Cy3 e Cy5 após 15 minutos.

#### EXEMPLO 37 Efeito das concentrações de $\text{H}_2\text{O}_2$ na descoloração de Cy3

Foi testada uma gama de concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  desde 0 até 1,5% e o espectro de absorção foi monitorizado ao longo de 30 minutos, utilizando o método descrito no Exemplo 35. O pH da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi mantido a 10. O Cy3 foi utilizado como um corante e a absorvência foi registada no seu comprimento de onda máximo a 550 nm. Excepto para  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,1%, todas as outras concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mostraram-se muito semelhantes e quase reduziram a absorvência do corante para 5%, no intervalo de 15 minutos, como mostrado na FIG. 33. Não existe diferença estatística entre tratamentos com concentrações de 0,5%, 1% e 1,5% ( $P > 0,1$ ).



#### EXEMPLO 38 Efeito de $H_2O_2$ em diversos fluoróforos

Um painel de corantes fluorescentes foi testado para o efeito de  $H_2O_2$  ( $H_2O_2$  a 3%, pH 10) em diferentes fluoróforos, utilizando o método descrito no Exemplo 35. O espectro de absorção foi monitorizado ao longo de 30 minutos e os valores de absorvência são mostrados na FIG. 34. Os dados aqui mostrados são valores de D.O., ao comprimento de onda de absorção máximo do corante, normalizados para O.D. no tempo 0. A fluoresceína, que é muito sensível à fotodescoloração, foi relativamente estável a este método oxidante. ATTO 496 e Alexa 488 também foram menos sensíveis ao agente oxidante, quando comparados com outros corantes. A FIG. 34 mostra que os corantes podiam ser destruídos utilizando  $H_2O_2$ .

#### EXEMPLO 39 Efeito de $H_2O_2$ em *Quantum Dots* (QD 655)

Foi testada uma gama de concentrações de  $H_2O_2$  (diluição de 20x a 2000x) e o espectro de absorção foi monitorizado ao longo de 30 minutos, utilizando o método descrito no Exemplo 36. O pH da solução de  $H_2O_2$  foi mantido a 10. Os valores de absorvência foram comparados com uma amostra de controlo de uma solução de QD 655, a diferentes concentrações (diluição de 20x a 2000x).

Um solução de conjugado de IgG anti-murganho de cabra de F(ab')<sub>2</sub> Qdot 655 (1  $\mu$ M) foi diluída 10x, 100x ou 1000x com solução de bicarbonato de sódio a 0,775 M (ajustada para pH 10). A cada solução, foi adicionado um volume igual de 6% de peróxido de hidrogénio. Fracções de 100  $\mu$ L de cada, em triplicado, foram colocadas numa placa de microtitulação de 96 poços. As amostras sem peróxido, mas diluídas para a mesma concentração final com água, foram utilizadas como controlos. Foi utilizada uma solução

de bicarbonato diluída 2x como controlo do fundo. A fluorescência foi medida ao longo do tempo, num leitor de placas spectromax M2, utilizando os seguintes parâmetros: 350 nm de Excitação, 655 nm de Emissão e auto-exclusão de 630 nm. Para a menor concentração, foi alcançada redução de 99% em fluorescência após 5 min. No intervalo de 30 min, a fluorescência de todas as amostras de peróxido foi reduzida em >99,5%. A fluorescência de amostras de controlo ficou maioritariamente intacta (>93% para a amostra de menor concentração e ~99% para a amostra de maior concentração).

Foi utilizado três por cento de peróxido de hidrogénio, em tampão bicarbonato (pH 10), para destruir o sinal. Os valores de absorvência foram comparados com uma amostra de controlo de uma solução de QD 655, a diferentes concentrações (diluição de 20x a 2000x). A todas as concentrações de Qdot, a fluorescência foi reduzida para menos de 6% do valor de controlo no intervalo de de 5 minutos, como mostrado na FIG. 35.

#### EXEMPLO 40 Efeito de radicais hidroxilo na fluoresceína

Os espectros de absorção do corante de fluoresceína FAM cadaverina ("FAM-CAD") foram medidos utilizando diferentes condições de agente oxidante para as Amostras 41 (FAM-CAD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (1:1:1), 42 (FAM-CAD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e FeCl<sub>3</sub> (1:1:1)), 43 (FAM-CAD, H<sub>2</sub>O e FeCl<sub>3</sub> (1:1:1)), 44 (FAM-CAD e H<sub>2</sub>O (1:2)). Uma solução de Fluoresceína-cadaverina foi misturada com peróxido de hidrogénio a 9% e uma solução de FeCl<sub>3</sub> a 2% em água, na razão de 1:1:1 em volume. A mistura foi deixada repousar durante 5 minutos. Uma vez que a adição de FeCl<sub>3</sub> altera o pH para altamente ácido e que se sabe que o espectro de fluoresceína é diferente sob condições ácidas, antes da medição do espectro UV/VIS, a

solução foi tornada básica por adição de NaOH a 1 N, filtrada e o seu espectro foi registado. As soluções tratadas de modo semelhante, excepto nos casos em que o peróxido de hidrogénio foi substituído com água ou a solução de  $\text{FeCl}_3$  foi substituída com água, foram utilizadas como controlos. Uma solução em que  $\text{FeCl}_3$  e peróxido de hidrogénio foram substituídos com água, foi também utilizada como outro controlo. Embora na presença de peróxido os espectros tenham um pouco de ruído e a linha de base esteja elevada devido à formação de bolhas, os espectros mostram claramente que enquanto as amostras de controlo não foram afectadas, praticamente toda a fluoresceína foi destruída na amostra de teste. A absorvência reduziu consideravelmente após 5 minutos para a Amostra 42, como mostrado na FIG. 36, indicando que a fluoresceína pode ser destruída por utilização de um agente oxidante para criar radicais hidroxilo.

As formas de realização anteriores são, deste modo, para serem consideradas, em todos os aspectos, ilustrativas em vez de limitativas da invenção aqui descrita. O âmbito da invenção é, assim, indicado pelas reivindicações anexas em vez da descrição anterior e todas as alterações no âmbito e gama de equivalência das reivindicações pretendem estar, deste modo, aí abrangidas.

Lisboa, 2 de Dezembro de 2011

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método de sondagem de múltiplos alvos numa amostra biológica, compreendendo:
  - (a) proporcionar uma amostra biológica contendo múltiplos alvos aderidos a um suporte sólido;
  - (b) ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na amostra;
  - (c) observar um sinal da sonda fluorescente ligada no passo (b);
  - (d) oxidar a sonda fluorescente ligada, com uma solução compreendendo um agente oxidante que inativa substancialmente a sonda fluorescente;
  - (e) ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na amostra do passo (d); e
  - (g) observar um sinal da sonda fluorescente ligada no passo (e).
2. Método da reivindicação 1, em que a solução no passo (d) é uma solução básica.
3. Método da reivindicação 1, em que o passo de oxidação é realizado sem remover mais do que cerca de 20% da sonda fluorescente a partir do alvo aderido ao suporte sólido.
4. Método da reivindicação 1, em que a sonda fluorescente compreende um ligante e um gerador de sinal fluorescente.
5. Método da reivindicação 4, em que o gerador de sinal fluorescente compreende um corante de cianina.

6. Método da reivindicação 1, em que os passos (d)-(f) são repetidos uma ou mais vezes.
7. Método da reivindicação 1, compreendendo ainda a medição de um ou mais valores de intensidade do sinal observado no passo (c) de observação, no passo (f) de observação ou nos passos (c) e (f).
8. Método da reivindicação 7, compreendendo ainda a correlação do valor da intensidade com uma quantidade de alvo presente na amostra.
9. Método da reivindicação 4, em que o gerador de sinal fluorescente no passo (b) é o mesmo que o gerador de sinal fluorescente no passo (e).
10. Método da reivindicação 4, em que o gerador de sinal fluorescente no passo (b) é diferente do gerador de sinal fluorescente no passo (e).
11. Método da reivindicação 1, em que os sinais observados no passo (c) e no passo (f) são ambos detectáveis no mesmo comprimento de onda de detecção.
12. Método da reivindicação 1, em que o sinal observado no passo (c) ou no passo (f) são independentemente detectáveis a um comprimento de onda diferente de detecção.
13. Método de sondagem de múltiplos alvos numa amostra biológica, compreendendo:

- (a) proporcionar uma amostra biológica contendo múltiplos alvos aderidos a uma membrana;
- (b) ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na amostra;
- (c) observar um sinal da sonda fluorescente ligada no passo (b);
- (d) oxidar a sonda fluorescente ligada, com uma solução compreendendo um agente oxidante que inactiva substancialmente a sonda fluorescente;
- (e) ligar, pelo menos, uma sonda fluorescente a um ou mais alvos presentes na amostra do passo (d); e
- (g) observar um sinal da sonda fluorescente ligada no passo (e).

14. Método da reivindicação 13, compreendendo ainda a separação de múltiplos alvos por electroforese antes do passo (a).

Lisboa, 2 de Dezembro de 2011

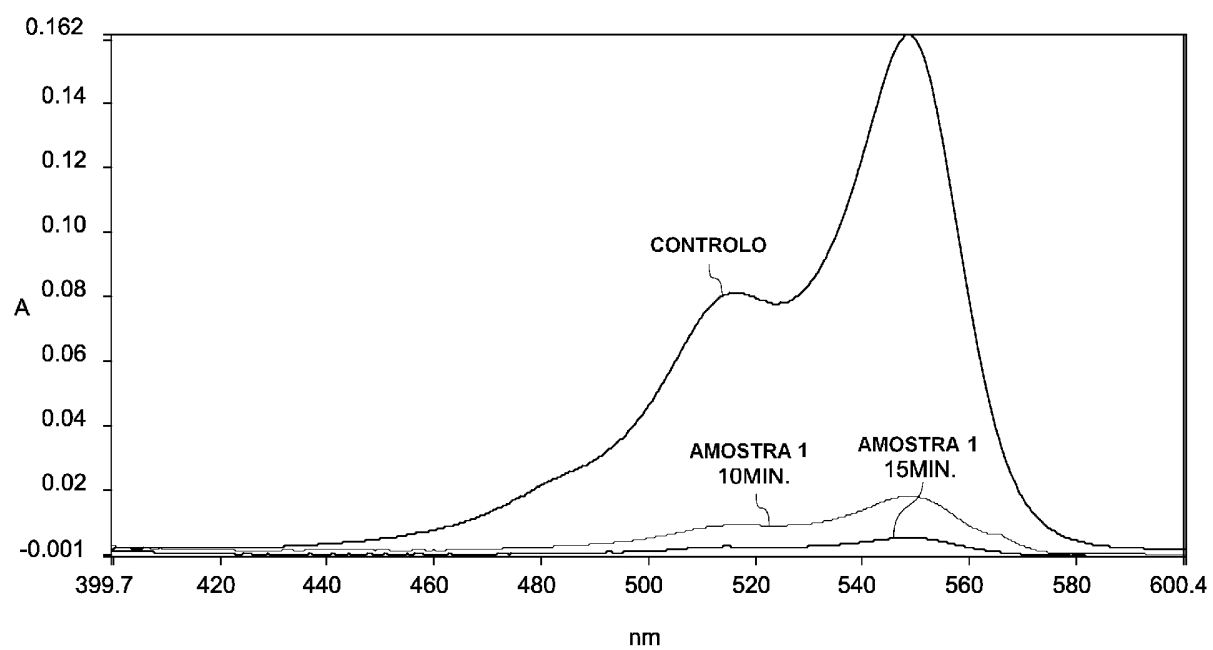


FIG. 1

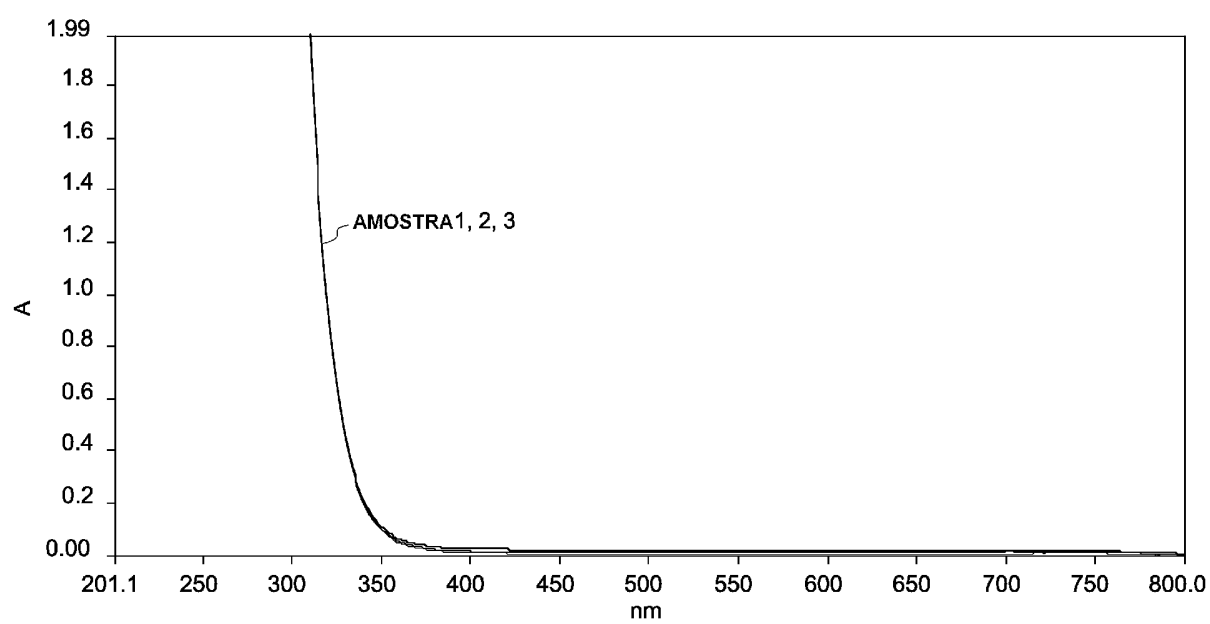


FIG. 2



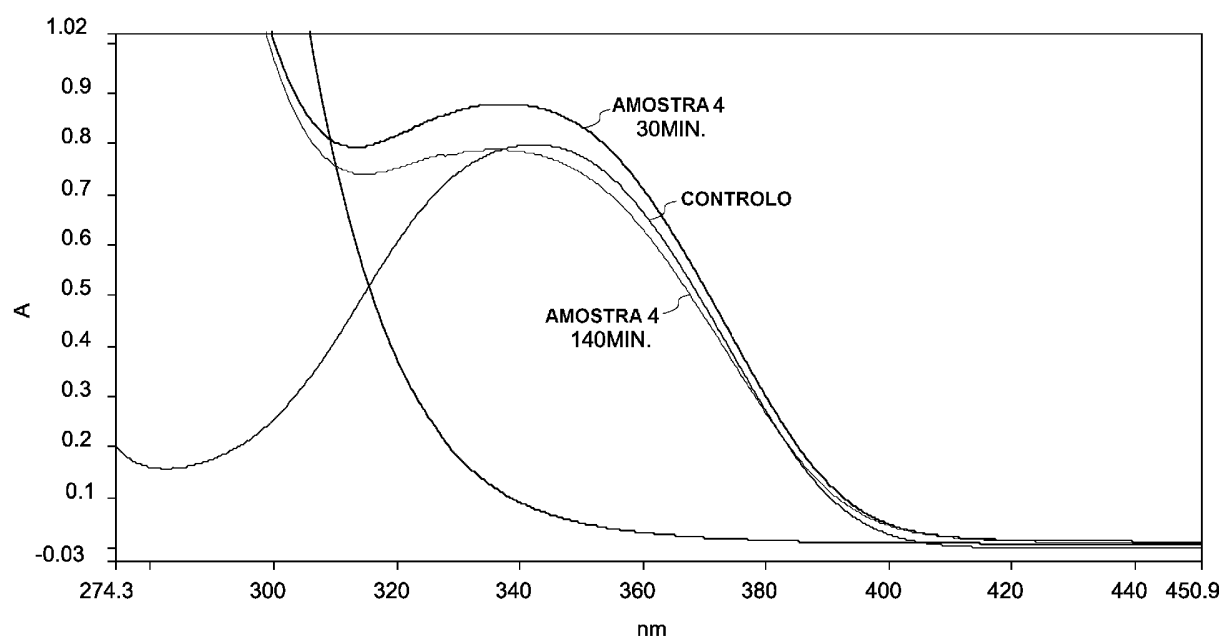


FIG. 3

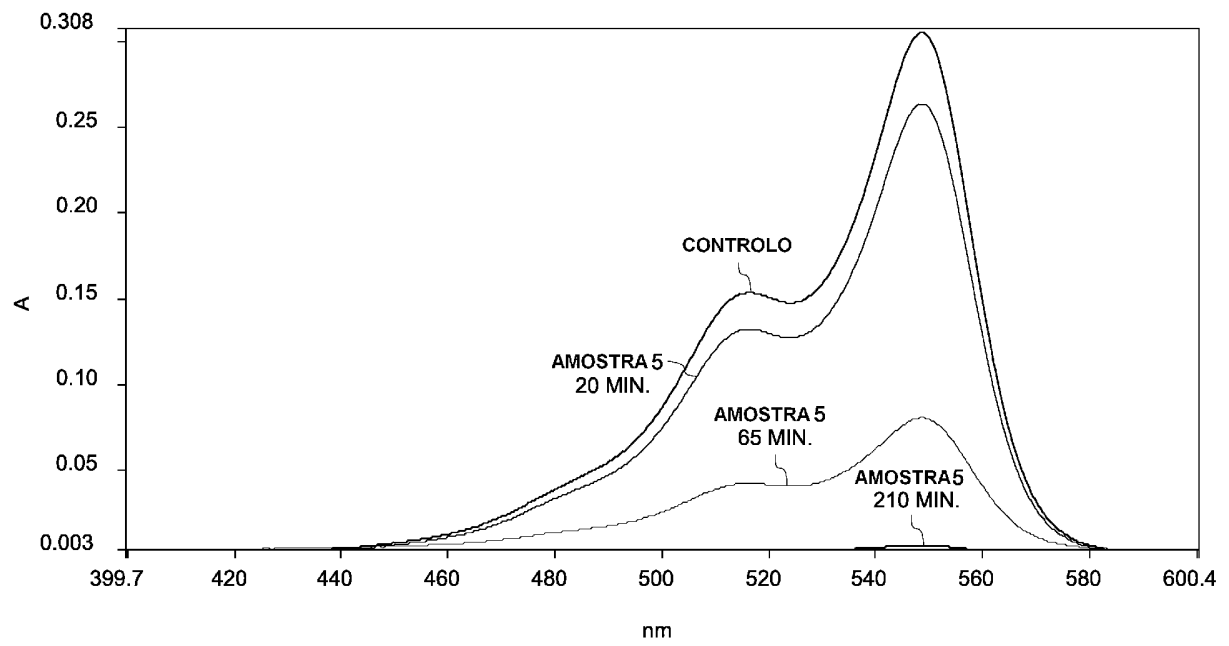


FIG. 4

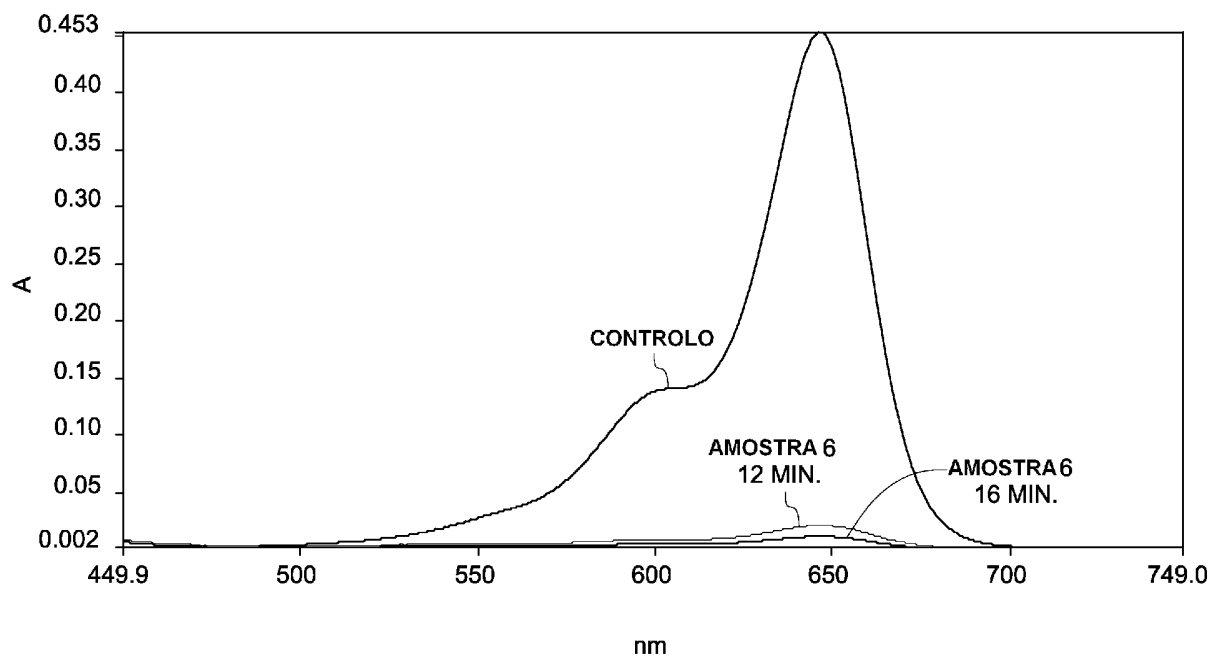


FIG. 5

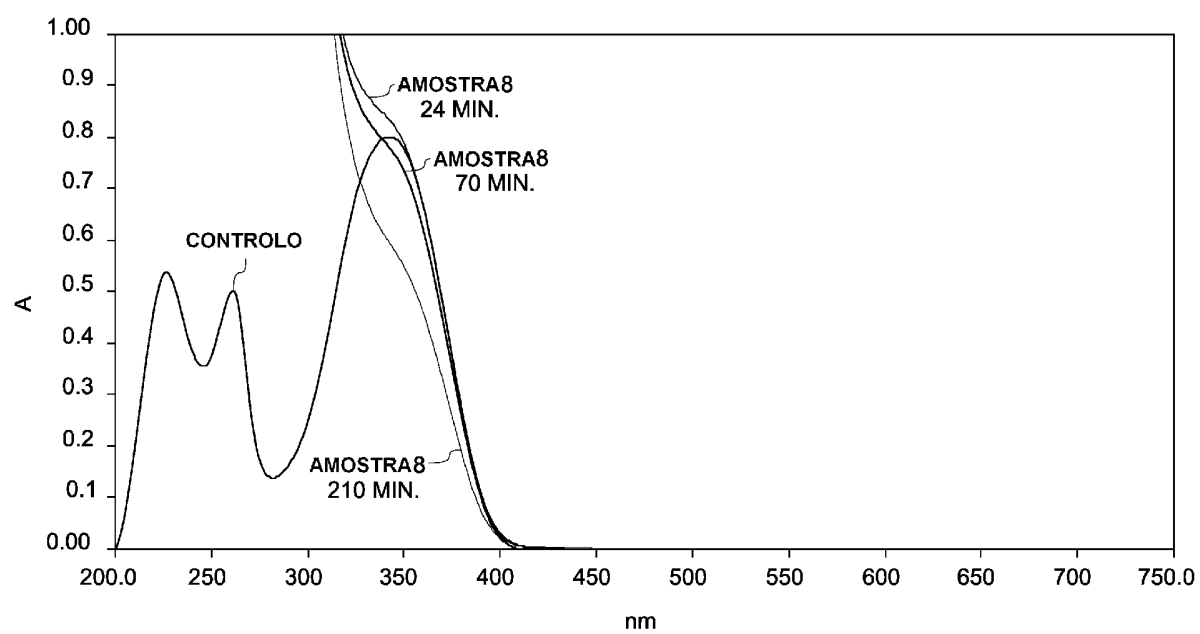


FIG. 6

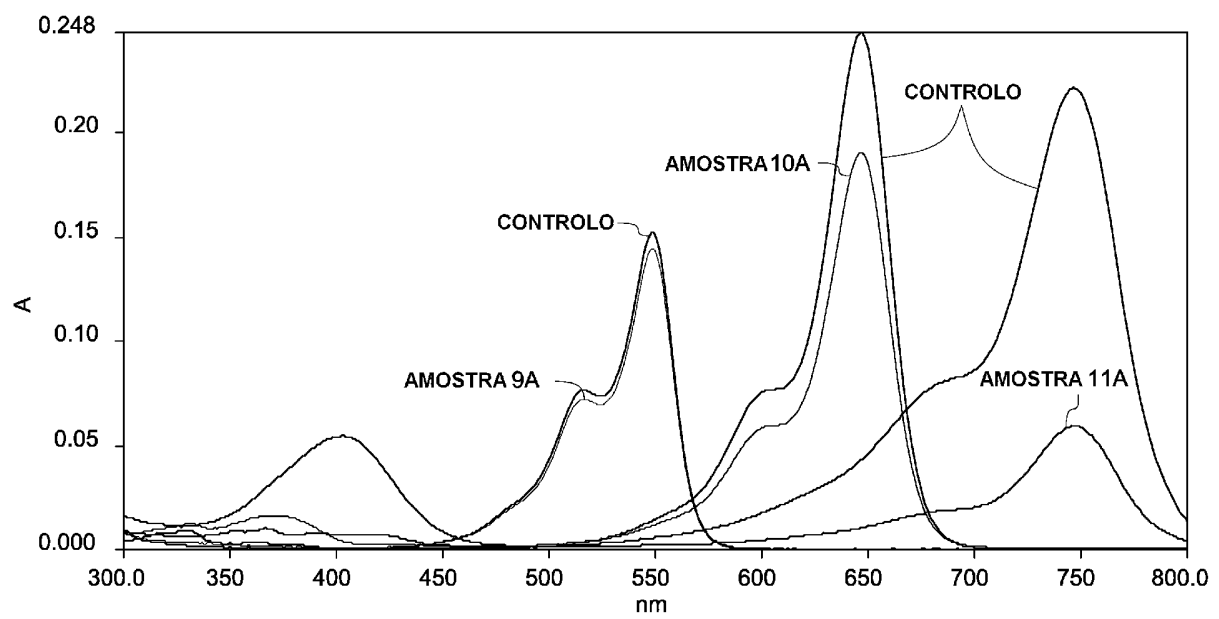


FIG. 7

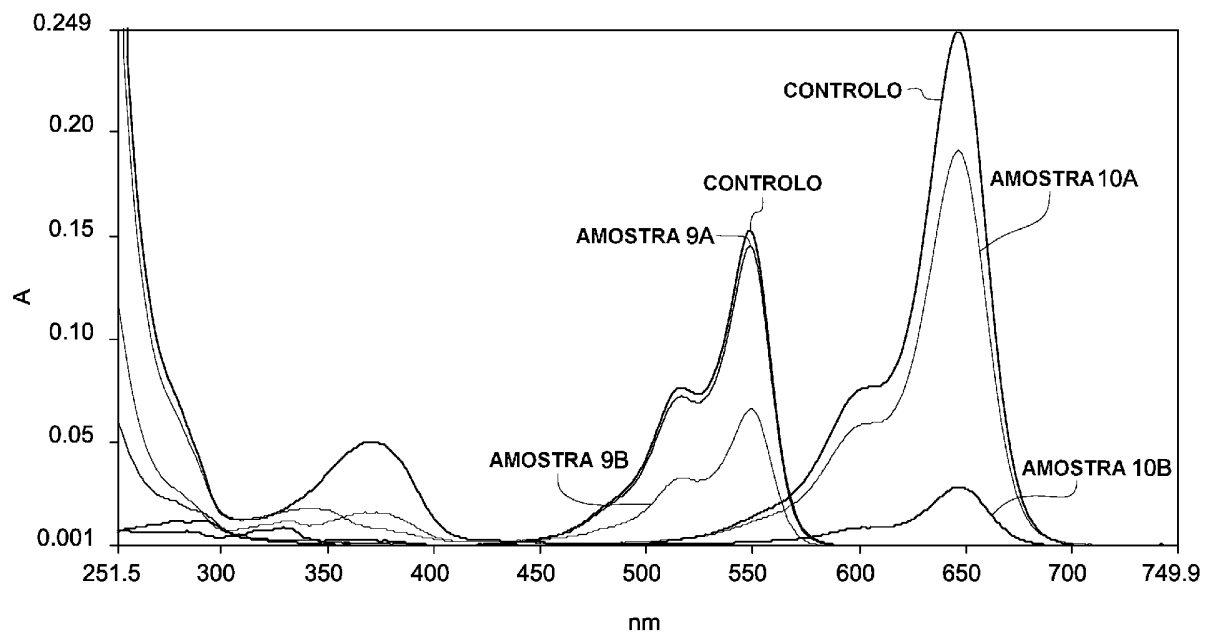


FIG. 8

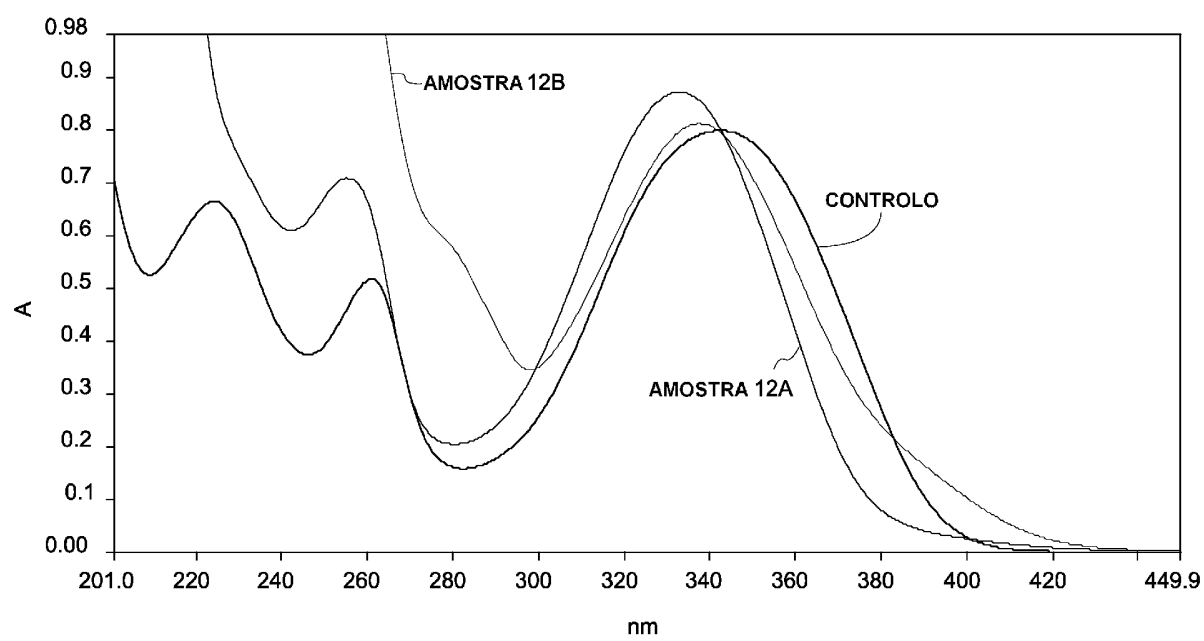


FIG. 9

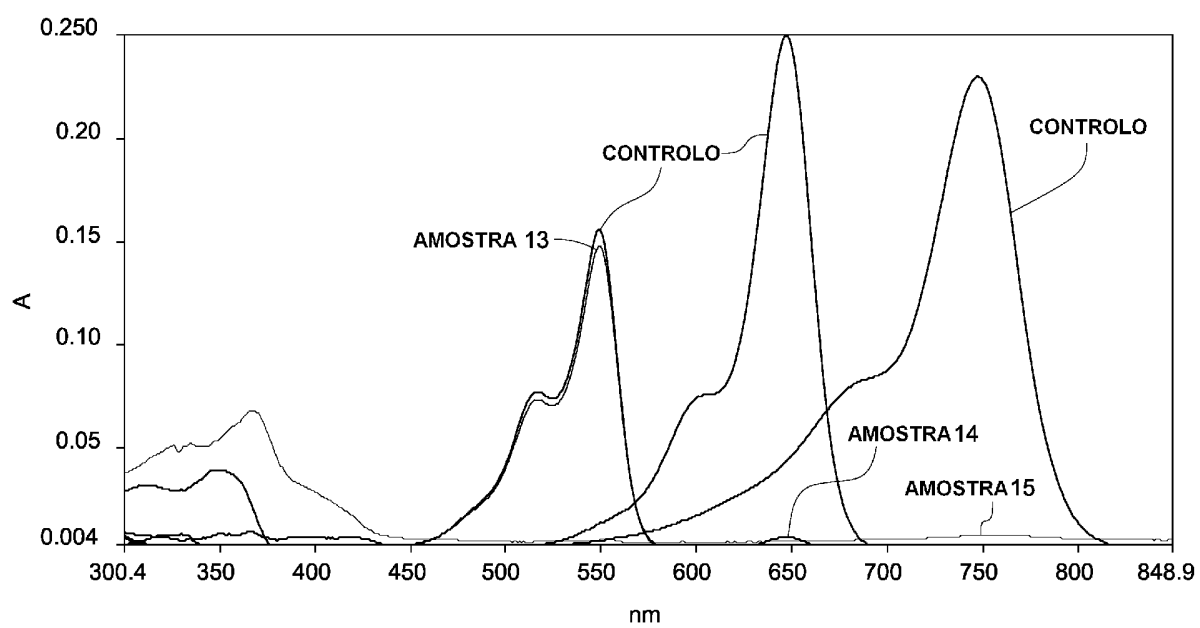


FIG. 10



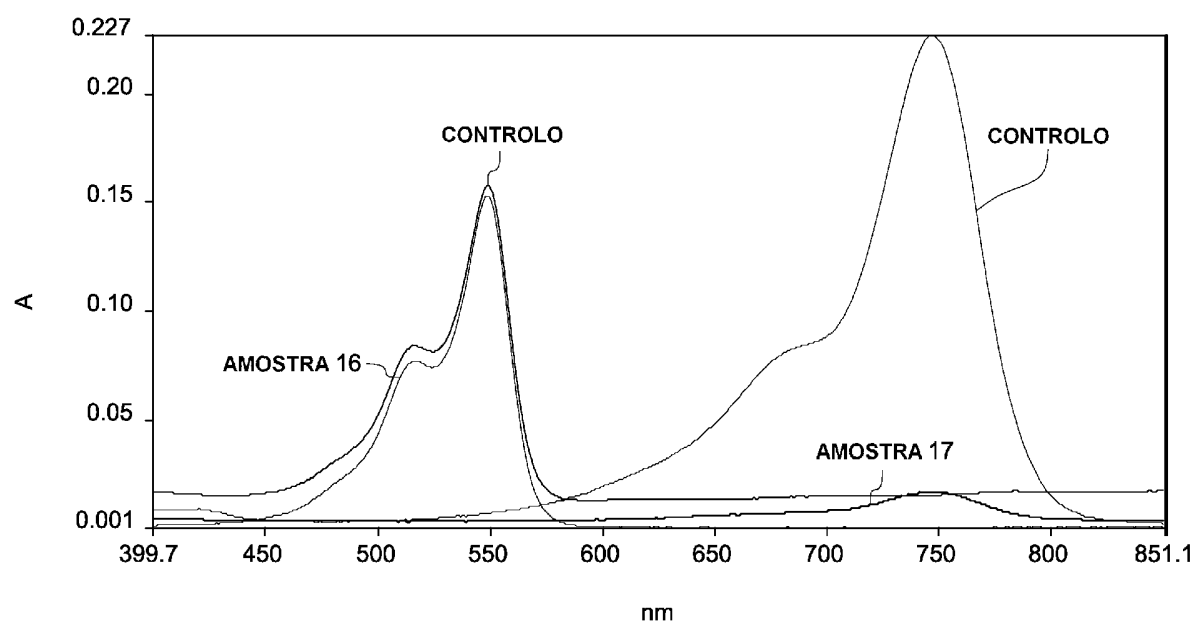
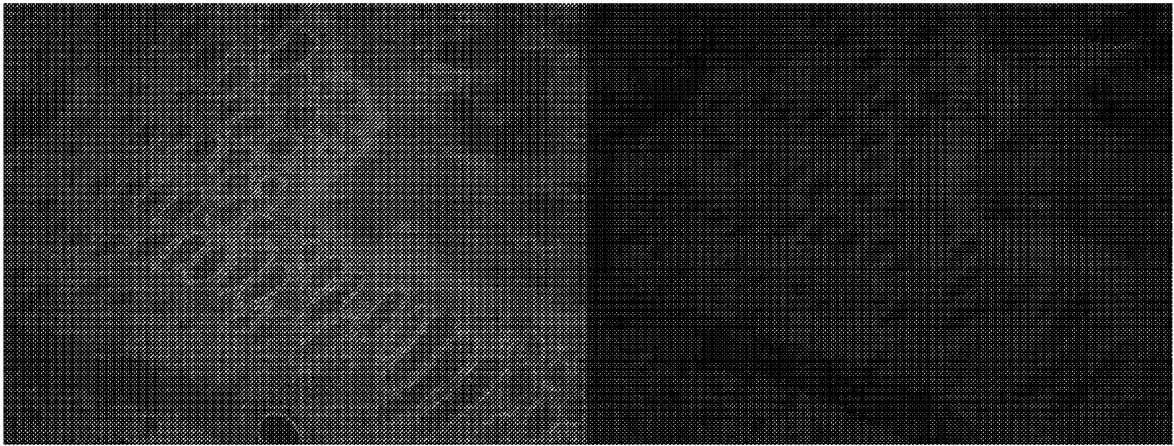


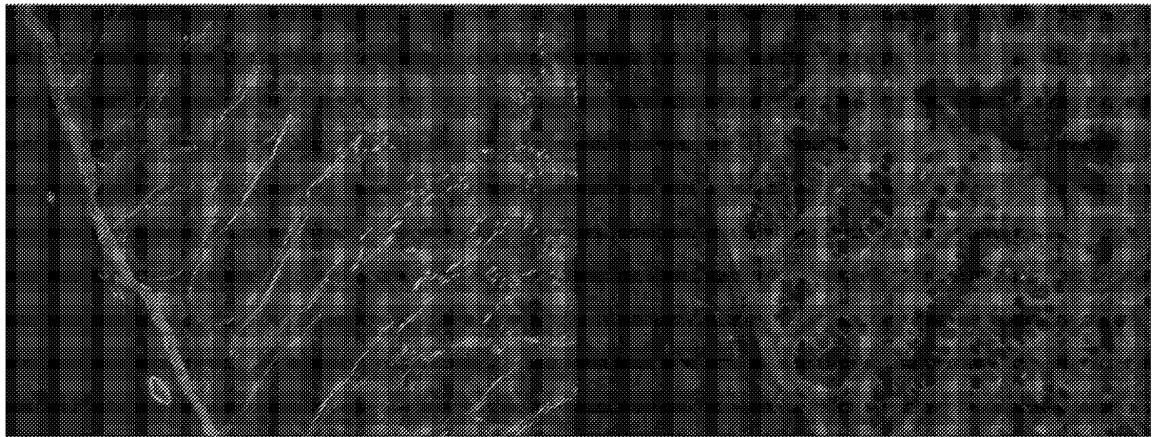
FIG. 11



AMOSTRA 18A

AMOSTRA 18B

FIG. 12



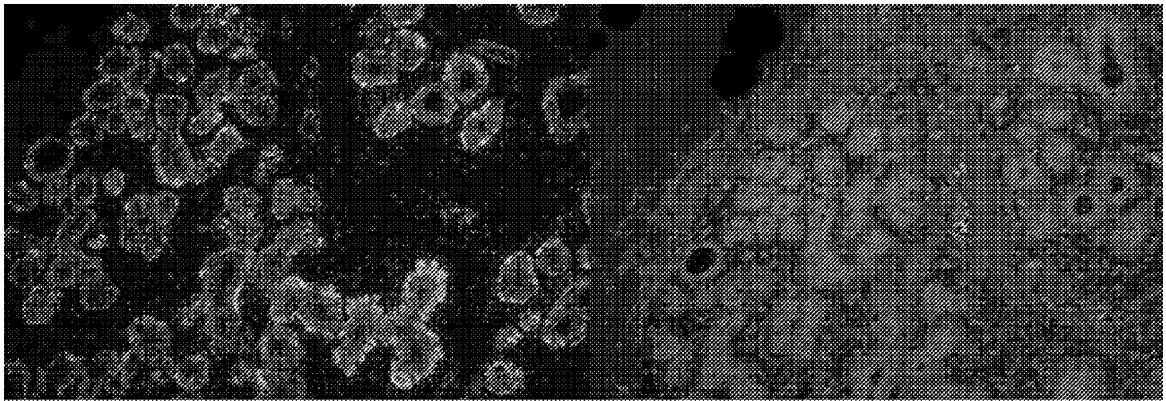
AMOSTRA 19A

AMOSTRA 19B

FIG. 13

AMOSTRA 20A

AMOSTRA 20B



AMOSTRA 20C

AMOSTRA 20D

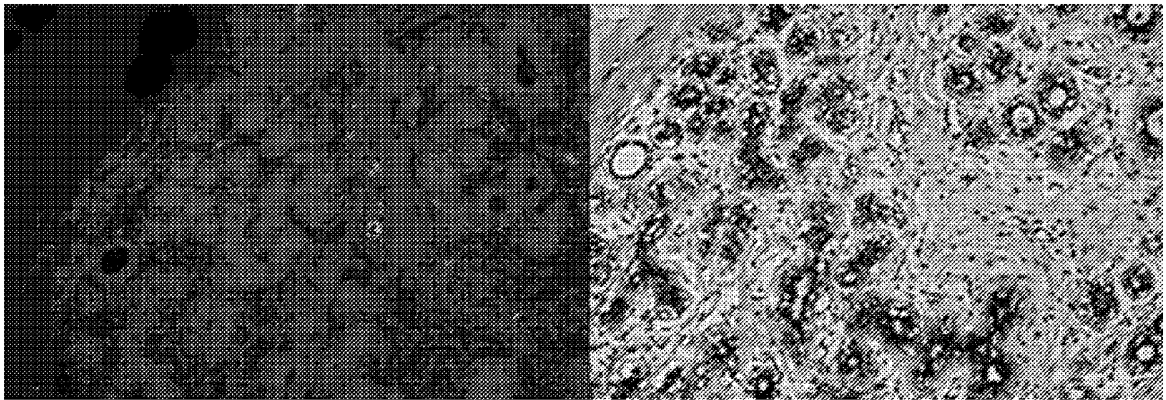
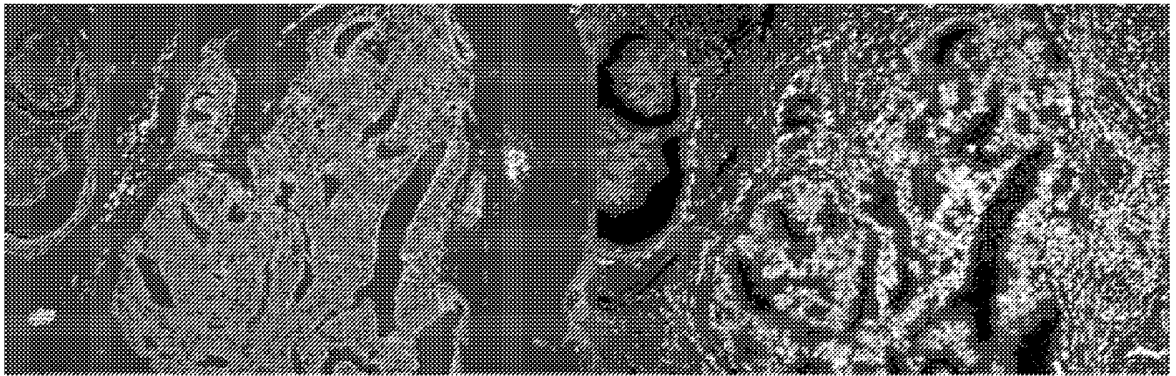


FIG. 14

AMOSTRA 21A

AMOSTRA 21B



AMOSTRA 21C

AMOSTRA 21D

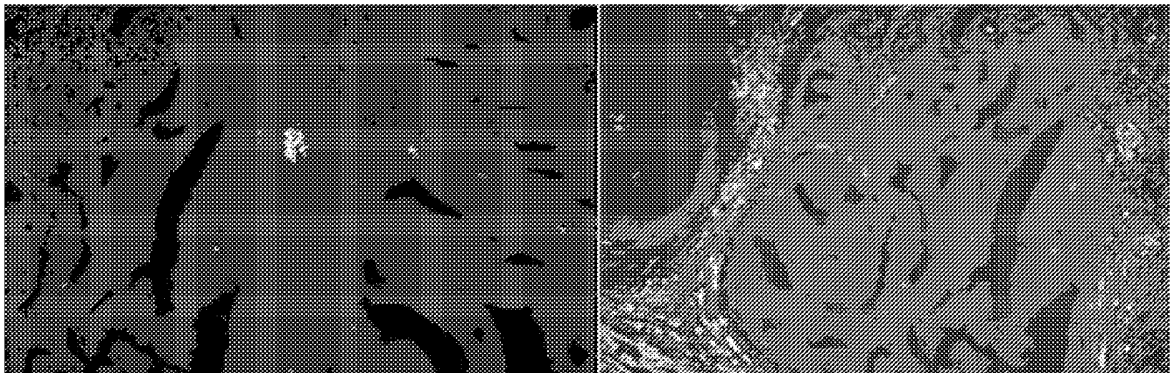
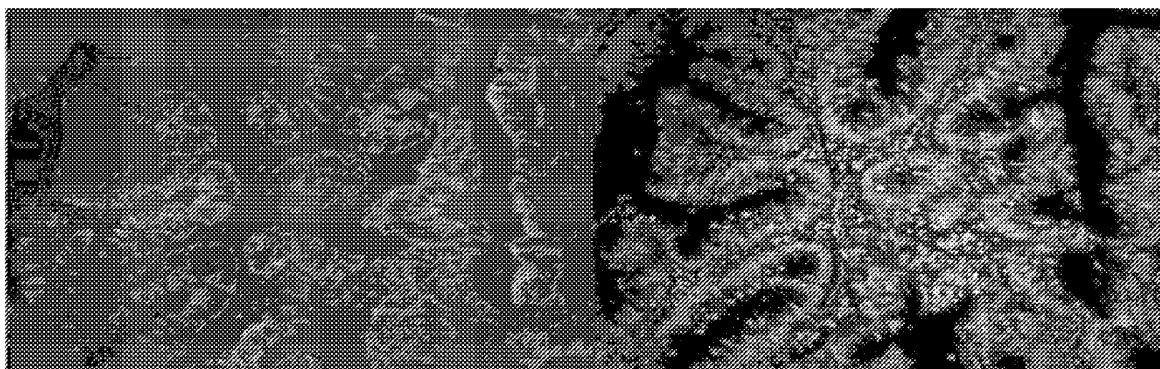


FIG. 15

AMOSTRA 22A

AMOSTRA 22B



AMOSTRA 22C

AMOSTRA 22D

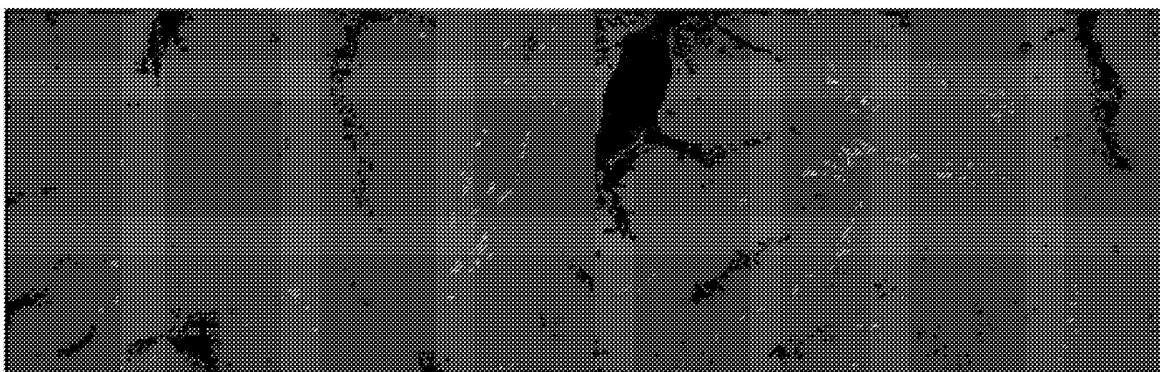
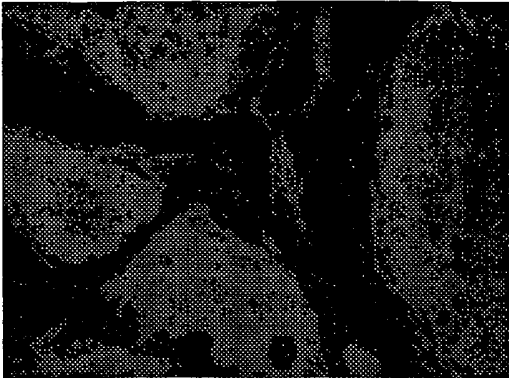
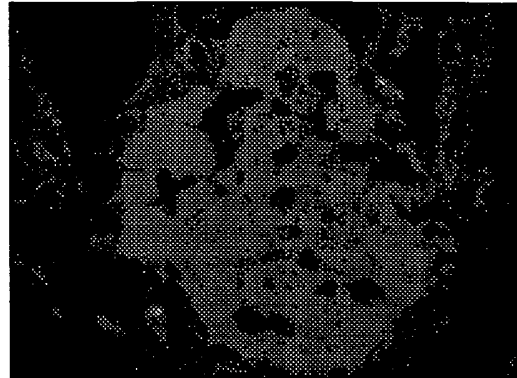


FIG. 16

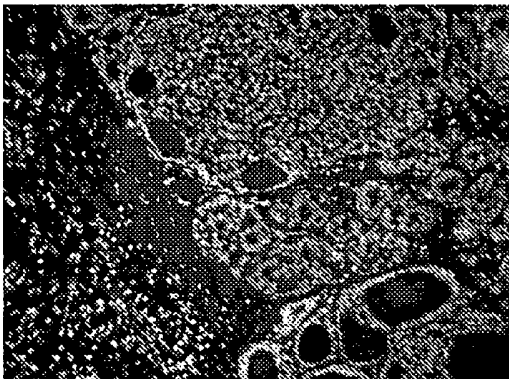
AMOSTRA 23A  
canal DAPI



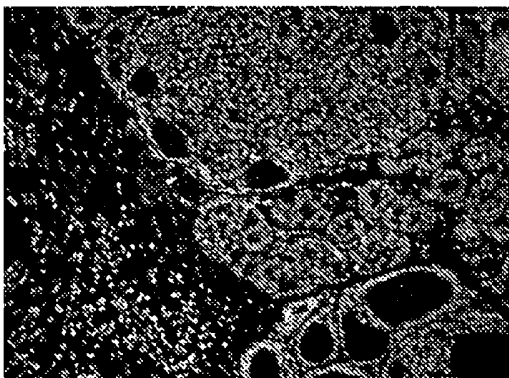
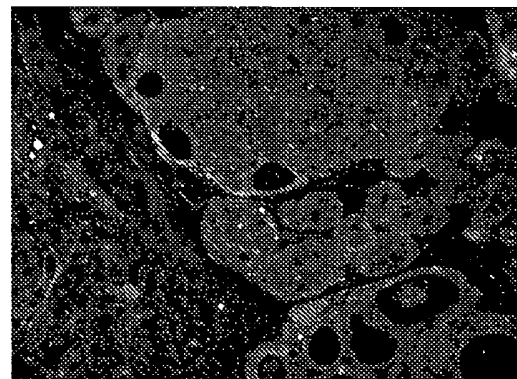
AMOSTRA 23A  
canal Cy3



AMOSTRA 23B



AMOSTRA 23D



AMOSTRA 23C

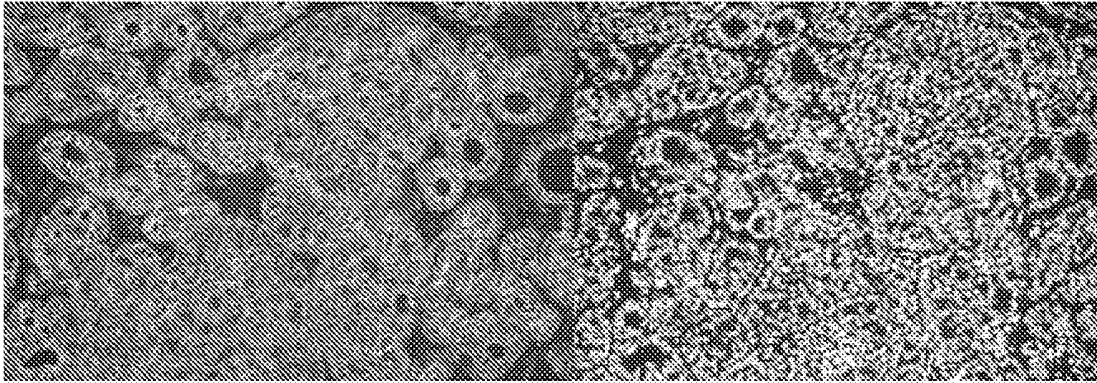


AMOSTRA 23E

FIG. 17

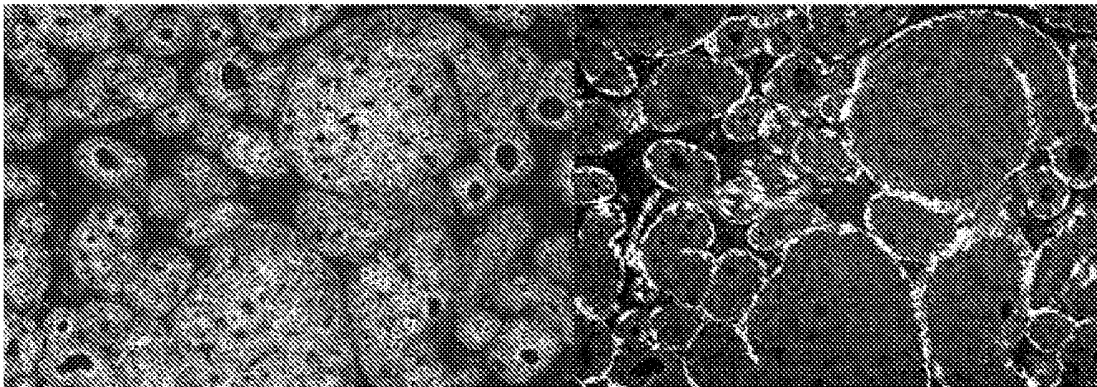
AMOSTRA 24A

AMOSTRA 24B



AMOSTRA 24C

AMOSTRA 24D



AMOSTRA 24E

AMOSTRA 24F

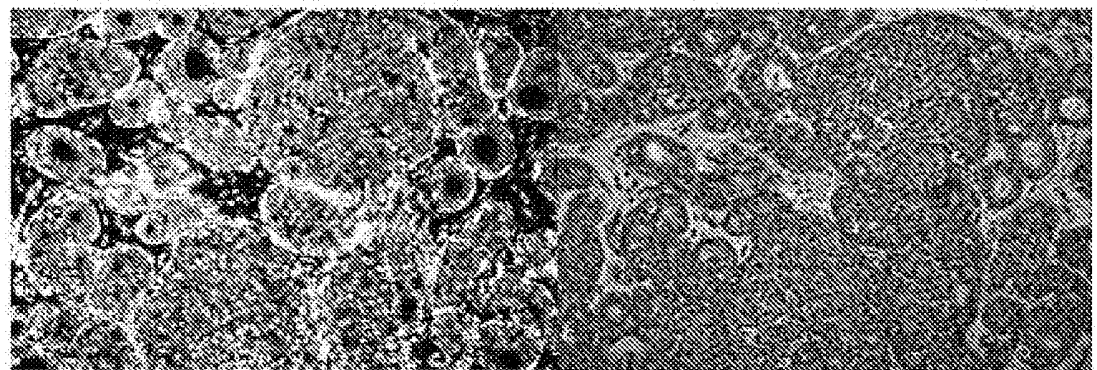


FIG. 18



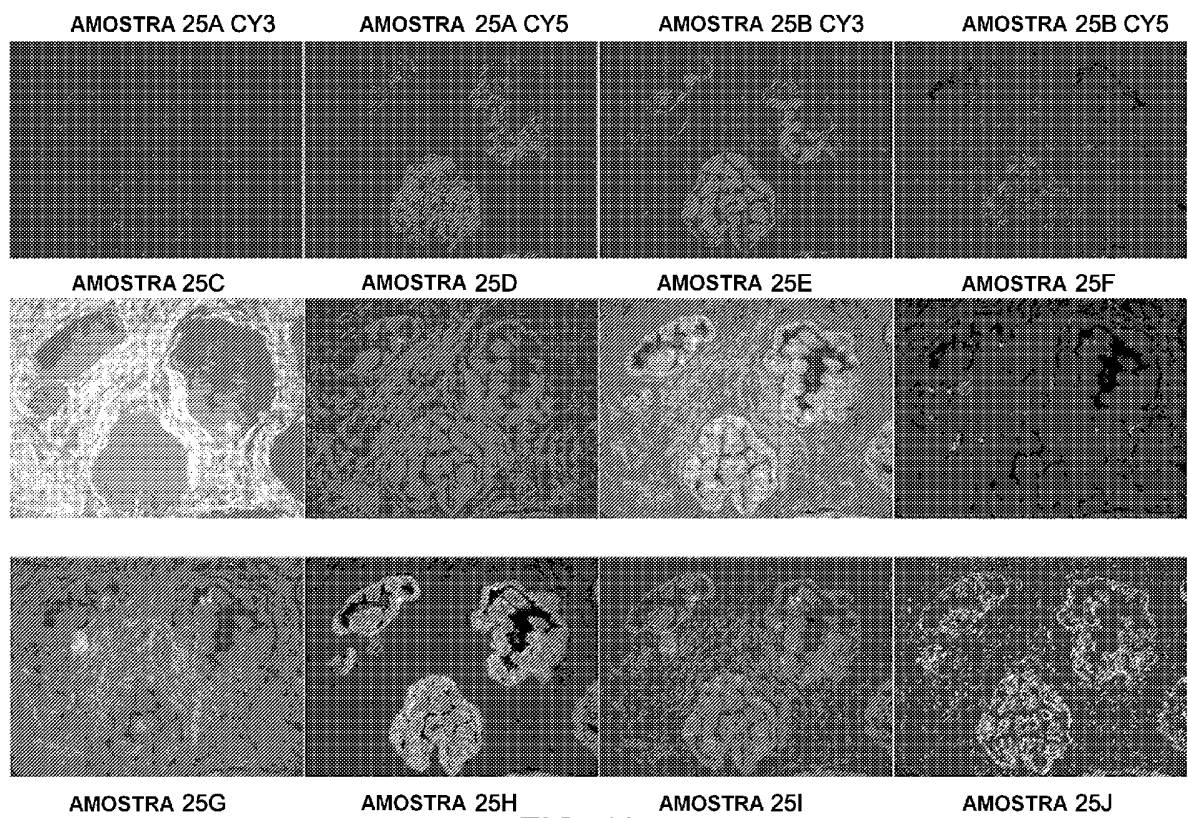


FIG. 19

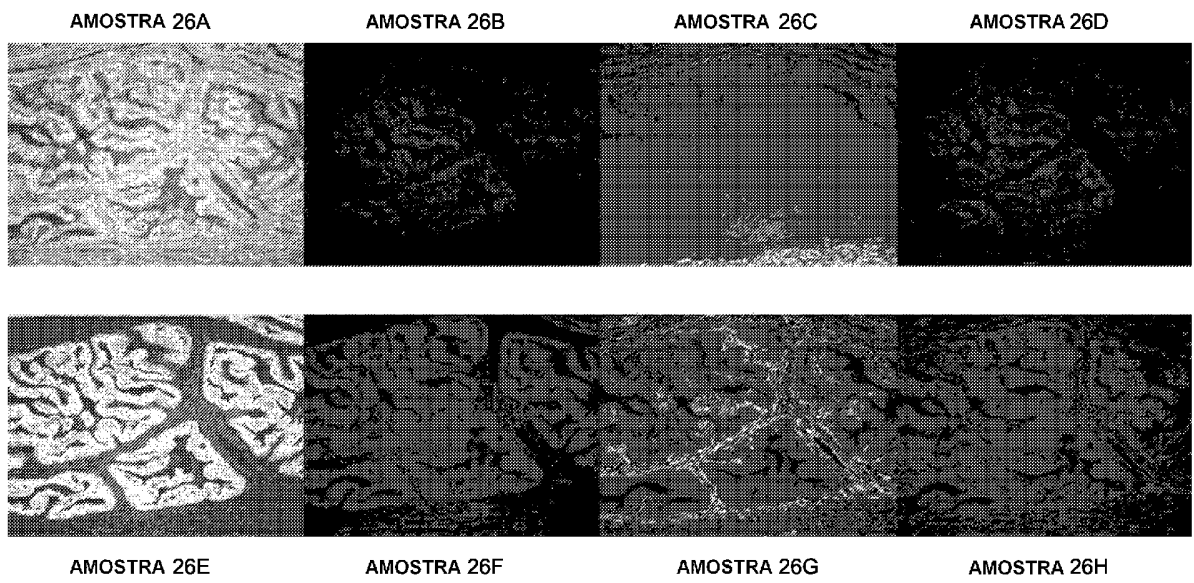


FIG. 20



FIG. 21

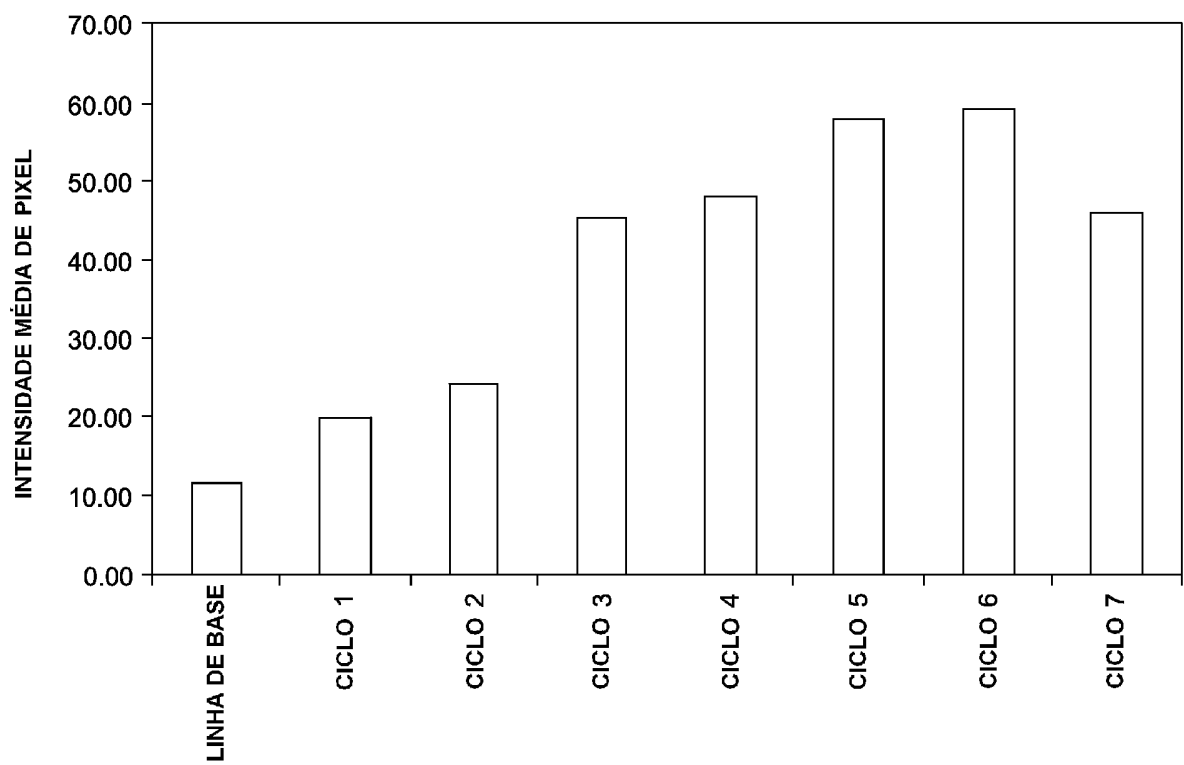


FIG. 22

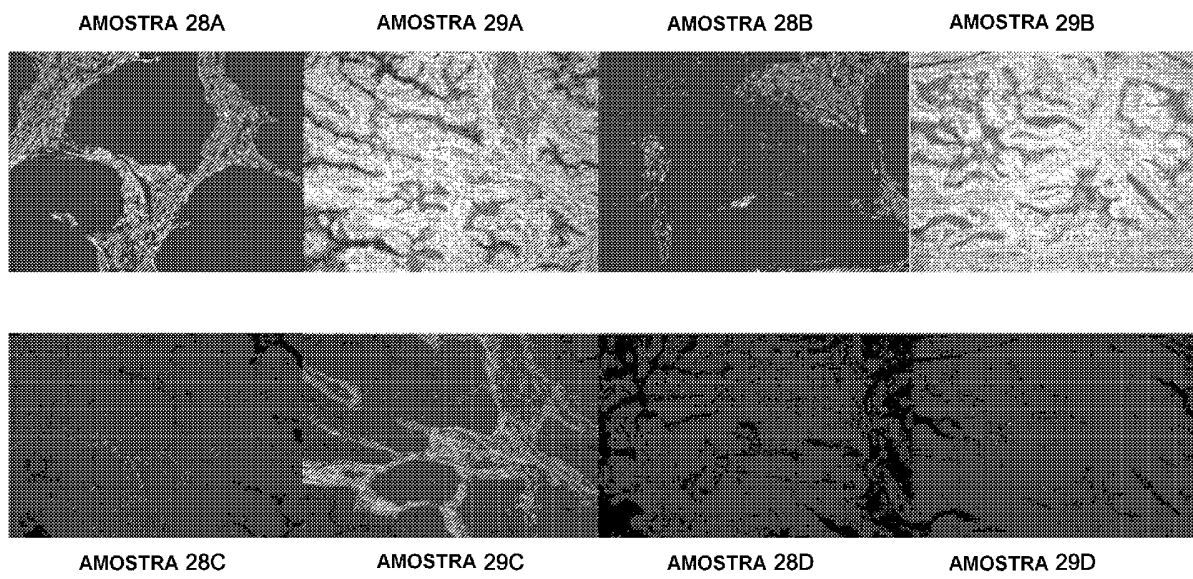
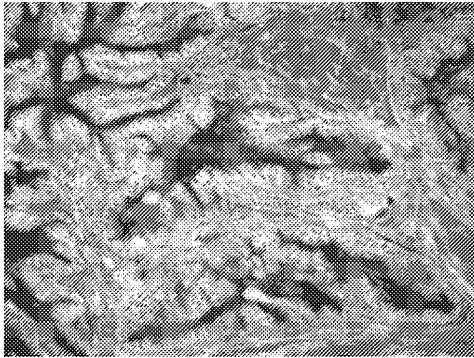
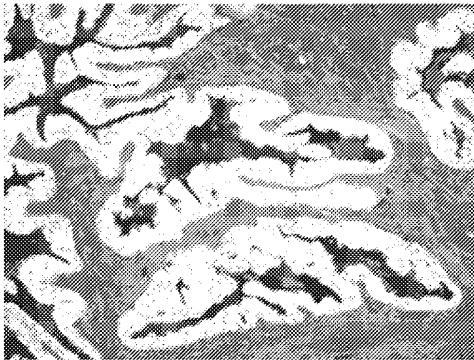
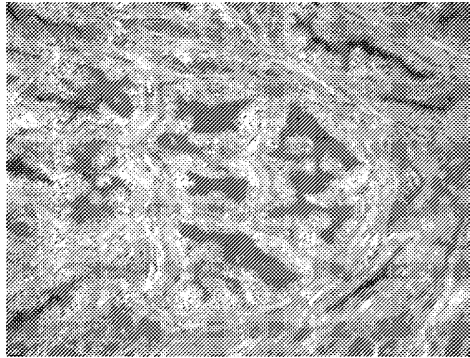


FIG. 23

AMOSTRA 30A



AMOSTRA 30B



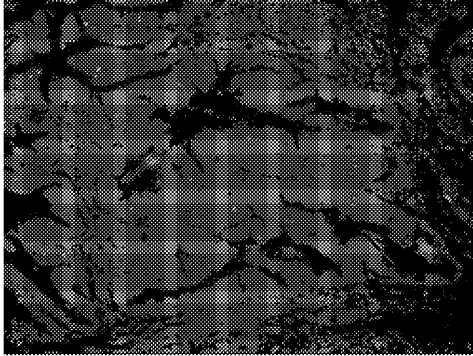
AMOSTRA 30C



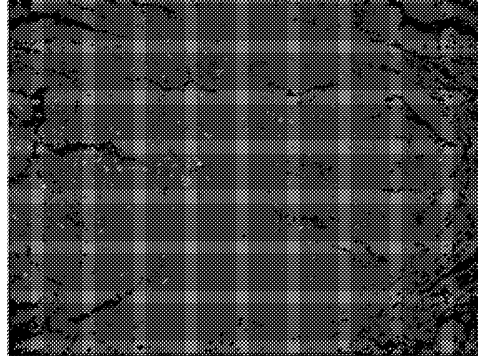
AMOSTRA 30D

FIG. 24

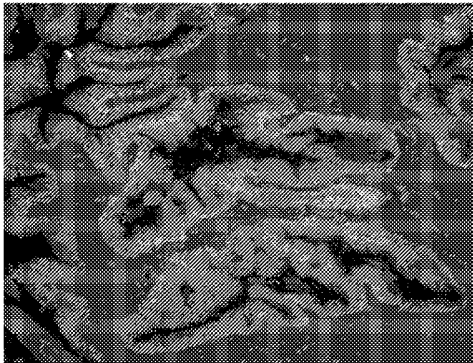
AMOSTRA 30E



AMOSTRA 30F



AMOSTRA 30C



AMOSTRA 30D

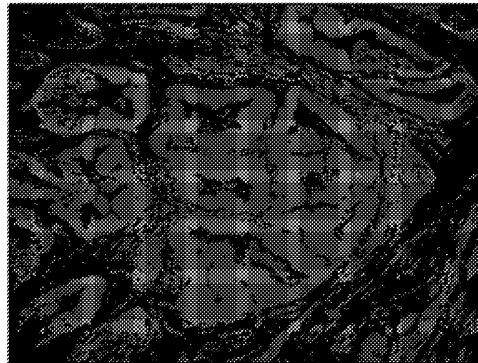


FIG. 25

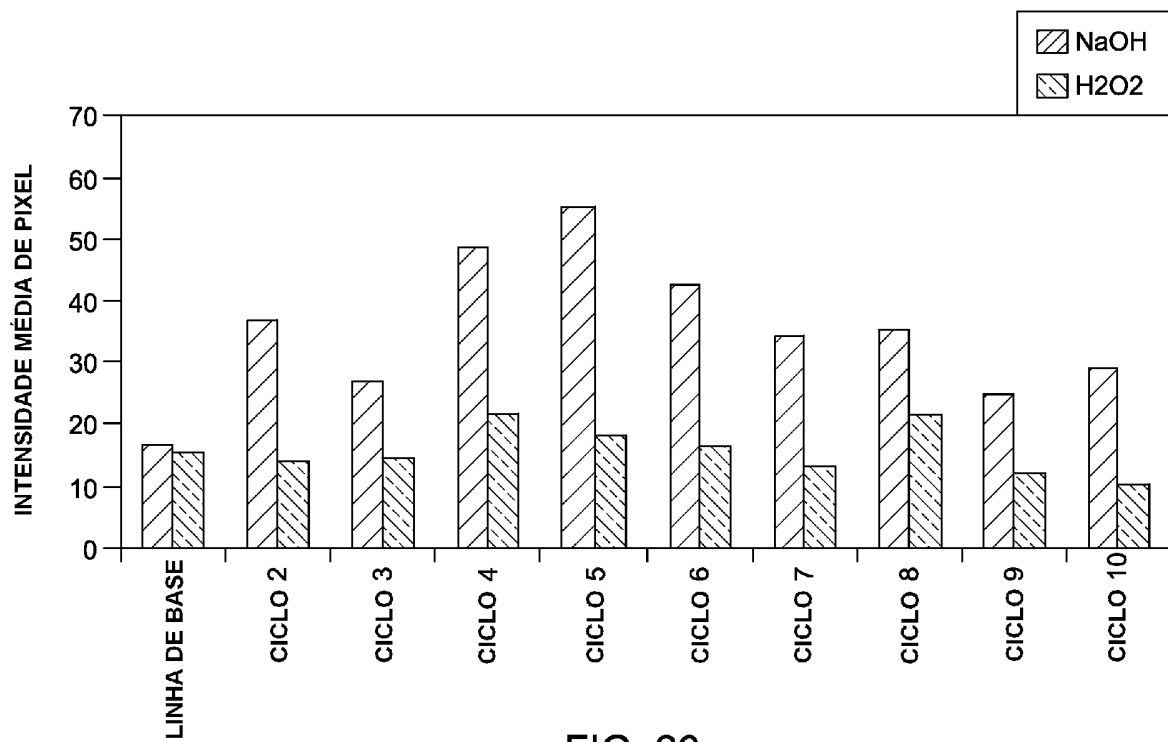
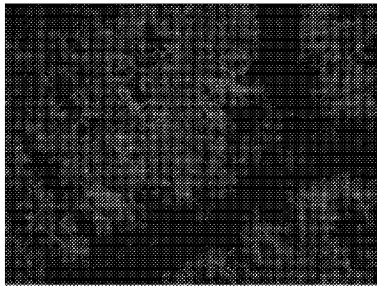
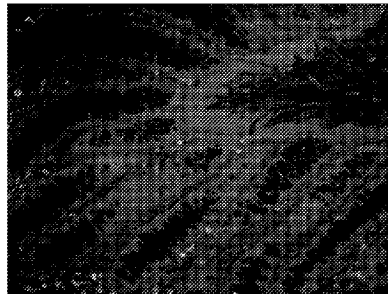


FIG. 26





AMOSTRA 31A

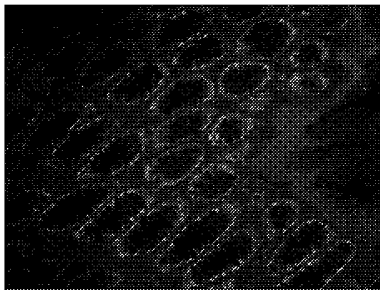


AMOSTRA 31B



AMOSTRA 31C

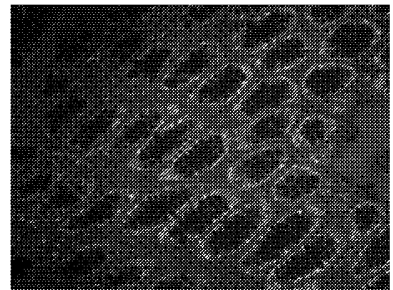
FIG. 27



AMOSTRA 32A

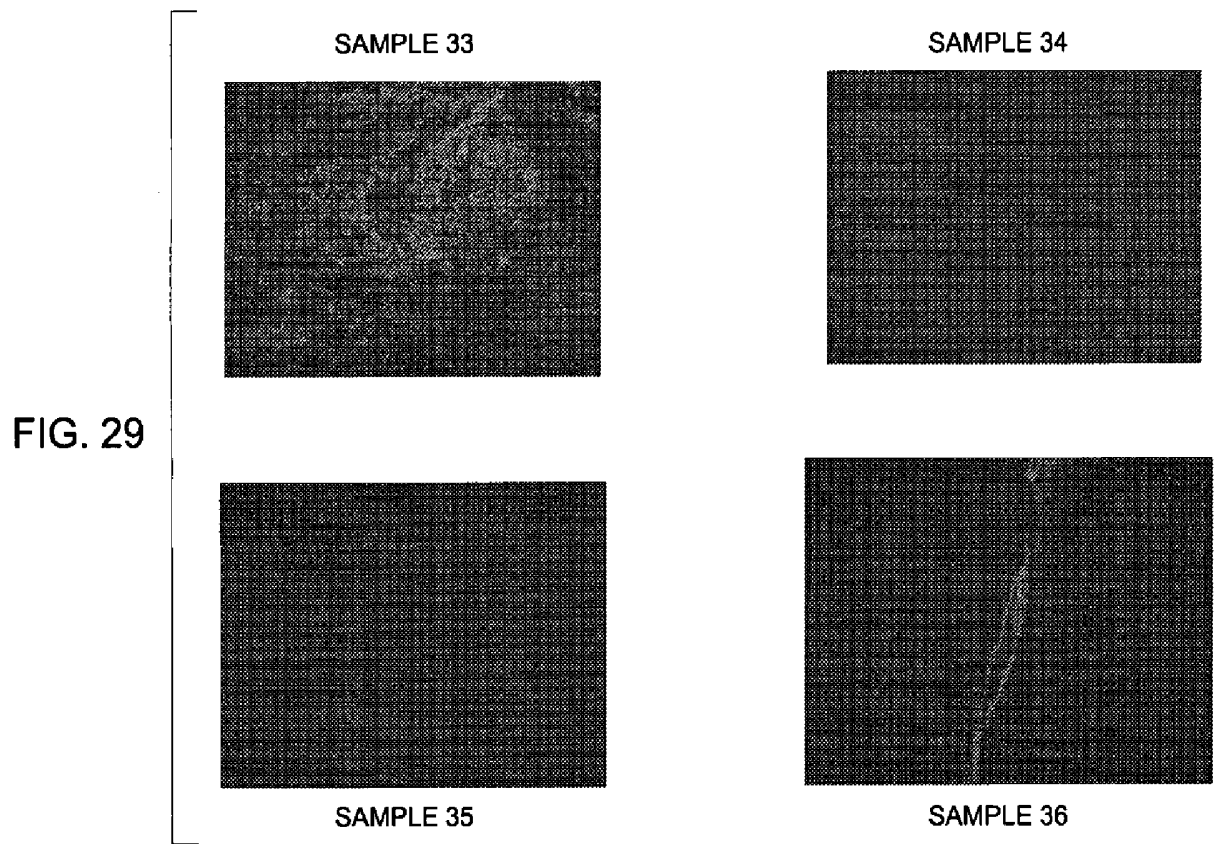


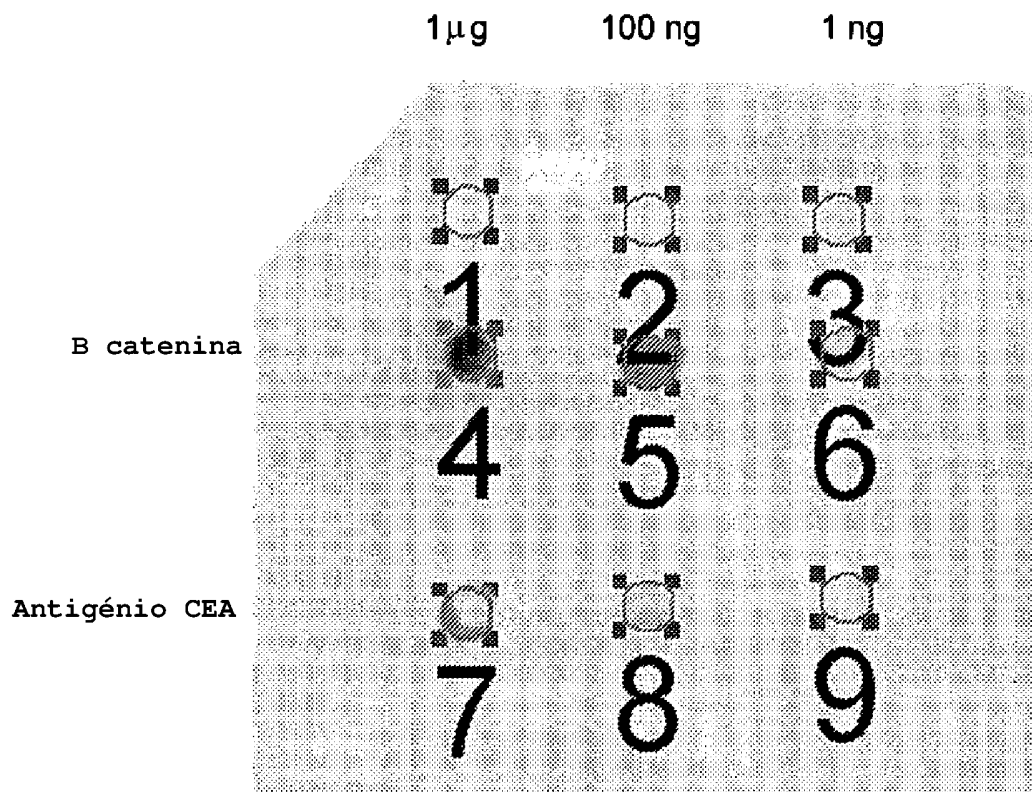
AMOSTRA 32B



AMOSTRA 32C

FIG.28





AMOSTRA 40

FIG. 30

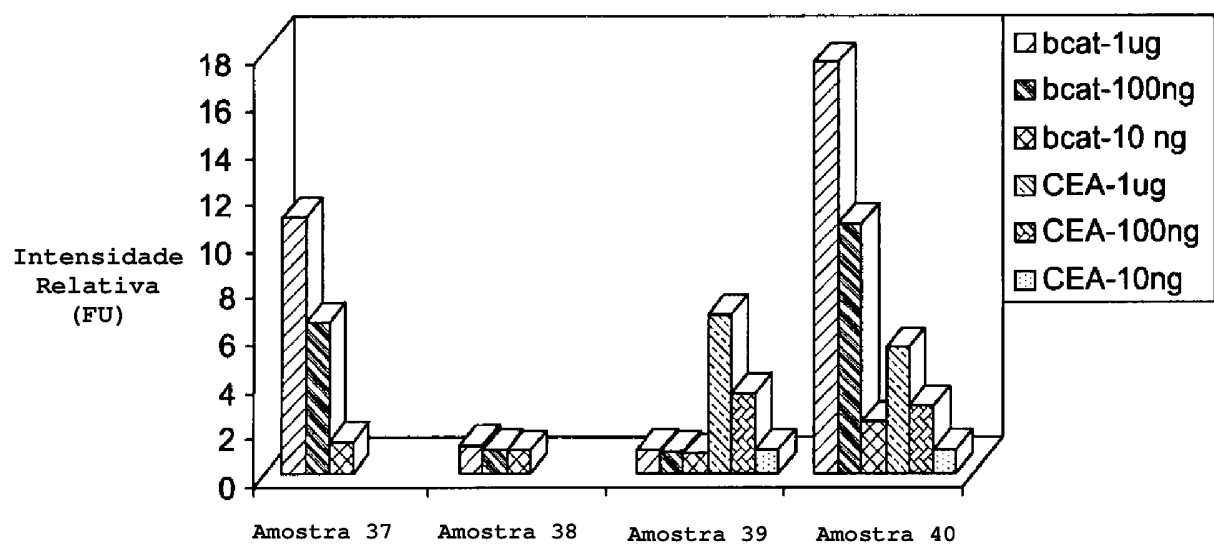


FIG. 31

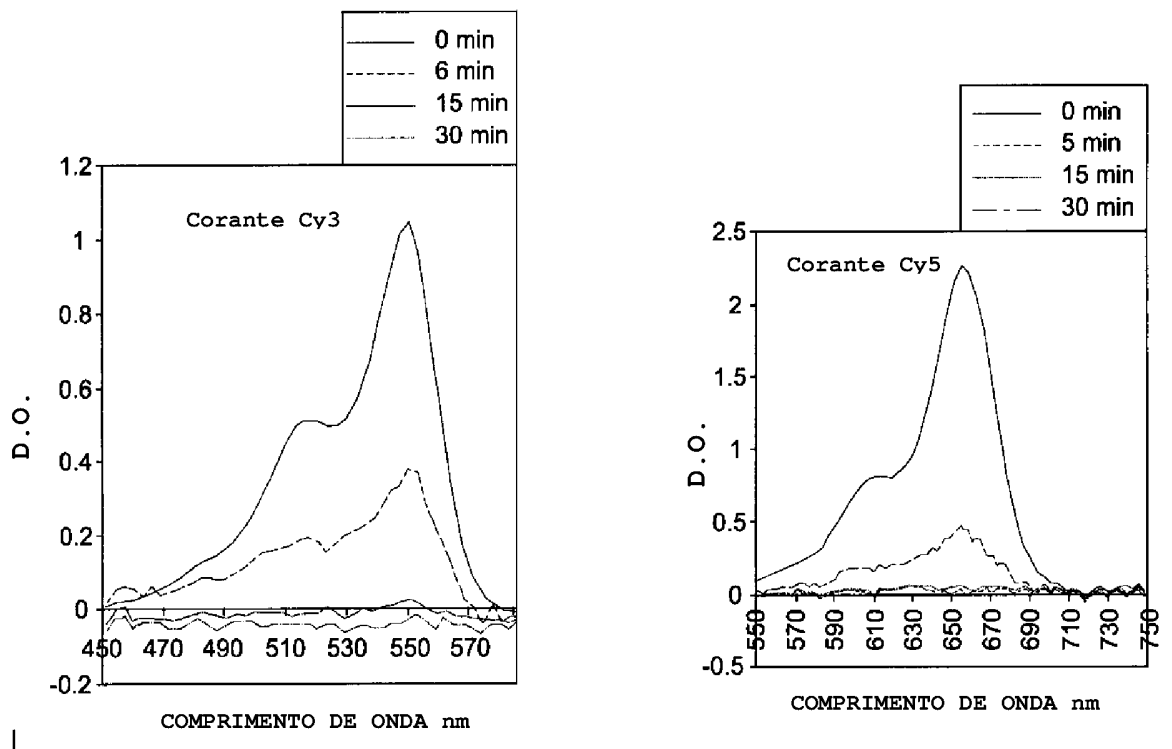


FIG. 32

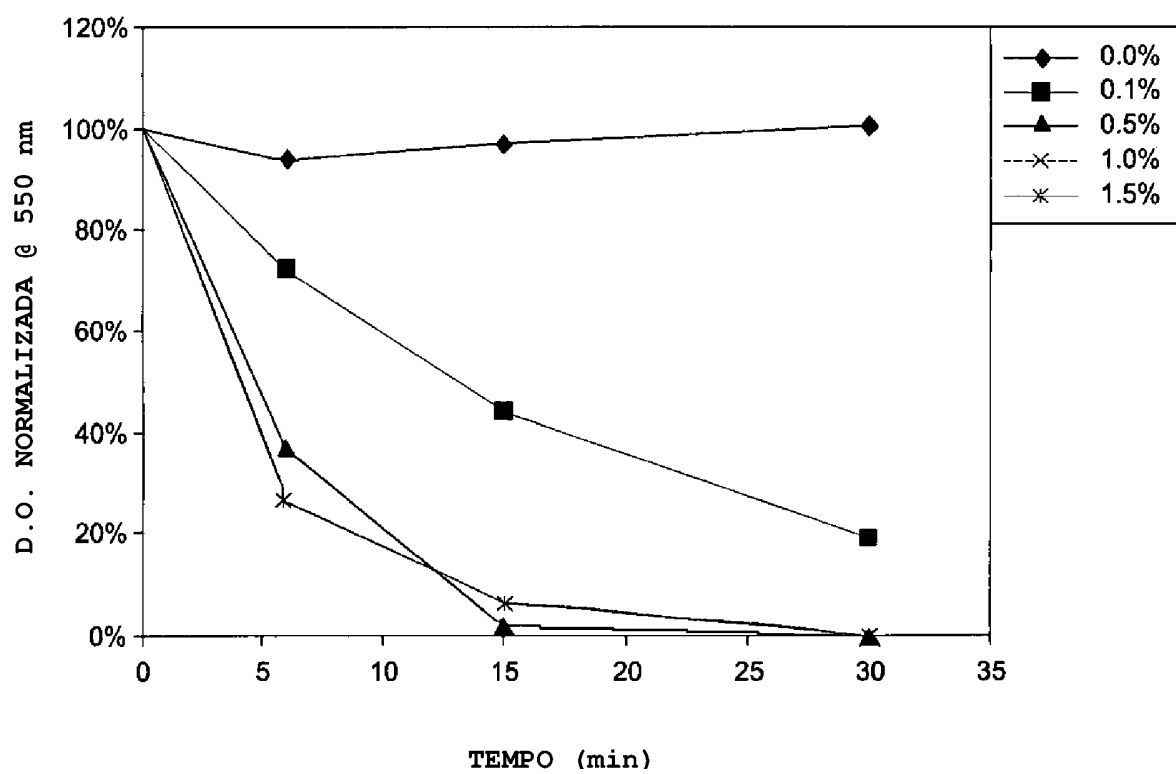


FIG. 33

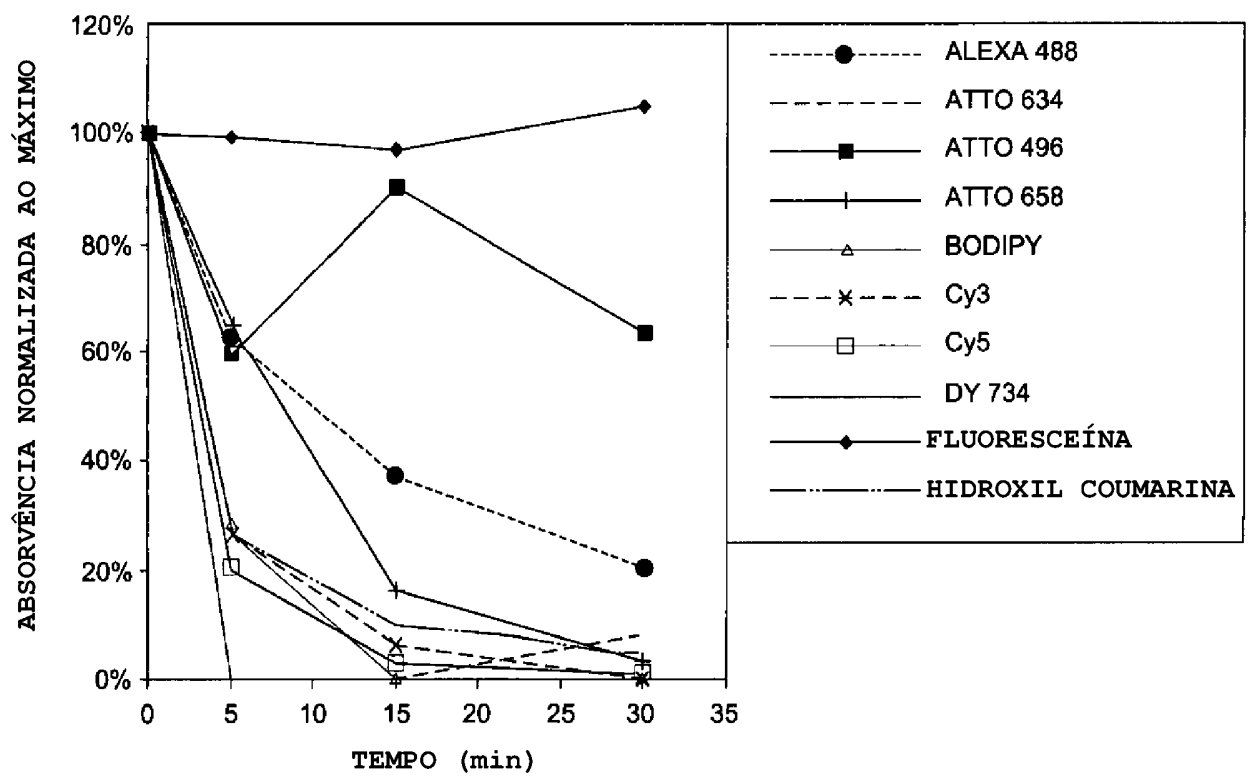


FIG. 34



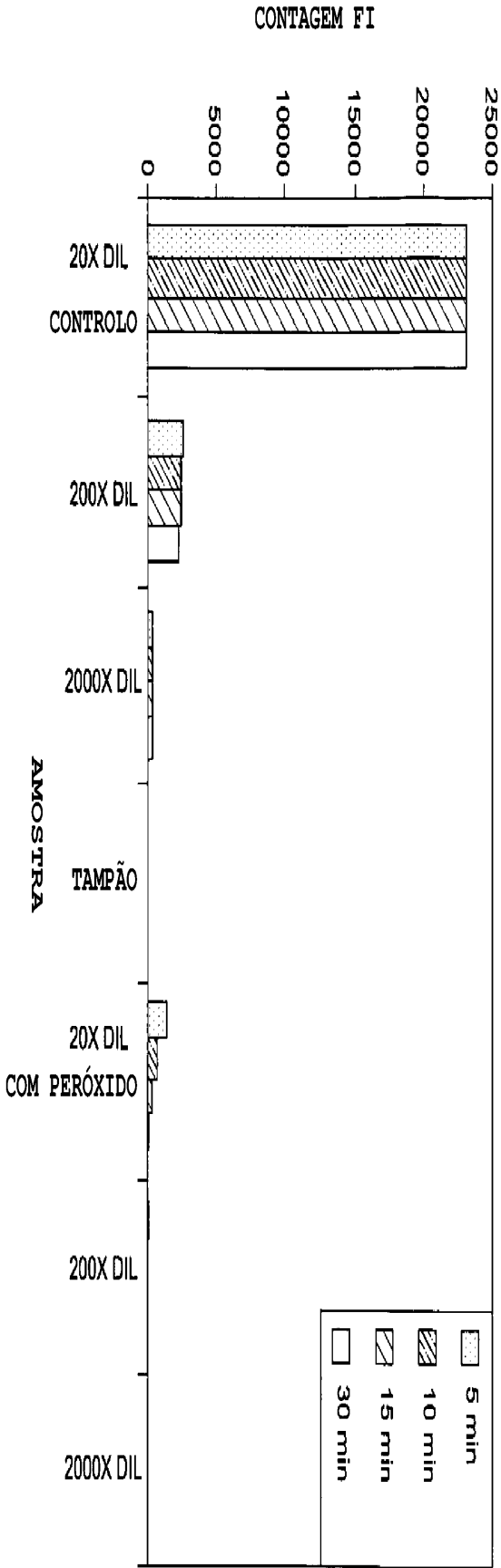


FIG. 35

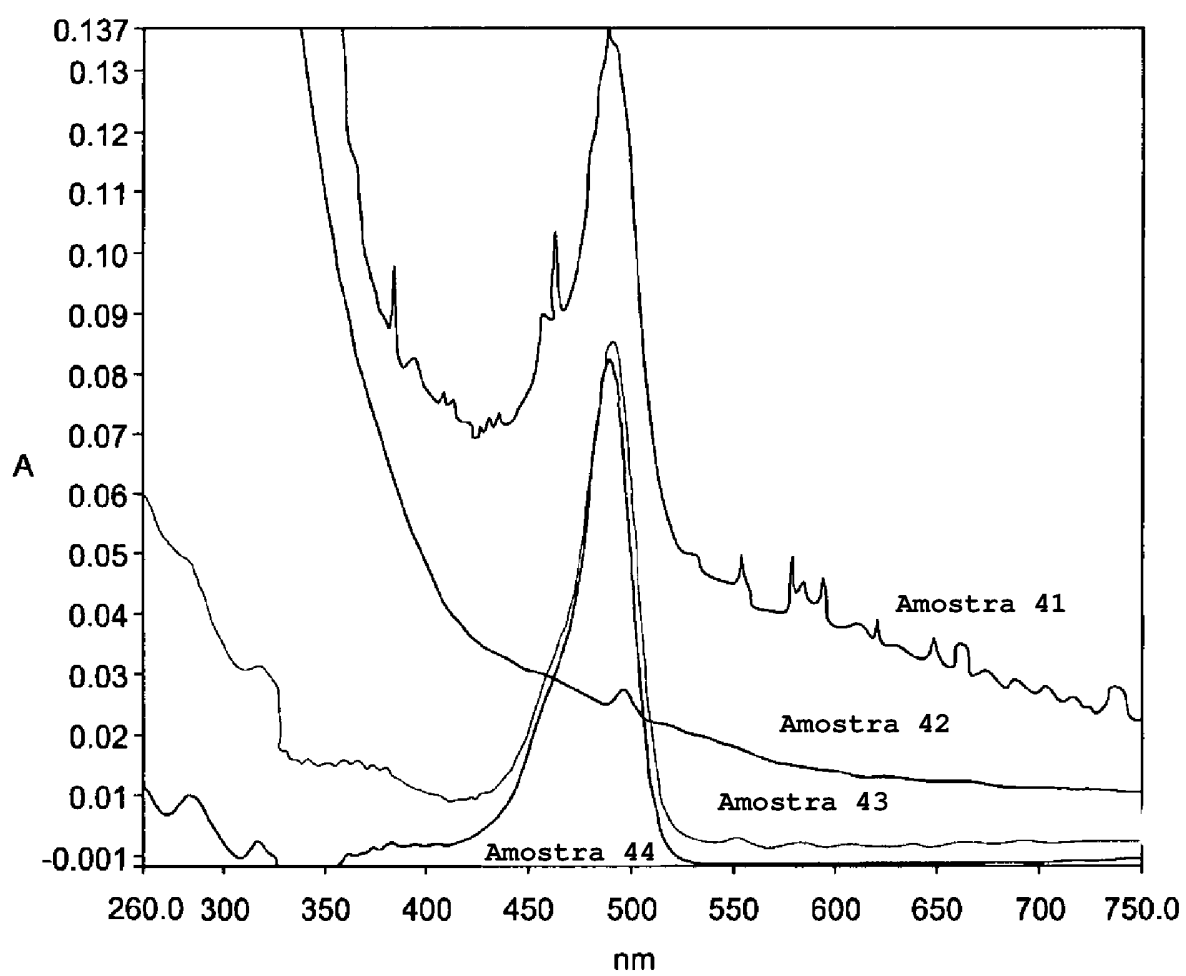


FIG. 36