

(11) Número de Publicação: **PT 1715340 E**

(51) Classificação Internacional:
G01N 33/50 (2007.10) **G01N 1/36** (2007.10)
G01N 1/08 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1999.02.24**

(30) Prioridade(s): **1998.02.25 US 75979 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.10.25**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.09.03**
244/2008

(73) Titular(es):
**THE UNITED STATES GOVERNMENT AS
REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF
HEALTH AND HUMAN SERVICES
OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, SUITE
325, 6011 EXECUTIVE BOULEVARD
ROCKVILLE, MD 20852-3804** **US**

(72) Inventor(es):
JUHA KONONEN **US**
OLLI KALLIONIEMI **US**
STEPHEN B. LEIGHTON **US**

(74) Mandatário:
**MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODO E APARELHO PARA PREPARAR UMA SÉRIE PARA O
ESTABELECIMENTO RÁPIDO DE PERFIS MOLECULARES**

(57) Resumo:

RESUMO

"MÉTODO E APARELHO PARA PREPARAR UMA SÉRIE PARA O ESTABELECIMENTO RÁPIDO DE PERFIS MOLECULARES"

Uma tecnologia à base de séries facilita o estabelecimento rápido de perfis de número de cópias e expressão de genes correlacionados de números muito grandes de tumores humanos. Centenas de biopsias de tecidos cilíndricas (diâmetro 0,6 mm) de regiões morfológicamente representativas de tumores individuais podem ser dispostas em série num único bloco de parafina. Secções consecutivas dessas séries fornecem alvos para visualização e quantificação *in situ* paralelas de alvos de DNA, RNA ou proteínas. Por exemplo, amplificações de seis *loci* (*mybL2*, *erbB2*, *Ciclina-D1*, *myc*, *17q23* e *20q13*) foram rapidamente determinadas por hibridização *in situ* com fluorescência a partir de 372 cancros da mama fixados em etanol. A estratificação de tumores por dados de receptores de estrogénio e expressão de p53 revelou padrões distintos de amplificação de genes nos vários subgrupos de cancro da mama que podem ter utilidade em prognóstico. A tecnologia de séries de tecidos é útil no estabelecimento rápido de perfis moleculares de centenas de espécimes de tecidos ou células cultivadas normais e patológicos.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO E APARATO PARA PREPARAR UMA SÉRIE PARA O ESTABELECIMENTO RÁPIDO DE PERFIS MOLECULARES"

ÁREA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método e aparelho para a preparação de espécimes de tecido para análise paralela.

CONTEXTO DA INVENÇÃO

Os mecanismos biológicos de muitas doenças foram clarificados por exame microscópico de espécimes de tecidos. O exame histopatológico também permitiu o desenvolvimento de tratamentos médicos eficazes para uma variedade de doenças. Em patologia anatômica comum, faz-se um diagnóstico com base na morfologia e características de coloração celulares. Espécimes de tumores, por exemplo, podem ser examinados para caracterizar o tipo de tumor e prever se o paciente irá responder a uma forma particular de quimioterapia. Apesar deste exame microscópico e classificação de tumores terem melhorado os tratamentos médicos, é frequente a aparência microscópica de um espécimen de tecido corado por métodos comuns (como hematoxilina e eosina) revelar apenas uma quantidade limitada de informações de diagnóstico ou moleculares.

Avanços recentes em medicina molecular forneceram uma oportunidade ainda maior para compreender os mecanismos celulares de doenças e seleccionar tratamentos apropriados com a maior probabilidade de sucesso. Por exemplo, algumas células de tumores da mama dependentes de hormonas têm uma expressão acrescida de receptores de estrogénio nas suas superfícies celulares, indicando que o paciente de onde foi

recolhido o tumor responderá provavelmente a certos tratamentos com fármacos anti-estrogénicos. Outras alterações celulares de diagnóstico e prognóstico incluem a presença de antígenos da superfície celular específicos para tumores (como em melanoma), a produção de proteínas embrionárias (como α -fetoproteína em cancro do fígado e antígenos de glicoproteínas carcino-embrionárias produzidos por tumores gastrointestinais) e anormalidades genéticas (como oncogenes activados em tumores). Uma variedade de técnicas evoluiu para detectar a presença destas anormalidades celulares, incluindo imunofenotipagem com anticorpos monoclonais, hibridização *in situ* com sondas e amplificação de DNA utilizando a reacção em cadeia de polimerase (PCR).

No entanto, o desenvolvimento de novos marcadores moleculares tem sido dificultado pela incapacidade para agrupar um grande número de tecidos numa área superficial pequena. Pode ser disponibilizada apenas uma quantidade limitada de sobrenadante de hibridoma, particularmente durante a fase inicial da geração de anticorpos monoclonais, o que limita o número de espécimes que podem ser analisados. Contudo, mesmo que estejam disponíveis grandes quantidades do agente imuno-histológico, os reagentes são dispendiosos e a sua reactividade pode variar. Estes problemas conduziram Battifora *et al.* a propor, em *Lab. Invest.* 55: 244-248 (1986), e na Patente U.S. Nº 4 820 504, que múltiplos espécimes de tecidos possam ser agrupados em conjunto numa única lamela para permitir que os espécimes sejam rastreados simultaneamente por aplicação de uma única gota de hibridoma de um sobrenadante. Os espécimes foram preparados utilizando uma lâmina de barbear manual para cortar em tiras espécimes de

tecidos desparafinados e desidratados, que depois foram reunidos em feixes aleatoriamente, envolvidos num invólucro de salsicha e novamente embutidos em parafina. Esta técnica exigiu um grau elevado de destreza manual e incorporou amostras num bloco compósito de um modo que dificultou encontrar e identificar espécimes particulares de interesse.

Uma modificação deste processo foi revelada por Wan *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 103: 121-129 (1987), e Furmansky *et al.* na Patente U.S. Nº 4 914 022, na qual se obtiveram núcleos de tecidos embutidos em parafina a partir de blocos de tecidos comuns. Os núcleos foram suavizados e endireitados enrolando-os manualmente numa superfície morna e depois foram reunidos em feixes dentro de uma palhinha de beber convencional. Foi afirmado que este método é adequado para a realização de testes histológicos simultâneos de múltiplos espécimes de tecidos, por exemplo, na caracterização de anticorpos monoclonais. De modo semelhante, a técnica de Miller e Groothuis, *A.J.C.P.* 96: 228-232 (1991), enrolou tiras de tecidos em "troncos" de onde se recolheram secções transversais para serem embutidas em parafina. No entanto, as técnicas da palhinha e do tronco requereram muito trabalho, um grau elevado de destreza manual e também dispuseram as amostras aleatoriamente de um modo que complicou a identificação de espécimes de interesse.

Battifora e Mehta, *Lab. Invest.* 63: 722-724 (1990), e Patente U.S. Nº 5 002 377, tentaram ultrapassar alguns dos problemas da colocação aleatória cortando espécimes numa pluralidade de tiras estreitas, que foram individualmente posicionadas em fendas rectangulares paralelas de um molde.

As tiras de tecidos foram embutidas em gel de agar, que foi derramado nas fendas para produzir um membro de tipo placa com uma série de estrias. Várias das placas com estrias foram empilhadas e embutidas em parafina para formar um bloco de tecidos. Uma abordagem semelhante foi proposta por Sundblad, A.J.C.P. 102: 192-193 (1993), na qual as tiras de tecidos foram colocadas em cunhas triangulares em vez de fendas rectangulares. Cortar o tecido em tiras, reuni-las em linhas e embuti-las em vários passos para formar o bloco foi um método demorado que reduziu a eficiência do exame de um grande número de espécimes de tecidos.

Todas estas técnicas têm sido inadequadas para a preparação eficiente de uma série de espécimes de tecidos que possa ser utilizada para análise paralela rápida de uma variedade de marcadores moleculares independentes. Esta ineficiência tem sido um problema importante em áreas tais como a investigação de cancro, porque o desenvolvimento e a progressão de cancros são um processo em múltiplos passos que envolve perdas, rearranjos e amplificações sequenciais de várias regiões cromossómicas e múltiplos genes. Estes acontecimentos conduzem a uma desregulação de vias de transdução do sinal críticas para o crescimento, morte e diferenciação celulares. Os pormenores deste processo complexo permanecem incompletamente compreendidos, parcialmente porque ainda não foram disponibilizadas estratégias e técnicas de alto rendimento para analisar essas alterações genéticas em grandes números de tumores humanos não cultivados.

Por exemplo, a análise simultânea de vários genes na mesma via de transdução do sinal ou em vias de transdução do sinal relacionadas pode ser necessária para localizar

passos críticos e limitadores da velocidade na desregulação do crescimento de células cancerígenas. Suplementarmente, a análise de alterações estruturais e numéricas que afectam vários cromossomas, *loci* e genes ao mesmo tempo poderá ser necessária para compreender os padrões de acumulação de alterações genéticas em diferentes fases da progressão de cancro. Por fim, depois de terem sido identificados novos genes e alterações genéticas de importância potencial em cancro, é habitualmente necessária investigação adicional substancial para determinar o significado de diagnóstico, prognóstico e terapêutico destes marcadores moleculares em oncologia clínica.

Uma vez que a quantidade de tecido torna-se, muitas vezes, limitadora da velocidade para esses estudos, é importante a capacidade para procurar, fixar, armazenar e distribuir eficientemente tecidos para análise molecular de um modo que minimize o consumo de espécimes tumorais frequentemente únicos e preciosos. Em consequência, um objectivo desta invenção consiste em estabelecer perfis moleculares em larga escala de espécimes de tecidos (como tumores), com requisitos mínimos de tecidos, de um modo que permita uma análise paralela rápida de características moleculares (como dosagem e expressão de genes) de centenas de espécimes de tumores morfolologicamente controlados.

A patente US-A-4 684 613 refere-se a um dispositivo para efectuar recolhas de amostras de meios semi-sólidos através de uma punção recíproca.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os objectivos anteriores são atingidos por um método de acordo com a Reivindicação 1.

Numa especificação mais particular do método, forma-se um bloco receptor a partir de um meio de fixação rígido, como parafina, que pode ser cortado com uma punção ou micrótomo, e também se forma um bloco dador separado embutindo um espécime biológico no meio de fixação. Perfuram-se no bloco receptor núcleos de receptáculos cilíndricos para formar uma série de receptáculos em posições fixas, e obtêm-se núcleos de amostras dadoras cilíndricas do espécime biológico embutido no bloco dador. Em seguida, os núcleos das amostras dadoras são colocados nos receptáculos cilíndricos em localizações atribuídas da série, e o bloco receptor é cortado em tiras para se obter uma secção transversal dos núcleos de amostras dadoras da série sem destruir as localizações atribuídas na série. Em cada secção pode efectuar-se uma análise histológica diferente, por exemplo, utilizando diferentes anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos distintos, ou uma combinação de anticorpos monoclonais antigenicamente distintos e sondas de ácidos nucleicos (por exemplo, RNA e DNA) em secções sequenciais. Compara-se o resultado de cada análise histológica distinta em cada posição da série, por exemplo, para determinar se um tecido que expressa um receptor de estrogénio também tem evidências de um oncogene particular ter sido activado.

Numa especificação mais particular do método, forma-se um bloco receptor a partir de um meio de fixação rígido, como parafina, que pode ser cortado com uma punção ou micrótomo, e também se forma um bloco dador separado embutindo um espécime biológico no meio de fixação. Perfuram-se no bloco receptor núcleos de receptáculos cilíndricos para formar uma série de receptáculos em posições fixas, e obtêm-se núcleos de amostras dadoras cilíndricas do espécime

biológico embutido no bloco dador. Em seguida, os núcleos de amostras dadoras são colocados nos receptáculos cilíndricos em localizações atribuídas da série, e o bloco receptor é cortado em tiras para se obter uma secção transversal dos núcleos de amostras dadoras da série sem destruir as localizações atribuídas na série. Em cada secção pode efectuar-se uma análise histológica diferente, por exemplo, utilizando diferentes anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos distintos, ou uma combinação de anticorpos monoclonais antigenicamente distintos e sondas de ácidos nucleicos (por exemplo, RNA e DNA) em secções sequenciais. Compara-se o resultado de cada análise histológica distinta em cada posição da série, por exemplo, para determinar se um tecido que expressa um receptor de estrogénio também tem evidências de um oncogene particular ter sido activado. A presença ou ausência do receptor de estrogénio e oncogene pode então ser correlacionada com informações clínicas ou patológicas sobre o tecido (como a presença de doença metastática ou o nível histológico de um tumor). Esta análise paralela simultânea de múltiplos espécimes ajuda a clarificar as inter-relações de múltiplas características moleculares e clínicas do tecido.

A divulgação também inclui um método para obter pequenas amostras alongadas de tecido de um espécime de tecido, como um tumor, e o espécime pode ser submetido a uma análise laboratorial, como uma análise histológica ou molecular. A amostra de tecido alongada pode ser recolhida de uma região de interesse do espécime de tecido, e a dimensão da amostra é suficientemente pequena para que a característica a ser analisada seja substancialmente homogénea em toda a amostra pequena. Numa especificação revelada, a amostra é uma amostra cilíndrica puncionada do espécime de tecido, em que

o espécime cilíndrico tem cerca de 1-4 mm de comprimento e tem um diâmetro de cerca de 0,1-4 mm, por exemplo, cerca de 0,3-2,0 mm. Em formas de realização específicas, o diâmetro do cilindro é inferior a cerca de 1,0 mm, por exemplo, 0,6 mm. A amostra é preferivelmente conservada de um modo (como fixação em etanol) que não interfere com a análise de ácidos nucleicos; em consequência, a amostra pode ser sujeita a qualquer tipo de análise molecular, tal como qualquer tipo de análise molecular baseada em DNA ou RNA isolado.

A invenção também inclui um aparato para preparar espécimes destinados a análise paralela de secções de séries de materiais biológicos, como definido na Reivindicação 18. O aparato pode incluir uma plataforma e um bloco dador de tecido na plataforma, uma punção para puncionar ou perfurar um espécime de tecido do bloco dador. A plataforma também pode conter um bloco receptor no qual a punção forma uma série de receptáculos em posições seleccionadas. Cada receptáculo pode ser posicionado de modo que um espécime de tecido possa ser expelido da punção recíproca para o receptáculo. Um dispositivo de posicionamento x-y move, de forma incrementada, a punção ou bloco receptor um relativamente ao outro à medida que a punção executa o movimento de vaivém, para formar a série de receptáculos. O dispositivo de posicionamento x-y também alinha receptáculos sequenciais do bloco receptor com a punção, para distribuir espécimes de tecidos da punção para o receptáculo. Pode introduzir-se na punção um estilete para expelir o conteúdo da punção, que pode ser parafina do bloco receptor ou tecido do bloco dador. As regiões de interesse do espécime de tecido são localizadas posicionando uma lamela de secção fina sobre o bloco dador,

para alinhar estruturas de interesse na lamela de secção fina com regiões correspondentes do espécime de tecido do bloco dador.

Numa forma de realização preferida, a invenção utiliza um sistema implementado num computador para a análise paralela de secções consecutivas de séries de tecidos, na qual uma plataforma de posicionamento x-y movimenta um tabuleiro para uma variedade de coordenadas que correspondem a posições numa série de blocos receptores. Uma punção receptora punciona então um núcleo receptor de um bloco receptor na plataforma de posicionamento e um estilete expelle o núcleo receptor da punção receptora. Uma punção dadora (que poderá ser a mesma ou outra independente da punção receptora) punciona um espécime dador de um bloco dador na plataforma de posicionamento e um estilete expelle o espécime dador da punção dadora no receptor assim que a punção dadora é introduzida no receptor. O espécime dador tem adequadamente um diâmetro que é substancialmente o mesmo que o diâmetro do receptor, de modo a que o espécime dador encaixa de modo seguro no receptáculo. O sistema de computador identifica o tecido através da sua localização na série receptora, de tal modo que quando o bloco dador é seccionado para uma posição correspondente em cada série seccional, esta irá conter tecido do espécime dador idêntico.

Os objectivos, características e vantagens anteriores e outros da invenção tornar-se-ão mais claros a partir da descrição pormenorizada seguinte de especificações preferidas, que prossegue com referência às figuras em anexo.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

- A FIG. 1 é uma perspectiva esquemática de uma primeira especificação do dispositivo de punção da presente invenção, mostrando o alinhamento da punção acima de uma região de interesse de tecido dador num bloco dador.
- A FIG. 2 é semelhante à FIG. 1, mas em que a punção foi avançada para obter uma amostra de espécime dador.
- A FIG. 3 é uma perspectiva esquemática de um bloco receptor onde foi colocado o espécime dador.
- As FIGs.4-8 ilustram os passos da preparação de séries de secção fina a partir do bloco receptor.
- A FIG. 9 é uma perspectiva de um dispositivo de retenção para manter um espécime montado numa lamela acima do tecido do bloco dador, para localizar uma região de interesse.
- A Fig. 10A é uma perspectiva de uma série de tecido de secção fina, corada com H&E, montada numa lamela para exame microscópico.
- A FIG. 10B é uma ampliação de uma porção da lamela da FIG. 10A, mostrando resultados da hibridização *in situ* de mRNA de erbB2 numa série de tecidos da região do rectângulo pequeno da FIG. 10A.
- A FIG. 10C é um gel de electroforese mostrando que DNA e RNA de elevado peso molecular podem ser extraídos dos espécimes de cancro da mama.
- A FIG. 10D é uma ampliação de uma das amostras de tecido da série da FIG. 10A, mostrando uma coloração de imunoperoxidase para o antigene de erbB2.
- A FIG. 10E é semelhante à FIG. 10D, mostrando amplificação em nível elevado do gene erbB2 detectada por hibridização *in situ*

fluorescente (FISH) de tecido na série por uma sonda de DNA de erbB2.

- A FIG. 11 é um esquema que ilustra um exemplo da análise paralela de séries obtidas pelo método da presente invenção.
- A FIG. 12 é uma ampliação de uma porção da FIG. 11.
- A FIG. 13 é uma perspectiva de topo de uma segunda especificação de um dispositivo para formar as séries da presente invenção.
- A FIG. 14 é uma perspectiva de frente do dispositivo mostrado na FIG. 13, ilustrando a formação de um receptáculo num bloco receptor com uma punção receptora.
- A FIG. 15 é semelhante à FIG. 14, mas mostrando a expulsão de um tampão da punção receptora para um tabuleiro de desperdícios.
- A FIG. 16 mostra uma punção dadora obtendo um espécime de tecido de um bloco dador.
- A FIG. 17 mostra a inserção do tecido dador num receptáculo do bloco receptor.
- A FIG. 18 é uma ampliação da punção dadora alinhada acima de uma estrutura de interesse do bloco dador, da qual se mostra a secção transversal.
- A FIG. 19 é uma perspectiva ampliada da secção transversal da punção receptora, ao passo que a FIG. 20 é uma perspectiva semelhante da punção dadora, ilustrando os diâmetros relativos das secções transversais das duas punções.
- A FIG. 21 é uma perspectiva da secção transversal do bloco receptor com os espécimes dadores dispostos na série receptora, e mostrando-se

linhas de secções de micrótomo do bloco receptor.

A FIG. 22 é um esquema de um sistema computacional no qual pode ser implementado o método da presente invenção.

A FIG. 23 é um algoritmo que ilustra um exemplo do método da presente invenção implementado computacionalmente.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA

Especificação das FIGS. 1-10

Mostra-se nas FIGS. 1-2 uma primeira especificação de um dispositivo para preparar as micro-séries da presente invenção, em que se mostra um bloco dador 30 num recipiente rectangular 31 montado numa plataforma estacionária 32, com uma guia na extremidade configurado em L 34 que mantém o recipiente dador 31 numa orientação predeterminada na plataforma 32. Um aparato de punção 38 está montado acima da plataforma 32, que inclui uma placa de guia vertical 40 e uma placa de posicionamento horizontal 42. A placa de posicionamento 42 está montada num estrado x-y (não mostrado) que pode ser posicionado de forma precisa com um par de micrómetros digitais.

A placa de guia vertical 40 tem uma face de frente plana que fornece uma superfície de guia de precisão contra a qual uma base de punção recíproca 44 pode deslizar ao longo de uma calha 46, entre uma posição retraída mostrada na FIG. 1 e uma posição estendida mostrada na FIG. 2. Uma banda elástica 48 ajuda a controlar o movimento da base 44 ao longo deste percurso, e os limites de avanço e retracção da base 44 são fixados pelo membro de calha 46, que forma

uma terminação que limita a amplitude da oscilação da base 44. Uma punção em tubo de aço inoxidável de paredes finas 50 com extremidades condutoras afiadas está montada na face inferior plana da base 44, de modo que a punção 50 pode ser avançada e retraída relativamente à plataforma 32 e ao recipiente 31 da plataforma. O interior oco da punção 50 é contínuo com uma perfuração cilíndrica através da base 44, e a perfuração abre na abertura 51 na borda horizontal 53 da base 44.

A FIG. 1 mostra que uma secção fina de tecido pode ser obtida do bloco dador 30 e montada numa lamela 52 (com preparação e coloração apropriadas), de modo a ser possível localizar no bloco 30 estruturas anatómicas e micro-anatómicas de interesse. A lamela 52 pode ser mantida acima do bloco dador 30 por um suporte de braço articulado 54 (FIG. 9) com um gancho 56, que fixa de forma segura uma extremidade de uma lamela de suporte transparente 58. O suporte em braço 54 é articulado na junção 60, para girar em torno desse eixo entre uma primeira posição, em que a lamela de suporte 58 está fixa na posição acima do recipiente 31, e uma segunda posição, em que a lamela de suporte 58 é movida horizontalmente para sair da posição mostrada na FIG. 9, permitindo o acesso livre à punção 50.

No modo de operação, o recipiente rectangular 31 é colocado na plataforma 32 (FIG. 1) com as extremidades do recipiente 31 confinando com as guias na extremidade 34, para manter o recipiente 31 numa posição seleccionada. Prepara-se um bloco dador 30 embutindo um grande espécime de tecido (como um espécime de tumor tridimensional 62) em parafina. Uma secção fina do bloco dador 30 é removida com uma lâmina de barbear, é corada e montada na lamela 52 na forma da secção

fina 64, e a lamela 52 é seguidamente colocada na lamela de suporte 58 e posicionada acima do bloco dador 30, como mostrado na FIG. 9. A lamela 52 pode ser movida na lamela de suporte 58 até as extremidades da secção fina 64 estarem alinhadas com as extremidades do grande espécime patológico 62, como mostrado pelas linhas tracejadas na FIG. 9. O braço 54 é então bloqueado na primeira posição, à qual pode subseqüentemente regressar depois de ter sido deslocado para a segunda posição.

Em seguida, uma estrutura micro-anatómica ou histológica de interesse 66 pode ser localizada examinando a secção fina ao microscópio (não mostrado). Se o espécime de tecido for, por exemplo, um adenocarcinoma da mama, então a localização de interesse 66 pode ser uma área do espécime na qual a arquitectura celular sugere metaplasia (por exemplo, núcleos picnóticos, pleomorfismo, invasão). Depois de localizada a estrutura de interesse 66, a região correspondente do espécime de tecido 62 de onde se obteve a estrutura de interesse de secção fina 66 é localizada imediatamente abaixo da estrutura de interesse 66. Como mostrado na FIG. 1, a placa de posicionamento 42 pode ser movida nas direcções x e y (sob o controlo dos micrómetros digitais ou de uma alavanca de direcção), ou o bloco dador pode ser movido para distâncias maiores, para alinhar a punção 50 na posição acima da região de interesse do bloco dador 30, e a lamela de suporte 58 é então afastada horizontalmente da sua posição acima do bloco dador 30 em redor da junção articulada 60 (FIG. 9).

Em seguida, a punção 50 é introduzida na estrutura de interesse do bloco dador 30 (FIG. 2) fazendo avançar a placa de guia vertical 40 ao longo da calha 46 até a placa

44 atingir a sua posição de paragem (que é predefinida pelo aparato 38). À medida que a punção 50 avança, a sua extremidade condutora afiada perfura um espécime de tecido cilíndrico do bloco dador 30, e o espécime fica retido no interior da punção enquanto a punção regressa à sua posição retraída mostrada na FIG. 1. O espécime de tecido cilíndrico pode ser subsequentemente desalojado da punção 50 fazendo avançar um estilete (não mostrado) na abertura 51. Por exemplo, o espécime de tecido é desalojado da punção 50 e é introduzido num receptáculo cilíndrico de configuração e dimensão complementares de uma série de receptáculos de um bloco receptor 70 mostrado na FIG. 3.

Podem preparar-se um ou mais blocos receptores 70 antes de se obter o espécime de tecido do bloco dador 30. Pode preparar-se o bloco 70 colocando um bloco de parafina sólida no recipiente 31 e utilizando a punção 50 para fazer perfurações cilíndricas no bloco 70 num padrão regular que produz uma série de receptáculos cilíndricos do tipo mostrado na FIG. 3. Pode gerar-se a série regular posicionando a punção 50 num ponto de partida acima do bloco 70 (por exemplo, num canto da futura série), avançando e depois retraindo a punção 50 para remover um núcleo cilíndrico de uma coordenada específica do bloco 70, depois desalojando o núcleo da punção por introdução de um estilete na abertura 51. Em seguida, o aparato da punção ou o bloco receptor é movido, em incrementos regulares, nas direcções x e/ou y para a coordenada seguinte da série e repete-se o passo de punção. Na forma de realização específica revelada da FIG. 3, os receptáculos cilíndricos da série têm diâmetros de cerca de 0,6 mm, em que os centros dos cilindros estão espaçados por uma distância de

cerca de 0,7 mm (de modo que há uma distância de cerca de 0,05 mm entre as extremidades adjacentes dos receptáculos).

Num exemplo específico, biopsias de tecido do núcleo com um diâmetro de 0,6 mm e uma altura de 3-4 mm foram recolhidas de regiões representativas seleccionadas de blocos de tumores embutidos em parafina "dadores" individuais e foram dispostas em série de forma precisa num novo bloco de parafina "receptor" (20 mm × 45 mm). As secções coradas com H&E foram posicionadas acima dos blocos dadores e utilizadas para orientar a amostragem de sítios morfológicamente representativos dos tumores. Apesar de se poder variar o diâmetro da punção de biopsia, verificou-se que cilindros de 0,6 mm são adequados, porque são suficientemente grandes para avaliar padrões histológicos em cada elemento da série de tumores mas são suficientemente pequenos para causar apenas danos mínimos nos blocos de tecidos dadores originais e para isolar blocos de tecidos razoavelmente homogéneos. Podem colocar-se até 1000 desses cilindros de tecido num bloco de parafina receptor de 20 × 45 mm. Diâmetros específicos revelados dos cilindros são 0,1-4,0 mm, por exemplo, 0,5-2,0 mm, e muito especificamente menos de 1 mm, por exemplo, 0,6 mm. A automatização do procedimento, com colocação dos espécimes orientada computacionalmente, permite que espécimes muito pequenos sejam colocados muito proximamente entre si na série receptora.

A FIG. 4 mostra a série no bloco receptor depois dos receptáculos da série terem sido cheios com cilindros de espécimes de tecidos. Seguidamente, a superfície de topo do bloco receptor é coberta com um filme adesivo 74 de um sistema de seccionamento de fita revestida com adesivo

(Instrumedics), para ajudar a manter as secções de cilindros de tecidos no seu lugar da série depois de ter sido cortada. Com o filme adesivo no lugar, corta-se uma secção de 4-8 μm do bloco receptor de forma transversal ao eixo longitudinal dos cilindros de tecido (FIG. 5), para produzir uma secção da micro-série fina 76 (contendo secções dos cilindros de espécimes de tecido na forma de discos), que é transferida para uma lamela de espécimes convencional 78. A secção da micro-série 76 adere à lamela 78, por exemplo, colocando adesivo sobre a lamela. Depois, o filme 74 é retirado do membro da micro-série subjacente 76, expondo-a para processamento. Uma extremidade escurecida 80 da lamela 78 é adequada para etiquetar ou manusear a lamela.

Um espécime de tecido de cancro da mama foi fixado em etanol frio, para ajudar a conservar DNA e RNA de elevado peso molecular, e 372 dos espécimes foram fixados desta forma. De cada bloco podem cortar-se pelo menos 200 secções consecutivas da série de tumor de 4-8 μm , fornecendo alvos para análises *in situ* correlacionadas de números de cópias ou expressão de múltiplos genes. Esta análise é efectuada testando quanto a amplificações de genes diferentes em secções separadas da série e comparando os resultados dos testes em coordenadas idênticas da série (que correspondem a espécimes de tecido do mesmo cilindro de tecido obtido do bloco dador). Esta abordagem permite medir virtualmente centenas de características moleculares de cada tumor, desse modo facilitando a construção de uma grande série de características genotípicas ou fenotípicas correlacionadas de tumores humanos não cultivados.

Um exemplo de uma única micro-série 76 contendo 645 espécimes está mostrado na FIG. 10A. Mostra-se na FIG. 10B uma secção ampliada da micro-série (destacada por um rectângulo na FIG. 10A), na qual um autorradiograma de hibridização *in situ* de mRNA de erbB2 ilustra que dois espécimes adjacentes da série exibem um sinal forte de hibridização. A FIG. 10C ilustra géis de electroforese mostrando que DNA e RNA de elevado peso molecular podem ser extraídos de espécimes de cancro da mama fixados em etanol a 4 °C durante a noite num forno de vácuo.

Um dos espécimes de tecidos que originou os sinais "positivos" fluorescentes também foi analisado por coloração com imunoperoxidase, como mostrado na FIG. 10D, onde se confirmou (pela coloração escura) que o produto do gene erbB2 estava presente. Utilizou-se uma sonda de DNA para o gene erbB2 para efectuar hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A FIG. 10D mostra um dos elementos da série tumoral que exibiu amplificação do gene erbB2 em nível elevado. A inserção da FIG. 10E mostra três núcleos com numerosos sinais de hibridização de erbB2 fortemente aglomerados e duas cópias da sonda de referência centromérica. Pormenores adicionais destes ensaios são apresentados nos Exemplos 1-4 abaixo.

O potencial da tecnologia de séries da presente invenção para efectuar uma análise molecular paralela e rápida de múltiplos espécimes de tecidos está ilustrado na FIG. 11, em que o eixo y dos gráficos corresponde a percentagens de tumores em grupos específicos que têm características clinicopatológicas ou moleculares definidas. Este diagrama mostra correlações entre características clínicas e histopatológicas dos espécimes de tecidos da micro-série.

Cada caixa pequena nas linhas alinhadas da FIG. 11B representa uma localização coordenada na série. Coordenadas correspondentes de secções finas consecutivas do bloco receptor estão verticalmente alinhadas, umas acima das outras, nas linhas que se prolongam horizontalmente. Estes resultados mostram que os espécimes de tecidos podem ser classificados em quatro classificações de tumores (FIG. 11A) com base na presença ou ausência de expressão de receptores de estrogénio presentes nas membranas celulares e na presença ou ausência da mutação p53 no DNA celular. Na FIG. 11B, a presença da mutação p53 está mostrada por uma caixa escurecida e a presença de receptores de estrogénio também está mostrada por uma caixa escurecida. Mostra-se a classificação em cada um de quatro grupos (ER-/p53+, ER-/p53-, ER+/p53+ e ER+/p53-) pelas linhas tracejadas entre as FIGS. 11A e 11B, que dividem as categorias nos Grupos I, II, III e IV correspondentes ao estado ER/p53.

A FIG. 11B também mostra características clínicas que estavam associadas ao tecido em cada coordenada respectiva da série. Uma caixa escurecida para Idade indica que o paciente está na fase pré-menopausa, uma caixa escurecida N indica a presença de doença metastática nos nodos linfáticos regionais, uma caixa escurecida T indica um tumor de fase 3 ou 4 que está clinicamente mais avançado e uma caixa escurecida para nível indica um tumor de nível elevado (pelo menos nível III) que está associado a malignidade acrescida. A correlação do estado ER/p53 pode ser feita comparando as quatro linhas de cima de caixas de indicação clínica (Idade, N, T, Nível) com as duas linhas intermédias de caixas (estado ER/p53). Os resultados desta correlação cruzada estão apresentados no gráfico de barras da FIG. 11A, onde se pode observar que tumores ER-/p53+

(Grupo I) tendem a ter um nível mais elevado do que os outros tumores e tinham uma frequência particularmente elevada de amplificação de *myc*, ao passo que era mais provável que tumores ER+/p53+ (Grupo III) tivessem nodos positivos na altura da ressecção cirúrgica. Os tumores ER-/p53- (Grupo II) mostraram que o gene mais comum amplificado nesse grupo foi o *erbB2*. Em contraste, verificou-se que os tumores ER-/p53- (Grupo II) e ER+/p53- (Grupo IV) tinham menos indicadores de doença grave, sugerindo assim uma correlação entre a ausência da mutação p53 e um prognóstico melhor.

Este método também foi utilizado para analisar os números de cópias de vários outros oncogenes importantes de cancro da mama nos 372 espécimes de cancro da mama primário dispostos em série em experiências de FISH consecutivas, tendo-se utilizado esses resultados para estabelecer correlações entre as classificações ER/p53 e a expressão destes outros oncogenes. Obtiveram-se estes resultados utilizando sondas para cada um dos oncogenes separados, em secções sucessivas do bloco receptor, e comparando os resultados em coordenadas correspondentes da série. Na FIG. 11B, um resultado positivo para a amplificação do oncogene ou marcador específico (*mybL2*, 20q13, 17q23, *myc*, *cnd* e *erbB2*) está indicado por uma caixa escurecida. O oncogene *erbB2* foi amplificado em 18% dos 372 espécimes dispostos em série, *myc* em 25% e ciclina D1 (*cnd1*) em 24% dos tumores.

Verificou-se que as duas novas regiões recentemente descobertas de amplificação de DNA frequente em cancro da mama, 17q23 e 20q13, eram amplificadas em 13% e 6% dos tumores, respectivamente. Verificou-se que o oncogene *mybL2* (que foi recentemente localizado em 20q13.1 e que se

verificou estar super-expresso em linhas celulares de cancro da mama) era amplificado em 7% do mesmo conjunto de tumores. O mybL2 foi amplificado em tumores com número normal de cópias do locus principal de 20q13, indicando que pode definir uma região de amplificação independentemente seleccionada em 20q. Mais uma vez, as linhas tracejadas entre as FIGS. 11B e 11C dividem os padrões complexos de co-amplificação destes genes em Grupos I-IV, que correspondem a ER-/p53+, ER-/p53-, ER+/p53+ e ER+/p53-.

As FIGS. 11C e 11D mostram que 70% dos espécimes ER-/p53+ era positivo para um ou mais destes oncogenes e que myc foi o oncogene predominante amplificado neste grupo. Em contraste, apenas 43% dos espécimes do grupo ER+/p53- exibiu co-amplificação de um destes oncogenes e, por sua vez, esta informação pôde ser correlacionada com os parâmetros clínicos apresentados na FIG. 11A. Assim, a tecnologia de micro-séries permite que um grande número de espécimes tumorais seja convenientemente e rapidamente rastreado quanto a estas muitas características e analisado quanto a padrões de expressão de genes que poderão estar relacionados com a apresentação clínica do paciente e a evolução molecular da doença. Na ausência da tecnologia de micro-séries da presente invenção, é mais difícil obter estas correlações.

Um método específico para obter estas correlações está ilustrado na FIG. 12, que é uma ampliação da porção do lado direito da FIG. 11B. A micro-série 76 (FIG. 10A) está disposta em secções que contêm dezassete linhas e nove colunas de localizações circulares correspondentes a secções transversais de espécimes de tecidos cilíndricos de diferentes tumores, em que cada localização da micro-série

pode ser representada pelas coordenadas (linha, coluna). Por exemplo, os espécimes da primeira linha da primeira secção têm posições coordenadas (1,1), (1,2)... (1,9), e os espécimes da segunda linha têm posições coordenadas (2,1), (2,2)... (2,9). Cada uma destas coordenadas da série pode ser utilizada para localizar espécimes de tecidos de posições correspondentes em secções sequenciais do bloco receptor, para identificar espécimes de tecidos da série que foram cortados do mesmo cilindro de tecido.

Como mostrado na FIG. 12, a série rectangular é convertida numa representação linear, em que cada caixa da representação linear corresponde a uma posição coordenada da série. Cada uma das linhas de caixas está alinhada de modo que cada caixa que corresponde a uma posição coordenada idêntica da série esteja localizada acima de outras caixas da mesma posição coordenada. Assim, as caixas ligadas pela linha tracejada 1 correspondem aos resultados que podem ser obtidos olhando para os resultados da posição coordenada (1,1) em secções finas sucessivas do bloco dador, ou dados clínicos que podem não ter sido obtidos da micro-série mas que podem ser inseridos no sistema para identificar suplementarmente tecido de um tumor que corresponde a essa posição coordenada. De modo semelhante, as caixas ligadas pela linha tracejada 10 correspondem aos resultados que se podem encontrar na posição coordenada (2,1) da série, e as caixas ligadas pela linha tracejada 15 correspondem aos resultados da posição coordenada (2,6) da série. As letras a, b, c, d, e, f, g e h correspondem a secções sucessivas do bloco dador que são cortadas para formar a série.

Ao comparar as caixas alinhadas ao longo da linha 1 na FIG. 12, pode observar-se que se obteve um tumor de uma mulher pós-menopausa sem doença metastática nos seus nodos linfáticos na altura da ressecção cirúrgica, em que o tumor tinha um grau inferior a 3 mas em que a histologia do tumor era pelo menos de Nível III. Um bloco de tecido foi recolhido deste tumor e introduzido na série receptora na posição coordenada (1,1); depois da série ter sido completada, foi seccionada em oito secções paralelas (a, b, c, d, e, f, g e h), cada uma das quais continha uma secção representativa da série cilíndrica. Cada uma destas secções foi analisada com uma sonda diferente específica para um atributo molecular particular. Na secção a, os resultados indicaram que este espécime de tecido era p53+; na secção b, que era ER-; na secção c, que não exibiu amplificação do oncogene mybL2; nas secções separadas d, e, f, g e h, que era positivo para a amplificação de 20q13, 17q23, myc, cnd1 e erbB2.

Podem fazer-se comparações semelhantes de características moleculares do cilindro de espécime de tumor que foi colocado na posição coordenada (2,1) seguindo a linha vertical 10 da FIG. 12, que liga a décima caixa de cada linha, e corresponde à segunda linha, primeira coluna (2,1) da série 76 da FIG. 10(A). De modo semelhante, as características das secções do cilindro de espécime de tumor na posição coordenada (2,6) podem ser analisadas seguindo a linha vertical 15 até à 15^a caixa de cada linha. Deste modo podem obter-se informações paralelas acerca das secções separadas da série para todas as 372 posições da série. Esta informação pode ser apresentada visualmente para análise como na FIG. 12, ou pode ser inserida numa base de dados para análise e correlação de diferentes

características moleculares (como padrões de amplificação de oncogenes e a correspondência entre esses padrões de amplificação e a apresentação clínica do tumor).

A análise de secções consecutivas das séries permite co-localizar centenas de diferentes alvos de DNA, RNA ou proteínas nas mesmas populações de células em regiões morfológicamente definidas de cada tumor, o que facilita a construção de uma base de dados de um grande número de características genotípicas ou fenotípicas correlacionadas de tumores humanos não cultivados. A pontuação de hibridizações *in situ* de mRNA ou coloração imuno-histoquímica de proteínas também é facilitada com micro-séries de tecidos de tumores, porque para cada análise se utilizam pequenas quantidades dos reagentes idênticos. As séries de tumores também reduzem substancialmente o consumo de tecidos, utilização de reagentes e trabalho efectuado em comparação com o processamento de espécimes convencionais individuais para seccionamento, coloração e pontuação. A análise combinada de vários alvos de DNA, RNA e proteínas proporciona um meio poderoso para a estratificação de espécimes de tumores em virtude das suas características moleculares. Esses padrões ajudarão a detectar características moleculares previamente não consideradas mas importantes dos tumores que podem acabar por ter utilidade de diagnóstico ou prognóstico.

Estes resultados mostram que os cilindros muito pequenos utilizados para preparar séries de tecidos podem, na maioria dos casos, fornecer informações rigorosas, especialmente quando o sítio da amostragem de tecido do bloco dador é seleccionado de modo a conter características histológicas que são as mais representativas de regiões

tumorais. Também é possível recolher amostras de múltiplas regiões histologicamente definidas num único bloco de tecido dador para obter uma representação mais completa do tecido original e para analisar directamente a correlação entre fenótipo (morfologia do tecido) e genótipo. Por exemplo, pode construir-se uma série de modo a incluir centenas de tecidos que representam fases diferentes da progressão de cancro da mama (por exemplo, tecido normal, hiperplasia, hiperplasia atípica, cancro intraductal, cancro invasivo e metastático). A tecnologia de séries de tecidos será então utilizada para analisar os acontecimentos moleculares que correspondem à progressão tumoral.

Um empacotamento mais cerrado de cilindros e um bloco receptor maior também podem fornecer um número ainda mais elevado de espécimes por série. Arquivos inteiros de laboratórios de patologia podem ser colocados em micro-séries repetidas de tecidos de 1000 espécimes para o estabelecimento de perfis moleculares. Utilizando automatização do procedimento para a amostragem e disposição em séries, é possível preparar dúzias de séries de tumores repetidas, cada uma fornecendo centenas de secções para análises moleculares. A mesma estratégia e instrumentação desenvolvidas para séries de tumores também permite a micro-dissecção de cilindros de tecidos para o isolamento de RNA e DNA de elevado peso molecular a partir de elementos de tecidos de tumores optimamente fixados e morfologicamente definidos, desse modo permitindo efectuar uma análise correlacionada dos mesmos tumores por técnicas à base de PCR para RNA e DNA. Quando se planeia uma análise de ácidos nucleicos, o espécime de tecido é preferivelmente fixado (antes de ser embutido em parafina) em etanol ou

Fixador de Biologia Molecular (Streck Laboratories, Inc., Omaha, NE) em vez de formalina, porque a formalina pode formar ligações cruzadas e danificar de outros modos o ácido nucleico. O cilindro de tecido da presente invenção fornece uma quantidade ampla de DNA ou RNA onde efectuar uma variedade de análises moleculares.

O potencial desta tecnologia de séries foi ilustrado em análise FISH de amplificações de genes em cancro da mama. A análise FISH é um método excelente para visualizar e detectar rigorosamente rearranjos genéticos (amplificações, deleções ou mudanças de localização) em células individuais morfológicamente definidas. A tecnologia de séries de tumores combinada permite que FISH se torne num método poderoso de alto rendimento que permite a análise de centenas de espécimes por dia.

Especificação das FIGS. 13-23

Mostra-se nas FIGS. 13-23 um exemplo de um sistema automatizado para a preparação a alta velocidade das micro-séries. O sistema inclui um estrado 100 com uma unidade impulsora x 102 e uma unidade impulsora y 104, cada uma das quais faz rodar, respectivamente, um eixo motor 106, 108. O eixo motor 108 faz mover uma bancada de espécimes 110 numa direcção y, ao passo que o eixo motor 106 faz mover um tabuleiro 112 da bancada 110 numa direcção x. Numa linha frontal do tabuleiro 112 estão montados três recipientes receptores 116, 118 e 120, cada um dos quais contém um bloco de parafina receptor 122, 124 ou 126, e um recipiente dador 128 que contém um bloco de parafina dador 130, onde é embutido um espécime de tecido 132. Numa linha traseira do tabuleiro encontram-se dois tabuleiros dadores de múltiplas cavidades 132, 134 (que contêm múltiplos recipientes para

manter os espécimes em meio líquido) e um recipiente de desperdícios 136.

Acima do estrado 100 está disposto um aparato de punção 140 que pode ser movido para cima e para baixo numa direcção z. O aparato 140 inclui uma unidade impulsora de estilete central e disposta verticalmente 142 onde um estilete 144 efectua um movimento de vaivém. O aparato 140 também inclui uma unidade impulsora de punção receptora inclinada 146 e uma unidade impulsora de punção dadora inclinada 148. A unidade impulsora de punção 146 inclui um êmbolo recíproco 150 com uma punção receptora tubular 154 na sua extremidade distal, e a unidade impulsora de punção 148 inclui um êmbolo recíproco 152 com uma punção tubular dadora 156 na sua extremidade distal. Quando o êmbolo 150 é estendido (FIG. 14), a punção receptora 154 é posicionada com a extremidade aberta da sua perfuração tubular alinhada com o estilete 144, e quando o êmbolo 152 é estendido (FIG. 16), a punção dadora 156 é posicionada com a extremidade aberta da sua perfuração tubular alinhada com o estilete 144.

A operação sequencial do aparato 140 está mostrada nas FIGS. 13-17. Depois do dispositivo ser montado tal como na FIG. 13, pode utilizar-se um sistema computacional para operar o aparato com a finalidade de obter alta eficiência. Assim, o sistema computacional pode inicializar-se a si próprio por determinação da localização dos recipientes no tabuleiro 112 mostrado na FIG. 13. Em seguida, as unidades impulsoras x e y 102, 104 são activadas para mover a bancada 110 e tabuleiro 112 para a posição mostrada na FIG. 14, de modo que a activação do êmbolo 150 estende a punção receptora 154 para uma posição acima da posição (1,1) do bloco receptor 122. Depois da punção 154 estar posicionada,

o aparato move-se para baixo na direcção z para puncionar uma perfuração cilíndrica na parafina do bloco receptor. O aparato 140 move-se então para cima na direcção z, para elevar a punção 154 para fora do bloco de parafina receptor 122, mas a punção 154 retém um núcleo de parafina que deixa um receptáculo cilíndrico no bloco receptor 122. As unidades impulsoras x-y são seguidamente activadas para mover a bancada 110 e posicionar o recipiente de desperdícios 136 por baixo da punção 154. Depois, a unidade impulsora do estilete 142 é activada para fazer avançar o estilete 144 para a extremidade aberta da punção 154 alinhada, com a finalidade de desalojar o núcleo de parafina da punção 154 para o recipiente de desperdícios 136.

O estilete 144 é retraído da punção receptora 154, o êmbolo 150 é retraído e a unidade impulsora x-y faz mover a bancada 110 e o tabuleiro 112 para colocar o recipiente dador 128 numa posição (mostrada na FIG. 16) de modo que o avanço do êmbolo 152 faz avançar a punção dadora 156 para uma localização desejada sobre o bloco dador 130. Em seguida, o aparato 140 é movido para baixo na direcção z para puncionar um núcleo cilíndrico de tecido do bloco dador 130, e o aparato 140 é depois movido na direcção z para recolher a punção dadora 156 com o espécime de tecido cilíndrico retido na punção. Seguidamente, a unidade impulsora x-y move a bancada 110 e tabuleiro 112 para a posição mostrada na FIG. 17, de modo que o movimento do aparato 140 para baixo na direcção z faz avançar a punção dadora 156 para o receptáculo na posição coordenada (1,1) do bloco 122 de onde foi removido o tampão receptor. A punção dadora 156 está alinhada por baixo do estilete 144 e o estilete é avançado para desalojar o cilindro de tecido

retido da punção dadora 156, de modo que o cilindro de tecido dador permanece no receptáculo do bloco receptor 122 à medida que o aparato 140 sobe na direcção z, para retrair a punção dadora 156 da série receptora. O êmbolo 152 é então retraído.

Este processo pode ser repetido até um número desejado de receptáculos receptores ter sido formado e cheio com tecidos dadores cilíndricos nas localizações coordenadas desejadas da série. Apesar deste método ilustrado mostrar a formação alternada sequencial de cada receptáculo e a introdução do cilindro de tecido no receptáculo formado, também é possível formar todos os receptáculos nos blocos receptores 122, 124 e 126 como passo inicial e depois prosseguir para o passo de obter os espécimes de tecidos e introduzi-los nos receptáculos pré-formados. O mesmo espécime de tecido 132 pode ser repetidamente utilizado, ou o espécime 132 pode ser alterado depois de se ter obtido cada espécime de tecido dador, por introdução no recipiente 128 de um novo bloco dador 130. Se o bloco dador 130 for alterado depois de se ter obtido cada cilindro de tecido, cada coordenada da série pode incluir tecido de um espécime de tecido diferente.

Mostra-se na FIG. 18 um dispositivo de posicionamento que ajuda a localizar estruturas de interesse de onde se podem recolher espécimes dadores. O dispositivo de posicionamento inclui uma lamela de suporte 160 que se prolonga entre paredes opostas do recipiente dador 128, para suportar uma lamela de espécime 162 sobre a qual se dispõe uma secção corada fina do espécime 132 do bloco dador 130. Utilizando um microscópio montado no aparato 140 (a objectiva do microscópio está mostrada em 166), podem encontrar-se

estruturas micro-anatómicas de interesse. Pode determinar-se a altura vertical correcta do aparato 140 acima da superfície superior do bloco dador 130 utilizando duas luzes de posicionamento 168, 170 que são montadas no aparato 140. Os feixes de luz 172, 174 são projectados das luzes 168, 170 num ângulo tal que os feixes coincidem num único sítio 176 quando a altura vertical do aparato 140 acima da superfície superior da luz está num nível z desejado. Este nível z desejado irá posicionar as punções 152, 154 numa altura apropriada para penetrarem na superfície do bloco 130 na localização desejada e até uma profundidade desejada.

É vantajoso que os cilindros de tecido puncionados do bloco 130 se ajustem de forma segura aos receptáculos receptores que são formados para os receber. Se a punção dadora 156 tiver os mesmos diâmetros interno e externo da punção receptora 154, então o espécime de tecido dador cilíndrico será formado pelo diâmetro interno da punção e o receptáculo receptor será formado pelo diâmetro externo da punção. Esta discrepância fornecerá um receptáculo cujo diâmetro é ligeiramente maior do que o diâmetro do cilindro de tecido dador. Assim, como mostrado nas FIGS. 19 e 20, a punção receptora 154 tem um diâmetro mais pequeno do que a punção dadora 156. Em consequência, a punção receptora irá formar um receptáculo cilíndrico (com um diâmetro correspondente ao diâmetro externo da punção 154) que tem substancialmente o mesmo diâmetro do cilindro de espécime de tecido 180, que é formado com um diâmetro determinado pelo diâmetro interno da punção dadora 156.

A FIG. 21 ilustra uma secção transversal da série receptora depois dos receptáculos 182 terem sido formados e cheios

com cilindros de espécimes de tecidos 180. Pequenas partições de material de parafina 122 separam os cilindros de tecido 180, e os receptáculos 182 como ilustrados são mais profundos do que os cilindros de espécimes 180, de modo que está presente um pequeno espaço vazio entre os espécimes e a base dos receptáculos. Depois da série ter sido formada, pode utilizar-se um micrótomo para cortar uma secção fina S do topo do bloco 122, de modo que a secção S pode ser montada numa lamela de espécimes 162 (FIG. 18), para ajudar a localizar estruturas de interesse no espécime de tecido 132. Em seguida, o micrótomo também corta secções paralelas finas a, b, c, d, e, f, g e h, podendo cada uma ser sujeita a uma análise molecular diferente, como já foi descrito.

Ambiente Operacional Exemplificativo

Pretende-se que a FIG. 22 e a discussão seguinte forneçam uma descrição breve e geral de um ambiente computacional adequado onde pode ser implementada a invenção. A invenção é implementada numa variedade de módulos de programas. Em geral, módulos de programas incluem rotinas, programas, componentes, estruturas de dados, etc., que realizam tarefas particulares ou implementam tipos de dados abstractos particulares. A invenção pode ser posta em prática com outras configurações de sistemas computacionais, incluindo dispositivos manuais, sistemas de múltiplos processadores, electrónica de consumo à base de microprocessadores ou programável, minicomputadores, computadores de grande porte e afins. A invenção também pode ser posta em prática em ambientes computacionais distribuídos, em que as tarefas são realizadas por dispositivos de processamento remoto que estão ligados através de uma rede de comunicações. Num ambiente

computacional distribuído, os módulos dos programas podem estar localizados em dispositivos de armazenamento de memória locais e remota.

Reportando-nos à FIG. 22, um ambiente operacional para uma especificação ilustrada da presente invenção é um sistema computacional 220, com um computador 222 que compreende pelo menos uma unidade de processamento de alta velocidade (CPU) 224 em conjunção com um sistema de memória 226, um dispositivo de entrada 228 e um dispositivo de saída 230. Estes elementos estão interligados por pelo menos uma estrutura de barramento 232.

O CPU 224 ilustrado é de concepção familiar e inclui uma ALU 234 para fazer cálculos, uma colecção de registadores 236 para armazenamento temporário de dados e instruções e uma unidade de controlo 238 para controlar a operação do sistema 220. O CPU 224 pode ser um processador com qualquer uma de uma variedade de arquitecturas, incluindo Alpha da Digital; MIPS da MIPS Technology, NEC, IDT, Siemens e outras; x86 da Intel e outras, incluindo Cyrix, AMD e Nexgen; 680x0 da Motorola, e PowerPC da IBM e Motorola.

O sistema de memória 226 inclui geralmente memória principal de alta velocidade 240 na forma de um meio como dispositivos semicondutores de memória de acesso aleatório (RAM) e memória só de leitura (ROM), e armazenamento secundário 242 na forma de meios de armazenamento a longo prazo, como disquetes, discos rígidos, fita magnética, CD-ROM, memória "flash", etc., e outros dispositivos que armazenam dados utilizando meios de registo eléctricos, magnéticos, ópticos ou outros. A memória principal 240 também pode incluir memória de exibição de vídeo para

exibir imagens através de um dispositivo de visionamento. Os experimentados na área reconhecerão que a memória 226 pode compreender uma variedade de componentes alternativos com uma variedade de capacidades de armazenamento.

Os dispositivos de entrada e saída 228, 230 também são familiares. O dispositivo de entrada 228 pode compreender um teclado, um ratinho, um "scanner", uma câmara, um cartão de captura, um interruptor limitador (como interruptores domésticos, de segurança ou de estado), um transdutor físico (por exemplo, um microfone), etc. O dispositivo de saída 230 pode compreender um monitor, uma impressora, uma interface motora, um solenóide, um transdutor (por exemplo, um altifalante), etc. Alguns dispositivos, como uma interface de rede ou um "modem", podem ser utilizados como dispositivos de entrada e/ou saída.

Como é familiar para os experimentados na área, o sistema computacional 220 inclui suplementarmente um sistema operativo e pelo menos um programa de aplicação. O sistema operativo é o conjunto de "software" que controla a operação do sistema computacional e a localização de recursos. O programa de aplicação é o conjunto de "software" que desempenha uma tarefa desejada pelo utilizador, utilizando recursos computacionais disponibilizados pelo sistema operativo. Ambos residem no sistema de memória ilustrado 226.

Por exemplo, a invenção pode ser implementada com um Power Macintosh 8500 disponibilizado pela Apple Computer, ou um Computador Pessoal (PC) compatível com IBM. O Power Macintosh utiliza um CPU PowerPC 604 da Motorola e tem um sistema operativo MacOS da Apple Computer, como System 8.

Os dispositivos de entrada e de saída podem ser sujeitos a interface com o CPU utilizando a bem conhecida interface SCSI ou com cartões de expansão utilizando o barramento Peripheral Component Interconnect (PCI). Uma configuração típica de um Power Macintosh 8500 tem 72 megabytes de RAM para a memória principal de alta velocidade e um disco rígido de 2 gigabytes para armazenamento secundário. Um PC compatível com IBM terá uma configuração com 32 megabytes de RAM para a memória principal de alta velocidade e um disco rígido de 2-4 gigabytes para armazenamento secundário.

De acordo com as práticas de pessoas experimentadas na área da programação computacional, a presente invenção é descrita com referência a actos e representações simbólicas de operações que são efectuados pelo sistema computacional 220, a menos que indicado em contrário. Esses actos e operações são, por vezes, referidos como sendo executados pelo computador. Será apreciado que os actos e operações simbolicamente representadas incluem a manipulação, pelo CPU 224, de sinais eléctricos representando bits de dados, o que causa uma transformação ou redução resultante da representação dos sinais eléctricos, e a manutenção de bits de dados em localizações de memória do sistema de memória 226, para assim configurar novamente ou alterar de outra forma a operação do sistema computacional, bem como outros processamentos de sinais. As localizações de memória onde são mantidos bits de dados são localizações físicas que têm propriedades eléctricas, magnéticas ou ópticas particulares correspondentes aos bits de dados.

Descrição do Sistema de Série Computacional

Mostra-se na FIG. 23 um diagrama de blocos que apresenta um sistema para pôr em prática a invenção. O "hardware" é inicializado no passo 250, por exemplo, determinando a posição das punções 154, 156, bancada 110 e tabuleiro 112. Em seguida, o sistema pode ser configurado pelo operador no passo 252, por exemplo, inserindo dados ou pedindo ao sistema para encontrar a localização (coordenadas x, y, z) do canto superior direito de cada bloco receptor 122-126, bem como as localizações dos tabuleiros 130-136. O número de blocos dadores, receptáculos, velocidade operacional, etc., também podem ser inseridos nesta altura.

No passo 254, o sistema pede para ser inserida informação identificadora do primeiro bloco dador 130 que será colocado no tabuleiro 128. Esta informação identificadora pode incluir informação do número de acesso, informação clínica sobre o espécime e/ou outras informações que possam ser úteis na análise das séries de tumores. No passo 256, o operador prime um botão de função seleccionado que faz subir as punções 154, 156 e permite que uma alavanca de direcção mova os espécimes utilizando as unidades impulsoras x-y. Os dados inseridos são exibidos no passo 258 e são aprovados em 260.

Em seguida, o sistema obtém um ou mais espécimes dadores do bloco dador identificado no passo 262 e pede ao utilizador para inserir informação acerca do bloco dador seguinte. Se for inserida informação sobre outro bloco dador, o sistema regressa ao passo 256 e obtém o número desejado de espécimes do novo bloco. Depois de um novo bloco dador ter sido colocado no recipiente dador 128, o sistema também verifica a posição das punções no passo 268. Se não for inserida informação sobre outro bloco no passo 264, o

sistema move o tabuleiro dador para a posição de recarga, de modo que um bloco 130 no tabuleiro dador possa ser removido. Este sistema também é adaptável à amostragem de biopsias cilíndricas de sítios histologicamente controlados de espécimes (como tumores) para isolamento de DNA/RNA.

A tecnologia automatizada de séries de tumores permite testar facilmente dúzias ou centenas de marcadores a partir do mesmo conjunto de tumores. Estes estudos podem ser realizados num cenário de múltiplos centros, enviando blocos ou secções de séries de tumores repetidos para outros laboratórios. A mesma abordagem será particularmente valiosa para testar marcadores moleculares descobertos de novo quanto à sua utilidade em diagnóstico, prognóstico ou terapêutica. A tecnologia de séries de tecidos também facilita a investigação básica de cancros ao fornecer uma plataforma para o estabelecimento rápido de perfis de centenas ou milhares de tumores aos níveis de DNA, RNA e proteínas, conduzindo a uma construção de uma base de dados correlacionada de biomarcadores a partir de uma grande colecção de tumores. Por exemplo, a busca de genes-alvo para amplificação requer análises correlacionadas de amplificação e expressão de dúzias de genes e *loci* candidatos nas mesmas populações celulares. Essas análises moleculares extensas de uma grande série definida de tumores seriam difíceis de efectuar com tecnologias convencionais.

Exemplos da Tecnologia de Séries

As aplicações da tecnologia de séries de tecidos não se limitam a estudos de cancro, apesar dos Exemplos 1-4 seguintes revelarem especificações da sua utilização em conjugação com a análise de neoplasmas. A análise de séries

também pode ser um instrumento para a compreensão da expressão e dosagem de múltiplos genes noutras doenças, bem como em tecidos humanos e animais normais, incluindo depósitos de tecidos de diferentes animais transgénicos ou células cultivadas. Os exemplos específicos seguintes ilustram algumas especificações particulares da invenção.

EXEMPLO 1

Espécimes de Tecidos

Utilizou-se um total de 645 espécimes de cancro da mama para a construção de uma micro-série de tecido tumoral de cancro da mama. As amostras incluíram 372 tumores fixados em etanol e congelados de fresco, bem como 273 cancros da mama fixados em formalina, tecidos normais e controlos de fixação. O subconjunto de amostras de cancro da mama congelado foi seleccionado aleatoriamente do banco de tumores do Instituto de Patologia, Universidade da Basileia, que inclui mais de 1500 cancros da mama congelados obtidos por ressecções cirúrgicas durante 1986-1997. Para análises moleculares só se utilizaram os tumores deste banco de tumores. Este subconjunto foi revisto por um patologista, que determinou que os espécimes incluíram 259 carcinomas ductais, 52 lobulares, 9 medulares, 6 mucinosos, 3 cribriformes, 3 tubulares, 2 papilares, 1 histiocítico, 1 de células claras e 1 rico em lípidos. Também havia 15 carcinomas ductais *in situ*, 2 carcinossarcomas, 4 carcinomas primários que tinham recebido quimioterapia antes da cirurgia, 8 tumores recorrentes e 6 metástases. A classificação histológica só foi feita em tumores primários invasivos que não tinham sofrido quimioterapia prévia. Destes tumores, 24% eram de nível 1, 1,40% de nível 2 e 36% de nível 3. A fase pT era pT1 em 29%, pT2 em 54%, pT3 em 9%

e pT4 em 8%. Tinham sido examinados nodos linfáticos axilares em 282 pacientes (45% pNO, 46% pN1, 9% pN2). Todos os tumores previamente não fixados foram fixados em etanol frio a +4 °C durante a noite e depois foram embutidos em parafina.

EXEMPLO 2

Imuno-histoquímica

Após formação da série e seccionamento do bloco dador, utilizaram-se procedimentos comuns de imunoperoxidase indirecta para imuno-histoquímica (ABC-Elite, Vector Laboratories). Utilizaram-se anticorpos monoclonais da DAKO (Glostrup, Dinamarca) para a detecção de p53 (DO-7, ratinho, 1:200), erbB-2 (c-erbB-2, coelho, 1:4000) e receptores de estrogénio (ER ID5, ratinho, 1:400). Efectuou-se um pré-tratamento com micro-ondas para a recuperação de antígenos de p53 (30 minutos a 90 °C) e erbB-2 (60 minutos a 90 °C). Utilizou-se como cromogénio diaminobenzidina. Os tumores com positividade conhecida foram utilizados como controlos positivos. O anticorpo primário foi omitido para os controlos negativos. Os tumores foram considerados positivos para ER ou p53 se fosse observada positividade nuclear inequívoca em pelo menos 10% de células tumorais. A coloração para erbB-2 foi classificada subjectivamente em 3 grupos: negativa (sem coloração), fracamente positiva (positividade membranar fraca), fortemente positiva (positividade membranar forte).

EXEMPLO 3

Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH)

Realizaram-se duas hibridizações FISH de duas cores utilizando sondas para ciclina D1, myc ou erbB2 etiquetadas com Spectrum-Orange juntamente com sondas correspondentes de referência centroméricas etiquetadas com FITC (Vysis). As hibridizações FISH de uma cor foram feitas com sondas da região comum mínima de 20q13 (Vysis, e ver Tanner *et al.*, *Cancer Res.* 54: 4257-4260 (1994)), mybL2 e 17q23 (Barlund *et al.*, *Genes Chrom. Cancer* 20: 372-376 (1997)) etiquetadas com Spectrum Orange. Antes da hibridização, secções da série de tumores foram desparafinadas, secas ao ar e desidratadas em etanol a 70, 85 e 100%, seguido de desnaturação durante 5 minutos a 74 °C em 70% formamida-solução 2 X SSC. A mistura de hibridização continha 30 ng de cada uma das sondas e 15 µg de Cot1-DNA humano. Após hibridização durante a noite a 3 °C numa câmara humidificada, as lamelas foram lavadas e contra-coradas com DAPI 0,2 µM numa solução que evita uma rápida perda de fluorescência ("antifade"). Os sinais de FISH foram classificados com um microscópio de fluorescência Zeiss equipado com filtros de dupla banda de passagem, para a visualização simultânea de sinais de FITC e Spectrum Orange. Mais de 10 sinais de FISH por célula ou agregados muito próximos de sinais foram considerados critérios para a amplificação de genes.

EXEMPLO 4

Hibridização *In Situ* de mRNA

Para a hibridização *in situ* de mRNA, secções de séries de tumores foram desparafinadas e secas ao ar antes da hibridização. Sondas oligonucleotídicas sintéticas dirigidas contra mRNA de erbB2 (número de acesso da Genbank X03363, nucleótidos 350-396) foram etiquetadas na

extremidade 3' com ^{33}P -dATP utilizando desoxinucleotidil-transferase terminal. As secções foram hibridizadas numa câmara humidificada, a 42 °C durante 18 horas, com 1×10^7 CPM/ml da sonda em 100 μl de mistura de hibridização (formamida 50%, sulfato de dextrano 10%, sarcosil 1%, fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, 4 X SSC, 1 X solução de Denhardt e 10 mg/ml de ssDNA). Após a hibridização, as secções foram lavadas várias vezes em 1 X SSC a 55 °C, para remover sonda não ligada, e foram brevemente desidratadas. As secções foram expostas durante três dias a ecrãs de PhosphorImager, para visualizar a expressão de mRNA de ERBB2. As secções de controlos negativos foram tratadas com RNase antes da hibridização, que aboliu todos os sinais de hibridização.

O presente método permite uma análise de alto rendimento de centenas de espécimes por série. Em consequência, esta tecnologia proporciona um aumento de uma ordem de magnitude do número de espécimes que pode ser analisado, em comparação com blocos anteriores nos quais poucas dúzias de espécimes individuais fixados em formalina estão numa configuração pouco definida ou indefinida e são utilizados para a realização de testes de anticorpos. Outras vantagens da presente invenção incluem destruição desprezável dos blocos de tecidos originais e um protocolo de fixação otimizado, que expande a utilidade desta tecnologia à visualização de alvos de DNA e RNA. O presente método também permite a aquisição e distribuição aperfeiçoadas de tecidos de tumores humanos para fins de investigação. A automatização do procedimento permite uma amostragem eficiente de espécimes e formação de séries em múltiplas séries de tecidos, cada uma fornecendo tanto quanto 50, 100 ou mesmo até 200 secções para análise molecular. Depósitos

inteiros de dezenas de milhar de tecidos existentes fixados em formalina provenientes de laboratórios de patologia podem ser colocados em algumas dúzias de micro-séries de tecidos de alta densidade para estudar muitas variedades de tipos de tumores, bem como diferentes fases da progressão tumoral. A estratégia de séries de tumores também permite testar dúzias ou mesmo centenas de potenciais marcadores moleculares de prognóstico ou diagnóstico a partir do mesmo conjunto de tumores. Alternativamente, as amostras de tecidos cilíndricas proporcionam espécimes que podem ser utilizados para isolar DNA e RNA para análise molecular.

Tendo em vista as muitas especificações possíveis às quais podem ser aplicados os princípios da nossa invenção, deve reconhecer-se que as especificações ilustradas são exemplos preferidos da invenção, não devendo ser considerados limitadores do âmbito da invenção. Ao invés, o âmbito da invenção é definido pelas reivindicações seguintes. Em consequência, reivindicamos como nossa invenção tudo o que pertence ao âmbito destas reivindicações.

Lisboa, 3 de Dezembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a preparação de espécimes de tecido para análise paralela, compreendendo:

a obtenção de uma pluralidade de espécimes dadoras alongados a partir de um bloco dador (30);

a colocação de cada espécime dador numa localização atribuída numa série receptora concebida por uma série de receptores formados num bloco receptor (70); tendo os receptores um tamanho transversal e uma forma complementares a um tamanho complementar e forma dos espécimes dadores

a obtenção de uma pluralidade de secções (76) a partir da série receptora através do corte de secções finas (76) da série receptora, após os espécimes dadores serem colocados nas localizações atribuídas na série receptora, de tal modo que cada secção (76) contém uma pluralidade de espécimes dadores que mantêm as suas localizações atribuídas depois de a série receptora ser cortada.

2. O método de acordo com a reivindicação 1, em que cada espécime dador é obtido através da perfuração de uma amostra alongada a partir do referido bloco dador (30).

3. O método de acordo com a reivindicação 2, em que a colocação de cada espécime dador numa localização atribuída na série receptora compreende a formação de um receptáculo alongado no referido bloco receptor (30) e a colocação da amostra alongada no receptáculo alongado do referido bloco receptor (70).

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a formação do receptáculo alongado compreende a formação de uma perfuração cilíndrica no bloco receptor (70) e a amostra é obtida através da perfuração de um espécime de tecido cilíndrico a partir do bloco dador (30), em que um diâmetro do receptáculo alongado é substancialmente o mesmo que o diâmetro da amostra.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda a associação de um parâmetro clínico a cada localização atribuída da série receptora.
6. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda a execução de uma análise histológica diferente de cada secção (76) incluindo a realização de teste diferentes seleccionados a partir do grupo de uma análise imunológica e de uma hibridação ácida.
7. Método de acordo com a reivindicação 6, compreendendo ainda a determinação se existem correlações entre os parâmetros clínicos, análise imunológica e hibridação de ácidos nucleicos.
8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os espécimes dadores são espécimes de tecidos ou preparações celulares, respectivamente.
9. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda:
a formação do referido bloco dador (30) através da incorporação de um espécime biológico num agente de incorporação.

10. Método de acordo com a reivindicação 9 enquanto dependente da reivindicação 6, compreendendo ainda a comparação de resultados das diferentes análises histológicas em cada localização atribuída com informação clínica sobre o espécime biológico na localização atribuída.
11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o espécime biológico é um tecido de um tumor.
12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que a análise histológica compreende a análise imunológica e análise de hibridação de ácido nucleico.
13. Método de acordo com a reivindicação 9, compreendendo ainda o alinhamento de uma secção de tecido fino acima do dador (30) para identificar uma área de interesse a partir da qual cada um dos espécimes dadores é retirado.
14. Método de acordo com a reivindicação 9, em que cada espécime dador alongado é cilíndrico e tem um diâmetro que é inferior a cerca de 1 mm.
15. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a obtenção de um a variedade de espécimes dadores compreende a punção de uma amostra de tecido alongada de um espécime de tecido *ex vivo*.
16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a localização, a partir da qual um espécime dador é obtido do bloco dador, é determinada através de exame

de uma secção de corte fina do bloco dador a partir do qual o espécime dador é obtido.

17. Método de acordo com a reivindicação 9, em que a obtenção da pluralidade de espécimes dadores inclui a obtenção de uma pluralidade de núcleos de amostras de dador cilíndricas a partir do espécime biológico; os núcleos receptores perfurados de um agente receptor embutido para formar a série receptora de receptáculos cilíndricos; em que a obtenção da pluralidade das secções inclui o seccionamento do agente embutido receptor para obter uma secção transversal dos núcleos de amostra dadores na série ao mesmo tempo que mantém as localizações atribuídas na série em secções transversais consecutivas.
18. Um aparelho para a preparação de espécimes para a análise paralela de secções de séries de material biológico, compreendendo:
 - uma punção dadora (156) disposta de modo a puncionar um espécime de tecido a partir do bloco dador (30) numa posição dadora,
 - uma punção receptora (154) disposta de modo a puncionar núcleos receptores a partir de um bloco receptor (70) numa posição receptora, para formar uma série receptora de receptores que estão individualmente posicionados numa posição pré-seleccionada em relação à punção dadora (156);
 - em que a punção de dador (156) está disposta de modo a entregar um espécime de tecido num receptor na posição pré-seleccionada;
 - em que a punção receptora (154) tem um diâmetro externo que é mais pequeno do que um diâmetro da

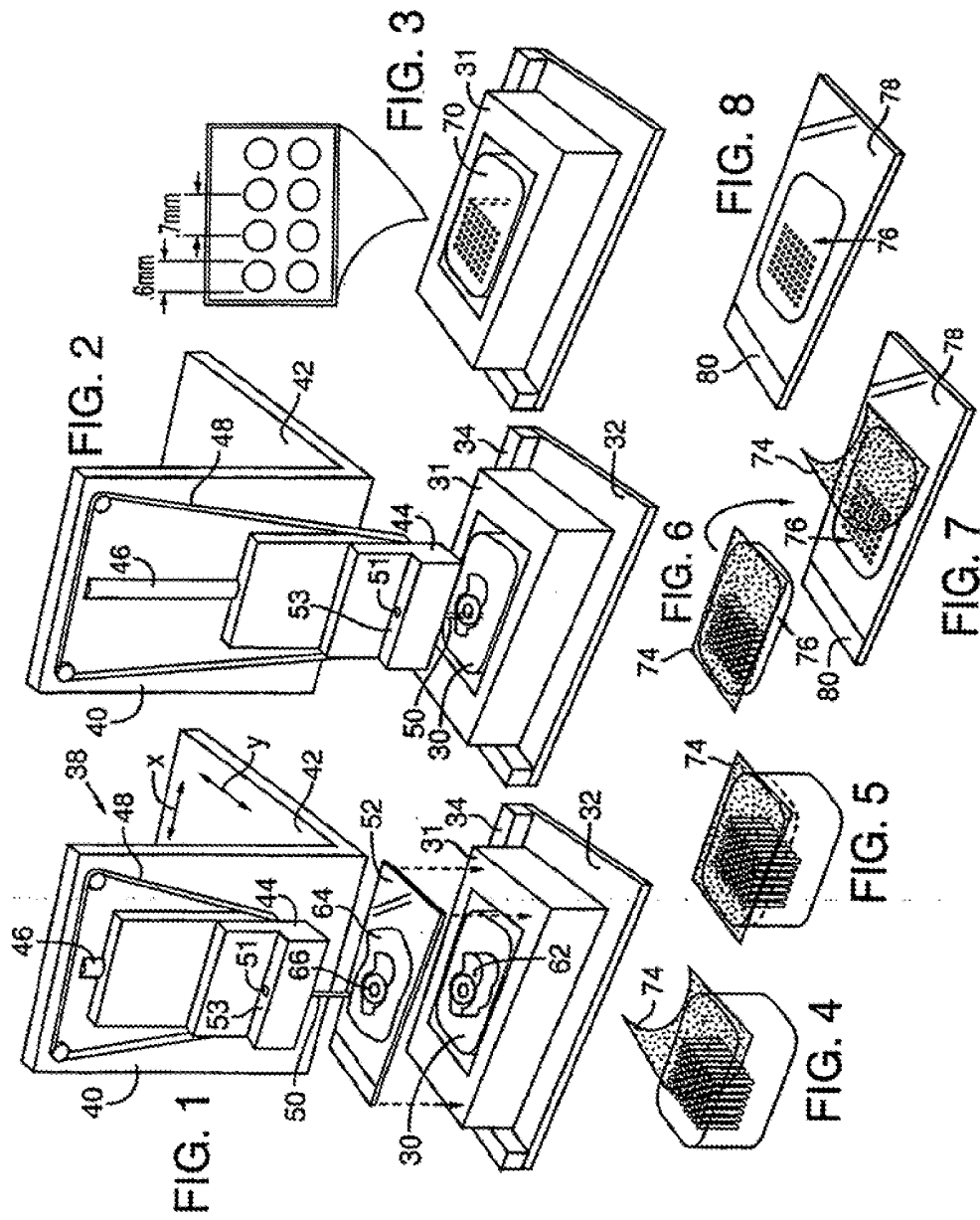
punção dadora (156), de tal modo que os receptores têm uma forma complementar à forma do espécime de tecido.

19. Aparelho de acordo com a reivindicação 18, compreendendo ainda um suporte (31) posicionado de modo a manter o bloco receptor numa posição de recepção.
20. Aparelho de acordo com a reivindicação 19, em que o suporte (31) está posicionado de modo a manter o bloco dador na posição dadora.
21. O aparelho de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 20, em que o suporte (31) compreende um dispositivo de posicionamento x-y (102, 104) que pode ser implementado de modo incremental de modo a alinhar receptores sequenciais do bloco receptor (70) com a punção dadora (156).
22. Aparelho de acordo com a reivindicação 18, compreendendo ainda um estilete (144) posicionado para a introdução na punção dadora (156) de modo a expelir o espécime de tecido da punção (156) num dos receptores alinhados com a punção (156).
23. O aparelho de acordo com a reivindicação 18, compreendendo ainda um dispositivo de posicionamento disposto de modo a suportar um deslizamento de secção fina ao longo do bloco dador (30) e para permitir o posicionamento de um deslizamento de secção fina, para alinhar estruturas de interesse no deslizamento de secção fina com regiões correspondentes do espécime de tecido (62, 132) no bloco dador (30).

24. O aparelho de acordo com a reivindicação 18, em que o a punção receptora (154) é capaz de ser posicionada numa posição fixa em relação ao bloco receptor (70) para formar a série de receptores no bloco receptor (70, 122).
25. O Aparelho da reivindicação 24, compreendendo ainda um registo para registar as posições dos receptores no bloco receptor (70, 122).
26. O aparelho de acordo com a reivindicação 25, em que o registo é um sistema implementado em computador (220) para registar as posições dos receptores, e uma identificação do espécime de tecido (62, 132) que se encontra colocado em cada receptor.
27. O aparelho de acordo com a reivindicação 19, em que: o suporte (31) é uma plataforma de posicionamento x-y para deslocar num tabuleiro que sustenta o bloco receptor (70, 122) numa variedade de coordenadas.
28. O aparelho de acordo com a reivindicação 27, compreendendo ainda um microscópio para visionar o bloco dador (30, 130) e localizar uma estrutura de interesse num deslizamento de referência alinhado com o bloco dador (30, 130).
29. O aparelho de acordo com a reivindicação 27, compreendendo ainda um estilete (144) que se selectivamente e alternativamente alinhado com a punção dadora (156) e a punção receptora (154) para deslocar conteúdos da punção receptora (154) após o núcleo

receptor ter sido puncionado a partir do bloco receptor (70, 122) e para deslocar os conteúdos da punção dadora (156) em receptores do bloco receptor (70, 122) depois de um espécime de tecido ser puncionado a partir do bloco dador (30, 130).

Lisboa, 3 de Dezembro de 2008



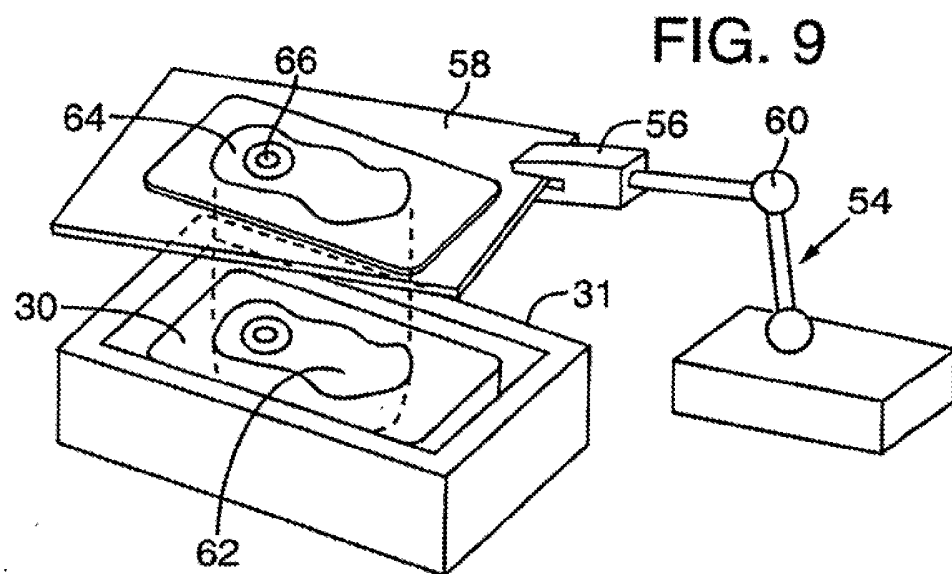


FIG. 10A

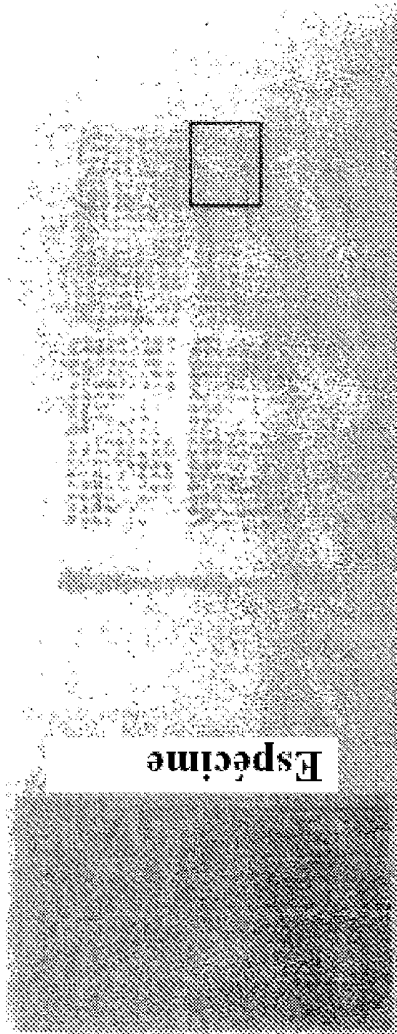


FIG. 10B



RNA

26S
18S



FIG. 10C

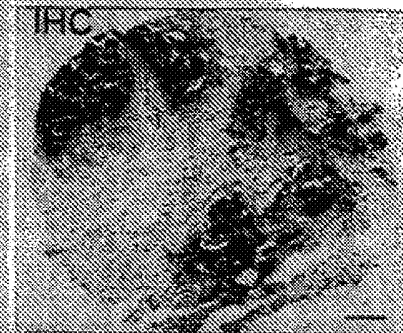


FIG. 10D

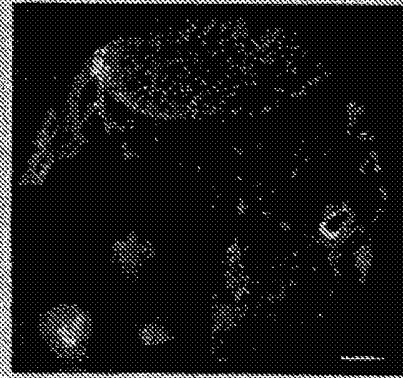


FIG. 10E

Especime

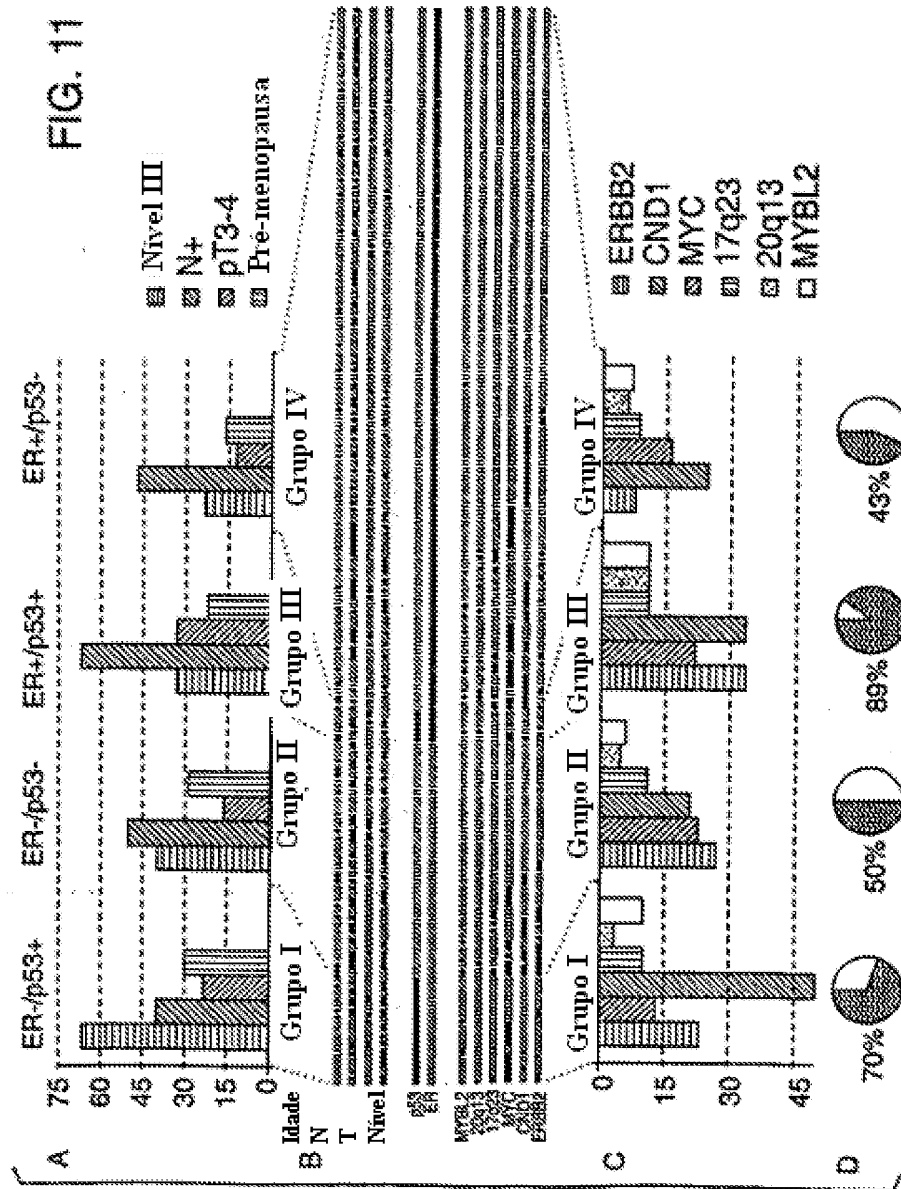


FIG. 12

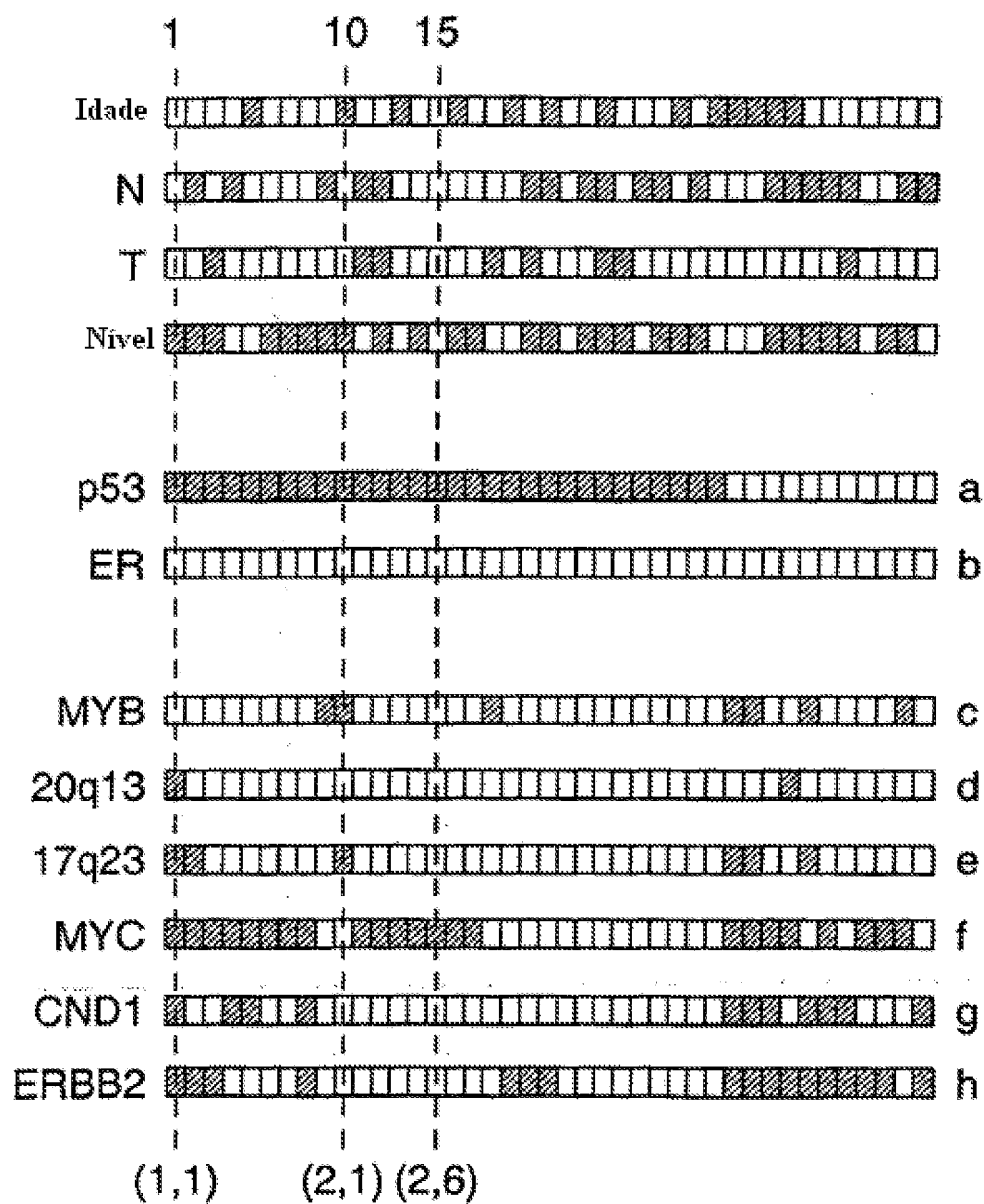


FIG. 13

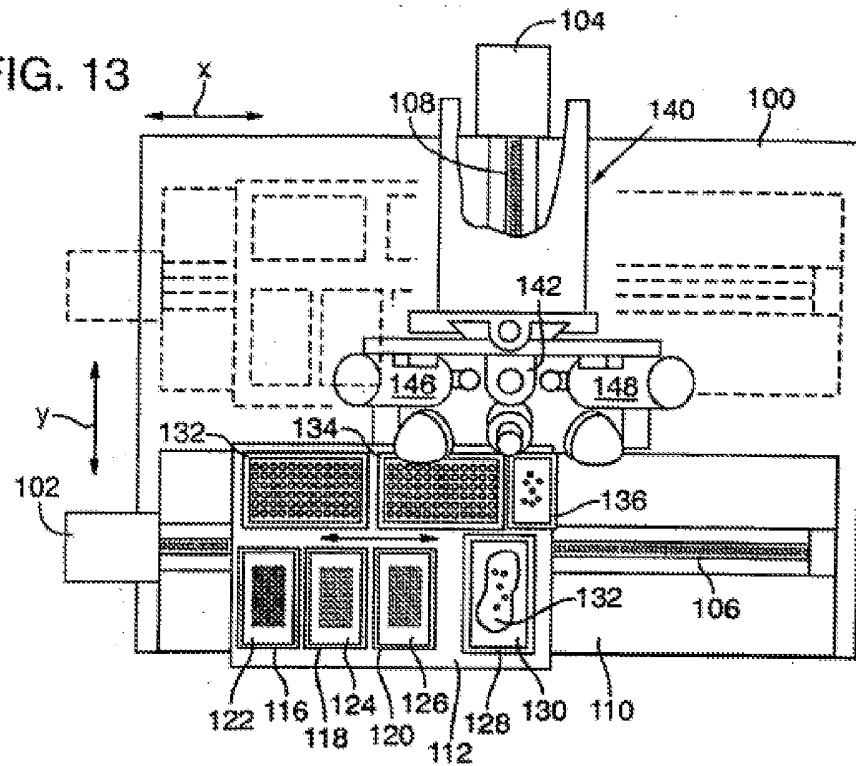
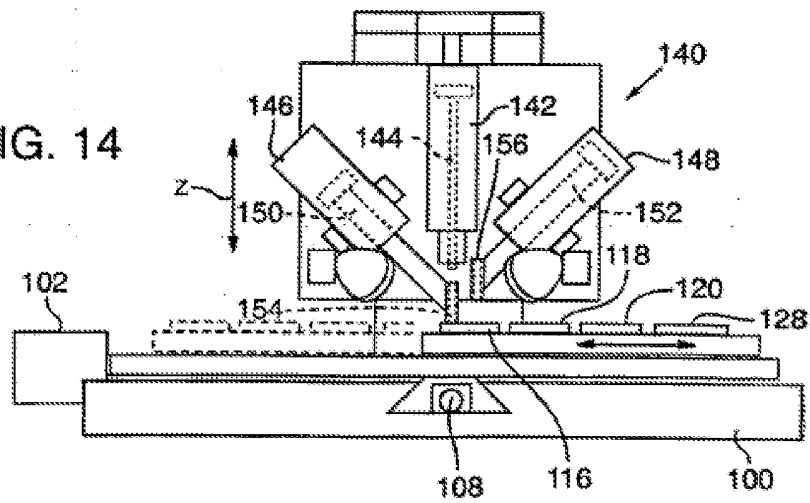
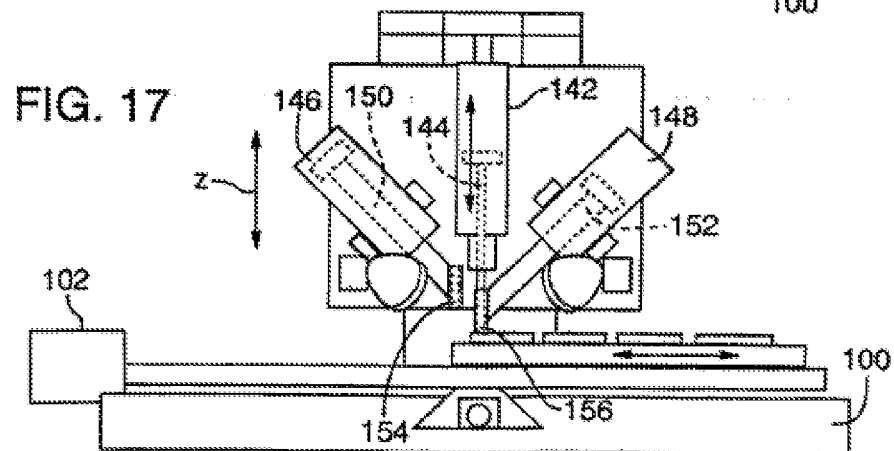
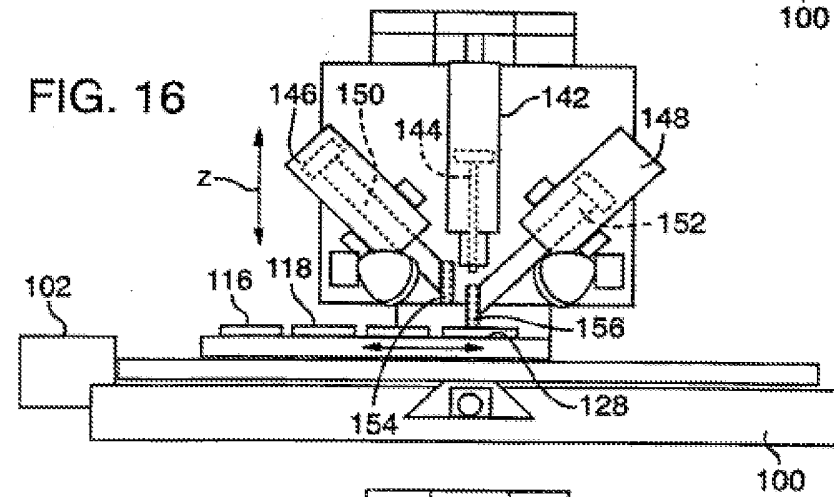
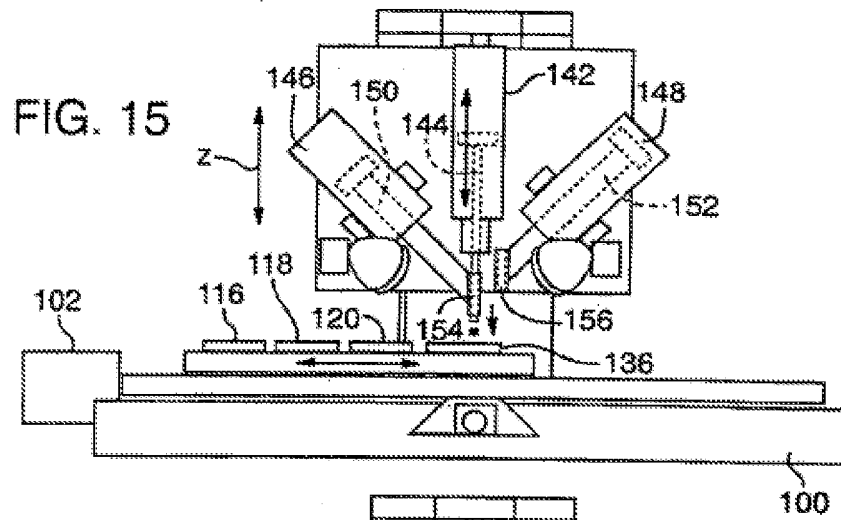
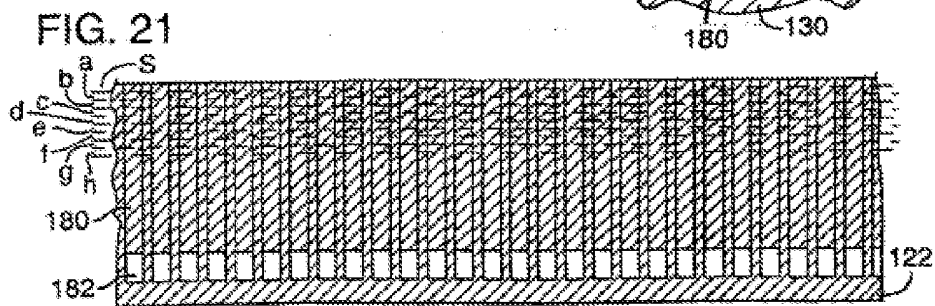
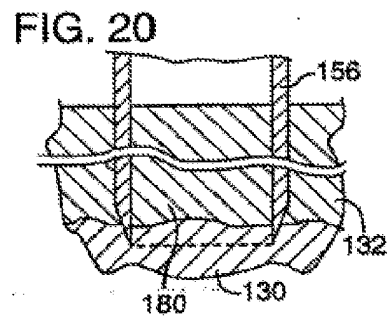
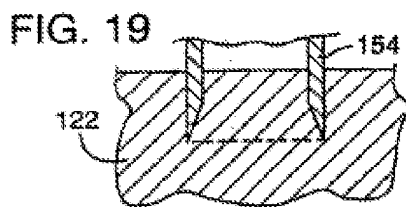
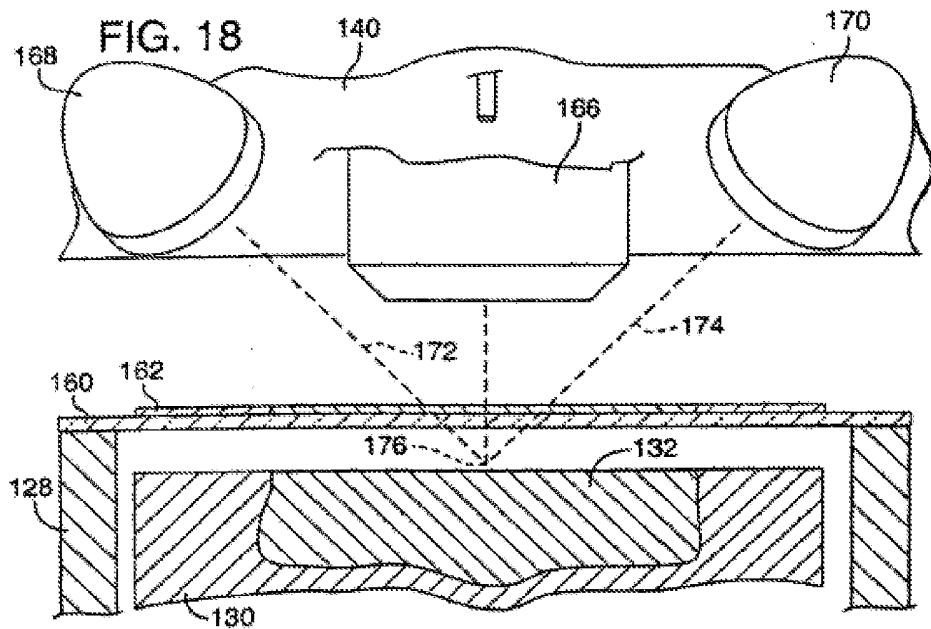


FIG. 14







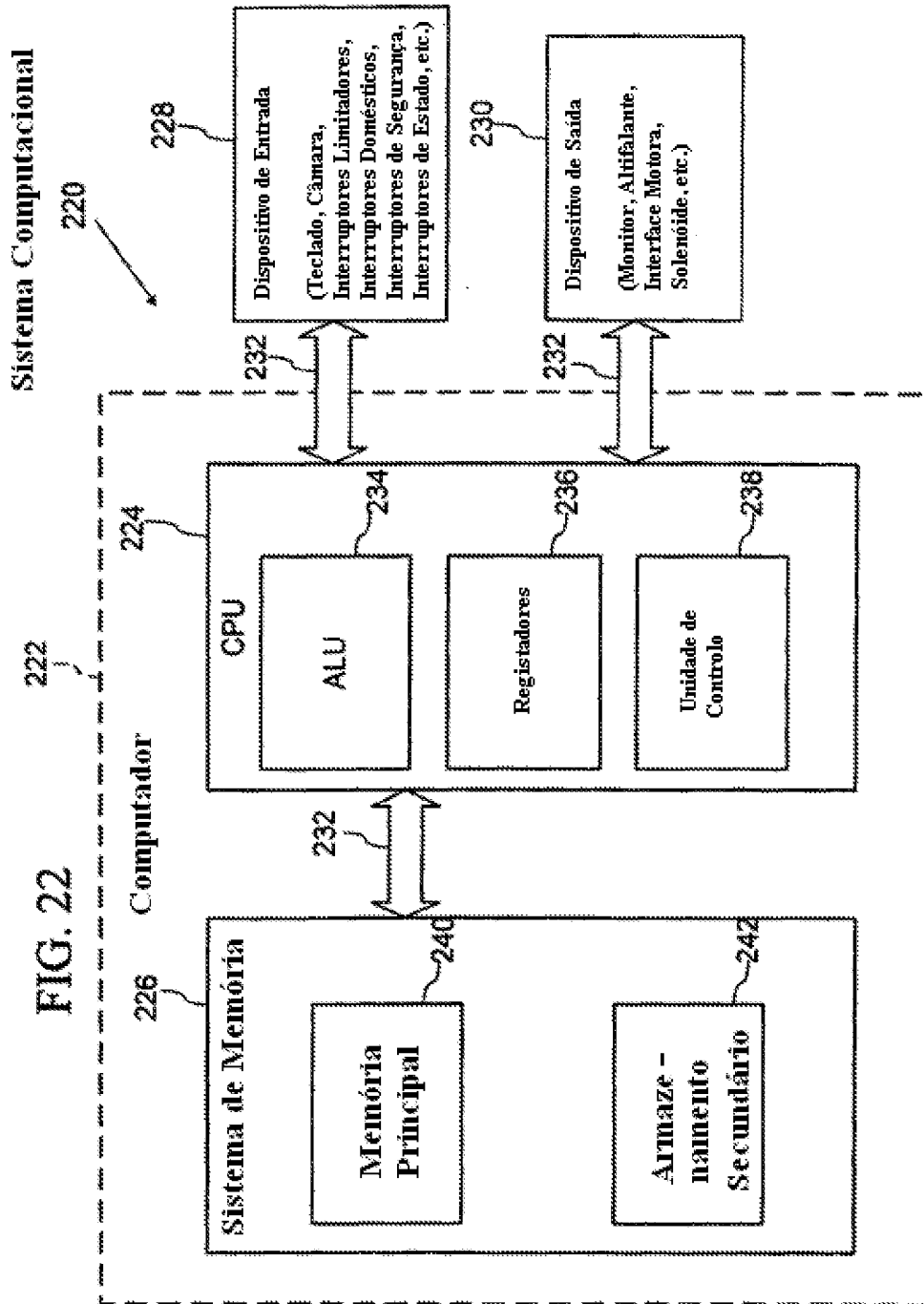


Fig. 23

