



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

(21) PI0619599-7 A2



* B R P I 0 6 1 9 5 9 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 08/12/2006
(43) Data da Publicação: 11/10/2011
(RPI 2127)

(51) Int.Cl.:
C12N 5/06
A61K 45/06

(54) Título: MÉTODO PARA INIBIR CÉLULAS DE LINHAGEM DE TUMOR E PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE TUMORES EM UM PACIENTE

(30) Prioridade Unionista: 09/12/2005 US 60/748,951

(73) Titular(es): Massachusetts Institute Of Technology

(72) Inventor(es): Elena V. Gostjeva, William G. Thilly

(74) Procurador(es): Vieira de Mello Advogados

(86) Pedido Internacional: PCT US2006047136 de 08/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/067795 de 14/06/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA INIBIR CÉLULAS DE LINHAGEM DE TUMOR E PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE TUMORES EM UM PACIENTE. Descrevem-se neste contexto métodos para inibir o crescimento de tumores que compreendem alvejar uma célula de linhagem de tumor no paciente com um agente ou tratamento que modifica quimicamente uma molécula específica de célula de linhagem de tumor, impedindo desta forma a proliferação de células de linhagem de tumores.

PI - 0619599-4

Pet - 020080104829

Data - 08/08/08

1/41

MÉTODO PARA INIBIR CÉLULAS DE LINHAGEM DE TUMORES E
PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE TUMORES EM UM PACIENTE

Pedido Relacionado

O presente pedido reivindica o benefício
5 do pedido provisório U.S. No. 60/748.951, depositado
em 9 de dezembro de 2005. A totalidade dos ensina-
mentos do pedido supracitado fica incorporada neste
contexto por referência.

Antecedentes da Invenção

10 Os cientistas reconheceram a semelhança
das células de tumores e construções de tecidos pato-
lógicos (tais como teratocarcinomas) com as células e
tecidos de embriões prematuros. Células de linhagem
embrionárias normais, mas não diferenciadas foram ca-
15 pazes de dar origem a órgãos por processos indefini-
dos os quais, logicamente, tiveram de incluir rápido
aumento no número de células e diferenciação para an-
lage de órgão e subsequente organogênese. Os tumores
malignos desenvolvem-se em proporções similares aos
20 fetos prematuros e contêm nichos que são seja histo-
logicamente não diferenciados ou organizados com uma
aparência de tecido normal.

Adicionalmente aos glicosaminoglicans
antigênicos complexos na superfície da célula, os
25 "antígenos carcino-embriónários", moléculas envolvi-
das na aderência de células e reestruturação de tecido,
por exemplo, caderinas, cateninas, metaloproteas-

ses, são expressos em tecidos fetais e tumores.

Os tumores imitam o uso mitocondrial de aminoácidos para reduzir oxigênio sob as condições hipóxicas de tecidos fetais prematuros.

5 A oncogênese, da mesma forma que a ontogenese, parece originar-se por descendência linear através de um conjunto desdobrável de células de linhagem. Somente uma pequena fração de células provenientes de um tumor humano têm a capacidade de formar
10 novos tumores como xenoenxertias em roedores imuno-suprimidos. Experiências de xenoenxertias de diluição limitantes mostraram que uma ou mais células entre as células tumorigênicas putativas exibem propriedades semelhantes a células de linhagem em que elas
15 são capazes de gerar novos tumores que contêm células inflexíveis adicionais, bem como de regenerar as populações fenotipicamente misturadas de células presentes no tumor original.

O conceito de capacidade de monoclonagem
20 de tumores foi estabelecido nos inícios de 1900, e no século 20 foi determinado que praticamente todas as formas de câncer inicial-tardio passam por um período prolongado de pré-neoplasia e que estas colônias pré-neoplásticas eram elas próprias monoclonais e resultantes de mais que uma mutação citogenética incomum a partir do DNA embrionário. No começo do século 21, tentativas diretas de se enriquecerem populações de células de tumores com células de "linhagem" para experiências

de transplante/diluição demonstraram que não só eram as células de linhagem de tecido as células com toda a probabilidade de origem de pré-neoplasia, mas que os próprios tumores continham células de "linhagem". Foi 5 sugerida moderna reiteração da hipótese de que os tumores são, com efeito, estruturas fetais heterogêneas consideravelmente bem organizadas. Era de se esperar que células de linhagem "carcinoembrionária" aumentassem em número e dessem origem a tipos de células diferenciadas povoando os nichos altamente heterogêneos dentro da massa do tumor. Entretanto, o reconhecimento de células como células de linhagem no desenvolvimento de órgãos e tumores, ainda não foi consumado.

10

Foram usados vários marcadores antigênicos 15 empregados por todo o campo de células de linhagem para enriquecer células capazes de regenerar tecidos ou tumores freqüentemente para um alto grau. Entretanto, nenhuma células dentro destas populações enriquecidas demonstraram qualquer propriedade celular morfológica 20 microscópica que as marcassem como células de linhagem. Se for verdade que tumores resultam de uma única célula de linhagem, é requerido um meio para identificá-las e coletá-las como uma população de células de linhagem homogênea suficiente para análise de analitos 25 moleculares e bioquímicos. Somente então poderá alguém focar a potência de tecnologias de ordem macromolecular (genômica, proteômica, glicômica e outras) e formas poderosas de análise bioquímica, tais como es-

pectrometria de ressonância magnética nuclear de ângulo mágico.

Sumário da Invenção

A invenção refere-se a métodos para identificação de células de linhagem de tumor e para destruir seletivamente e especificamente células de linhagem de tumor sem ou com prejuízo mínimo para as células de linhagem normais ou de manutenção em seu ambiente próximo. Expõe-se neste contexto a descoberta inesperada de que células de linhagem de tumor contêm núcleos onde, durante a divisão nuclear, o genoma é, durante um período de tempo significativo e utilizável, DNA substancialmente torcido único (ssDNA). Pela utilização de agentes, por exemplo, agentes químicos ou enzimáticos, que visam e alteram ssDNA (por exemplo, reagentes de alquilação, nucleases específicas de cordão único, agentes que visam maquinismos de replicação, agentes que visam segregação e agentes que visam uma ou mais moléculas específicas de células de linhagem), o material nuclear de células de linhagem de tumor é visado para destruição, uma vez que o ssDNA modificado seria incapaz de sofrer outra replicação de volta ao DNA de cordão duplo (dsDNA). Uma molécula específica da célula de linhagem de tumor é uma molécula presente nas células de linhagem de tumor, preferentemente no núcleo, e não nas células das células circundantes. Moléculas específicas de células de tumor específicas podem ser visadas, pelo que a visagem e interrupção da função ou atividade da molécula específica de célula de li-

nhagem de tumor impedem ou inibem o crescimento de células de tumor. Por exemplo, qualquer agente que impede a replicação de ssDNA, por exemplo, uma molécula que torna híbrido o DNA, mas é incapaz de ser estendido, 5 por exemplo, um oligo-nucleotídeo modificado ou derivado de ácido nucléico, por exemplo, um ácido nucléico do fosfato-7 necessário para extensão ou um ácido nucléico de peptídio. São conhecidos métodos na técnica destinados a distribuir agentes ou tecido de tumor em um paciente, onde esses agentes impedirão a replicação do genoma ssDNA, e dessa maneira impedirão a proliferação 10 das células de linhagem de tumor.

De acordo com uma concretização, métodos destinam-se à prevenção ou inibição seletiva de crescimento (por exemplo, divisão nuclear ou celular) de células de linhagem de tumor sem impedir ou inibir substancialmente o crescimento das células circundantes (por exemplo, manutenção das células de linhagem). Em particular, enquanto a célula de linhagem visada está 20 sendo submetida à divisão nuclear, o método compreende contactar a célula com um agente capaz de entrar no núcleo da célula e modificar ou alterar o ssDNA do núcleo, resultando na prevenção ou na inibição de maior divisão nuclear e celular da célula visada.

25 De acordo com outra concretização, métodos destinam-se a um método para inibir o crescimento de tumor em um paciente que compreende a visagem de uma célula de linhagem de tumor no paciente com um agente ou tratamento

que altera ou modifica uma molécula específica de célula de linhagem de tumor (por exemplo, ssDNA), impedindo ou inibindo desta forma a replicação de ssDNA e finalmente impedindo ou inibindo a proliferação de células de linhagem de tumor. Em uma concretização particular, o agente objetiva uma molécula específica de célula de linhagem de tumor que é sintetizada dentro da célula e segraga nos núcleos campaniformes filiais. De acordo com uma concretização, a molécula específica de célula de linhagem de tumor é DNA de torça única (ssDNA). Em outra concretização, o agente é um agente químico, radio agente, enzima ou tratamento por radiação, pelo que é visada uma molécula específica de célula de tumor.

Breve Descrição dos Desenhos

15 A Figura 1 é um sumário de imagens explicativas. A) Exemplos de morfotipos nucleares observados nas células de interfase e prófase prematura (E.P.) em intestino fetal humano, mucosa de cólon normal, adenomas e ade-
no-carcinomas. B) Imagem de alta resolução ($\times 1400$) de nú-
20 cleos campaniformes de intestino fetal. DNA condensado parece criar um anel que mantém uma abertura na estrutura de sino oco. Escala gráfica, 5 μm .

As Figuras 2A e B são imagens de intestino embrionário, 5-7 semanas. Figura 2A: Imagem de contraste de fase (quadro esquerdo) e imagem de núcleos coloridos (do meio) e a imagem transfundida (direita) mostram as disposições lineares de núcleos dentro do sincício tubular de -50 micrometros de diâmetro. Figura 2B: Imagem de alta

resolução dos núcleos mostra estruturas campaniformes ocaas. A orientação “da cabeça aos pés” dos sinos é preservada em todos os tubos embrionários observados, mas os tubos coleiam para trás e para diante de forma tal que tubos 5 paralelos podem ter orientação dos núcleos campaniformes antiparalela localmente. Escalas gráficas, 50 µm em ampliação baixa e 5µm em ampliação alta.

As Figuras 3A-D mostram imagens de fissão nuclear de núcleos campaniformes em intestino fetal. Figuras 3A e B: Fissão nuclear simétrica. Núcleos campaniformes emergem a partir de núcleos campaniformes de forma assemelhada. Figuras 3C e D: Fissão nuclear assimétrica. Um núcleo esférico e um núcleo em forma de charuto emergem de um núcleo campaniforme. Escala gráfica, 5 µm.

15 As Figuras 4A-C mostram imagens provenientes de folículos de cólon adultos normais. Figura 4A: Folículos de cerca de 2000 núcleos esferóides, esféricos ou discoides ocasionalmente (<1/100) continham um núcleo (seta) campaniforme reconhecível localizado no fundo do folículo. 20 Figura 4B: Base de folículo mostrando outro núcleo campaniforme. Figura 4C: Morfotipos de núcleos de interfase e mitóticos das paredes e da superfície luminal em um folícuo bem estendido. As imagens ampliadas mostram: (i) núcleos de interfase esféricos e ovóides, (ii, iii) prófases 25 prematuras de núcleos de forma esférica e oval, e (iv) e um núcleo anatelofase. Escalas gráficas, 100 µm para imagens de baixa e 5 µm para imagens de alta ampliação.

As Figuras 5A-E mostram imagens a partir

de Adenomas. Figura 5A: Folículo de adenomas de ramificação ampla característica. Figura 5B: Uma estrutura semelhante a folículo irregular encontrada por toda a parte de adenomas. Tipicamente dois, mas por vezes 1, 4 ou mesmo 8, núcleos campaniformes (insertos) aparecem na base destas estruturas grandes semelhantes a folículo irregulares (>4000 células). Figura 5C: Um cacho de células de morfótipo nuclear similares que contém um núcleo campaniforme. Estas formas de cachos contêm exatamente um total de 16, 32, 64, e 128 células. Painel esquerdo, coloração de Feulgen-Giemsa. Painel direito, imagem autofluorescente de contraste de fase. Figura 5D: Contextos em que núcleos campaniformes aparecem nos adenomas: (i) Cacho com 31 núcleos ovóides e um núcleo campaniforme, (ii) Múltiplos núcleos campaniformes em disposição de ombro com ombro, (iii) Núcleos campaniformes dispostos em um padrão lado a lado (seta), (iii). Mistura irregular de - 250 núcleos com vários núcleos campaniformes sugestivos de base de folículo nascente. Figura 5E: Estrutura semelhante a folículo irregular que contém aparentemente emplastros clonais de células de 5 diferentes morfotipos nucleares com um núcleo campaniforme (seta) na base. Escalas gráficas, 100 μm (em "a,b") e 5 μm (em "e").

As Figuras 6A-E mostram imagens provenientes de adenocarcinomas. Figura 6A: Estruturas semelhantes a folículos muito grandes (células >8000), com ramições com pontos de ruptura freqüentes. A seta indica um exemplo de uma estrutura semelhante a folícu-

lo de ~250 células, encontrada principalmente perto da superfície do tumor. Figura 6B: Massa de tumor interior com múltiplos núcleos campaniformes (~3% de todos morfotipos nucleares). Figura 6C: Núcleos campaniformes na Figura 6B 5 orientados nas configurações sinciciais da cabeça aos pés e não-sinciciais lado a lado. Figura 6D: Fissão nuclear simétrica em adenocarcinoma. Figura 6E: Fissão nuclear assimétrica de um sino que cria um núcleo em forma de charuto em adenocarcinoma. Estruturas assemelhadas foram observadas em metástases cólicas para o fígado. Escala gráfica, 5 μm .

As Figuras 7A-D são ilustrações dos estágios em citometria de imagem quantitativa no estudo em tecidos e células humanas. Figura 7A: Descarte cirúrgico de colón recente pronto para fixação. Figura 7B: Preparação de lamina microscópica que mostra o resultado do desenvolvimento de uma seção de 1 mm através de um pólipo (posicionamento de um pólipo, salientado de cima para baixo). Figura 7C: Desdobramentos de núcleos de células 10 (na cor magenta) observáveis para os folículos completos. Todos os núcleos de folículos são preservados, quando comparados com as seções de 5 μ (coloração de BrdU e coloração de H&M), ilustradas anteriormente. Figura 7D: Estação de trabalho para análise de imagem de software "Axioscop microscope-AxioCam color CCD camera-KS 400" motorizada.

As Figuras 8A e B são ilustrações de um "alvo de interesse" na aplicação de FISH para explorar

núcleos campaniformes não-divididos e divididos em tumores. Figura 8A: Tratamento com cromato (coloração mais escura por cauda do teor de DNA mais elevado por μm^2) cria os cromossomos de prófase que lembram a estrutura 5 única dispostos como dois círculos paralelos. Estes círculos colocados no desenho ilustram a predição destes cromossomos específicos pode ser encontrada neste local específico dos núcleos campaniformes. Figura 8B: Distribuição de tratamento com cromato e alterações de posicionamento 10 de cromossomos específicos como transformação imaginária (núcleos "campaniformes para ovais" neste caso) tomando lugar por toda a divisão assimétrica dos núcleos campaniformes.

As Figuras 9A-D são imagens que ilustram os 15 resultados de hibridização fluorescente *in situ* do cromossoma 11 nos núcleos esféricos de células humanas TK-6. Figura 9A: Dois pares de cromossomos em desdobramentos de cromossomos prófase. Figura 9B: Coloração nuclear DAPI de núcleos esféricos. Figura 9C: O mesmo par de cromossomas hibridizado com sonda de fluorescência FITC. Figura 9D: Imagem fundida de coloração de cromossomos de 20 interfases DAPI e FITC. Escala gráfica, 5 micrômetros.

A Figura 10 mostra imagens de divisão nuclear simétrica de núcleos campaniformes dispostos em sincícios. 25

A Figura 11 mostra imagens que ilustram a localização de DNA em núcleos campaniformes submetidos a divisão nuclear.

A Figura 12 mostra a disposição e composição (ssDNA ou dsDNA) de material nuclear durante a divisão nuclear de núcleos campaniformes.

As Figuras 13A-D mostram imagens provenientes de preparados fetais humanos que ilustram uma série de formas nucleares anteriormente não reconhecidas. Estas formas dão origem aos núcleos campaniformes originais. A Figura 13A mostra um núcleo com uma condensação de ~10% do teor total de DNA como um "cinto" em torno do eixo longitudinal dos núcleos esféricos ou levemente ovais. A Figura 13B mostra um núcleo em que dois "cintos" nucleares condensados parecem estar separados, mas são ainda parte de um único núcleo. A Figura 13C mostra um par de núcleos que parecem ter surgido por fissão dos núcleos duplamente cintados da Figura 13B. A Figura 13D mostra que cada sincício contém um conjunto de sinos com um único par de sinos no seu ponto mediano linear com as bocas voltadas como na Figura 13C. Estas imagens mostram que uma série de divisões simétricas criam núcleos que são afastados em relação a um par central.

As Figuras 14A e B mostram morfotipos nucleares em adenoma de cólon (Figura 14A) e adenocarcinomas (Figura 14B). Morfotipos de carcinogênese mostram cintos similares - um ou dois em torno do eixo longitudinal dos núcleos ovais.

As Figuras 15A-C mostram a coloração FISH específica para centrômeros humanos. A Figura 15 mostra centrômeros (brilhantes) em núcleos de forma esférica (na

Figura 15A), "charuto"- (na Figura 15B) e sino- (na Figura 15C) provenientes de tecidos de cólon fetal humano de 12 semanas.

Descrição Detalhada da Invenção

5 A presente invenção está relacionada com a descoberta inesperada de que células de linhagem de tumor, por exemplo, células que se dividem conduzindo a tumores, sofrem uma divisão nuclear assimétrica. Núcleos campaniformes, não encontrados em tecidos adultos
 10 exceto para tecidos de tumores, passam por períodos de tempo onde o genoma é representado como DNA de torcida única (ssDNA). Este aspecto de núcleos campaniformes que se dividem assimetricamente permite a objetivação específica de células que contém esses núcleos, por
 15 exemplo, células de linhagem de tumor, para identificação e destruição.

As estruturas com núcleos campaniformes são dotadas de qualidades semelhantes a células de linhagem em tumores humanos.

20 Neste contexto descrevem-se métodos que se baseiam na descoberta inesperada de que núcleos campaniformes dividem-se tanto simétrica quanto assimetricamente por processos de fissão não mitóticos em tumores humanos de cólon e pancreáticos (Gostjeva et al., 2005, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, no prelo). Estes núcleos campaniformes aparecem em grandes números em intestino posterior embrionário em 5-7 onde eles são encerrados em sincícios tubulares e compreendem 30% de todos os núcleos e te-

cidos de tumores onde eles existem em abundância em nichos "não diferenciados". Eles possuem diversas qualidades semelhantes às células de linhagem, particularmente o "critério" de divisão assimétrica e uma freqüência de fissão nuclear coerente com taxas de crescimento de tecido preneoplástico e neoplástico de cólon humano (Herrero-Jimenez et al., 1998, 2000). Estas formas nucleares anteriormente não reconhecidas são elas duas a fonte de geração e diferenciação de tumores e deste modo objetivos para estratégias terapêuticas de cânceres.

As estruturas (por exemplo, células, estruturas semelhantes a células ou sincícios) que contêm núcleos campaniformes representam as células de linhagem de tumor. A sua modalidade amitótica de fissão nuclear requer maquinismo molecular que definirá objetivos moleculares os quais não são expressos em células de linhagem de manutenção embrionária (blastômeros) e de adulto que parecem dividir-se por mitose. Por exemplo, a observação de que estes núcleos campaniformes passam por um estágio onde o genoma é representado por ssDNA permitirá a sua objetivação e destruição. A exploração de como os núcleos campaniformes são organizados espacialmente, como a cromatina é dispersa nos núcleos, de se cromossomas específicos ou não ocupam territórios específicos totalmente pelo interior da lamina nuclear sugerirão busca de objetivos terapêuticos mais específicos e proporcionarão compreensão adicional da relação entre o morfótipo nuclear (forma) e a expressão de genes.

Expõe-se neste contexto a descoberta de uma sucessão de formas nucleares fechadas distintas em adenomas e adenocarcinomas de cólon, de intestino posterior fetal, que parecem decorrer *ab initio* de fissão nuclear assimétrica proveniente de núcleos campaniformes, mas subsequentemente dividem-se por mitose e expiram por apoptose.

5 O conjunto compartilhado de formas nucleares em embriões e tumores que estão ausentes no tecido adulto sustentam a hipótese do século 19 de que tumores eram desenvolvimentos embrionários em organismos adultos (Cohnheim, J., *Virchows Arch.*, 65:p.64, 1875; Sell, S., *Crit. Rev. Onc. Hematol.*, 51:1-28, 2004).

10

Os métodos descritos neste contexto permitem que aquele versado na técnica realize *in vivo* a análise de pontos extremos citogenéticos dos núcleos de diferentes morfologias, com ênfase especial em núcleos campaniformes em tumores do cólon, pancreático, renal, dos ovários e outros tumores, com base em técnicas de análise de imagem de micro-cópia e quantitativa de alta resolução do estado da técnica.

15

As estruturas nucleares, teor de DNA e a distribuição especial de cromossomos em núcleos campaniformes de células e sincícios podem ser caracterizadas por métodos conhecidos daqueles versados na técnica,

20

25

As, por exemplo, por meio de citometria de imagem quantitativa e microscopia confocal. Por exemplo, essas técnicas permitem que aquele versado na técnica determine o teor de DNA total, e utilize reagentes específicos, tais

como, por exemplo, sondas de hibridização de DNA laranja acridina ou torcida específica, para diferenciar o ssDNA em relação ao DNA de torcida dupla (dsDNA). Esta informação pode ser usada para diferenciar núcleos campaniformes de 5 diferentes morfologias, tipos de tumores (de cólon contra pancreático) e nichos dentro dos tumores. Estas técnicas também podem ser usadas para caracterizar o progresso da síntese de DNA e detector a presença de proteínas associadas com, por exemplo, síntese de DNA e segregação em núcleos campaniformes durante a fissão nuclear das formas simétricas e das diferentes formas assimétricas.

10

Isolamento de células e sincícios com núcleos campaniformes como amostras homogêneas.

O método descrito neste contexto e em outros 15 documentos (PCT/US2005/021504, depositado em 17 de junho de 2005; e pedido U.S. No.: 11/156.251, depositado em 17 de junho de 2005; cujos conteúdos ficam incorporados neste contexto por referência na sua totalidade) da preparação de tecido de tumor pode ser adaptado aos requisitos de micro-dissecção a laser ativada por pressão de "catapulta" 20 para criar amostras de células homogêneas para morfologia nuclear que pode ser aplicada a análises de metabolitos e macromoléculas. Este método permite que aquele versado na técnica identifique objetivos lógicos para retardamento da divisão, ou destruição de estruturas que contêm núcleos 25 campaniformes em tumores humanos.

Os métodos da presente invenção são baseados em parte em meios para reconhecer morfologia nuclear em

preparados de tumor não fixos de maneira que preparados homogêneos de células vivas e sincícios com núcleos campaniformes podem ser estudados *ex vivo*. Os núcleos campaniformes vivos podem ser estudados para melhor compreensão de seus mecanismos de segregação e sintéticos de DNA peculiares e sugerir meios para interferir com estes processos em terapias de câncer.

5 O “objetivo de célula de linhagem” na terapêutica de câncer.

10 Os objetivos principais dos métodos de terapêutica de câncer existentes são células que passam pelo ciclo de célula (Gomez-Vidal, J. et al., A., *Curr. Top. Med. Chem.*, 4:175-202, 2004; Fischer, P. and Giannella-Borradori, A., *Expert Opin. Investig. Drugs*, 14:457-477, 2005). Nenhuma distinção é feita entre as células em trânsito entre as células de linhagem de manutenção adultas que se dividem para proporcionarem células de transição para substituírem a perda de células terminais perdidas pela morte de célula programada e as 15 células de linhagem de tumor. A terapia visa a estreita janela de regimes que exterminam todas as células de linhagem de tumor sem matar o paciente. Mas será de se esperar logicamente que as células de linhagem de manutenção adultas tenham a propriedade de crescimento zero 20 de células líquido, enquanto as células de linhagem de tumor, da mesma forma que as células de linhagem fetais, estão por definição envolvidas no rápido crescimento de células líquido. Divisões de células de li-

nhagem de manutenção adultas parecerão ser forçosamente de natureza assimétrica, dando origem a uma nova célula de linhagem de manutenção e uma primeira célula de transição diferenciada. Células de linhagem de tumor 5 requererão divisões nucleares simétricas sucessivas para suportar o crescimento líquido dos tumores. É na descoberta dos núcleos campaniformes submetidos a divisão nuclear de “taça para taça” simétrica em tumores que foi encontrado um objetivo específico para terapias 10 citostáticas ou citocidais.

Independente destas estratégias citocidais de quimioterapia foi a hipótese de que os tumores poderiam ser asfixiados pela prevenção de angiogênese, por exemplo, Folkman and Ingber (*Sem. Cancer Biol.*, 3:88-15 96, 1992). Outros sugeriram abordagens para a terapia de câncer pelo bloqueio da diferenciação celular. Mas a criação de hipóxia pode recriar as condições de embriogênese prematura no que se relaciona com as células de linhagem e pode explicar os efeitos pali- 20 ativos, mas não curativos, de táticas anti-angiogênicas (Warburg, O., *Biochem. Zeitschrift*, 152:479, 1924). O bloqueio da diferenciação em tumores pode bloquear a diferenciação em tecidos normais com consequências indesejáveis. A compreensão de que as atuais terapias de 25 câncer são apenas minimamente efetivas porque as células de linhagem podem repovoar tumores em um curto espaço de tempo tornou-se um estímulo poderoso para a pesquisa de características moleculares e bioquímicas

peculiares às células de linhagem de tumor ao contrário das células de linhagem de manutenção adultas (Otto, W., *J.Pathol.*, 197:527-535, 2002; Sperr, W. et al., *Eur. J. Clin. Invest.*, 34 (Suppl 2):31-40, 2004; Veneczel, T. et al., *PLoS Biol.*, 2:e301, 2004). Tais características moleculares e/ou bioquímicas das células de linhagem de tumor, poderiam servir como objetivos na terapêutica de câncer. A descoberta de núcleos campâniformes que são submetidos a divisões simétricas e assimétricas em tumores de cólon, mas não em epitélio de cólon adulto, permite àquele versado na técnica diferenciar as células de linhagem de tumor em relação às células de linhagem de manutenção adultas (Gostjeva, E. et al., *Cancer Genet. Cytogenet.*, 164:16-24, 2006).

15 Citogenética de células de linhagem em embriões, linhas de células de linhagem e tumores.

As propriedades de célula de linhagem de tumor incluem divisões simétricas para conseguir crescimento de célula de linhagem líquido e divisões assimétricas para conseguir auto-renovação e diferenciação. Entretanto, os mecanismos de progressão de ciclo de células, incluindo síntese de DNA e segregação na fissão nuclear, permanecem essencialmente inexplorados nas células de linhagem de embriões e tumores. Esta escassez de esforço é compreensível na medida em que não houve marcadores citológicos diretos para identificarem as células de linhagem em seres humanos ou tecidos. As divisões assimétricas em células de linhagem adultas de cólons de murídeos e variedades de células

têm sido exploradas com a demonstração extraordinariamente importante de segregação pangenômica seletiva de fiadas de DNA de origem em células de linhagem putativas (Potten, C. et al., *J. Célula Sci.*, 115:2381-2388, 2002; Merok, J. 5 et al., *Cancer Res.*, 62:6791-6795, 2002). Este reconhecimento de uma modalidade específica de célula de linhagem de transmissão genética de cromossomos de uma maneira não randômica precede o presente reconhecimento do que parece ser uma morfologia nuclear específica de célula 10 de linhagem e modalidade de divisões durante várias décadas (Cairns, J., *Nature*, 255:197-200, 1975).

EXEMPLOS

Exemplo 1. Estabelecimento de uma fonte de tecidos e tumores.

15 Obtiveram-se espécimes de tecido e tumores adultos como descartes cirúrgicos e a partir de colaboradores no Massachusetts General Hospital, Department of Pathology (Gostjeva, E. et al., *Cancer Genet. Cytogenet.*, 164:16-24, 2006). O uso de tumores e seções de 20 tecido descartados anônimos foi aprovado pelo "MIT Committee on Use of Humans as Experimental subjects", através do laboratório do Prof. W. G. Thilly.

Desenvolvimento de um método para a excisão de tecido, fixação, desdobramento e coloração de DNA.

25 O protocolo exposto em seguida permite a visualização de núcleos de espécimes de tecido e tumores de clareza desejada para observações estruturais e quantita-

tivas de cromossomos e núcleos. Elementos chave são o uso de amostras de tumores recentes fixadas dentro de 30 minutos da cirurgia e abstenção do procedimento padrão de secionamento fino. Os núcleos campaniformes são aparentemente vítimas prematuras de autólise em amostras de tecido e tumores e não mais discerníveis cerca de 45 minutos depois da ressecção. Seções de 5 micrômetros padrão simplesmente fatiaram as várias formas nucleares descobertas aproximadamente todas as quais tiveram diâmetros mínimos maiores do que 5 micrômetros. A técnica específica delineada é exposta como evidência de progresso significativo:

Dentro de um período de 30 minutos depois de ressecção, folhas (-1 cm²) tais como mucosa de cólon separadas ou seções de -1 mm de espessura de adenomas, adenocarcinomas ou metástases são colocadas em pelo menos três volumes de fixador de Carnoy recém-preparado a 4°C (3:1, metanol:ácido acético glacial). Fixador novo é substituído três vezes (a cada 45 minutos) e então substituído por metanol a 70%, 4°C, para armazenamento da amostra a -20°C. As seções fixas são enxaguadas em água destilada e colocadas em 2 ml de 1N HCl a 60°C durante 8 minutes para hidrólise parcial de macromoléculas e depuração de DNA. A hidrólise é concluída por enxaguamento em água destilada fria. A amostra enxaguada é mergulhada em ácido acético a 45% (temperatura ambiente) durante 15 a 30 minutos para "maceração do tecido" que permite o espalhamento e observação das seções de tecido de plan-

ta e animal com suave pressão em cobre-lamelas de microscópio. Cada seção macerada é bi-seccionada em peças de -0,5 x 1 mm e transferida com 5 µl de ácido acético para uma lamela de microscópio sob um cobre-lamela. Para espalhamento de tecido 5 camadas de papel de filtro são colocadas no cobre-lamela. Um cabo de pinça é movido uniformemente em uma direção ao longo do papel de filtro com pressão leve e uniforme. No tecido de cólon bem espalhado não existem núcleos danificados enquanto folículos são calcados no que é essencialmente uma monocamada. Os cobre-lamelas são removidos depois de congelamento em gelo seco e as lamelas são secadas durante uma hora. As lamelas são colocadas em recipientes Coplin preenchidos com reagente de Schiff para colorir DNA parcialmente depurinado (coloração de Feulgen) sob temperatura ambiente durante uma hora, enxaguado no mesmo recipiente de Coplin duas vezes com 2xSSC (citrato de tri-sódio 8,8 g/l, cloreto de sódio 17,5 g/l), uma vez durante 30 segundos e uma vez rapidamente. As lamelas são então enxaguadas com água destilada e ficam adequadas para análises de imagem de núcleos (Gostjeva, E., *Cytol. Genet.*, 32:13-16, 1998). Para se conseguir resolução superior, as lamelas são ainda coloridas com reagente Giemsa. Imediatamente depois de enxaguamento em 2xSSC as lamelas são colocadas em solução de Giemsa a 1% (Giemsa, Art. 9204, Merck) durante 5 minutos, então enxaguadas rapidamente, primeiro em amortecedor de So-

renssen (diidrato de fosfato de hidrogênio dissódico 11,87 g/l, fosfato de diidrogênio de potássio 9,07 g/l), e então água destilada. As lamelas são secadas sob temperatura ambiente durante uma hora e colocadas em 5 um recipiente de Coplin preenchido com xileno durante pelo menos 3 horas para remover a gordura. Os cobrelamelas são colados às lamelas com meios de montagem DePex e secados durante 3 horas antes de varredura de alta resolução.

10 Alternativamente, maceração pode ser conseguida por exposição a enzimas proteolíticas tais como, por exemplo, colagenase II, para se conseguir isolamento das células vivas com um morfótipo nuclear definido.

Microscópio e sistema de processamento de imagens.

15 O software para análise de imagem quantitativa que é usado neste contexto utiliza uma abordagem de supressão de fundo adaptada a partir de sistemas de levantamento por satélite anteriores. Esta tecnologia foi adquirida pela Kontron Corporation na Alemanha, que foi 20 desde então adquirida pela Zeiss, Inc. Todas as imagens foram obtidas utilizando-se um *KS-400 Image Analysis System™, Version 3.0*, customized (Zeiss, Germany) que consistia de um microscópio luminoso motorizado, Axioscope™, câmara CCD colorida, AxioCam™ (Zeiss, Germany) vinculada a um computador pessoal. As imagens são transmitidas a partir do microscópio sob uma ampliação de 25 1,4/100 da objetiva apocromática plana utilizando-se luz visível e um filtro 560 nm (verde) quando se empregou co-

loração Feulgen sozinha. Não se utilize qualquer filtro quando se emprega coloração Feulgen-Giemsa. O pegador de moldura e exposição de luz ótima são ajustados antes de cada sessão de varredura. As imagens nucleares são gravadas em uma dimensão de pixel de 0,0223 x 0,0223 micrômetros.

Intestino embrionário.

Sete morfótipos nucleares distintos (forma esferóide grande, esferóide condensada, ovóide, de feijão, de charuto, de salsicha e campaniforme) foram encontrados por todas as amostras de intestino fetal (Figura IA). Os núcleos campaniformes que pareceram ser mantidos abertos por cromatina condensada lembraram cromossomos condensados (Figura IB). Os núcleos campaniformes foram organizados em uma orientação de "cabeça para os pés" linear dentro de tubos ou sincícios -- 20-50 micrômetros, ou (Figura 2). O padrão "cabeça aos pés" dos núcleos campaniformes foi preservado em todos os tubos embrionários observados, mas os tubos colearam para trás e para diante de forma tal que os tubos paralelos tinham orientação localmente antiparalela dos núcleos campaniformes.

Observou-se que os núcleos campaniformes foram submetidos a amitoses simétricas e paralelas, mas apenas dentro dos sincícios (Figura 3). As amitoses de núcleos campaniformes simétricos assemelharam-se a uma separação simples de dois copos de papel empilhados. Na resolução mais alta, a cromatina condensada assemelhando-se a cromossomos emparelhados pareceu formar um anel que manti-

nha a "boca" de sino em uma condição aberta. Fora dos sincícios tubulares observou-se que as mitoses foram freqüentemente "fechadas" para cada um dos diversos morfótipos nucleares e evidenciaram-se pequenas colônias que consistiam de células de idêntico morfótipo nuclear. A morfologia nuclear "fechada" específica foi preservada na prófase prematura, tal como se encontra ilustrada na Figura 1.

Epitélio de cólon normal.

Aproximadamente todos os núcleos em folículos puderam ser observados a partir da base de folículo base até à superfície luminar (Figura 4A). Muitos dos folículos propagaram-se de uma maneira tal que foi possível discernir formas nucleares individuais. As células com núcleos ovóides ou esferóides alinharam o folículo desde o ponto logo acima da base no sentido e para a extensão epitelial dentro do lúmen (Figura 4C). Nas primeiras $\sim 2^5$ células da base de folículo, predominou um nono morfótipo nuclear, potencialmente distinto, que pode ser caracterizado como discóide, $\sim 2\text{-}3$ micrômetros de espessura e ~ 10 micrômetros de diâmetro (Figura 4B). Em menos do que 1% de todas as bases de folículos em que as células foram bem separadas discerniu-se um núcleo campaniforme solitário entre os núcleos aparentemente discóides (Figuras 4A e 4B). Uma baixa freqüência assemelhada de núcleos campaniformes foi observada em preparados de fígado adulto. Em um cólon adulto sem qualquer indicação patológica de neoplasia ou

pré-neoplasia nenhuma outra variante morfológica nuclear foi observada em uma varredura de célula-por-célula de mais que um milhar de folículos bem espalhados.

Adenomas.

5 Os adenomas continham muitos folículos, indistinguíveis a partir de folículos de cólon normais cada um com ~ 2000 células. Estas foram freqüentemente encontradas em formas ramificadas conforme ilustradas na Figura 5A. Os mesmos núcleos esferóides e ovóides nas paredes de folículo como nos folículos de cólon normais, mas mais freqüentemente do que no cólon normal ocorreu um ou dois núcleos campaniformes na base de folículo. Estruturas lobulares irregulares também foram observadas as quais continham até ~ 8000 células, cujas células eram mais facilmente espalhadas pela maceração de tecido. Em quase todas as estruturas irregulares haviam dois ou mais núcleos campaniformes orientados com as aberturas das campânulas na direção do corpo da estrutura (Figura 5B). Adicionalmente muitas células e grupos diversos estavam disseminadas entre os folículos e estruturas irregulares (Figura 5C). Algumas estruturas regulares pareceram estar crescendo no sentido de folículos normais de dimensão plena que continham ~250, ~500 ou ~1000 células.

10 20 25 Muitos grupos de células foram vistos como "anéis" de exatamente 8, 16, 32, 64 e 128 células cada um com um núcleo campaniforme (Figura 5D).

O exame sob ampliação maior revelou que en-

quanto isso a maior parte das células das paredes das estruturas semelhantes a folículo tinham núcleos esféricos ou ovóides como no folículo de cólon adulto normal. Colônias de células com núcleos sejam eles ovóides, em forma de charuto ou em forma de bala apareceram nas estruturas lobulares irregulares sugerindo uma fusão de diversas colônias diferentes. Colônias com núcleos ovóides e em forma de charuto foram observados no intestino embrionário posterior, mas o morfótipo nuclear em forma de bala foi visto somente em adenomas e adenocarcinomas (Figura 5E). O morfótipo nuclear em forma de bala também surgiu de a partir de núcleos campaniformes por amitoses assimétricas com a extremidade irregular emergindo primeiro. Observaram-se pequenas colônias de células com núcleos em forma de bala e estas colônias continham células submetidas a mitoses comuns exceto pelo fato interessante de que as morfologias nucleares peculiares foram retidas em certa extensão a partir de prófase através de anateloafase.

Embora raros em cólon adulto normal, os núcleos campaniformes apareceram freqüentemente e em um número de contextos de adenoma. Alguns foram encontrados como de um a dez ou mais "sinos" nos espaços entre as estruturas semelhantes a folículo (Figura 5D). Outros foram encontrados como "sinos" únicos nas estruturas de anel multicelulares em que um núcleo de sino foi sempre observado no anel com $(2^n - 1)$ células esferóides ou outro morfótipo (Figuras 5C e 5D).

Núcleos campaniformes apresentaram-se como

sinos únicos, mais freqüentemente na forma de um par de sinos ou ocasionalmente 4 ou 8 sinos dentro do copo básico de estruturas semelhantes a folículo. Nas estruturas lobulares irregulares muito maiores, núcleos campaniformes foram anatomicamente integrados nas paredes das estruturas anômalas misturadas com células de outras morfologias nucleares. Evidenciam-se como se estas estruturas semelhantes a folículos irregulares fossem mosaicos de múltiplas espécies diferentes de cachos, cada um com seu próprio morfótipo nuclear. Estimou-se que adenomas grandes (~ 1 cm) continham cerca de 1000 núcleos campaniformes. Observaram-se centenas de núcleos campaniformes em cada um dos múltiplos adenomas, mas não foi observado um único núcleo campaniforme em qualquer adenoma na forma simétrica de fissão nuclear freqüentemente encontrada em seções embrionárias; não obstante, observaram-se diversos exemplos de fissão nuclear assimétrica, em adenomas.

Adenocarcinomas.

Os adenocarcinomas da mesma forma que os adenomas continham a mistura de folículos, estruturas irregulares maiores e cachos inter-foliculares de 16, 32, 64 e 128 células. Encontraram-se ainda núcleos campaniformes na forma de camisetas, pares ou números maiores na taça basal de folículos e embutidos em voltas complexas nas paredes das estruturas lobulares irregulares maiores (Figura 6). O conjunto de morfótipos nucleares nos adenocarcinomas parece ser idêntico ao conjunto que foi observado nos adenomas incluindo o

morfótipo em forma de bala.

Uma diferença discernível entre adenomas e adenocarcinomas foi a de que as estruturas semelhantes a folículo estavam orientadas aleatoriamente com 5 relação à superfície de tumor. Também não foram encontrados folículos e estruturas irregulares no interior do tumor, o que pode ser mais bem caracterizado como uma coleção eclética, mas não caótica, de estruturas menores, organizadas localmente.

10 A diferença mais notável pela qual os adenocarcinomas diferiram dos adenomas foi o freqüente aparecimento de grupamentos aparentemente organizados de mais que centenas de núcleos campaniformes, muitos dos quais estavam freqüentemente (~1%) envolvidos em 15 fissões nucleares simétricas. Estas fissões simétricas foram posteriormente identificadas como compreendendo material nuclear condensado. Um núcleo campaniforme teria uma quantidade de DNA igual àquela de uma célula haplóide normal. À medida que os núcleos campaniformes 20 começam a sofrer a divisão simétrica de "taça para taça", o teor de DNA aumenta para 1,05 a quantidade de DNA contido em um genoma haplóide (aproximadamente o aumento que se espera se os centrômeros são replicados). O teor de DNA permanece neste nível até muito 25 depois no processo de "taça para taça" ponto este em que os dois núcleos contêm 2 vezes a quantidade do material de DNA. É durante o estágio quando talvez apenas os centrômeros são replicados e os cordões do genoma

são separados que o genoma é organizado principalmente em ssDNA. Não até à replicação, muito tarde no processo o genoma se torna dsDNA novamente.

Sob baixa ampliação estas estruturas 5 surgiram nos espaços entre estruturas semelhantes a folículo e pareceram como uma teia de aranha ou esqueleto de nervuras de folha. Sob uma ampliação maior, as nervuras finas mostraram ser cordões de células parcialmente ordenadas com núcleos campaniformes 10 tendo a característica curiosa de apresentarem suas bocas orientadas na mesma direção, 90° em relação ao eixo da nervura (Figura 6C). Núcleos campaniformes também foram encontrados em sincícios delimitados localmente na orientação "cabeça para os pés" (Figura 15 6C) observada no intestino embrionário mas não nos adenomas. Estima-se que milhões de núcleos campaniformes estejam em uma massa adenocarcinomatosa com freqüentes amitoses simétricas e assimétricas (Figuras 6D e 6E). Metástases de tumores cólon-retais para o fígado recrearam o padrão de morfótipos nucleares, folículos e estruturas irregulares, aparentemente não diferentes daqueles observados para adenocarcinomas.

Microscopia confocal em núcleos campaniformes simples preservados 3D e pares de núcleos campaniformes divididos 25 do-se simetricamente.

Para executar microscopia confocal em núcleos campaniformes simples preservados 3D e pares de nú-

cleos campaniformes dividindo-se simetricamente, utilizando-se o "DeltaVision® RT Restoration Imaging System at Imaging Center, Whitehead Institute". O sistema proporciona desconvolução 2D em tempo real e projeções 3D Z para res-

5 tauração de imagens de núcleos.

Contracoloração do citoplasma nuclear (FITC-faloidina) e (DAPI) nuclear foram aplicados para explorar a estrutura interior dos núcleos campaniformes. As células são espalhadas na lamela seguindo-se

10 o mesmo procedimento usado para a coloração de Feulgen: mediante maceração por "hidrólise". A diferença é que as fixações nos dois diferentes fixadores são aplicadas para comparar os resultados: fixador de Carnoy (4°C) e 3,7% formaldeído durante 15 min. e solução

15 de bloqueio durante 2 horas em 2% BSA (2g), leite não-gorduroso a 0,2% (0,2g), Triton X-100 a 0,4% (400 µl) em 100 ml de PBS (temperatura ambiente), este último como recomendado para fixações de células de tecido vivas. Lamelas de microscópio com desdobramentos de

20 tecido nas mesmas, depois de duas vezes lavadas em PBS, são transferidas para câmara de umidade, gotejam-se 100 ml de gotículas de anticorpos principais diluídos apropriadamente em solução de bloqueio para cobrir toda a área de dispersão e as sobre-lamelas são vedadas no topo

25 por cimento de borracha, colocadas em recipiente embrulhado em ouropel e colocadas em câmara de umidade em recinto frio durante a noite. As lamelas não vedadas são então lavadas três vezes em PBS. Retiram-se as lamelas e

colocam-se novamente 100 µl de gotículas de anticorpos secundários e/ou colorações de células (por exemplo, FITC-faloidina, DAPI) diluídas apropriadamente em solução de bloqueio, para cobrir a área que contém as células es-

5 palhadas e transferidas para a câmara de umidade colocada em recipiente. O recipiente/câmara de umidade é vedado, embrulhado em ouropel e colocado sob temperatura ambiente durante 2 horas. As lamelas são lavadas cinco vezes em PBS e preparadas de uma maneira tal que cada uma tem go-

10 tículas de 2-5 µl de meio de suporte (anti-desvanecedor *SlowFade*, *VectaSheild* ou *ProLong*). Cobre-lamelas são montadas assegurando-se que seja removido um excesso de PBS (batendo-se de leve com o canto do cobre-lamelas em uma toalha de papel). O número de bolhas formadas duran-

15 te a montagem é limitado pela introdução da borda do cobre-lamelas no meio de montagem antes de abaixá-lo completamente. Os cobre-lamelas são vedados na lamela utilizando-se polidor de unhas e as lamelas são armazenadas no escuro a 4°C (ou -20°C durante períodos prolongados).

20 As lamelas são visualizadas utilizando-se o DeltaVision® RT Restoration Imaging System.

O protocolo do procedimento de Feulgen-Schiff, que demonstrou ser de precisão para a localização citoquímica de DNA e estequiometria, foi usado para medir 25 o teor de DNA dos núcleos. O teor de DNA foi medido em núcleos isolados pela medição da absorvência de moléculas de um complexo de Feulgen-DNA (corante-ligante) (Kjellstrand, P., J. Microscopy, 119:391-396, 1980; Andersson,

G. e Kjellstrand, P., *Histochemie*, 27:165-200, 1971). Realizou-se a medição de núcleos campaniformes não-divisórios (interfase) ande divisórios por intermédio da medição de densidade óptica integrada sobre a totalidade da área (IOD) de cada núcleo individual utilizando-se software adaptado a partir do sistema de análise de imagens *KS 400* (*Zeiss Inc, Germany*).
Esta estação operacional de análise de imagens particular (vide Figura 9D) consiste de um microscópio Axioscop 2 MOT (Zeiss) acoplado com câmara AxioCam color CCD (Zeiss) conectada a um computador, montada por Carl Zeiss Inc. Engineers, é capaz de microscopia de imagem de alta resolução de estruturas de célula e nucleares, que tem cerca de 1000 bp de DNA por pixel em medições de cromossomos de prófase prematuros. Portanto, são possíveis medições exatas de domínios de cromatina condensada de pares - 1Mb em núcleos de interfase. Imagens foram examinadas sob parâmetros constantes de ampliação, exposição de luz e limiar (contorno) dos núcleos utilizando-se filtro verde de 560 nm. Esta forma de medição do teor de DNA foi escolhida como promissora para os resultados mais exatos (Biesterfeld. S. et al., *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 23:123-128, 2001; Hardie, D. et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 50:735 - 749, 2002; Gregory and Hebert, 2002; Gregory, 2005).

Hibridização Fluorescente *in situ* para definir a distribuição especial de todos os 24 cromossomos humanos

em núcleos campaniformes em interfase e durante fissão nuclear.

Utilizou-se FISH para determinar a totalidade dos cromossomos que estão envolvidos na condensação que aparece como um "anel" no topo dos núcleos campaniformes. Basicamente, a rotulação dos cromossomos no "anel" é prognosticada como um meio para analisar a sua transformação quando núcleos campaniformes dão origem a núcleos de morfologia diferente (tal como se encontra ilustrada na Figura 10B), bem como o desenvolvimento de um marcador de fluorescência para reconhecer estes núcleos por outros meios que não morfologia nuclear.

Células de tumor de não mais que $1-5 \times 10^7$ células por lamela são espalhadas na lamela. As lâminas fixadas de duas maneiras diferentes de espalhamento de células: uma usada no protocolo para citometria de imagem de DNA de Feulgen e a outra proposta por Gibson para isolamento de células epiteliais a partir de espécimes de biópsia de colonoscópio (Gibson, P. et al., *Gastroenterology*, 96:283-291, 1989). Este último é basicamente a tomada de um tecido de tumor dentro de 30 minutos da cirurgia e imediatamente colocá-lo em 50 ml de solução salina equilibrada de Hank fria, então lavada. Os espécimes são então fragmentados com uma lâmina de bisturi e digeridos durante 1,5 h em 4 ml de meio de colagenase-Dispase (meio de cultura contendo 1,2 U/ml Dispase I (*Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Ind.*) e 50

U/ml colagenase tipo IV (Worthington, Biochemical Corp., Freehold, N.J.). A pílula é espalhada na superfície da lamela de microscópio por pressão deslizante suave no cobre-lamelas. O espalhamento por maceração de "hidrólise" 5 serve como controle positivo para verificar se ocorreu qualquer distorção de morfologia nuclear campaniforme depois da aplicação de tratamento de colagenase-Dispase para espalhamento de células. As lamelas preparadas são então submetidas a secagem e colocadas a 37°C durante a noite.

10 As lamelas são então desidratadas sucessivamente em etanol gelado a 70%, 80%, 100% sob temperatura ambiente durante 2 minutos cada uma e secadas completamente, submetidas a desnaturação em 70% formamida/2xSSC a 72°C durante 2 minutos e imediatamente desidratadas novamente com a mesma sequência e secadas completamente. Preparam-se misturas de 15 hibridização que contêm 7 µl de amortecedor de hibridização, 2 µl de água estéril, e 1 µl de sonda. As misturas são desnaturadas a 72°C durante 8 até 12 minutos e imediatamente adicionadas a lamelas que então cobertas, vedadas 20 com cimento de borracha, e colocadas a 37°C em uma caixa escura umedecida durante a noite.

As lamelas são então desidratadas em Etnol a 70% frio, etanol a 80% frio, e etanol a 100% sob temperatura ambiente durante 2 minutos cada uma; desnaturadas em formamida a 70%, 2xSSC a 72°C durante 50-60 25 segundos, na dependência da extensão da desnaturação do ácido acético. As lamelas são desidratadas novamente em etanol a 70% frio, etanol a 80% frio, e etanol a

100% sob temperatura ambiente durante 2 minutos cada uma. A mistura de hibridização inclui 7 μ l de amortecedor de hibridização, 1,5 μ l de H₂O estéril, e 1,5 μ l. São aplicadas sondas Whole Chromosome Paint (*Vysis*) com 5 corante, seja ele Spectrum Orange ou Spectrum Green fluorescente. A mistura de hibridização é desnaturada durante 5-10 minutos a 72°C e as lamelas subsequente-mente secas completamente. Uma mistura de hibridização é aplicada às lamelas, sobre-lamelas e vedadas com ci-10 mento de borracha. As lamelas são então incubadas durante a noite a 37°C em uma caixa umedecida. No dia seguinte, as lamelas são lavadas em formamida a 50%, 2xSSC a 42°C du-as vezes durante 8 minutos cada uma. As lamelas são então lavadas com 2xSSC a 37°C durante 8 minutos e então lavadas 15 três vezes em 1xPBD (0,05% Tween, 4xSSC) sob temperatura ambiente durante 1 minuto cada uma. Então, adicionam-se 10 μ l de DAPI II Antifade, 125 ng/ml (*Vysis*) e sobre-lamelas. O excesso de DAPI II Antifade é removido por ma-ta-borrão e as lamelas vedadas com cimento de borracha. 20 As lamelas são mantidas no escuro a -20°C antes do proce-dimento de varredura de imagem.

Uso de citometria de DNA quantitativo para síntese de DNA de seqüência antes, durante e depois de fissão nuclear de núcleos campaniformes.

25 As técnicas descritas neste contexto per-mitem a detecção de diferenças tão baixas quanto 2% en-tre quaisquer dois núcleos ou as anatelofases de núcleos filiais durante mitose em culturas de células humanas.

Estas técnicas foram usadas para se determinar quando o DNA é sintetizado por células ou sincícios que contêm núcleos campaniformes. Isto envolveu a varredura de núcleos que parecem estar no processo de fissão nuclear.

5 Observa-se que de um modo geral núcleos campaniformes fetais contêm a quantidade esperada de DNA de uma célula humana diplóide por comparação com o teor de DNA de linfócitos humanos na mesma lamela colorida.

Além disso, observa-se que a quantidade de DNA em núcleos campaniformes de lesões e tumores pré-

10 neoplásticos humanos desvenda uma ampla variação em torno de um meio que é em média maior do que a quantidade de DNA diplóide. Medições realizadas revelaram uma outra descoberta totalmente inesperada: a síntese

15 de DNA é concordante de preferência a preceder o processo de fissão nuclear para as fissões nucleares assimétricas que envolvem núcleos campaniformes. Os núcleos apresentam-se como estando bem juntos no processo de separação de "taça para taça" antes de um aumento no teor de

20 DNA total a partir da quantidade de núcleo individual ser claramente detectado. A quantidade total de DNA aumenta a partir de um valor baixo que se aproxima da média de núcleos de tumores individuais em núcleos que começam aparentemente a fissão e alcançam cerca de duas vezes o teor

25 nuclear médio em núcleos que parecem ter justamente completado a fissão.

Exemplo 2. Núcleos sincícios campaniformes na organogênese

fetal.

Uma série de formas nucleares anteriormente não reconhecidas foi identificada em preparados fetais humanos que deram origem aos núcleos campaniformes. Estas 5 formas foram detectadas na quinta semana, como foram os primeiros sincícios tubulares, que continham núcleos campaniformes. Exemplos destes estão ilustrados nas Figuras 13A-D. Esta é uma descoberta importante que marca a transição morfológica a partir de núcleos esféricos, mitóticos, de embriogênese prematura, para os núcleos campaniformes amitóticos posteriores, que representam a família 10 de células de "linhagem" geradora de crescimento líquido e diferenciação.

Estas descobertas são congruentes através 15 dos tipos de tecidos, uma vez que eles foram observados em uma série de preparados de tecidos incluindo, por exemplo, músculo, membros em desenvolvimento, tecido nervoso e órgãos viscerais, incluindo o estômago, pâncreas, bexiga, pulmão e fígado. Os sincícios são encontrados como cachos 20 de ~16-24 sincícios regularmente espaçados dentro da massa de órgão em desenvolvimento, cada um com ~16 núcleos campaniformes. Os sincícios são evidentes no último material humano desenvolvido disponível (~5 semanas) e desapareceram na décima - terceira semana. Depois da décima - segunda 25 semana os núcleos campaniformes são regularmente distribuídos em três dimensões de uma maneira peculiar para cada órgão.

A Figura 13A mostra um núcleo com uma con-

densação de ~10% do teor de DNA total como um "cinto" em torno do eixo longitudinal dos núcleos esféricos ou ligeiramente ovais. A Figura 13B mostra um núcleo em que dois "cintos" nucleares condensados parecem ter-se separado,

5 mas ainda são parte de um núcleo individual. A Figura 13C mostra um par de núcleos que parecem ter surgido por fissão dos dois núcleos em cinto da Figura 13B. A Figura 13D mostra que cada sincício contém um conjunto de cintos com um par de cintos individuais no seu ponto mediano linear

10 tendo bocas voltadas como na Figura 13C. Estas imagens sugerem-nos que uma série de divisões simétricas criam núcleos que se afastam em relação a um par central. A estrutura de sincício é detectada em grupos tão pequenos quanto quatro núcleos campaniformes.

15 Em estudos dos morfótipos nucleares de carcinogênese, núcleos mostraram cintos similares - um ou dois - em torno do eixo longitudinal de núcleos ovais - em pequenos números em adenomas de cólon (Figura 14A) e adenocarcinomas (Figura 14B). Esta descoberta confirma e amplia o suporte para a hipótese geral de que a oncogênese compartilha de muitas etapas de transição fenotípica chave da ontogênese presente, entretanto na ordem inversa de aparecimento.

20

Coloração FISH específica para centrômeros humanos.

25 Núcleos campaniformes extra-sincícios contêm efetivamente DNA humano. A maior parte dos centrômeros encontram-se associados com a região de DNA condensada na boca dos núcleos campaniformes em amostras

fetais. De acordo com um aspecto interessante, protocolos FISH padrão não colorem intra-sincícios campaniformes ou núcleos de outras formas, sugerindo que a barreira que contém elemento contrátil do sincício pode 5 bloquear a entrada dos reagentes FISH. A Figura 15 mostra centrômeros (em verde) de núcleos na forma esférica (Figura 15A), de "charuto"- (Figura 15B) e de sino - (Figura 15C) a partir de tecidos de cólon fetal humano com 12 semanas.

10 Observou-se igualmente que o teor de DNA dos núcleos gêmeos é igual em amitoses fetais de núcleos campaniformes, mas eles revelam um grau acentuado de segregação de DNA desigual em amitoses de núcleos campaniformes em tumores humanos a partir dos múltiplos 15 tecidos de origem. Muito embora nenhum exemplo de fissão amitótica entre os núcleos campaniformes de pólipos pré-neoplásticos de cólon tenha sido encontrado, observa-se que a dispersão acentuada de teor de DNA entre as dúzias de núcleos campaniformes encontrados por pólio 20 sugerem que a divisão de DNA desigual é um fenômeno que é operacional em pré-neoplasia bem como em neoplasia, mas não em fissões fetais de núcleos campaniformes. Estas observações ampliam as observações de Virchow e Cohnheim de que tecido de tumor e tecido embrionário 25 têm aspectos histológicos similares, ao mesmo tempo em que também expandem aquelas de Boveri de que células de tumor em mitose revelam uma grande fração de cromossomos anômalos comuns a todas as células do tumor- suge-

rindo uma origem comum anterior na formação ou segregação cromossômica instável.

Morfologia nuclear em camundongos.

Todas as várias formas de núcleos, em particular incluindo os núcleos campaniformes, formas pré-sinciciais e sinciciais em morfologia quase idêntica às Figuras 13A-D foram encontradas em tecido de camundongos fetais, com as formas pré-sinciciais primeiro detectadas em fetos de 12,5 dias, então em 14,5 - 16,5 dias, estreitamente paralelas ao período de definição de órgãos no camundongo fetal. Embora estas descobertas no camundongo não sejam surpreendentes dadas as observações humanas, elas abrem um amplo espectro de possibilidades de estudos de organogênese em espécies não humanas não éti-
cas ou possíveis em seres humanos.

Em amostras de descartes fetais fixos de qualidade variáveis da quinta até à décima - sexta semana de gestação, os sincícios não são mais evidentes, mas núcleos campaniformes são distribuídos em padrões regulares na totalidade dos órgãos em desenvolvimento.

Exemplo 3.

Sincícios e núcleos campaniformes abundantes do intestino primitivo são usados para aplicar uma série de procedimentos histoquímicos, incluindo FISH, para definir as posições de cromossomos e elementos cromossômicos, várias moléculas contráteis (por exemplo, actin) e outros marcadores identificáveis, incluindo aqueles comumente de-

nominados "marcadores de células de linhagem". As técnicas descritas neste contexto são aplicadas à tarefa de coletar núcleos sinciciais e individuais utilizando o instrumento de micro-dissecção ZEISS-P.A.L.M.. O critério de 5 êxito é a coleta de uma série de amostras homogêneas com relação às formas sinciciais ou morfótipos nucleares em números iguais ou maiores do que 10.000 equivalentes nucleares, números suficientes para a varredura de mRNAs celulares, proteínas e glicoseaminoglicans que são mais co- 10 muns.

Muito embora esta invenção fosse ilustrada e descrita com particularidade com referência a concretizações preferidas da mesma, será compreendido por aqueles versados na técnica que várias alterações na 15 forma e detalhes poderão ser realizadas sem com isso fugir do escopo da invenção abrangido pelas reivindicações em anexo.n.

REIVINDICAÇÕES

1 - Método para inibir células de linhagem de tumor, **caracterizado** pelo fato de compreender alvejar a célula de linhagem de tumor com um agente ou tratamento que modifica quimicamente uma molécula específica de célula de linhagem de tumor, impedindo desta forma a proliferação de células de linhagem de tumor.

5
2 - Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a molécula específica de célula de linhagem de tumor é sintetizada e segregada em núcleos campanulares.

10
3 - Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a molécula específica de célula de linhagem de tumor é DNA de trançado simples (ssDNA).

15
4 - Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o agente é um agente químico.

20
5 - Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o agente é uma enzima.

25
6 - Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento é por radiação.

7 - Método para inibir o crescimento de tumores em um paciente, **caracterizado** pelo fato de compreender alvejar uma célula de linhagem de tumor no paciente com um agente ou tratamento que modifica quimi-

camente a molécula específica de célula de linhagem de tumor, impedindo desta forma a proliferação de células de linhagem de tumores.

8 - Método, de acordo com a reivindicação 5 7, **caracterizado** pelo fato de que a molécula específica de célula de linhagem de tumor é sintetizada e segregada em núcleos campanulares.

9 - Método, de acordo com a reivindicação 10 7, **caracterizado** pelo fato de que a molécula específica de célula de linhagem de tumor é DNA de traçado simples (ssDNA).

10 - Método, de acordo com a reivindicação 15 7, **caracterizado** pelo fato de que o agente é um agente químico.

11 - Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o agente é uma enzima.

12 - Método, de acordo com a reivindicação 20 7, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento é por radiação.

TIPOS MORFO-NUCLEAR	TRIPA FETAL	COLON ADULTO NORMAL	ADENOCARCINOMA, ADENOMA
NÚCLEO EM FORMA DE SINO	 PRÓFASE INICIAL NÃO OBSERVADA		
NÚCLEO ESFÉRICO	 E.P.		
NÚCLEO EM FORMA OVAL		E.P.	 E.P.
NÚCLEO EM FORMA DE CIGARRO	 E.P.	NÃO OBSERVADO	
NÚCLEO EM FORMA DE BALA	NÃO OBSERVADO	NÃO OBSERVADO	
NÚCLEO ESFÉRICO CONDENSSADO		NÃO OBSERVADO	NÃO OBSERVADO
NÚCLEO EM FORMA DE FEIJÃO	 E.P.	NÃO OBSERVADO	NÃO OBSERVADO
NÚCLEO EM FORMA DE SALCHISA	 E.P.	NÃO OBSERVADO	

FIG. 1A



FIG. 1B

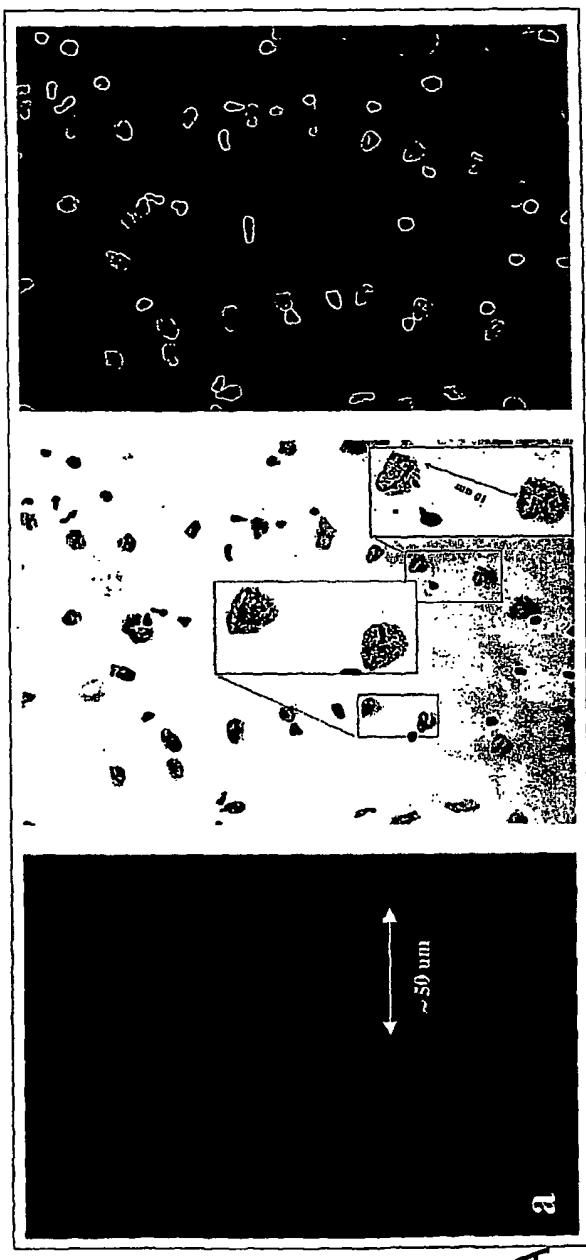


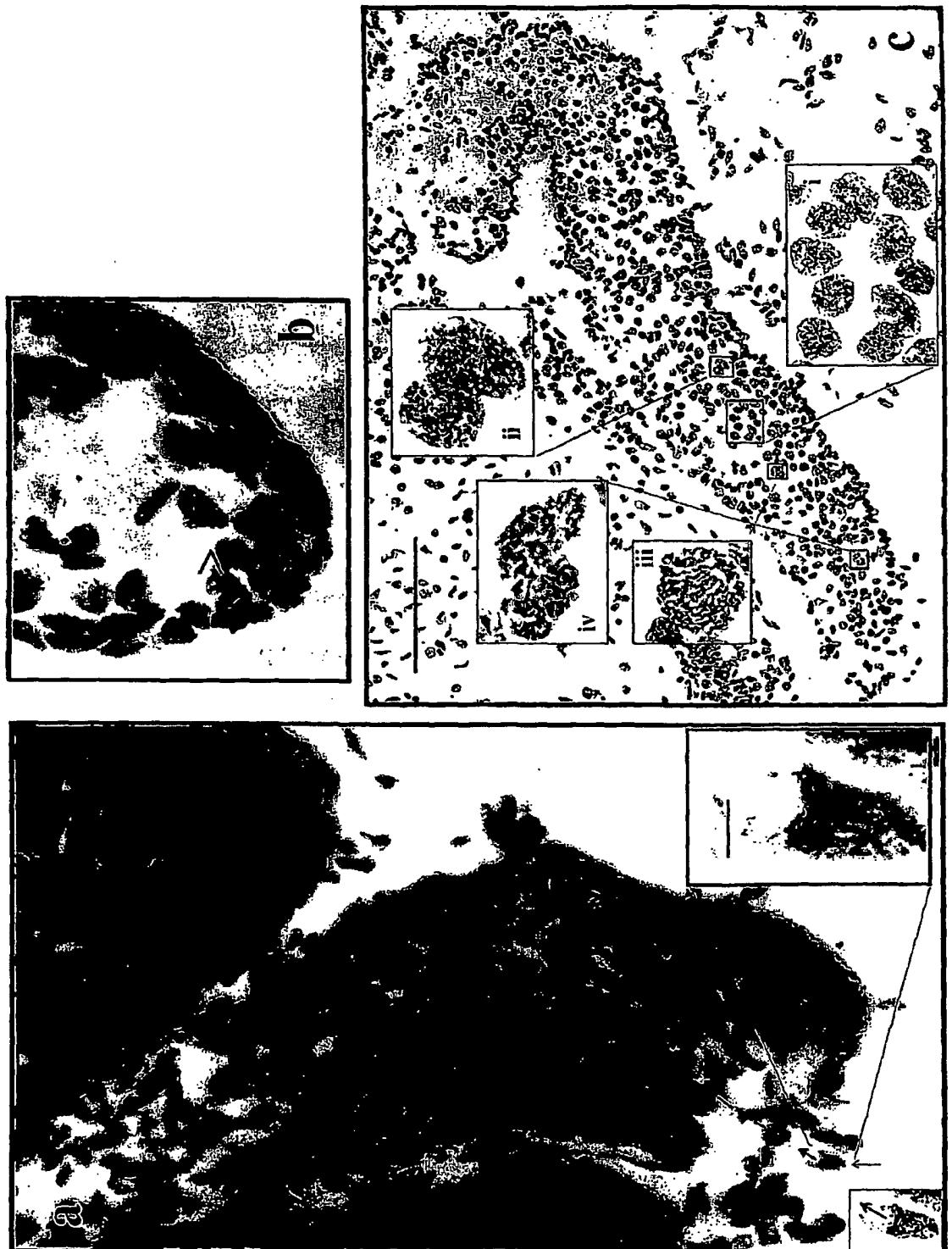
FIG. 2A
a



FIG. 2B



FIG. 3



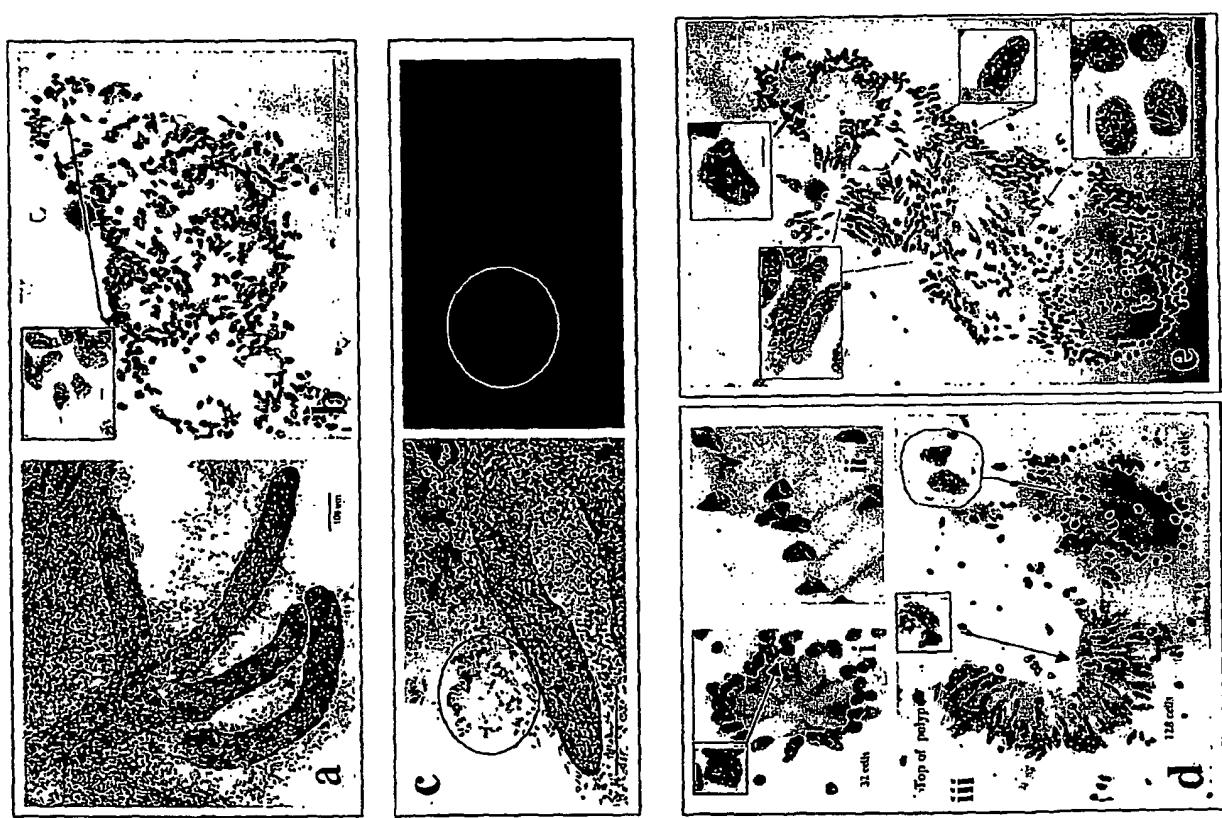


FIG. 5

6/15



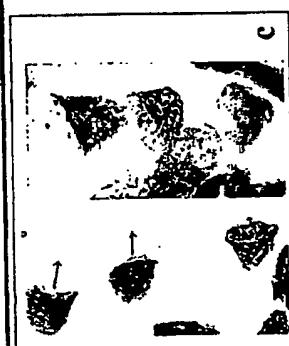
e



d



b



c



a

FIG. 6

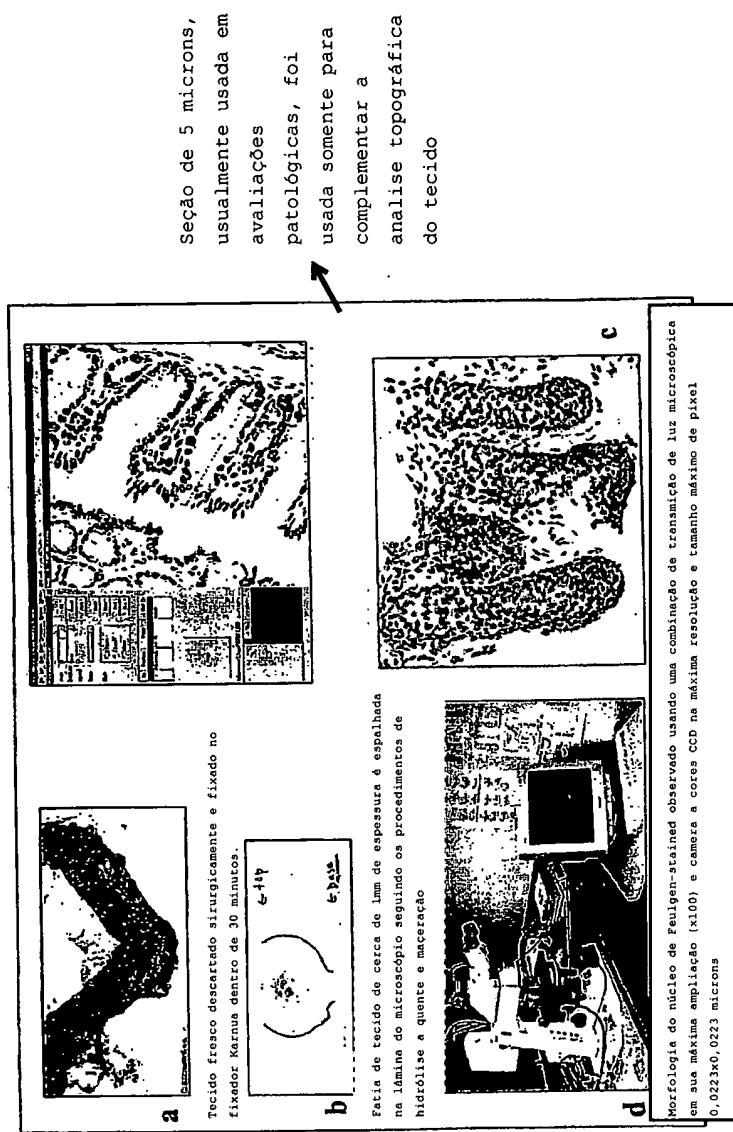


FIG. 7

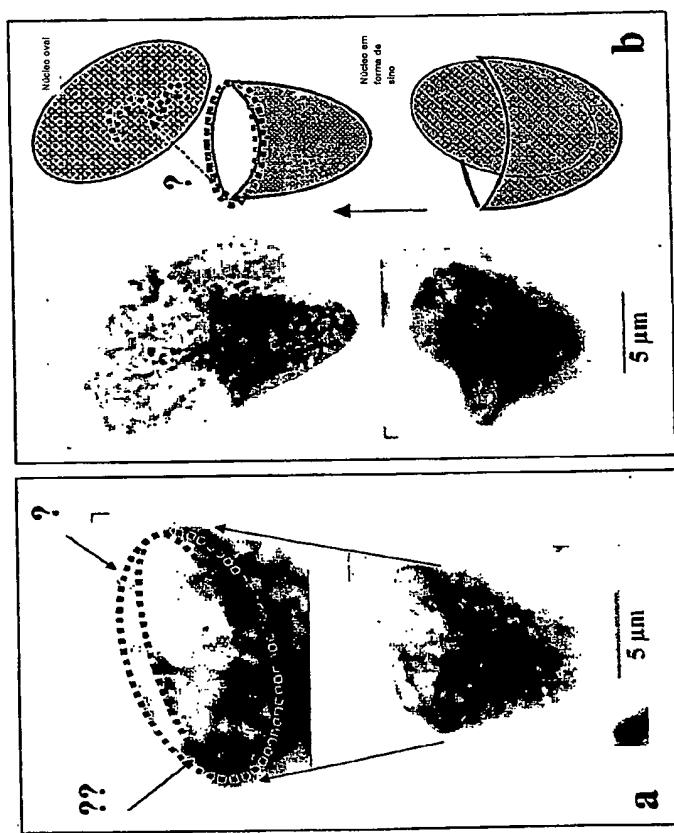


FIG. 8

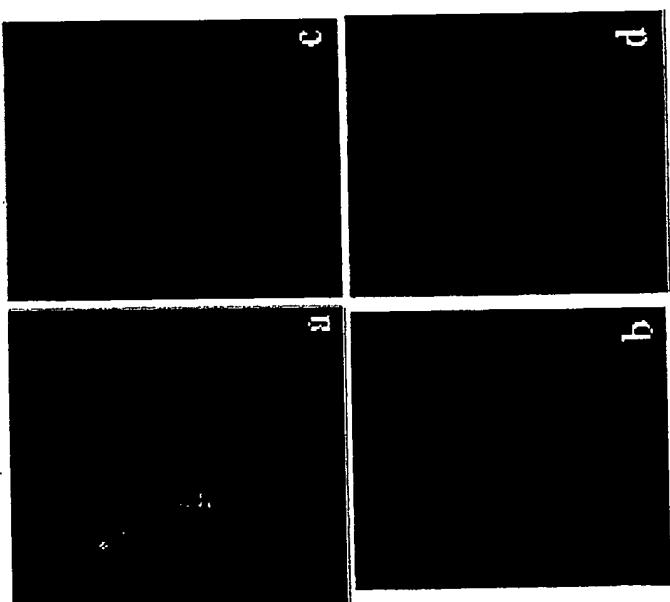
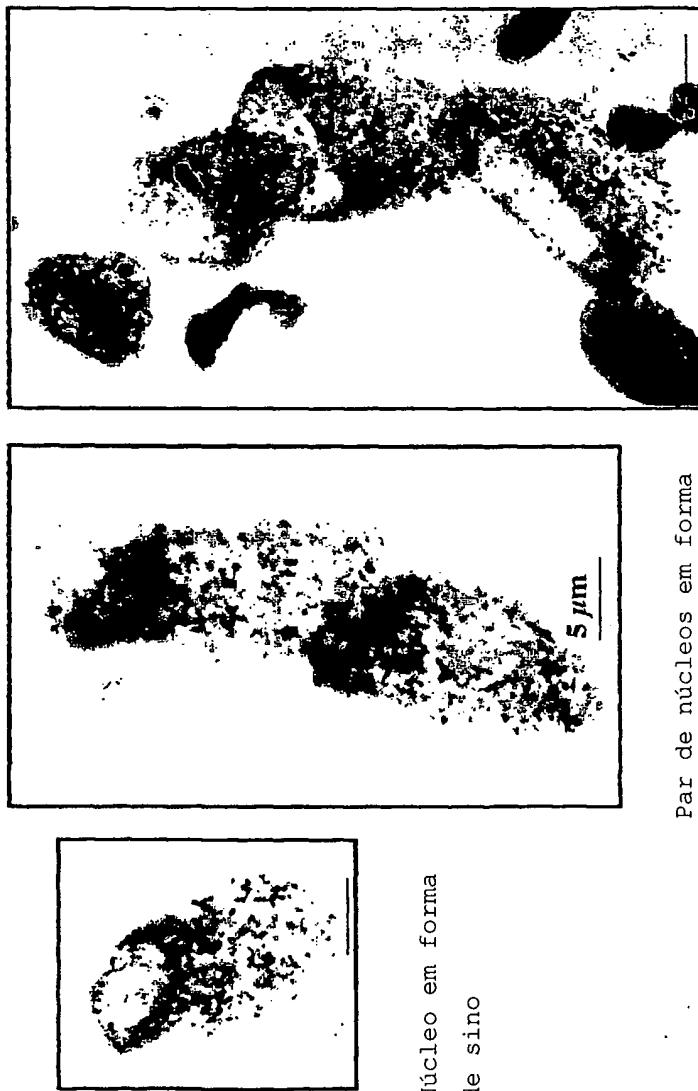


FIG. 9

Fissão nuclear de forma de sino cria a sincícia:



Par de núcleos em forma de sino morfologicamente idênticos

Divisão parassíncronica
do núcleo de forma de sino

10/15

FIG. 10

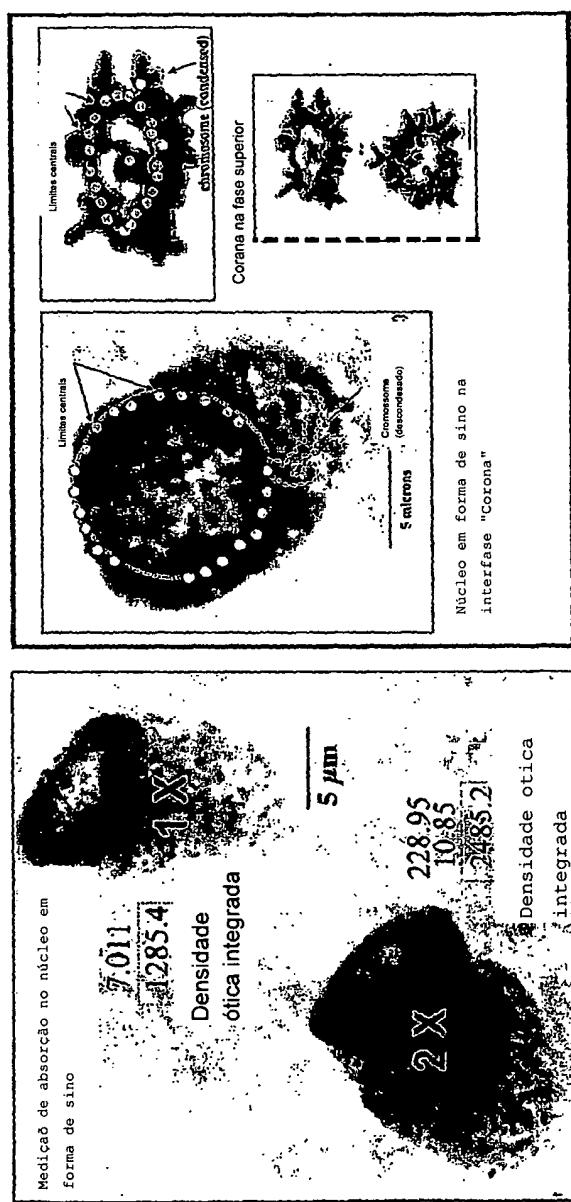


FIG. 11

12/15

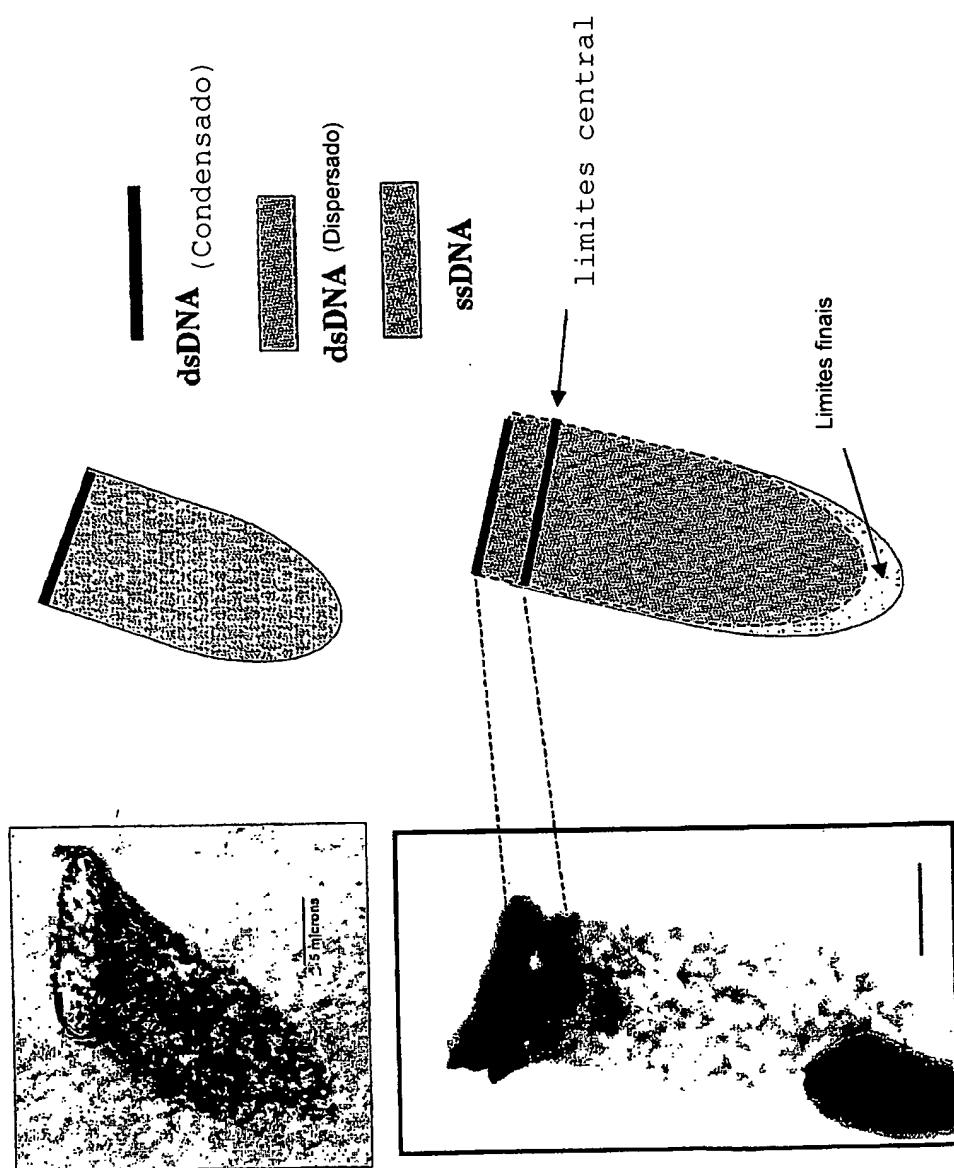


FIG. 12

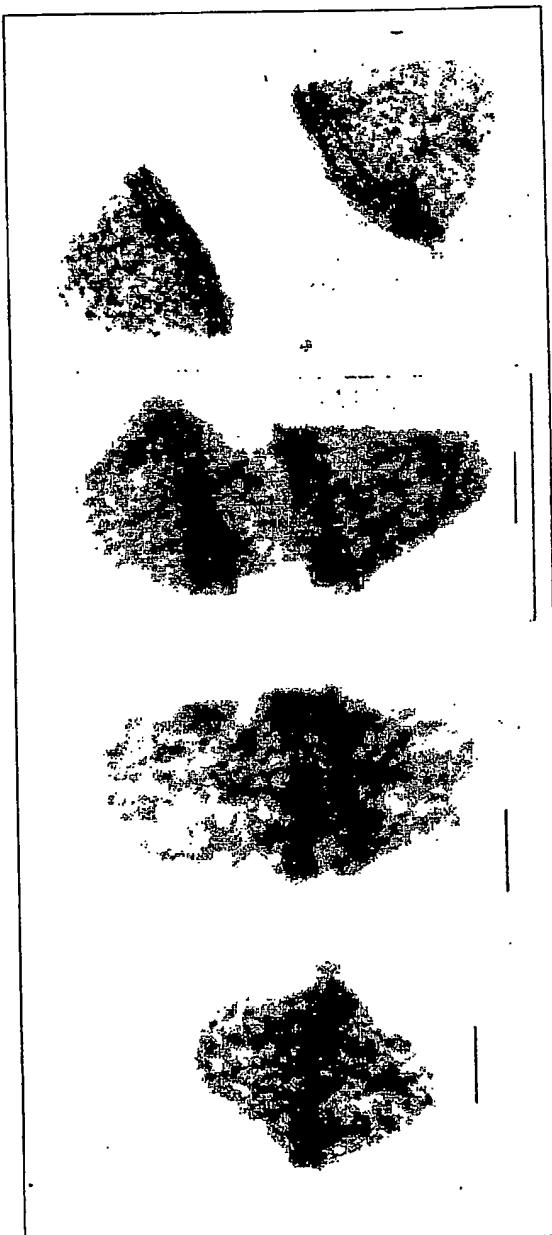


FIG. 13A FIG. 13B FIG. 13C FIG. 13D

14/15



FIG. 14B

FIG. 14A

15/15

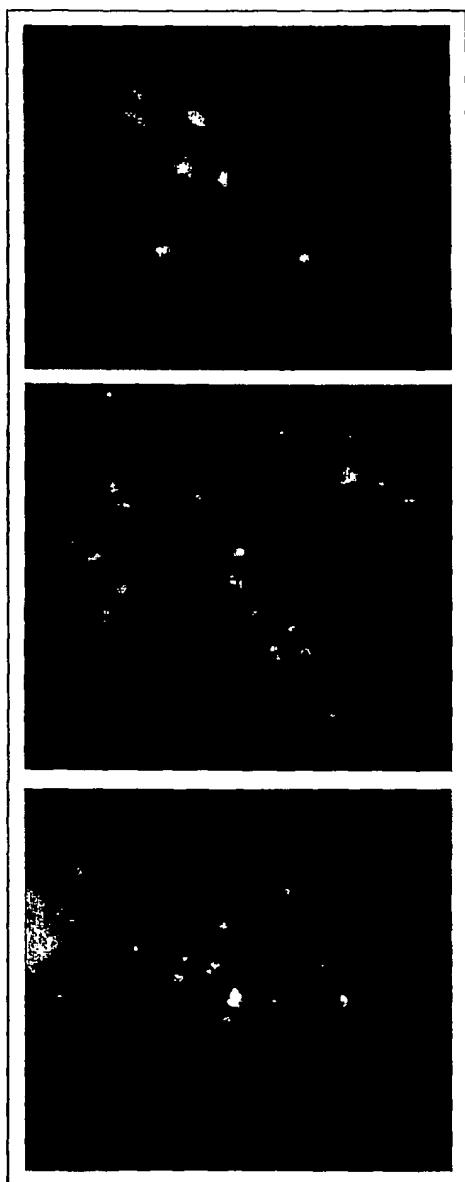


FIG. 15A FIG. 15B

FIG. 15C

RESUMO

MÉTODO PARA INIBIR CÉLULAS DE LINHAGEM DE TUMOR E PARA
INIBIR O CRESCIMENTO DE TUMORES EM UM PACIENTE

Descrevem-se neste contexto métodos para
5 inibir o crescimento de tumores que compreendem alvejar
uma célula de linhagem de tumor no paciente com um agente
ou tratamento que modifica quimicamente uma molécula es-
pecífica de célula de linhagem de tumor, impedindo desta
forma a proliferação de células de linhagem de tumores.