



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0512731-9 B1**

**(22) Data do Depósito: 06/07/2005**

**(45) Data de Concessão: 28/08/2018**



\* B R P I 0 5 1 2 7 3 1 B 1 \*

---

**(54) Título:** DISPOSITIVO DE AMOSTRAGEM DE CÉLULAS COLORRETAIS

**(51) Int.Cl.:** A61B 10/00

**(30) Prioridade Unionista:** 07/07/2004 GB 0415277.3

**(73) Titular(es):** COLONIX LIMITED

**(72) Inventor(es):** ALEXANDRE LOKTIONOV; TATIANA BANDALETOVA; ANDREW HUMPHREY LLEWELYN; COLIN GEORGE FERRETT; RUPERT CHARLES GIFFORD LYWOOD; HUGO GEOFFREY GIFFORD LYWOOD

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 28/12/2006



reduzida, simplicidade e baixo custo com alta sensibilidade e especificidade. Dois métodos de triagem para o CRC são a colonoscopia/sigmoidoscopia flexível e testagem de sangue oculto fecal (FOBT) [Rennert, G. Recent Results Câncer Res. 2003; 163: 248-253, Atkin, W. Scand. J. Gastroenterol. (Suppl.) 2003, 237: 13-16, Walsh, J. M. e Terdiman, J. P. JAMA 2003; 289: 1288-1296]. Entretanto, ambos estes métodos têm inconvenientes significativos.

A colonoscopia/sigmoidoscopia flexível é considerada um procedimento diagnóstico preciso e seguro, mas sua capacidade de invasão, seu custo e a exigência de especialistas habilitados e experientes para realizar o procedimento tornam seu uso na triagem de rotina impraticável. O mesmo é verdadeiro para a colonografia tomográfica computadorizada (colonoscopia virtual) recém-introduzida.

A FOBT é barata e simples, mas produz taxas inaceitavelmente elevadas de resultados tanto negativos falsos quanto positivos falsos. Apesar destas limitações, a FOBT é atualmente o método de triagem escolhido.

Têm sido investigados métodos para diagnosticar o CRC com base em um indicador direto da presença de tumor. Um indicador que foi identificado é a análise dos colonócitos esfoliados. A esfoliação dos colonócitos (isto é, o desprendimento espontâneo das células da camada epitelial ordenadamente organizada da mucosa colônica) é um mecanismo de renovação celular importante no intestino humano [Eastwood, G. L. Gastroenterology 1977; 41: 122-15]. A análise citológica dos colonócitos obtidos de lavagens colônicas ou retais (is-

to é, pela irrigação da mucosa colorretal) foi realizada aproximadamente 50 anos atrás [Bader, G. M. e Papanicolau, G. N. Cancer 1952; 5: 307-14]. Este trabalho mostrou que células neoplásticas esfoliadas morfológicamente distintas poderiam ser detectadas em pacientes com CRC. Entretanto, o método de obtenção destas amostras (um procedimento de lavagem colônica invasivo) sofria das mesmas desvantagens da sigmoidoscopia/colonoscopia e exigia uma análise citológica detalhada da amostra uma vez obtida.

10 A abordagem predominante para a obtenção de células epiteliais esfoliadas tem sido a de isolá-las das fezes humanas. As fezes humanas foram identificadas como uma fonte de tais células, uma vez que as células esfoliadas do epitélio colônico podem ser excretadas em conjunto com outras  
15 substâncias fecais.

As primeiras tentativas de utilizar colonócitos isolados das fezes humanas para fins de diagnóstico e pesquisa começaram cerca de 15 anos atrás por P.P. Nair e seus colegas. Eles reivindicaram serem capazes de recuperar milhares de células esfoliadas "viáveis" de algumas gramas de  
20 material fecal disperso utilizando um procedimento de isolamento baseado na centrifugação com gradiente de densidade [Iyengar, V. et al., FASEB J 1991; 5: 347-350]. Entretanto, estas reivindicações ambiciosas geraram dúvidas consideráveis devido à pouca probabilidade da presença de colonócitos  
25 bem preservados em um ambiente anaeróbico agressivo, como o encontrado nas fezes. Além disto, a evidência morfológica apresentada em sua referência de 1991 não era convincente. .

P. P. Nair e os membros de seu grupo mantêm a validade de sua abordagem [Nair, P. et al., J. Clin. Gastroenterol. 2003; 36 (5 Suppl.) S84-S93], mas não produziram nenhum avanço prático com base nos resultados de seus estudos.

5 Entretanto, apesar da falta de avanços práticos de P. P. Nair e seus colegas, o uso da evacuação humana para fins de diagnóstico e pesquisa permanece uma área de pesquisa ativa, uma vez que não está associado a qualquer intervenção invasiva. Vários grupos têm empreendido tentativas de  
10 isolar material genético (DNA) derivado de colonócitos de amostras de evacuação humana de modo a desenvolverem procedimentos diagnósticos com o emprego de biomarcadores moleculares de malignidade. Embora o DNA diretamente isolado de fezes homogeneizadas possa ser amplificado e analisado quanto à presença de alterações genéticas associadas ao câncer,  
15 a ausência de um biomarcador molecular único altamente seguro para o câncer resultou no uso de vários marcadores moleculares que refletem várias alterações genéticas estão sabidamente presentes em células malignas a frequências relativamente elevadas. Várias abordagens, que propõem a detecção  
20 simultânea de várias mutações nos genes APC, K-ras e p53 combinada com análise de marcador de micro-satélite, têm sido descritas [Ahlquist, D. A. et al., Gastroenterology 2000; 119: 1219-1227, Dong, S. M. et al., J. Natl. Cancer  
25 Inst. 2001; 93: 858-865, Traverso, G. et al., N. Engl. J. Med. 2002; 346: 311-320]. Alterações de metilação no DNA fecal têm sido também consideradas como um marcador diagnóstico potencial [Muller, H. M. et al., Lancet 2004; 363: 1283-

1285]. Embora a detecção de tumores colorretais por análises moleculares com vários objetivos pareça exeqüível, a validade destes métodos para fins de triagem continua questionável devido ao alto custo e à relativa complexidade dos procedimentos de laboratório envolvidos.

A busca de marcadores moleculares de CRC no DNA extraído de amostras de evacuação homogeneizadas tem obscurecido a importância da coleta/isolamento inicial de colonócitos esfoliados. É evidente, contudo, que a evacuação homogeneizada é um material difícil para extração do DNA humano. Em particular, a abundância de bactérias nas fezes pode interferir com os procedimentos de recuperação do DNA em colonócitos, e uma rápida danificação e deterioração do DNA mamário ocorrem na presença da flora bacteriana anaeróbica do cólon humano.

O desenvolvimento de abordagens baseadas no isolamento de colonócitos esfoliados tem sido lento devido parcialmente a uma falta surpreendente de conhecimento sobre esfoliação de células no intestino tanto em condições fisiológicas normais quanto na doença. As concepções atuais sobre a esfoliação de colonócitos são ainda afetadas por uma velha e não provada hipótese que implica a esfoliação "obrigatória" de quase todos os colonócitos diferenciados quando de sua migração para o epitélio luminal das criptas colônicas (isto é, presume-se que deve haver milhões de colonócitos presentes nas matérias fecais uma vez que a taxa de proliferação de células do epitélio colônico é elevada e todas as células são finalmente esfoliadas). [Entretanto, está se tornando

evidente que a morte ou apoptose programada das células in situ é pelo menos tão importante quanto a esfoliação [Hall, P. A. et al., J. Cell Sci. 1994; 107: 3569-3577, Barkia, D. H. e Gibson, P. R. Pathology 1999; 31: 230-238, Ahlquist, D. A. et al., Hum. Pathol. 2000; 31: 51-57]. A relação entre estes dois mecanismos principais de remoção de células da mucosa colônica pode passar por alterações significativas na neoplasia colorretal [Ahlquist, D. A. et al. (supra)]. Na verdade, está agora provado que os percursos reguladores normais que levam as células à apoptose estão gravemente desregulados nos tumores malignos [Bedi, A. et al., Cancer Res. 1995; 55: 1881-1816, Laçasse, E. C. et al., Oncogene 1998; 17: 3247-3259, Jass. J. R. Gastroenterology 2002; 123: 862-876, Oren, M. Cell Death Differ. 2003; 10: 431-442, Boedefeld, W. M. 2<sup>nd</sup> et al., Ann. Surg. Oncol. 2003; 10: 839-851], do que resulta um potencial apoptótico de células cancerígenas consideravelmente reduzido. Ao mesmo tempo, sabe-se que a aderência das células tumorosas diminui acentuadamente à medida que o câncer progride. [Yamamoto, H. et al., Cancer Res. 1996; 56: 3605-3609, Haier, J. e Nicolson, G. L. Dis. Colon Rectum 2001; 44: 876-884, Leeman, M. F. et al., J. Pathol. 2003; 201: 528-534]. Este último fenômeno é importante para o espalhamento metastático, mas na neoplasia colorretal a supressão combinada de apoptose e diminuição na aderência/comunicação intercelular faz aumentar consideravelmente as probabilidades de desprendimento de células malignas da superfície de tumores crescentes. Se este for o caso, as células tumorosas esfoliadas, algumas das quais po-

dem reter um potencial de proliferação, devem diferir de suas homólogas esfoliadas normais (não tumorosas) por: i) serem mais abundantes devido à esfoliação facilitada da superfície tumerosa; e (ii) terem uma capacidade de "sobrevivência" muito maior, em particular devido a uma resistência mais elevada à falta de oxigênio [Graeber, T. G. et al., Nature 1996; 379: 88-91]. Quando da esfoliação, estas células entram em uma "camada mucocelular" relativamente bem oxigenada, que separa a mucosa colônica do conteúdo fecal do intestino e se move permanentemente em sentido distal com o fluxo de fezes [Ahlquist, D. A. et al. (supra)].

A importância da camada mucocelular, que proporciona uma interface entre a mucosa colorretal e o conteúdo fecal do intestino, não foi compreendida até recentemente. Estudos experimentais indicaram que um DNA de boa qualidade pode ser facilmente obtido da superfície das fezes de ratos e utilizado para amplificação adicional e análise da mutação de genes [Loktionov, A. e O'Neill, I. K. Int. J. Oncol. 1995; 6: 437-445]. Estas experiências iniciais sugeriam que o DNA extraído de colonócitos isolados da superfície de evacuações humanas (a superfície das evacuações pode ser considerada como uma fração da camada mucocelular excretada com as fezes) poderia ser utilizado na análise molecular. Foi desenvolvido um método de isolamento de células esfoliadas de amostras de evacuação total humana pela eliminação por lavagem das células da superfície das fezes resfriadas e pela coleta delas por um procedimento de separação imunomagnética [Loktionov, A. et al., Clin. Cancer Res. 1998; 4: 337-



e especialmente a impossibilidade da padronização dos procedimentos), impedindo sua comercialização e introdução séria na prática clínica. Tornou-se claro também que números relativamente pequenos de células bem preservadas podem ser obtidos da superfície de evacuações humanas com a utilização desta técnica [Bandaletova, et al., APMIS 2002; 110: 239-246]. Estes problemas, a dificuldade de padronização sendo o crucial, provocam sérias dúvidas com relação ao uso de colonócitos esfoliados isolados de amostras de evacuação para triagem de CRC em larga escala.

Há considerável evidência indicando que a camada mucocelular que cobre a mucosa retal humana é particularmente rica em colonócitos esfoliados bem preservados. Além disto, o conteúdo celular desta camada em pacientes com CRC parece ser muito mais elevado do que em indivíduos saudáveis devido basicamente à presença consideravelmente aumentada de colonócitos malignos altamente resistentes. Portanto, nas células tumorosas de pacientes com CRC, que são muito mais bem adaptadas a uma existência autônoma, devem dominar quantitativamente um agregado de células retais esfoliadas. Vários informes recentes que descrevem a implantação distal (anal, por exemplo) de células esfoliadas de tumores colorretais removidos [Jenner, D. C. et al., Dis. Colon Rectum 1998; 41: 1432-1434, Wind, P. et al., Dis. Colon Rectum 1998; 41: 1432-1434, Isbister, W. H. Dig. Surg. 2000; 17: 81-83, Hyman, N. e Kida, M. Dis. Colon Rectum 2003; 43: 835-836, Abbasakoor, F. et al., Ann. R. Coll. Surg. Engl. 2004; 86: 38-39] corroboram fortemente esta hipótese.

O acesso direto à mucosa retal é possível pelo exame retal digital de rotina com o dedo enluvado do examinador. Entretanto, embora se possa obter contato com a camada mucocelular retal pelo emprego desta manipulação simples, são inevitáveis perdas significativas de material e a contaminação com o epitélio escamoso irrelevante do canal anal durante a retirada do dedo do reto. Esfregaços preparados a partir das luvas utilizadas no exame retal mostram colonócitos bem preservados, combinados com um alto nível de contaminação por células do epitélio escamoso.

Há, portanto, grande necessidade de coleta direta de células epiteliais esfoliadas da superfície da mucosa retal sem os problemas de perda de material e grave contaminação com outros tecidos no estágio de remoção da superfície de coleta de células do reto. Tais células podem não só utilizadas na análise quantitativa de células e DNA, mas também investigadas quanto à presença de biomarcadores de câncer adicionais (proteínas, por exemplo) e finalmente avaliadas em termos imuno-histoquímicos e citológicos.

#### Sumário da Invenção

De acordo com um primeiro aspecto da invenção, é apresentado um dispositivo de amostragem de células colorretais que compreende:

um elemento de inserção colorretal que tem uma extremidade de inserção distal, uma extremidade proximal e um cavidade interna que pode ser fechada;

uma membrana flexível, tem uma superfície externa de amostragem de célula e uma superfície interna, em que a





mido que compreende um dispositivo mecânico capaz de distribuir uma quantidade pré-definida de uma primeira pressão elevada e de uma segunda pressão reduzida para o dispositivo de amostragem de células. Esta modalidade tem a vantagem de regular com precisão a pressão no interior do elemento de inserção, e o dispositivo mecânico tem a vantagem de ser reutilizado com um número indefinido de dispositivos de amostragem de células colorretais descartáveis.

Mais preferivelmente, os dispositivos para a pressurização da cavidade interna compreendem uma seringa. O uso de uma seringa permite tanto um funcionamento simples quanto o bombeamento de um volume fixo de ar para dentro da membrana flexível (de preferência pelo menos um aumento de dez vezes no volume de ar presente na membrana flexível). Por exemplo, em uma modalidade da invenção na qual uma seringa de 100 ml é presa na extremidade proximal do elemento de inserção, o êmbolo da seringa pode ser inicialmente fixado na marca de 70-90 ml. Uma quantidade pré-definida de uma primeira pressão elevada pode ser, portanto, aplicada empurrando-se o êmbolo até sua extensão máxima (até a marca de 0 ml, por exemplo), que encheria a membrana flexível com um volume de ar de 70-90 ml. Uma quantidade pré-definida de uma segunda pressão reduzida pode ser aplicada em seguida puxando-se o êmbolo da seringa de volta à sua extensão máxima (até a marca de 100 ml, por exemplo), o que introduziria a membrana flexível na cavidade interna do elemento de inserção. Em uma modalidade preferida da invenção, a seringa seria dotada de um ou mais recursos de retenção (locais de encaixe de pres-







tivo de amostragem de células colorretais conforme definido aqui e um tubo de acesso retal e opcionalmente um obturador.

O uso de um tubo de acesso retal tanto proporciona uma inserção mais confortável do dispositivo de amostragem quanto previne o contato entre o dispositivo de amostragem e qualquer superfície outra que não a superfície mucosa a ser amostrada. O uso de um obturador além do tubo de acesso retal pode aliviar o desconforto da inserção do tubo de acesso retal.

Em uma modalidade preferida da invenção, o estojo pode compreender adicionalmente um lubrificante, como uma geléia lubrificante (geléia K-Y, por exemplo). Isto tem a vantagem de proporcionar maior conforto durante a inserção do obturador ou dispositivo de amostragem de células da invenção.

Em uma modalidade preferida da invenção, o obturador é desengatado do tubo de acesso retal após a inserção do obturador e do tubo de acesso retal conjugados na cavidade retal.

Em uma modalidade preferida da invenção, o estojo compreende também um dispositivo de vedação, como uma tampa rosqueada, para entrar em contato com o elemento de inserção.

Em uma modalidade preferida da invenção, o estojo compreende também um ou mais reagentes, com um tampão. O uso de um tampão permite a preparação da amostra antes da análise adicional.

Em uma modalidade preferida da invenção, o tampão



de amostragem de células separadas, até as proximidades da superfície mucosa colorretal a ser amostrada, sem fazer contato prévio com qualquer outra superfície do corpo; pôr a superfície de amostragem de células em contato com a superfície mucosa colorretal de modo que seja obtida uma amostra da superfície mucosa; e

remover o dispositivo de amostragem e a amostra das proximidades da superfície mucosa sem que a superfície de amostragem de células separadas ou a amostra faça contato com qualquer outra superfície do corpo.

Este método engloba as etapas-chaves de amostrar diretamente células esfoliadas de uma superfície mucosa e assegura que a amostra não seja contaminada pelo contato da membrana de amostragem de células com outras superfícies do corpo. A contaminação é evitada pela separação da superfície de amostragem, em que a separação pode ser definida como a ação de isolar ou pôr à parte a superfície de amostragem antes de pô-la em contato com a superfície mucosa colorretal ou após a coleta das células da superfície mucosa colorretal.

Sob um quarto aspecto da invenção, é apresentado um método de amostragem de células esfoliadas a partir da superfície mucosa colorretal de um indivíduo humano, o qual compreende as etapas de:

inserir um dispositivo de amostragem de células colorretais de acordo com a invenção na cavidade retal e levar o dispositivo até as proximidades da superfície mucosa colorretal sem que a superfície externa de amostragem de células da membrana flexível faça contato prévio com qualquer

outra superfície do corpo;

pressurizar a cavidade interna até pelo menos uma primeira pressão elevada de modo que a membrana flexível seja emitida da extremidade distal do dispositivo de amostragem;

5 pôr a superfície mucosa colorretal em contato com a superfície externa de amostragem de células da membrana de modo que seja obtida uma amostra de células esfoliadas da superfície mucosa colorretal;

10 aplicar uma segunda pressão reduzida à cavidade interna de modo que a membrana flexível seja invertida e a amostra presente sobre a superfície de amostragem de células da membrana volte à cavidade interna do dispositivo de amostragem de células; e

15 remover o dispositivo de amostragem de células das proximidades da superfície mucosa colorretal e retirar o dispositivo da cavidade retal sem que a membrana ou amostra faça contato com qualquer outra superfície do corpo.

20 Deve ficar entendido que o dispositivo de amostragem de células pode exigir adicionalmente um tubo de acesso retal ou sozinho ou juntamente com um obturador.

Assim, em uma modalidade preferida da invenção, o método compreende adicionalmente as etapas de:

25 inserir um dispositivo de amostragem de células colorretais de acordo com a invenção e um tubo de acesso retal conjugados na cavidade retal; e

remover o dispositivo de amostragem e a amostra do tubo de acesso retal.

Em uma modalidade preferida da invenção, o método

compreende

adicionalmente as etapas de:

inserir um tubo de acesso retal e um obturador conjugados na cavidade retal;

5 retirar o obturador do tubo de acesso retal antes de inserir um dispositivo de amostragem;

remover o dispositivo de amostragem e a amostra;

substituir o obturador por meio do tubo de acesso retal; e

10 retirar o tubo de acesso retal e o obturador conjugados da cavidade retal.

Sob um quinto aspecto da invenção, é apresentado um método de amostragem de células esfoliadas da superfície mucosa colorretal de um indivíduo humano, o qual compreende

15 as etapas de:

inserir um tubo de acesso retal e um obturador na cavidade retal por meio do canal anal;

retirar o obturador do tubo de acesso retal;

20 inserir um dispositivo de amostragem de células colorretais de acordo com a invenção na cavidade retal por meio do tubo de acesso retal, sem que a membrana flexível do dispositivo de amostragem faça contato com qualquer outra superfície do corpo;

25 pressurizar a cavidade interna até uma primeira pressão elevada de modo que a membrana flexível seja emitida da extremidade distal do dispositivo de amostragem;

pôr a superfície mucosa colorretal em contato com a superfície externa de amostragem de células da membrana;

obter uma amostra de células esfoliadas da superfície mucosa colorretal;

5 aplicar uma segunda pressão reduzida à cavidade interna de modo que a membrana flexível seja invertida e a amostra presente sobre a superfície de amostragem de células da membrana volte à cavidade interna do dispositivo de amostragem de células;

10 retirar o dispositivo de amostragem de células da cavidade retal por meio do tubo de acesso retal, sem que a membrana flexível do dispositivo de amostragem entre em contato com qualquer superfície do corpo;

substituir o obturador por meio do tubo de acesso retal; e

15 retirar o tubo de acesso retal e o obturador do reto por meio do canal anal.

Deve ficar entendido que, enquanto o tubo de acesso retal permanece inserido na cavidade retal, um outro dispositivo de amostragem de células da invenção pode ser introduzido na cavidade retal. Por exemplo, pode ser introduzido o primeiro dispositivo de amostragem de células, que compreende um tampão de lise de células para permitir a extração do DNA e a análise (quantificação, por exemplo) de quaisquer células amostradas. Em seguida, pode ser introduzido um segundo dispositivo de amostragem de células, que  
20 compreende um meio preservador de células para permitir a análise citológica, bioquímica e imuno-histoquímica de  
25 quaisquer células amostradas.

Sob um aspecto alternativo da invenção, é apresen-



tado um dispositivo de amostragem para coletar uma amostra de uma superfície mucosa localizada dentro da cavidade retal de um indivíduo, que compreende:

um corpo substancialmente cilíndrico, que tem uma  
5 cavidade aberta na extremidade distal e uma cavidade que pode ser fechada na extremidade proximal;

uma membrana flexível mantida dentro do corpo substancialmente cilíndrico, que forma uma vedação que separa a cavidade distal aberta da cavidade proximal que pode  
10 ser fechada; as duas superfícies da membrana sendo a superfície proximal e a superfície distal; e

dispositivos para inflação e deflação, em que

o dispositivo para inflação pode aumentar a pressão interna do fluido da cavidade proximal que pode ser fechada quando fechada, fazendo com que a membrana vire do  
15 avesso a partir da extremidade distal do corpo substancialmente cilíndrico até que a superfície distal da membrana entre em contato com a superfície mucosa a ser amostrada; e

o dispositivo para deflação pode diminuir a pressão do fluido da cavidade proximal fechada, fazendo com que  
20 a membrana seja invertida, de modo que a membrana seja mantida dentro do corpo substancialmente cilíndrico depois que a superfície distal da membrana tiver entrado em contato com a superfície mucosa a ser amostrada.

25 Em uma modalidade preferida da invenção, o dispositivo de deflação é a válvula. Esta modalidade da invenção seria particularmente adequada para uso com uma membrana e-

lástica onde a pressão interna na cavidade proximal passível de fechamento fosse maior que a existente fora da cavidade.

Em uma modalidade preferida da invenção, o dispositivo de deflação compreende a seringa conectada à válvula.

5 Sob um segundo aspecto alternativo da invenção, é apresentado um método de amostragem de células esfoliadas de uma superfície mucosa localizada dentro da cavidade retal de um indivíduo humano, o qual compreende as etapas de:

10 levar um dispositivo de amostragem de acordo com a invenção até as proximidades da superfície mucosa sem que a membrana de amostragem faça contato prévio com qualquer outra superfície do corpo;

15 aumentar a pressão interna da cavidade proximal fechada de modo que a membrana flexível vire do avesso da extremidade distal do dispositivo de amostragem;

pôr a superfície mucosa em contato com a superfície distal da membrana flexível de modo que seja obtida uma amostra de células esfoliadas da superfície mucosa;

20 diminuir a pressão interna da cavidade proximal fechada de modo que a membrana flexível seja invertida e ela e a amostra sejam mantidas dentro da cavidade distal aberta; e

remover o dispositivo e a amostra das proximidades da superfície mucosa sem que a membrana flexível ou a amostra faça contato com qualquer outra superfície do corpo.

25 Em uma modalidade preferida da invenção, o método compreende as

etapas de:

prender uma fonte de ar comprimido à válvula e au-

mentar a pressão interna da cavidade proximal fechada abrindo-se a válvula; ou prender uma seringa à válvula e aumentar a pressão interna da cavidade proximal fechada inserindo-se o êmbolo.

5 Em uma modalidade preferida da invenção, o método compreende as

etapas de:

diminuir a pressão interna da cavidade proximal fechada abrindo-se a válvula; ou

10 diminuir a pressão interna da cavidade proximal fechada retirando-se o êmbolo.

Em uma modalidade preferida da invenção, o método compreende as etapas de:

15 adicionar um tampão de lise de células ou meio preservador de célula à cavidade distal aberta do dispositivo de amostragem; e

vedar a cavidade distal aberta do dispositivo de amostragem.

20 Sob um terceiro aspecto alternativo da invenção, é apresentado um método de amostragem de células esfoliadas da superfície mucosa localizada dentro da cavidade retal de um indivíduo humano, o qual compreende as etapas de:

inserir um tubo de acesso retal e um obturador na cavidade retal por meio do canal anal;

25 retirar o obturador do tubo de acesso retal;

inserir um dispositivo de amostragem de acordo com a invenção na cavidade retal por meio do tubo de acesso retal, sem que a membrana flexível do dispositivo de amostra-

gem faça contato com qualquer outra superfície do corpo;

ligar o dispositivo de amostragem a um dispositivo para inflação;

5 aumentar a pressão interna da cavidade proximal fechada de modo que a membrana flexível vire do avesso da extremidade distal do dispositivo de amostragem;

pôr a mucosa retal em contato com a área de superfície fixa da mucosa retal;

10 obter uma amostra de células esfoliadas da superfície da mucosa retal;

diminuir a pressão interna da cavidade proximal fechada de modo que a membrana flexível seja invertida e ela e a amostra sejam mantidas dentro da cavidade distal aberta;

15 retirar o dispositivo de amostragem da cavidade retal por meio do tubo de acesso retal, sem que a membrana flexível do dispositivo de amostragem entre em contato com qualquer superfície do corpo;

substituir o obturador por meio do tubo de acesso retal;

20 retirar o tubo de acesso retal e o obturador da cavidade retal por meio do canal anal;

adicionar um tampão de lise de células ou meio preservador de células à cavidade distal aberta; e

25 vedar a cavidade distal aberta do dispositivo de amostragem.

Sob um quarto aspecto alternativo da invenção, é apresentado um método de triagem e diagnose para câncer colorretal que compreende qualquer um dos métodos apresentados

acima e que compreende também recuperar a amostrada coletada do dispositivo de amostragem e realizar uma análise na amostra.

Em uma modalidade preferida da invenção, a análise é selecionada a partir da quantificação do DNA, da extração do DNA seguida por sua quantificação e análise molecular op-  
5 cional, investigação citológica/citoquímica e testes bioquímicos. Deve-se observar que a exatidão da triagem por qualquer um destes métodos será aperfeiçoada pela obtenção de uma amostra com baixos níveis de contaminadores e uma alta  
10 concentração de células tiradas da superfície mucosa colorretal que é amostrada.

#### Breve Descrição das Figuras

A invenção será agora descrita, a título de exemplo apenas, com referência aos desenhos anexos, nos quais:

15 A Figura 1 mostra uma vista em corte transversal de um dispositivo de amostragem de células da invenção.

A Figura 2 mostra uma representação esquemática de um dispositivo de amostragem de células no qual os dispositivos para pressurização compreendem uma seringa.

20 A Figura 3 mostra uma representação esquemática de um dispositivo de amostragem de células da invenção no qual os dispositivos para pressurização compreendem uma fonte de ar comprimido.

A Figura 4 mostra os componentes necessários para  
25 amostrar células esfoliadas da superfície mucosa colorretal de um indivíduo humano.

A Figura 5 mostra um exemplo de um método de amostragem de células esfoliadas da superfície mucosa colorretal

de um indivíduo humano que utiliza qualquer um dos dispositivos mostrados nas figuras 1-4.

A Figura 6 mostra um exemplo das etapas que podem seguir o método mostrado na figura 5.

5            Descrição Detalhada da Invenção

Descrição de modalidades de amostragem de células

O dispositivo de amostragem de células da figura 1 é projetado para inserção em uma cavidade retal. O dispositivo compreende um elemento de inserção substancialmente cilíndrico 1 com uma cavidade interna 3, fechada na extremidade de inserção distal 2 por uma membrana flexível e resiliente 4, que é presa, à maneira de vedação, ao elemento 1 na extremidade distal 2. Na posição mostrada na figura 1, a membrana 4 é mantida dentro da cavidade 3 e é adaptada para ser emitida da cavidade 3 quando a cavidade 3 é pressurizada por dispositivos 7 (mostrados mais detalhadamente na figura 2). A membrana 4 tem uma superfície de amostragem de células 5, que na posição de repouso mostrada na figura 1 é a superfície interna, mas quando a membrana é emitida é a superfície externa, e uma superfície oposta 6, que na posição de repouso é a superfície externa, mas que se torna a superfície interna quando a membrana é emitida. A membrana é feita de nitrilo, látex ou uma substância à base de borracha. Na extremidade proximal 34, a cavidade 3 é fechada por uma válvula de auto-vedação 18, à qual o dispositivo de pressurização 7 é adaptado para ser fixado.

A modalidade da invenção na qual o dispositivo para pressurização da cavidade interna 7 é uma seringa inte-

FIG. 2A  
FIG. 2B  
FIG. 2C  
FIG. 2D

grada é mostrada na figura 2, que mostra também esquematicamente as etapas necessárias para a amostragem de células esfoliadas da superfície mucosa colorretal de um indivíduo humano (Figuras 2A-2D).

5 A Figura 2A mostra uma representação do dispositivo de amostragem de células antes da inserção em uma cavidade retal. A seringa 7 é presa a um elemento de inserção 1 substancialmente conforme descrito na figura 1. A seringa tem um êmbolo 23, que desliza, à maneira de vedação, ao longo de um cilindro 32 da seringa 7 de modo a alterar o volume dentro da câmara interna 33 da seringa 7. O êmbolo 23 da seringa 7 é fixado de modo que 70 ml de ar estejam presentes dentro da câmara 33 da seringa 7.

15 A Figura 2B mostra uma representação do dispositivo de amostragem de células uma vez inserido em uma cavidade retal. O êmbolo 23 da seringa foi completamente apertado, o que faz com que a membrana flexível 4 seja inflada até um volume de 70 ml. A membrana flexível 4 inflada faz então contato com a superfície mucosa colorretal de um indivíduo humano de modo que quaisquer células esfoliadas sejam transferidas para a superfície externa da membrana flexível 4.

25 A Figura 2C mostra uma representação do dispositivo de amostragem de células uma vez amostradas as células esfoliadas e antes da remoção da cavidade retal. O êmbolo 23 da seringa 7 é retraído de modo que 80 ml de ar estejam presentes dentro da câmara da seringa 7. Isto cria, portanto, uma pressão reduzida dentro da câmara, que faz com que a membrana flexível 4 seja reintroduzida na cavidade interna



nada por um motor elétrico (não mostrado) capaz de distribuir doses repetidas de uma primeira pressão elevada seguida por uma segunda pressão reduzida mediante a ativação do gatilho 14. O dispositivo mecânico 9 é capaz de fixação em um elemento de inserção 1 substancialmente conforme descrito nas figuras 1 e 2 por meio de um posicionador de encaixe do tipo de estalido 16 presente no dispositivo mecânico 9, que coopera com um ressalto posicionador 17 no elemento de inserção 1. Uma válvula de auto-vedação 18 está presente no elemento de inserção 1 de modo a assegurar que a pressão seja mantida dentro do elemento de inserção 1 quando do desligamento do dispositivo mecânico 9. O elemento de inserção 1 compreende palhetas 19, que são projetadas para entrar em contato com um proctoscópio e são rosqueadas 20 na extremidade de inserção distal de modo a alojarem uma tampa rosqueada 9, que tem um pacote vesicante 21 que contém um tampão. O dispositivo mecânico 9 é projetado para ser ativado por bateria e pode ser recarregado por um fornecimento de energia através de uma tomada de carga 12. O dispositivo mecânico 9 compreende um filtro de admissão de ar 25, um cabo de borracha 13 e tem também um comutador liga-desliga 15 e diodos emissores de luz 10 e 11, que indicam quando o dispositivo 9 está pronto e quando o ciclo das primeira e segunda aplicações de pressão estão completas.

Quando em uso, o usuário segura o dispositivo mecânico 9 pelo punho 13 do cabo do tipo de pistola de borracha e prende o dispositivo 9 ao elemento de inserção 1. O elemento de inserção é em seguida inserido na cavidade re-

tal, onde entra em contato com um proctoscópio por meio das palhetas 19, o que permite uma consistência de penetração aperfeiçoada. Uma primeira pressão elevada é aplicada pelo usuário ao apertar o gatilho 14, o que faz com que o ar seja  
5 introduzido no dispositivo mecânico 9 através do filtro de admissão de ar 25, que é então comprimido e faz com que a membrana flexível seja emitida da extremidade distal do elemento de inserção 1 de modo a fazer contato com a superfície mucosa colorretal. Uma segunda pressão reduzida é em seguida  
10 aplicada pelo usuário ao apertar o gatilho 14 uma segunda vez, o que faz com que a membrana flexível volte à cavidade interna do elemento de inserção 1. Uma vez completada a amostragem das células, o elemento de inserção 1 é desengatado do proctoscópio e o dispositivo mecânico 9 é destacado do  
15 elemento de inserção 1 e a pressão dentro do elemento de inserção 1 é mantida por meio da válvula de auto-vedação 18. Uma tampa rosqueada 8, que tem um tampão que contém um pacote vesicante 21, pode ser então atarraxada em uma rosca 20 no elemento de inserção 1, fazendo com que o tampão seja li-  
20 berado para dentro do receptáculo formado pela membrana flexível esvaziada. O dispositivo mecânico 9 pode ser então reutilizado ao ser preso a elementos de inserção 1 subsequentes.

Componentes necessários para a técnica de amostragem de células por toque-impressão.  
25

Os componentes necessários para a amostragem de células esfoliadas a partir de uma superfície mucosa colorretal de um indivíduo humano são apresentados na figura 4.

i) O acesso à mucosa retal pode ser obtido pela utilização de um

tubo de acesso retal 29, que pode ser uma modificação de um instrumento existente para exame retal (o retoscópio 22, por exemplo). O tubo de acesso retal 29 consiste em um tubo rígido (com um cabo) equipado com um obturador 30, que apresenta uma superfície em forma de oliva e ininterrupta que facilita a introdução do tubo de acesso retal 29 no reto através do canal anal.

10 ii) O dispositivo de amostragem de células 1 mostrado na figura 4

é substancialmente conforme descrito na figura 1 e tem um diâmetro externo compatível com o diâmetro interno do tubo de acesso retal, isto é, na faixa de 15-20 mm.

15 iii) Uma fonte de ar comprimido 7 serve para proporcionar um meio para a pressurização da cavidade interna. Os dispositivos para pressurização 7 podem compreender uma seringa (conforme descrita na figura 2), uma bomba de ar (conforme descrita na figura 3) ou um mini-recipiente de ar comprimido (mini-cilindro). A pressão do ar no interior do  
20 dispositivo de amostragem de células pode ser limitada/controlada ou utilizando-se um volume de ar fixo (solução de seringa simples) ou atingindo-se um nível de pressão do ar fixo (uma válvula de precisão seria necessária para esta  
25 finalidade).

iv) Uma garrafa ou tubo com um tampão 35 específico (tampões diferentes devem ser utilizados para finalidades diferentes, tal como extração de DNA ou RNA ou isolamen-

to/separação de células para análise adicional).

v) Uma tampa hermética 8 para o dispositivo de amostragem de células (necessária para as reações de lise de células/proteínas se uma extração imediata de DNA ou RNA for feita, para procedimentos de isolamento de células e, especialmente, para armazenamento/transporte do material se não for utilizado imediatamente, como, por exemplo, transporte do consultório médico/clínica até o laboratório).

Os componentes necessários para o procedimento podem ser desenvolvidos de modo a serem utilizados como um estojo descartável, que deve incluir todos os componentes enumerados com a exceção da fonte de ar comprimido, que pode ser utilizada repetidamente.

Descrição da técnica de amostragem de células por toque-impressão (manipulações retais)

A Figura 5 mostra um exemplo da técnica de amostragem de células por toque-impressão para amostrar células esfoliadas da superfície mucosa colorretal de um indivíduo humano utilizando-se qualquer um dos dispositivos mostrados nas figuras 1-4. Este procedimento é simples e nenhum treinamento especial em proctologia ou endoscopia é necessário para que o operador o execute. Ele pode ser executado por um profissional médico qualificado (GP, enfermeira, etc.) em um consultório médico local ou na residência do paciente ou pode ser até auto-administrado pelo paciente.

A Figura 5A mostra esquematicamente um corte transversal da anatomia do reto humano 28, do canal anal 26 e da camada mucocelular colorretal 27. Deve-se observar que

qualquer contato do dispositivo de amostragem de células com o epitélio escamoso do canal retal pode resultar tanto em perda de material quanto na contaminação da amostra com o epitélio escamoso do canal anal.

5 O procedimento começa com a introdução de um tubo de acesso retal 29, semelhante a um retoscópio, com um obturador 30 no lugar no reto 28 (figura 5B). Um lubrificante apropriado pode ser utilizado no procedimento de introdução para facilitá-lo e diminuir o desconforto do paciente, que  
10 pode ser causado por este estágio inicial do procedimento.

Uma vez introduzido o tubo de acesso retal 29 (figura 5C) e removido o obturador 30, o acesso direto à mucosa retal é obtido e a camada mucocelular 27 se abre.

O elemento de inserção 1 é introduzido no tubo de  
15 acesso retal 29 de modo que a borda superior do elemento de inserção seja localizada imediatamente acima da borda do tubo de acesso retal (figura 5D).

É aplicada uma primeira pressão elevada, que infla a membrana flexível coletora de modo a se pôr a membrana em  
20 contato com a camada mucocelular retal 27, de modo a se obter a amostragem de células por toque-impressão (figura 5E). O dispositivo é deixado nesta posição durante aproximadamente 10-15 segundos de modo a se obter uma melhor aderência de células esfoliadas e materiais obtidos de células da camada  
25 mucocelular à membrana coletora.

A Figura 5F mostra a aplicação de uma segunda pressão reduzida, que esvazia a membrana flexível e faz com que ela volte à sua posição inicial com o material coletado



48

31 sobre a superfície externa de amostragem de células.

O elemento de inserção 1 é removido do tubo de acesso retal 29 e tomado para outras manipulações e análises. O obturador 30 (pode ser utilizado um novo, re-lubrificado) é reinstalado no tubo de acesso retal 29, e o tubo 29 é removido do reto 28 (ver a figura 5G). O procedimento completo (manipulações retais) não deve levar mais que dois minutos.

#### Processamento das células coletadas

A Figura 6 mostra um exemplo das etapas que podem seguir o método mostrado acima para as figuras 5A-5G, que devem ser completadas imediatamente após a coleta das células de modo a se evitar a secagem da membrana de coleta de células. A etapa (a) mostra o dispositivo de amostragem de células 1 com as células esfoliadas 31 sobre a membrana flexível coletora de células após a coleta de células. O compartimento de topo do dispositivo de amostragem de células é enchido com um volume fixo de um tampão 35 específico, que lisa ou suspende as células esfoliadas (Etapa (b)). Tampões de lise de células ou meios preservadores de células diferentes podem ser utilizados em procedimentos de extração de DNA ou RNA, tampões/meios especiais devem ser utilizados em aplicações que exigem o isolamento das células. O dispositivo de amostragem de células é preparado para transporte ou armazenamento de amostras por ser hermeticamente fechado com uma tampa rosqueada 8 segura (etapa (c)), mas deve ficar entendido que, quando a tampa rosqueada tem um tampão que contém um pacote vesicante, então a etapa (b) pode ser omitida. O dispositivo pode ser armazenado ou transportado para ou-

tros procedimentos a jusante para fins de triagem/diagnóstico e/ou pesquisa (etapa (d)).

#### Análise de amostras

Deve-se enfatizar que a técnica apresenta um grau muito mais elevado de padronização em comparação com outras abordagens existentes. O uso de um dispositivo padrão com pressão/volume de ar padrão, área padrão da membrana de coleta inflada (a área de contato com a camada mucocelular retal pode variar, mas esta variação é negligenciável comparada com outras maneiras obter células esfoliadas, como, por exemplo, técnicas baseadas em evacuações) e quantidade padrão de tampão adicionado após o procedimento de amostragem de células criam condições muito favoráveis para análise comparativa ou dos números de células ou das quantidades de substâncias obtidas das células (DNA, por exemplo).

#### *(a) Análise de amostras para fins de triagem de câncer colorretal*

A triagem do câncer colorretal implica uma ampla avaliação, baseada na população (definida pela idade), de indivíduos que não apresentam queixas para revelar casos assintomáticos (precoces na maioria dos casos) da doença, cujo tratamento oportuno pode reduzir a mortalidade causada pela condição. Um pré-requisito necessário para o método é sua aplicabilidade simultânea em milhares/milhões de pessoas.

i) Dado que há fortes indicações de quantidades consideravelmente mais elevadas de colonócitos e DNA derivado de colonócitos na camada mucocelular retal de pacientes com câncer colorretal em comparação com indivíduos isentos

de tumores, é muito provável que a técnica de amostragem direta de colonócitos esfoliados e materiais derivados de colonócitos pode proporcionar um teste de triagem simples para câncer colorretal com base na quantificação direta da quantidade de DNA extraído das células. Para esta abordagem, o tampão inicial utilizado imediatamente após a amostragem das células deve ser um tampão de lise de células utilizado no procedimento de extração de DNA selecionado. A adição do tampão deve proporcionar uma lise de células eficaz e a preservação do material que contém DNA durante a transporta-  
10 até um laboratório exclusivo e (provavelmente) algum período de armazenamento. O método de extração de DNA deve ser selecionado com base em sua aplicabilidade para análise de alto rendimento operacional, isto é, deve ser compatível com sistemas robóticos de manejo de líquido de vários canais. Os  
15 valores exatos das quantidades de DNA que definem os resultados "positivos", "negativos" e "duvidosos" do teste devem ser determinados em tentativas clínicas.

ii) As etapas iniciais semelhantes da extração de DNA podem ser aplicadas à análise de marcadores moleculares de câncer colorretal. As células amostradas pelo procedimento de toque-impressão devem apresentar um DNA de muito melhor qualidade em comparação com as técnicas atualmente empregadas de extração de DNA de amostras de evacuação. A  
25 amplificação PCR deste DNA pode ser feita sem quantificação precisa de sua quantidade. A análise molecular com vários objetivos é considerada como uma opção na triagem do câncer colorretal, mas ela pode ser mais demorada e dispendiosa

comparada com a análise quantitativa direta. Ao mesmo tempo, o DNA extraído para quantificação direta pode ser certamente utilizado para amplificação PCR na análise diagnóstica adicional de casos quantitativamente "positivos" ou "duvidosos".

5           iii) Em caso de necessidade de isolamento específico de colonócitos de células de outros tipos, podem ser aplicados métodos de separação (como, por exemplo, separação imunomagnética ou com gradiente de densidade) de modo a se  
10 obter maior pureza da população de células de colonócitos para a análise. Para isto, podem ser aplicados alguns meios preservadores de células que contêm antibióticos (alguma presença de bactérias no material coletado é impossível de evitar) e agentes mucolíticos. Os colonócitos isolados podem  
15 ser então utilizados em diferentes tipos de análise, tais como extração e quantificação de DNA, extração de DNA seguida de amplificação PCR, análise de marcadores moleculares e bioquímicos de câncer, avaliação citológica/citoquímica e contagem direta de células (duvidosa em termos de triagem  
20 devido à baixa velocidade e alto custo).

*(b) Diagnose de câncer colorretal*

O uso diagnóstico de testes é focalizado em indivíduos que apresentam algumas queixas específicas e já identificados como sofrendo de uma condição. Os grupos-alvo de  
25 pacientes são muito menores que os esperados para fins de triagem.

(i) A quantificação direta de DNA pode ser aplicada em indivíduos que apresentam queixas que indicam possí-



REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo de amostragem de células colorretais, compreendendo:

um elemento de inserção colorretal (1), que tem  
5 uma extremidade de inserção distal (2), uma extremidade proximal (3) e uma cavidade interna que pode ser fechada (3);

uma membrana flexível (4), que tem uma superfície externa de amostragem de células (5) e uma superfície interna, em que a membrana é presa, à maneira de vedação, à extremidade de inserção distal do elemento de inserção e quando mantida dentro da cavidade interna forma um receptáculo tendo uma superfície de amostragem de células no interior do mesmo, o receptáculo sendo aberto para a extremidade de inserção do elemento de inserção;

15 de modo que, quando em uso, a pressurização da cavidade interna até pelo menos uma primeira pressão elevada faz com que a membrana seja emitida da extremidade distal do elemento de inserção de modo a fazer contato com a superfície mucosa colorretal e a pressurização da cavidade interna  
20 através da válvula de auto-vedação até uma segunda pressão reduzida faz com que a membrana seja invertida e volte à cavidade interna do elemento de inserção;

**CARACTERIZADO** por o dispositivo compreender ainda dispositivos (8) para vedar a extremidade de inserção para  
25 formar uma cavidade fechada posicionada dentro da cavidade interna do elemento de inserção e definida pela superfície de amostragem de células da membrana flexível e os meios de vedação.

2. Dispositivo, conforme definido na reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a membrana flexível é elástica e é construída a partir do nitrilo, do látex ou de uma substância à base de borracha.

5 3. Dispositivo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** por compreender também dispositivos (7) para a pressurização da cavidade interna, em que os dispositivos são presos à válvula de auto-vedação presente na extremidade proximal do elemento de in-  
10 serção.

4. Dispositivo, conforme definido na reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os ditos dispositivos para pressurização da cavidade interna compreendem uma fonte de ar comprimido.

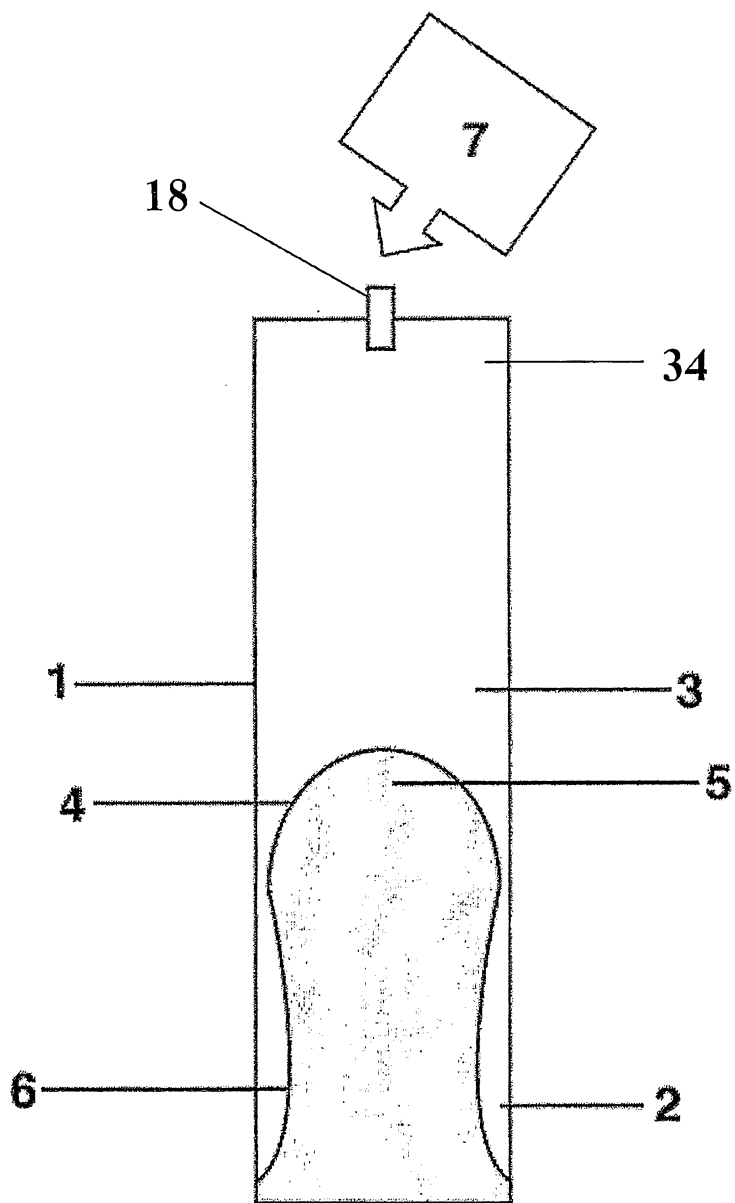
15 5. Dispositivo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o elemento de inserção é adaptado para entrar em contato com um tubo de acesso retal.

20 6. Dispositivo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o fluido pode ser introduzido na cavidade fechada formada pela membrana flexível e os dispositivos de vedação.

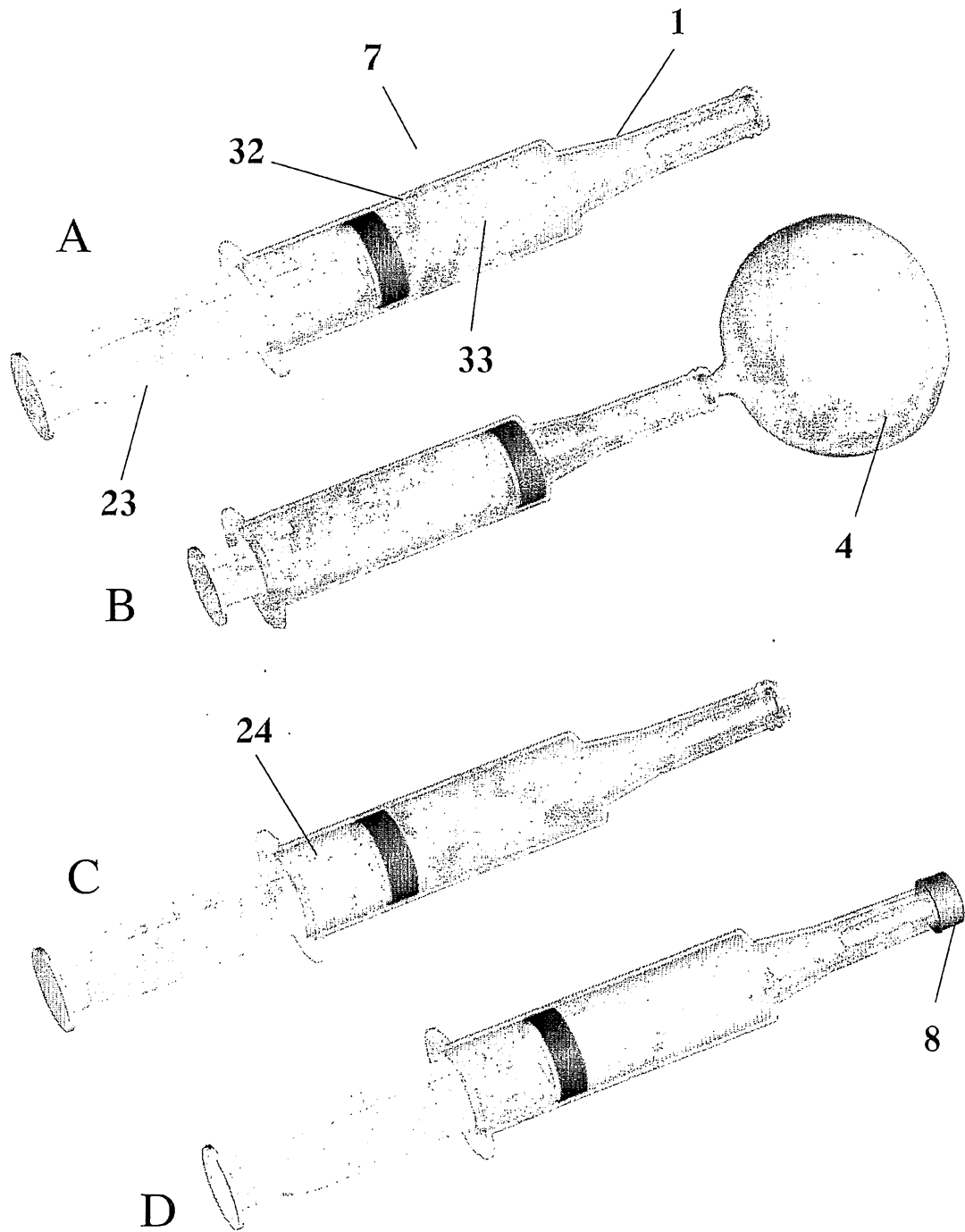
25 7. Dispositivo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a cavidade interna do elemento de inserção é fornecida com dispositivos de aderência.

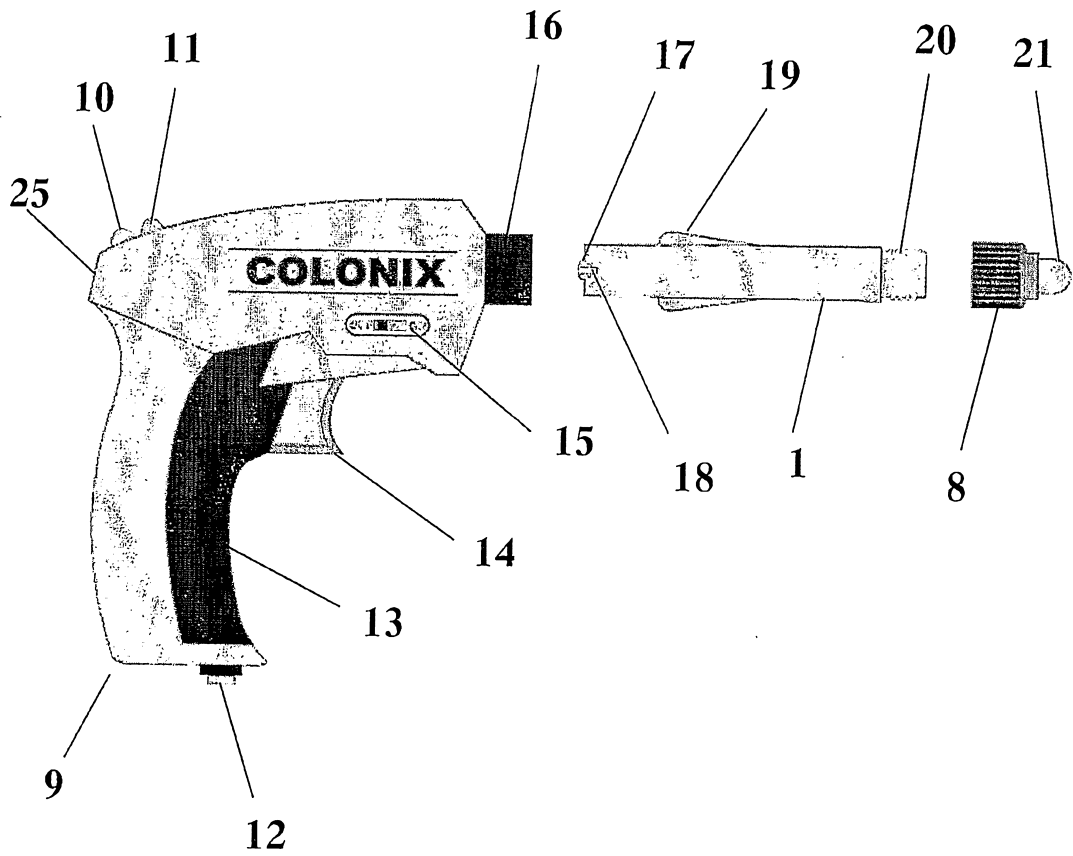
8. Dispositivo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os dispositivos de vedação são tampas rosqueadas.

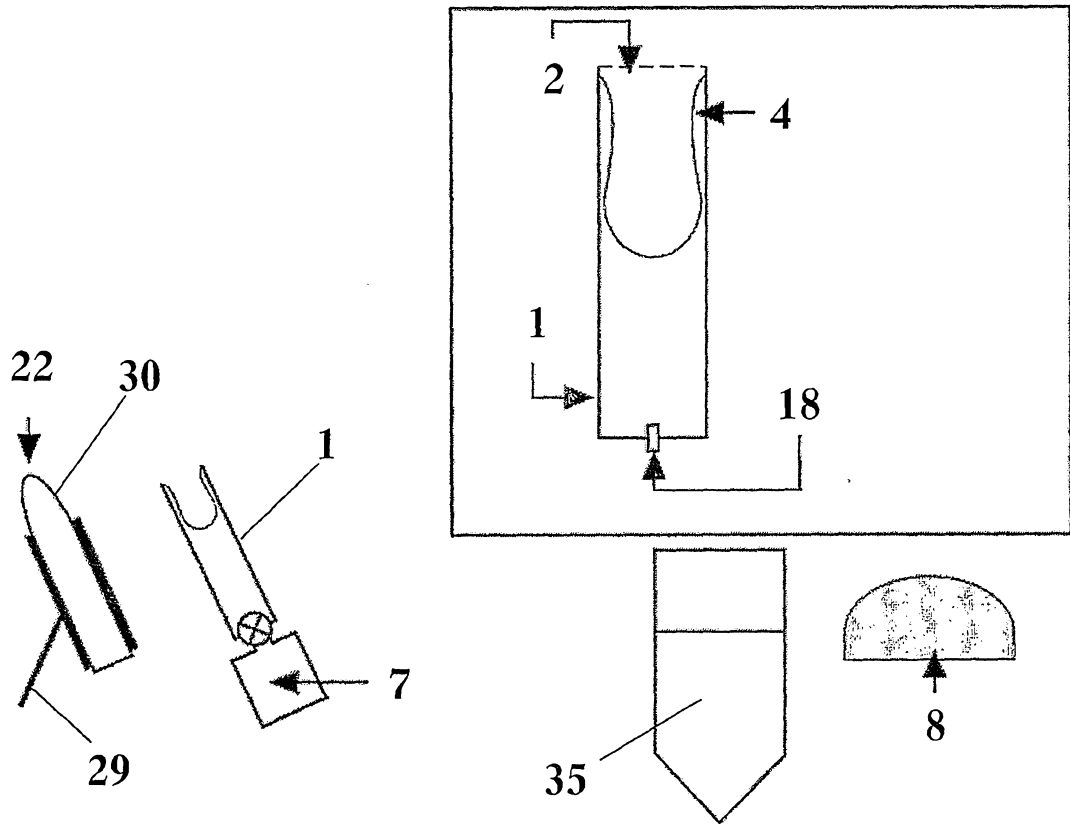
9. Dispositivo, conforme definido em qualquer reivindicação de 3 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os dispositivos para a pressurização da cavidade interna são destacáveis do elemento de inserção.

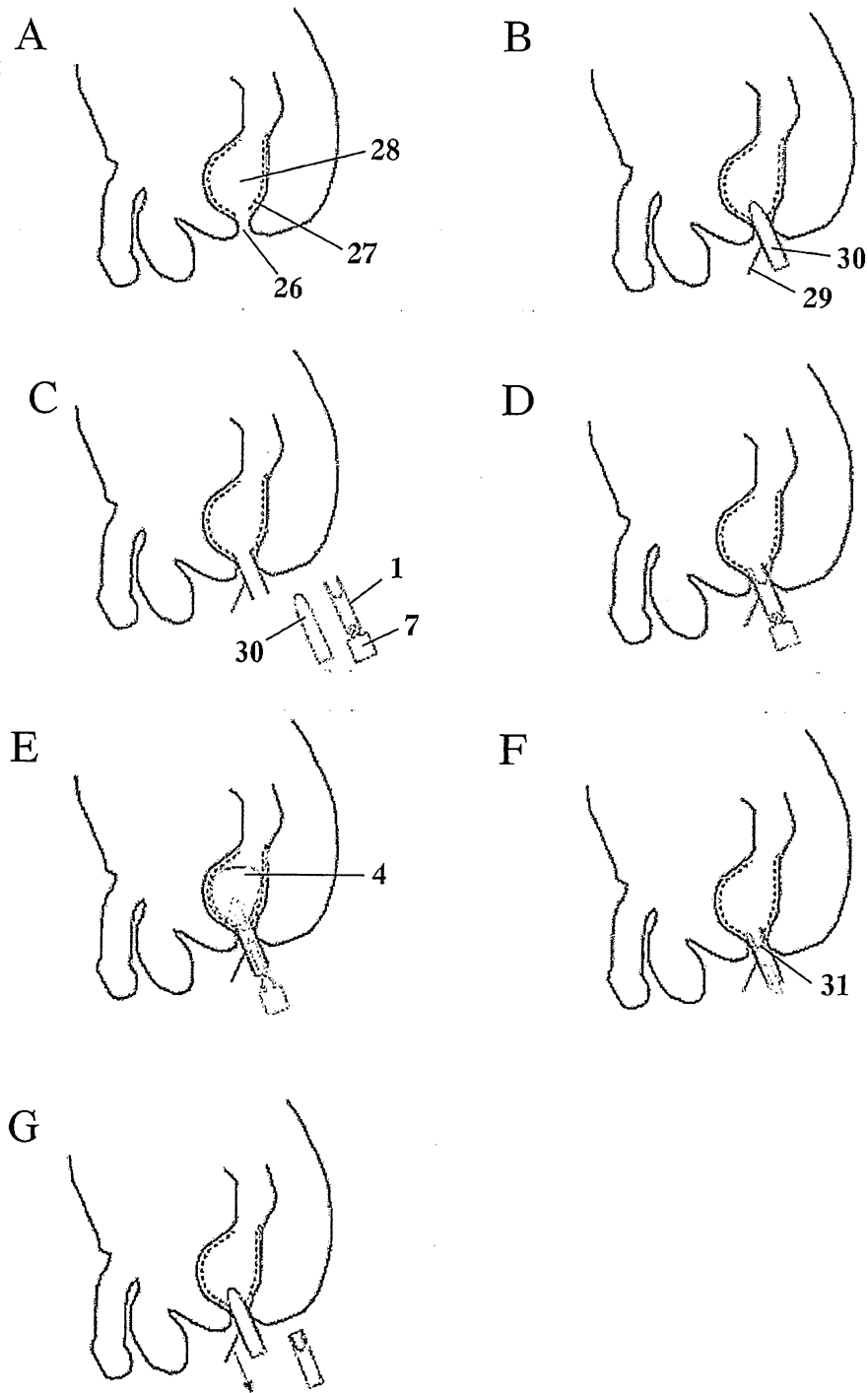


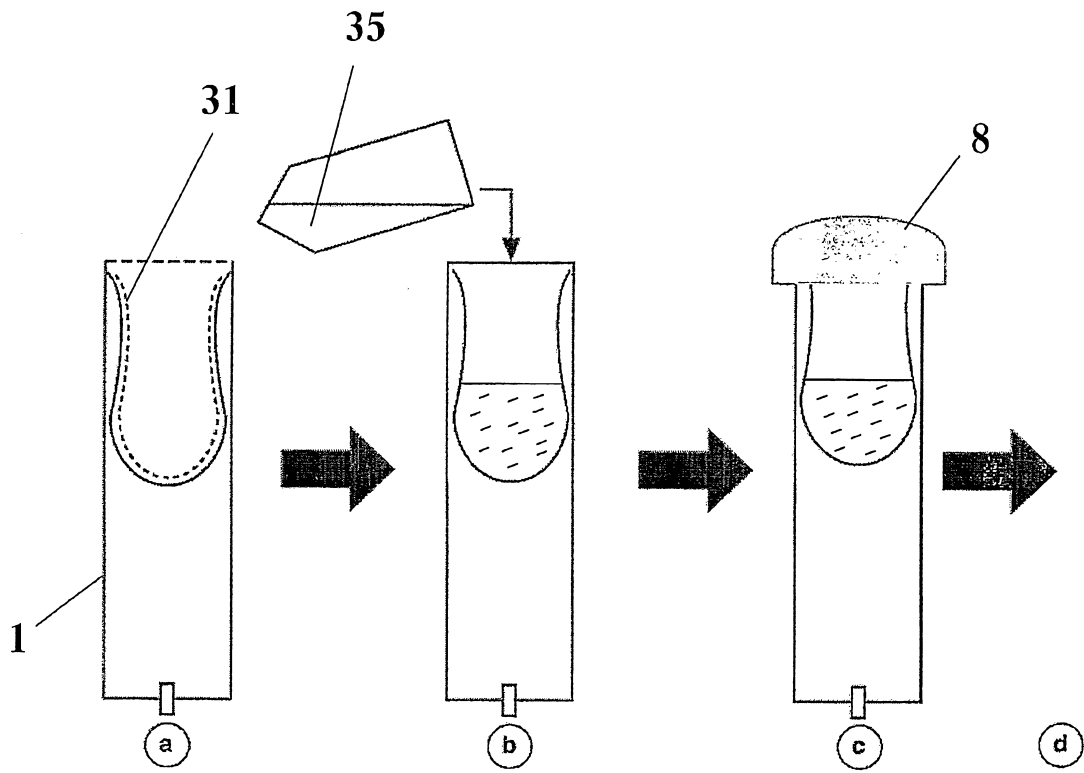
**FIGURA 1**

**FIGURA 2**

**FIGURA 3**

**FIGURA 4**

**FIGURA 5**

**FIGURA 6**