

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

(21) **PI 0713380-4 A2**

(22) Data de Depósito: 14/05/2007
(43) Data da Publicação: 20/03/2012
(RPI 2150)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/53
G01N 33/50
G01N 33/58
G01N 33/574
C12Q 1/68
G01N 33/487
G06T 7/00
G01N 15/14

(54) **Título:** MÉTODOS PARA DETERMINAR IN VITRO A QUANTIDADE DE ÁCIDOS NUCLEICOS NUCLEARES EM PELO MENOS UMA CÉLULA, E PARA DIAGNOSTICAR E/OU PROGNOSTICAR CÂNCER EM UM INDIVÍDUO HUMANO OU ANIMAL

(30) **Prioridade Unionista:** 29/06/2006 EP 06116336.6, 04/08/2006 EP 06118438.8, 04/08/2006 EP 06118438.8, 29/06/2006 EP 06116336.6

(73) **Titular(es):** Koninklijke Philips Electronics N. V.

(72) **Inventor(es):** Bernardus Hendrikus Wilhelmus Hendriks, Erik Robert Vossenaar, Gerhard Spekowitz, Nijs Cornelis Van Der Vaart, Stein Kuiper

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT IB2007051810 de 14/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/001235de 03/01/2008

(57) **Resumo:** MÉTODOS PARA DETERMINAR IN VITRO A QUANTIDADE DE ÁCIDOS NUCLEICOS NUCLEARES EM PELO MENOS UMA CÉLULA, E PARA DIAGNOSTICAR E/OU PROGNOSTICAR CÂNCER EM UM INDIVÍDUO HUMANO OU ANIMAL. A invenção refere-se a um método para determinar in vitro a quantidade de DNA nuclear dentro de uma célula humana ou animal, empregando-se medição de absorção UV com luz UV. A invenção também refere-se a um método para detectar in vitro células cancerosas em uma amostra biológica com base nos princípios acima mencionados. A invenção também se refere a um método in vitro de diagnosticar ou prognosticar a ocorrência provável de câncer em um indivíduo humano ou animal.

“MÉTODOS PARA DETERMINAR IN VITRO A QUANTIDADE DE ÁCIDOS NUCLEICOS NUCLEARES EM PELO MENOS UMA CÉLULA, E PARA DIAGNOSTICAR E/OU PROGNOSTICAR CÂNCER EM UM INDIVÍDUO HUMANO OU ANIMAL”

5 OBJETO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a um método para determinar in vitro a quantidade de ácidos nucleicos nucleares dentro do núcleo de uma célula humana ou animal, medindo-se a absorbância de UV dos ácidos nucleicos nucleares.

10 A invenção também se refere a um método de detectar in vitro células cancerosas em uma amostra biológica, que se baseia na absorbância de UV dos ácidos nucleicos nucleares.

A invenção refere-se ainda a um método in vitro de diagnosticar e/ou prognosticar câncer em um indivíduo humano ou animal,
15 com o método sendo baseado em absorbância de UV dos ácidos nucleicos nucleares.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A detecção precoce do câncer é um aspecto chave no tratamento de pacientes com câncer. Há várias possibilidades de detectar
20 células cancerosas em uma amostra biológica e, assim, diagnosticar um câncer existente ou pelo menos estimar a probabilidade de futuro desenvolvimento de câncer. Estas diferentes abordagens compreendem exame físico do tecido canceroso, caracterização morfológica de células cancerosas, coloração imuno-histoquímica e caracterização das estruturas celulares, tais
25 como membranas e o núcleo, medição da expressão dos fatores específicos de tumor etc.

Uma possibilidade de detectar células cancerosas é a chamada citometria de DNA, que mede a quantidade de DNA nuclear, a fim de detectar desvios do teor normal de DNA. Presume-se que, se uma célula, como

consequência de eventos mutagênicos, compreender menos ou mais DNA do que um padrão conhecido, que é sabido ser de um tipo não-canceroso, isto é, “saudável” ou “normal”, este desvio do teor do DNA pode ser indicativo de maiores rearranjos cromossomais e, assim, desenvolvimento de câncer em andamento.

A quantificação do DNA nuclear por colorações específicas de ácidos nucleicos está assim crescentemente sendo praticada em aplicações tanto de pesquisa como clínicas, no contexto do diagnóstico do câncer.

A medição do teor de DNA nuclear por citometria de fluxo ou de imagem é baseada, entre outros, nas pressuposições de que (i) a quantidade de coloração ligada ao DNA é proporcional à quantidade do DNA presente e de que (ii) o sinal óptico gerado pela coloração, por emissão, absorção ou transmissão, é proporcional à quantidade de coloração.

Um procedimento de tingimento específico de DNA, que é tipicamente usado para fins de medir o DNA nuclear por citometria de imagem de DNA, é uma reação baseada em ácido que foi nomeada em honra a Feulgen e Rossenbeck, com frequência simplesmente referida como reação Feulgen. Atualmente a reação Feulgen é uma reação cromogênica em que o DNA é hidrolisado por um ácido para criar um DNA livre de purina (isto é, chamado ácido apurínico, APA) com grupos aldeído livres. Estes são então reagidos com um reagente de Schiff, contendo um corante que se liga covalentemente aos grupos aldeído livres.

Embora a reação Feulgen seja específica para DNA, ela ressoante-se de várias desvantagens. É uma reação demorada e um tanto elaborada, que necessita ser cuidadosamente controlada e validada, a fim de produzir resultados reprodutíveis e significativos. Um problema surge pelo fato de que o HCl, que é comumente usado para a remoção das bases de purina, hidrolisar o APA em menores fragmentos. Entretanto, a fragmentação das moléculas de APA resulta em remoção destes fragmentos do núcleo

celular e, assim, em perda de material de DNA colorível.

Portanto, foram feitas tentativas na técnica de basear-se em uma combinação de caracterização morfológica, colorações imuno-histoquímicas e colorações de DNA para confiavelmente detectar as células cancerosas e diagnosticar o câncer.

A US 2004/0197839 A1 descreve o uso concomitante de dois diferentes tipos de colorações para identificar células cancerosas, em que uma coloração, p. ex., detecta características morfológicas, enquanto que uma segunda (imunológica) coloração, p. ex., mede a expressão de um marcador específico de tumor.

Entretanto, há uma necessidade contínua de métodos que permitam um meio confiável, rápido e eficiente de medir a quantidade de DNA nuclear e detecção de células cancerosas e cânceres.

OBJETIVO E SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É um objetivo da presente invenção prover um método para determinar a quantidade de ácidos nucleicos no núcleo de uma célula. Estes ácidos nucleicos podem ser de filamento duplo, tal como DNA.

É também um objetivo da presente invenção prover um método de detectar a presença de células cancerosas em uma amostra biológica a ser testada.

É um outro objetivo da presente invenção prover um método que permita diagnosticar a presença de câncer e/ou o provável desenvolvimento de câncer em um indivíduo humano ou animal.

A fim de se atingir os objetivos acima definidos, são providos métodos como definidos nas reivindicações independentes.

De acordo com uma forma de realização da invenção, é provido um método para determinar in vitro a quantidade de ácidos nucleicos nucleares, tais como DNA nuclear, em pelo menos uma célula presente em pelo menos uma amostra biológica, dito método compreendendo as etapas de:

a) determinar in vitro a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita célula,

b) determinar in vitro a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo, como determinado em a).

5 Em uma forma de realização exemplar, a posição e/ou dimensões do núcleo podem ser (aproximadamente) determinadas em dita pelo menos uma célula pela utilização de luz UV e/ou microscopia de contraste de fase. Se luz UV for usada na etapa), utilizar-se-á preferivelmente luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente
10 240 nm e aproximadamente 280 nm. Particularmente preferidos são comprimentos de onda tais como aproximadamente 250 nm, 255 nm ou 260 nm.

 Em outra forma de realização exemplar, utiliza-se luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente
15 280 nm para medir a absorbância de UV na etapa b). Particularmente preferidos são comprimentos de onda tais como aproximadamente 250 nm, 255 nm ou 260 nm.

 Em ainda outra forma de realização, pode-se contatar dita pelo menos uma célula com pelo menos um marcador fluorescente, que é capaz de
20 interagir com ácidos nucleicos de filamento duplo dentro de dita pelo menos uma célula, e então determinar a intensidade do sinal nuclear de dito pelo menos um marcador fluorescente sendo ligado aos ácidos nucleicos de filamento duplo nucleares por absorbância de UV na etapa b). Para este fim pode-se utilizar, p.ex., luz UV com um comprimento de onda entre
25 aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm.

 Entretanto, em outras formas de realização da presente invenção, não é necessário visualizar os ácidos nucleicos nucleares, tais como DNA, de dita célula por, p. ex., colorações imuno-histoquímicas, reações químicas tais como a reação Feulgen ou marcadores fluorescentes.

Assim, os métodos da presente invenção compreendem várias formas de realização que realizam a concepção básica de determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de uma célula e determinar a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo. Para determinar a posição e/ou dimensões do núcleo, que é equivalente a determinar os limites do núcleo, pode-se empregar microscopia de contraste de fase com luz visível, bem como abordagens de detecção com luz UV. Para determinar a absorbância de UV do núcleo, pode-se basear somente em medições UV, sem adicionar marcadores ultravioletas que sejam capazes de interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento ou pode-se usar tais marcadores.

Assim, pode-se em princípio localizar o núcleo da célula com microscopia de contraste de fase e determinar a absorbância de UV do núcleo sem utilizarem-se os marcadores acima descritos, pode-se localizar o núcleo da célula com microscopia de contraste de fase e determinar a absorbância de UV do núcleo usando-se os marcadores acima descritos, pode-se usar medições de absorbância de UV para localizar o núcleo e medir a absorbância de UV nuclear sem os marcadores acima descritos e pode-se usar medições de absorbância de UV para localizar o núcleo e medir a absorbância nuclear com os marcadores acima descritos etc.

A invenção em duas de suas formas de realização exemplares está envolvida com a localização do núcleo celular com microscopia de contraste de fase e determinação da absorbância de UV do núcleo, empregando-se os marcadores acima descritos, ou com a utilização de medições de absorbância de UV para localizar o núcleo e medir a absorbância de UV nuclear sem os marcadores acima descritos. Estas duas formas de realização serão descritas mais detalhadamente a seguir. Entretanto, a pessoa hábil está obviamente cônica de que, se certos aspectos tais como comprimentos de onda preferidos, natureza dos marcadores, dispositivos de detecção a serem usados etc. forem discutidos no contexto destas duas formas

de realização, estas explicações igualmente aplicam-se às duas outras formas de realização da invenção, como mencionado acima, a menos que seja explicitamente indicado de outro modo. A definição de termos tais como “célula”, “célula cancerosa”, “amostra”, “aneuploidia” etc., naturalmente, tem o mesmo significado para todas as várias formas de realização da invenção, a menos que de outro modo indicado. Os vários métodos como considerados pela presente invenção podem também ser usados para as mesmas finalidades.

Em uma forma de realização exemplar da presente invenção, os métodos supracitados para determinar a quantidade de ácidos nucleicos nucleares, tais como DNA, dentro de uma célula podem ser usados para detectar in vitro pelo menos uma célula cancerosa dentro de pelo menos uma amostra biológica.

Em uma outra forma de realização dos métodos acima mencionados, a absorbância de UV nuclear, que pode também ser designada como intensidade de sinal nuclear, pode ser usada para calcular o estado de (aneu)ploidia da célula.

Isto pode ser feito por referência da absorbância de UV nuclear obtida a uma absorbância de UV nuclear obtida sob condições substancialmente comparáveis ou idênticas de uma célula que se sabe ser de um tipo não-canceroso e cujo teor de DNA nuclear é conhecido.

Em ainda outra forma de realização da presente invenção, um estado de aneuploidia desviando-se pelo menos 10% de 2 ou 4 será considerado ser indicativo de uma célula cancerosa.

Em uma forma de realização da presente invenção, são usados métodos de determinar a quantidade de ácidos nucleicos nucleares, tais como DNA, dentro de uma célula como descrito acima, para detectar pelo menos uma célula cancerosa em pelo menos uma amostra biológica que é associada com um câncer selecionado do grupo compreendendo de leucemia, linfoma, câncer do cérebro, câncer cerebrospinhal, câncer da bexiga, câncer de

próstata, câncer de mama, câncer cervical, câncer de útero, câncer ovariano, câncer dos rins, câncer oral e da garganta, câncer esofágico, câncer dos pulmões, câncer retal do cólon, câncer pancreático e melanoma.

Em ainda outra forma de realização da presente invenção, são
5 realizados métodos de determinar a quantidade de ácidos nucleicos nucleares, tais como DNA, dentro de uma célula, como descrito acima, em pelo menos uma célula de uma amostra biológica em que a amostra biológica é selecionada do grupo compreendendo células da medula óssea, células de
10 nodos linfáticos, amostras mucosas, amostras de sangue periférico, amostras de fluido cerebrospinal, amostras de urina, amostras de efusão, aspirados de agulhas finas, raspados de sangue periférico, raspados de pele, tecidos embutidos em parafina e seções congeladas.

Em ainda outra forma de realização da presente invenção, um método de detectar uma célula cancerosa em uma amostra biológica tendo as
15 características acima descritas utiliza um microscópio sendo capaz de detectar, medir e calcular os sinais de absorção de UV e, op, sinais de contraste de fase. Em uma forma de realização preferida, utilizar-se-á um microscópio de varredura com laser confocal.

Em todos os métodos acima mencionados, pode-se contar com
20 uma luz (UV) com um predeterminado único comprimento de onda, para detectar o núcleo e medir a absorbância de UV nuclear.

Em outra forma de realização da presente invenção, é provido um método in vitro de diagnosticar e/ou prognosticar câncer em um indivíduo humano ou animal, que compreende as etapas de:

- 25
- a) prover uma amostra biológica do indivíduo;
 - b) determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de pelo menos uma célula de dita amostra in vitro,
 - c) medir in vitro a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo, como determinado em a),

d) calcular pela intensidade do sinal nuclear obtido na etapa d) o estado de ploidia de dita pelo menos uma célula e

e) decidir sobre a presença e/ou provável ocorrência futura de um câncer, dependendo do estado de ploidia.

5 Os métodos de diagnosticar de acordo com a presente invenção também compreendem várias formas de realização que realizam a concepção básica de determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de uma célula e determinar a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo. Para determinar a posição e/ou dimensões do núcleo, que é equivalente a
10 determinar os limites do núcleo, pode-se novamente utilizar a microscopia de contraste de fase com luz visível, bem como abordagens de detecção com luz UV. Para determinar a absorbância de UV do núcleo, pode-se contar somente com medições UV, sem adicionar marcadores fluorescentes que sejam capazes de interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento ou pode-se usar
15 tais marcadores.

Embora os métodos de diagnóstico sejam novamente descritos principalmente com respeito a duas formas de realização exemplares, isto é, localização do núcleo de célula com microscopia de contraste de fase e determinação da absorbância de UV do núcleo usando-se os marcadores
20 acima descritos, ou utilizando-se medições de absorbância de UV para localizar o núcleo e medir a absorbância de UV nuclear sem os marcadores acima descritos, a pessoa hábil entenderá que, se certos aspectos, tais como comprimentos de onda preferidos, natureza dos marcadores, dispositivos de detecção a serem usados etc., forem discutidos no contexto destas duas
25 formas de realização, estas explicações igualmente aplicam-se também a outras formas de realização da invenção, como mencionado acima, a menos que seja explicitamente indicado de outro modo. A definição dos termos tais como “célula”, “célula cancerosa”, “amostra”, “aneuploidia” etc., naturalmente, tem o mesmo significado por todas estas várias formas de

realização da invenção, a menos que indicado de outro modo.

Naturalmente, os aspectos descritos acima, tais como utilização de certos comprimentos de onda ou certos tipos de microscópio etc., igualmente aplicam-se no contexto do diagnóstico.

5 Assim, em uma forma de realização exemplificativa, a posição e/ou dimensões do núcleo pode(m) ser (aproximadamente) determinadas em dita pelo menos uma célula pela utilização da luz UV e/ou microscopia de contraste de fase. Se a luz UV for usada na etapa b), preferivelmente utilizar-se-á luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente 240 nm e
10 aproximadamente 280 nm. Particularmente preferidas são os comprimentos de onda tais como aproximadamente 250 nm, 255 nm ou 260 nm.

Em ainda outra forma de realização da presente invenção, na etapa b) a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita pelo menos uma célula é/são determinada(s) unicamente por microscopia de contraste de fase.

15 Em outra forma de realização exemplar, utiliza-se a luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente 250 nm e aproximadamente 280 nm, para medir absorbância de UV na etapa c). Particularmente preferidos são os comprimentos de onda tais como aproximadamente 250 nm ou 260 nm.

20 Em ainda outra forma de realização, pode-se contatar dita pelo menos uma célula com pelo menos um marcador fluorescente, que seja capaz de interagir com os ácidos nucleicos de duplo filamento dentro de dita pelo menos uma célula e então determinar a intensidade do sinal nuclear de dito pelo menos um marcador fluorescente sendo ligado aos ácidos nucleicos de
25 duplo filamento na etapa c). Para este fim, pode-se usar luz UV com um comprimento de onda entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm.

Em outra forma de realização exemplar do método de diagnóstico, não é necessário visualizar os ácidos nucleicos nucleares, tais

como DNA de dita célula, p. ex., por colorações imuno-histoquímicas, reações químicas, tais como a reação Feulgen ou marcadores fluorescentes.

Se for para serem usados marcadores fluorescentes, a mesma espécie de marcadores, como descrito acima e a seguir, pode ser contatada com a(s) célula(s).

Ainda outra forma de realização deste aspecto da invenção refere-se a um método in vitro de diagnosticar e/ou prognosticar câncer em um indivíduo humano ou animal com o método compreendendo as características acima mencionadas, em que um estado de ploidia desviando-se em pelo menos 10% de $2n$ ou $4n$, com n sendo o número de cromossomas, é indicativo de uma célula cancerosa e, assim, da presença ou provável desenvolvimento de (futuro) câncer.

Naturalmente, para estes aspectos da invenção que estão envolvidos com métodos de diagnóstico, as amostras biológicas podem ser selecionadas das mesmas amostras descritas acima.

Portanto, os cânceres que são diagnosticados e/ou prognosticados pelos métodos de diagnóstico descritos podem ser selecionados do mesmo grupo de cânceres, como descrito acima.

Em ainda outra forma de realização da presente invenção, o método para diagnosticar e/ou prognosticar câncer em um indivíduo humano ou animal utiliza um microscópio que é capaz de detectar sinais de absorção UV, sinais fluorescentes e que pode opcionalmente ser empregado para fins de contraste de fase. Para determinar a posição e/ou dimensões do núcleo e absorção UV nuclear, pode-se preferir utilizar um microscópio de varredura laser confocal.

LEGENDAS DAS FIGURAS

A Fig. 1 mostra um histograma, isto é, um perfil densitométrico como tipicamente obtido se o teor de DNA nuclear de uma população de células não-cancerosas for determinado. As células estão em

um estado não-proliferativo.

5 A Fig. 2 mostra um perfil de histograma, isto é, um perfil densitométrico como tipicamente obtido, se o teor de DNA nuclear, de uma população de células cancerosas, for determinado. O pico correspondendo ao valor de 4 é indicativo de desenvolvimento de câncer em andamento, quando um tipo de célula é examinado que em seu estado normal não é proliferativo.

A Fig. 3 mostra exemplos de biópsias por escova do olho (imagem esquerda) e da boca (imagem direita).

10 A Fig. 4 mostra os diferentes comportamentos de absorção de DNA e proteína na faixa entre comprimentos de onda de aproximadamente 230 nm e 300 nm.

15 A Fig. 5 mostra esquematicamente o princípio de uma forma de realização da presente invenção, para determinar os limites de um núcleo de célula utilizando-se a luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm.

A Fig. 6 mostra a medição de fluorescência para células mucosas que foram coloridas com EtBr. O núcleo de célula é claramente visível, entretanto, também as outras partes da célula apresentam alguma fluorescência.

20 A Fig. 7 mostra uma imagem de contraste de fase (imagem esquerda), imagem de fluorescência (imagem intermediária) e a imagem combinada (imagem direita) de uma célula mucosa que foi colorida com EtBr. Fundindo-se e correlacionando-se a imagem de microscopia de contraste de fase com uma imagem de fluorescência permite-se precisamente determinar a
25 posição do núcleo e suas dimensões.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A identificação de células cancerosas por citometria de DNA é tipicamente realizada utilizando-se citometria de fluxo ou citometria de imagem.

No caso de citometria de imagem de DNA que pode também ser designada como ICM, o DNA é colorido com um marcador, a fim de visualizar o DNA. Subseqüentemente, são usadas alterações da quantidade do DNA ou aberrações cromossomais estruturais que são comumente designadas
5 como aneuploidia, para detectar a presença de uma célula cancerosa, visto que a aneuploidia é considerada ser característica de um estado canceroso já existente ou um estado canceroso transicional de desenvolvimento. Assim, a detecção da aneuploidia do DNA permite um diagnóstico precoce e sensível de câncer, detectando-se as células cancerosas, com freqüência anos à frente
10 da caracterização morfológica e histológica das biópsias de tecido.

Entretanto, como mencionado acima, as reações de coloração de DNA estabelecidas, tais como o método de coloração Feulgen, são trabalhosas e demoradas.

Em vez disso, os inventores descobriram que, uma vez tenha-
15 se determinado a posição e/ou dimensões/limites do núcleo dentro de uma célula, pode-se somente contar com a luz UV para determinar a absorbância de UV pelo núcleo. A absorbância de UV determinada pode então ser usada para calcular o teor de DNA ou estado de ploidia de uma célula. Estes achados particularmente aplicam-se se utilizar-se luz UV comum
20 comprimento de onda preferido entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm.

Verificou-se ainda que pode-se também usar marcadores fluorescentes que sejam capazes de especificamente interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento dentro de uma célula em métodos baseados em
25 citometria de imagem de DNA de detectar células cancerosas em uma amostra biológica.

Assim, a presente invenção em uma forma de realização é direcionada a um método para determinar in vitro a quantidade de ácidos nucleicos nucleares em pelo menos uma célula estando presente em pelo

menos uma amostra biológica, compreendendo as etapas de:

a) determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita célula in vitro,

5 b) medir in vitro a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo, como determinado em a).

Como resumido acima, basicamente qualquer método pode ser usado na etapa a) que permita a determinação da posição e/ou dimensões e, assim, os limites do núcleo. Um tal exemplo é microscopia de contraste de fase. Entretanto, pode-se preferir utilizar somente luz UV (UV) na etapa) de
10 um comprimento de onda preferido entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm. Comprimentos de onda particularmente preferidos da etapa a) e b) são aproximadamente 250 nm, 255 nm ou 260 nm.

Se utilizar-se microscopia de contraste de fase, pode-se preferir determinar a absorção UV nuclear, isto é, intensidade do sinal
15 nuclear, contatando-se a(s) célula(s) com um dos marcadores fluorescentes acima ou abaixo mencionados.

Entretanto, em outras formas de realização exemplares da presente invenção, não é necessário auxiliar a visualização dos ácidos nucleicos nucleares contatando-se as células com marcadores fluorescentes.

20 Tais métodos podem ser usados, entre outras coisas, para determinar o tamanho do genoma de um indivíduo ou espécie. Naturalmente, tais métodos podem também ser usados para detectar pelo menos uma célula cancerosa dentro de pelo menos uma amostra biológica. A comparação da absorção UV nuclear obtida com a absorção UV nuclear de células não-
25 cancerosas pode conseguir isto.

Como exposto acima, os métodos da presente invenção compreendem várias formas de realização que realizam a concepção básica de determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de uma célula e determinar a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo. Para

determinar a posição e/ou dimensões do núcleo, que é equivalente a determinar os limites do núcleo, pode-se usar microscopia de contraste de fase com luz visível, bem como abordagens de detecção com luz UV. Para determinar a absorvância de UV do núcleo pode-se contar unicamente com medições Uv, sem adicionar marcadores fluorescentes, que são capazes de interagir com os ácidos nucleicos de duplo filamento ou pode-se usar tais marcadores.

Assim, pode-se em princípio localizar o núcleo da célula com microscopia de contraste de fase e determinar a absorvância de UV do núcleo sem se utilizarem os marcadores descritos acima, pode-se localizar o núcleo da célula com microscopia de contraste de fase e determinar a absorvância de UV do núcleo usando-se os marcadores acima descritos, pode-se usar medições de absorvância de UV para localizar o núcleo e medir a absorvância de UV nuclear sem os marcadores acima descritos e pode-se usar as medições de absorvância de UV para localizar o núcleo e medir a absorvância de UV nuclear com os marcadores acima descritos etc.

A invenção em duas de suas formas de realização exemplares está envolvida com a localização do núcleo de célula com microscopia de contraste de fase e determinação da absorvância de UV do núcleo usando-se os marcadores acima descritos, ou utilizando-se medições de absorvância de UV para localizar o núcleo e medir a absorvância de UV nuclear sem os marcadores acima descritos. Estas duas formas de realização serão descritas mais detalhadamente a seguir. Entretanto, a pessoa hábil está obviamente cônica de que, se certos aspectos tais como comprimentos de onda preferidos, a natureza dos marcadores, o dispositivos de detecção a serem usados etc. forem discutidos no contexto destas duas formas de realização, estas explicações igualmente aplicam-se também a outras formas de realização da invenção, como mencionado acima, a menos que seja explicitamente indicado de outro modo. A definição dos termos tais como

“célula”, “célula cancerosa”, “amostra”, “aneuploidia” etc., naturalmente, tem o mesmo significado por todas as várias formas de realização da invenção, a menos que indicado de outro modo. Os vários métodos como considerados pela presente invenção podem também ser usados para as mesmas finalidades.

5 Antes de algumas das formas de realização da presente invenção serem descritas com mais detalhes, as seguintes definições são introduzidas.

 Como usado neste relatório e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um” e “uma” também incluem os respectivos plurais, a
10 menos que o contexto claramente dite de outro modo. Assim, a expressão “uma conta microportadora” pode incluir mais do que uma conta microportadora, isto é, duas, três, quatro, cinco etc. contas microportadoras.

 Os termos “cerca de” e “aproximadamente” no contexto da presente invenção indicam um intervalo de precisão que a pessoa hábil na
15 técnica entenderá como ainda assegurar o efeito técnico do aspecto em questão. O termo tipicamente indica um desvio do valor numérico indicado de $\pm 10\%$ e, preferivelmente, $\pm 5\%$. O termo “aproximadamente”, no contexto de comprimento de onda, refere-se a desvios de 1,5%, preferivelmente 1% e muitíssimo preferivelmente de 0,5%.

20 Para os fins da presente invenção, a expressão “in vitro” refere-se a análise de células, que foram isoladas de seu ambiente natural e são investigadas fora do corpo humano ou animal.

 Para fins da presente invenção, a expressão “célula cancerosa” refere-se a qualquer célula, tecido celular ou órgão composto de células com
25 algumas ou todas as células compreendendo uma quantidade de DNA nuclear que se desvia da quantidade de DNA nuclear como determinada pra uma célula-não-cancerosa, como consequência de duplicações, deleções, inserções, translocações etc. cromossomais.

 É bem sabido que as inserções, duplicações, deleções e

translocações de DNA cromossomal são, em grande parte, responsáveis pelo desenvolvimento do câncer e podem, assim, ser consideradas características de células cancerosas.

5 Para fins da presente invenção, a expressão “amostra biológica” refere-se a qualquer amostra compreendendo matéria celular e, preferivelmente, células de um indivíduo humano ou animal, que são para ser testadas quanto à quantidade de DNA nuclear nestas células e particularmente à presença de células cancerosas.

10 Tais amostras biológicas podem, assim, ser selecionadas do grupo compreendendo células de medula óssea, células de linfonodo, linfócitos, eritrócitos, células neurais, células musculares, fibroblastos, ceratinócitos, amostras mucosas, amostras de sangue periférico, amostras de fluido cerebroespinal, amostras de urina, amostras de efusão, aspirados de agulhas finas, biópsias de aspiração de agulha fina, biópsias por escova, 15 raspagem de sangue periférico, raspagem de pele, esfregaços de células esfoliadas, preparações citocentrifugadas de fluidos corporais, espécime de separação celular (após dispersões mecânicas e/ou enzimáticas), tecidos embebidos em parafina e seções congeladas.

20 A expressão “intensidade do sinal nuclear” é tipicamente usada no contexto da utilização de marcadores fluorescentes e explicada mais abaixo. A pessoa hábil na técnica entenderá que a intensidade do sinal nuclear é correlacionada com absorbância de UV nuclear, supondo-se que a intensidade do sinal usualmente será a mais elevada quanto mais luz UV seja absorvida pelos marcadores fluorescentes, que são localizados no núcleo.

25 Para fins da presente invenção, a expressão “marcador fluorescente” refere-se a qualquer molécula que é capaz de especificamente interagir com os ácidos nucleicos de duplo filamento e que provê um sinal fluorescente na excitação com uma fonte de luz adequada. Em geral, os marcadores fluorescentes de acordo com a presente invenção absorverão luz

de um comprimento de onda entre aproximadamente 100 nm (UV) a aproximadamente 800 nm.

Tais marcadores fluorescentes podem ligar-se, por exemplo, aos maiores ou menores sulcos do DNA. Eles podem ser agentes de intercalação de base de ácido nucleico e podem ser selecionados do grupo compreendendo 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI), Iodeto de Propídio (PI) e brometo de Etídio (EtBr). Os marcadores fluorescentes também incluem SYBR Green.

Outros agentes fluorescentes compreendem SYTOX Blue, SITOX Green, SYTOX Orange, POP-1, BOBO-1, YOYO-1, TOTO-1, JOJO-1, POPO-2, LOLO-1, BOBO-I, YOYO-3, TOTO-3, PO-PRO-I, BO-PRO-I, TO-PRO-I, JO-PRO-I, PO-PRO-3, LO-PRO-I, BO-PRO-3, Y0-PR0-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5, coloração de ácido nucleico fluorescente-azul SYTO 40, coloração de ácido nucleico fluorescente-azul SYTO 41, coloração de ácido nucleico fluorescente-azul SYTO 42, coloração de ácido nucleico fluorescente-azul SYTO 43, coloração de ácido nucleico fluorescente-azul SYTO 44, coloração de ácido nucleico fluorescente-azul SYTO 45, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 9, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 10, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 11, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 12, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 13, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 14, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 15, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 16, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 20, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 21, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 22, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 23, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 24, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 25, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 26, coloração de ácido

nucleico fluorescente-verde SYTO 27, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO BC, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 80, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 81, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 82, coloração de
5 ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 83, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 84, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 85, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 86, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 17, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 59, coloração de ácido nucleico
10 fluorescente-vermelha SYTO 61, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 17, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 62, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 63, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 64, Homodímero de acridina, Acridina laranja, 7-AAD (7-amino-actinomicina D),
15 Actinomicina D, ACMA, DAPI, Diidroetídio, Brometo de Etídio, homodímero de Etídio-1 (EthD-1), homodímero de Etídio-2 (EthD-2), monoazida de Etídio, iodeto de Hexídio, Hoechst 33258 (bis-benzimida), Hoechst 33342, Hoechst 34580, Hidroxistibamidina, LDS 751 ou amarelo Nuclear. Todos estes compostos são disponíveis, p. ex., na Invitrogen GmbH,
20 Germany.

Para fins da presente invenção, a expressão “interagindo com ácidos nucleicos de duplo filamento” refere-se à capacidade de pelo menos um marcador fluorescente interagir com ácidos nucleicos que têm uma confirmação de duplo filamento.

25 Os marcadores fluorescentes podem, em uma forma de realização preferida, interagir especificamente com ácidos nucleicos de duplo filamento. Neste contexto, a expressão “especificamente interagindo com ácidos nucleicos de duplo filamento” refere-se à capacidade do pelo menos um marcador fluorescente interagir preferencialmente com ácidos nucleicos

que têm uma confirmação de duplo filamento.

Ligação preferencial refere-se à capacidade dos marcadores fluorescentes interagirem sob idênticas condições com ácidos nucleicos de duplo filamento, porém não com ácidos nucleicos de filamento único ou pelo menos em um menor grau.

Se um marcador fluorescente interagem preferencialmente com um ácido nucleico de duplo filamento e não com um ácido nucleico de filamento único pode ser determinado por experimentos in vitro, em que um ácido nucleico de duplo filamento isolado imobilizado e um ácido nucleico único isolado imobilizado são contatados em paralelo sob idênticas condições e incubados em temperatura ambiente. Em seguida, um tampão de lavagem é aplicado. Se, para o ácido nucleico de duplo filamento, após excitação com uma fonte de luz adequada emitindo um comprimento de onda como mencionado acima, um sinal for observado que seja mais forte do que para o ácido nucleico de filamento único, o marcador fluorescente é considerado ser específico para os ácidos nucleicos de duplo filamento.

Em outra forma de realização, os marcadores fluorescentes não podem ser específicos para ácidos nucleicos de duplo filamento como definido acima, porém têm a capacidade de fornecer um sinal fluorescente mais forte quando ligado aos ácidos nucleicos, em comparação com quando eles não são ligados.

No caso de Brometo de Etídio, por exemplo, o sinal fluorescente aumenta ~20 vezes quando ligado a ácidos nucleicos de duplo filamento e ~10 vezes quando ligado a moléculas de filamento único. Para SYBR green I, o sinal fluorescente aumenta ~200 vezes quando ligado a DNA de duplo filamento. É assim não absolutamente necessário ter-se um marcador que seja específico para ácidos nucleicos de duplo filamento porque, de acordo com a presente invenção, discrimina-se entre coloração nuclear e citoplásmica, como será explicado abaixo. Se for utilizado um

marcador que produz sinais mais brilhantes quando ligados ao DNA, pode-se potencialmente evitar lavagem, como será explicado a seguir.

Naturalmente, em uma forma de realização preferida, pode-se usar marcadores tais como, p. ex., Brometo de Etídio, que interajam especificamente com ácidos nucleicos de duplo filamento e tenham a capacidade de fornecer sinais mais fortes na ligação vs. estado não-ligado.

Antes de determinar a posição e/ou dimensões, isto é, os limites do núcleo de uma célula e também antes de a pelo menos uma célula (putativamente cancerosa) da pelo menos uma amostra biológica ser contatada com o pelo menos um marcador fluorescente ser capaz de especificamente interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento, pode ser necessário e/ou aconselhável que algumas formas de realização da presente invenção preparem a amostra biológica, de modo que a pelo menos uma célula (putativamente cancerosa) seja preparada para medir a absorbância de UV.

O preparo de amostras biológicas para teste de células dentro de uma amostra biológica em citometria de imagem de DNA é bem conhecido pela pessoa hábil na técnica e pode incluir diluição das amostras, isolamento de populações de células homogêneas por separação de células ativadas por fluorescência (FACS), enriquecimento e purificação de certos tipos de célula, tais como células de medula óssea, células de linfonodo, linfócitos, células sanguíneas vermelhas, células de fígado, células renais, células neurais, fibroblastos, ceratinócitos etc., utilizando-se imunoenriquecimento ou biologia de célula clássica e técnicas biomédicas incluindo hidrolise enzimática, ruptura mecânica ou osmótica, (densidade) centrifugação, cromatografia, diálise tampão etc.

Se necessário, as amostras celulares que são imobilizadas em um substrato sólido podem ser fixas. Neste contexto, a pessoa hábil na técnica considerará auxiliares de fixação típicos, tais como secagem,

formaldeído, paraformaldeído, etanol, propanol, metanol-acetona, metanol-ácido acético glacial, metanol-formalina-ácido acético glacial etc.

Enquanto a fixação pode ser útil e algum caso, não é sempre necessária. Se a amostra for examinada utilizando-se um dispositivo integrado, pode ser recomendável não fixar as células e somente imobilizá-las.

Se, entretanto, a fixação for considerada, pode-se proceder de acordo com protocolos padrão, que compreendam, p. ex., as etapas de:

no caso de paraformaldeído:

- adicionar 4% de solução PF em PBS nas células
- incubar 5 – 30 min em temperatura ambiente
- lavar com PBS

no caso de Metanol/Acetona:

- colocar o substrato com célula em 100 % Metanol gelado
- incubar 5 – 30 min a -20°C
- enxaguar o substrato com células com 100% de acetona
- deixar a acetona evaporar.

Os protocolos que podem ser usados para as atividades descritas acima, isto é, o isolamento e preparação da amostra, o isolamento e preparação das células, a imobilização, permeabilização e fixação das células, podem, p. ex., ser tirados dos livros didáticos de biologia celular e manuais de laboratório padrão sobre, p. ex., microscopia de fluorescência, tais como Cell Biology: A laboratory handbook, Volumes I-III, Cellis, J. E. ed. (1994); Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, Volumes I-III, Ausubel, R.M. ed. (1994), etc.

Pode-se então prosseguir para a etapa a), a fim de determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita célula, usando-se, p. ex., luz ultravioleta (UV) de um comprimento de onda preferido entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm ou, p. ex., usando-se

microscopia de contraste de fase.

A seguir, duas formas de realização exemplares da invenção serão examinadas mais detalhadamente. Na primeira forma de realização, que será a seguir designada como Forma de Realização 1, a localização do núcleo e determinação da absorbância de UV nuclear são realizadas usando-se luz UV de um comprimento de onda preferido e, preferivelmente, não envolve microscopia de contraste de fase e/ou o uso de marcadores fluorescentes. Na segunda forma de realização, que será a seguir designada como Forma de Realização 2, a localização do núcleo e determinação da absorbância de UV nuclear são realizadas usando-se microscopia de contraste de fase e marcadores fluorescentes. A pessoa hábil entenderá que certos aspectos destas duas formas de realização, que serão examinadas com detalhes mais minuciosos, tais como as etapas de incubação e lavagem no caso de os marcadores fluorescentes serem usados, dispositivos de detecção e faixas de comprimento de onda UV podem, contudo, similarmente ser aplicados a outras das formas de realização consideradas acima. Após alguns dos problemas das duas formas de realização terem sido descritos, será então examinado como a absorbância de UV nuclear/intensidades dos sinais nucleares podem ser usadas para determinar o estado de ploidia das células e, assim, a presença e/ou provável ocorrência de propriedades cancerígenas.

Forma de Realização 1 – Determinação da quantidade de ácidos nucleicos

Como mencionado, a presente invenção em uma forma de realização é dirigida a um método para determinar in vitro a quantidade de ácidos nucleicos em pelo menos uma célula estando presente em pelo menos uma amostra biológica, compreendendo as etapas de:

a) determinar in vitro a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita célula;

b) determinar in vitro a absorbância de UV dentro dos limites

do núcleo, como determinado em a) usando-se a luz UV de um comprimento de onda preferido entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm.

Entretanto, em uma forma de realização preferida utilizar-se-á a luz ultravioleta (UV) de um comprimento de onda preferido entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm. Comprimentos de onda particularmente preferidos da etapa a) e b) são aproximadamente 250 nm, 255 nm ou 260 nm.

O método acima especificado de determinar a quantidade de um ácido nucleico nuclear, que preferivelmente é usado para detecção de pelo menos uma célula cancerosa em pelo menos uma amostra biológica, será agora descrito com mais detalhes com respeito às etapas únicas a) a b).

Uma vez tenha-se preparado a(s) célula(s) como descrito acima, pode-se então prosseguir para a etapa a), a fim de determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita célula usando-se luz ultravioleta (UV) de um comprimento de onda preferido dentre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm.

O DNA absorve luz UV entre comprimentos de onda de 230 a 290 nm com diferente eficiência, em comparação com as proteínas. Na Fig. 4, a absorção nesta área de comprimento de onda para proteínas e DNA é plotada em função do comprimento de onda. Por isto pode-se claramente ver que, quando utilizando-se luz UV de um comprimento de onda de aproximadamente 240 nm a 280 nm, tal como 250 nm, o DNA absorve muito mais luz (aproximadamente 50 vezes mais) do que as proteínas.

Este comportamento pode ser usado para determinar os limites, isto é, a posição e/ou dimensão de um núcleo de célula.

Pode-se, por exemplo, utilizar um ponto de luz emitindo luz entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm e varrer com este ponto de luz através de uma célula dentro de um plano da célula. Isto pode,

por exemplo, ser realizado com um microscópio de varredura laser confocal. Como o núcleo compreende quase todo o DNA de uma célula e como o citoplasma consiste largamente de proteínas, observar-se-á um aumento pronunciado de absorção, uma vez o ponto de luz atravesse do citoplasma da célula para o núcleo de célula. Se assim uma seção de plano de uma célula for varrida com tal ponto de luz, pode-se claramente identificar os limites do núcleo das células medindo-se a mudança de absorção.

Para fins da presente invenção, os limites de um núcleo dentro de uma célula podem assim ser determinados utilizando-se luz UV de um comprimento de onda preferido entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm. Em outras formas de realização preferidas da invenção, o comprimento de onda é de aproximadamente 250 nm, 255 nm ou 260 nm.

Utilizando-se um instalação de microscópio confocal pode-se focalizar uma sonda estando dentro do núcleo da célula. Tipicamente, deixar-se-á o ponto de luz da instalação confocal ser menor do que o núcleo.

Utilizando-se esta abordagem pode-se não somente localizar a posição do núcleo dentro de uma única estrutura mas realmente pode-se determinar as dimensões totais do núcleo, isto é, seu volume.

Isto pode ser realizado como segue. Varrendo-se um ponto de luz em um único plano como descrito, pode-se determinar a intensidade da luz refletida como descrito. A distância na direção do movimento através da qual o sinal é comparativamente baixo mede a espessura local do núcleo.

Como Figura 5 ilustra uma única varredura dentro de um único plano do núcleo, estas varreduras 1-D podem ser estendidas para 3 dimensões, para obter-se o formato completo do núcleo pela realização da mesma medição para diferentes planos. Em diferentes coordenadas (xy) a espessura total do núcleo é medida na direção- z . Assim, reconstruindo-se uma imagem 3-D das diferentes imagens 1-D de vários planos, pode-se reconstruir e

calcular a aparência e volume do núcleo.

A quantidade de luz UV retro refletida pelo núcleo, conforme medido pela instalação confocal, é inversamente relacionada com a quantidade de luz absorvida pela área sondada pelo ponto. Presumindo-se
5 que a absorção é quase igual por todo o núcleo, pode-se então preferivelmente calibrar a medição e determinar a absorção UV dos ácidos nucleicos nucleares.

A calibração consiste de determinar a absorção da luz UV por um núcleo e pelas regiões fora do núcleo dentro do mesmo plano da varredura
10 confocal. Para ambas as medições dentro e fora do núcleo, a luz deslocou-se quase através da mesma quantidade e distância de tecido antes de alcançar a célula de interesse, resultando em sinais de fundo comparáveis e similares em ambas as medições. Portanto, a relação entre as medições para absorções nucleares versus absorção não-nuclear pode ser considerada como uma
15 medição absoluta para absorção do núcleo de célula. Entretanto, se a monocamada de células for analisada pode nem sempre ser necessário calibrar o sinal.

Na forma de realização preferida da invenção, usar-se-á a luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente 240 nm e
20 aproximadamente 280 nm. Em uma forma de realização particularmente preferida, usar-se-á luz UV com um comprimento de onda de 250 nm, 255 nm ou 260 nm.

A razão para utilizar-se luz UV e particularmente luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente
25 280 nm é, repetindo, que o DNA que é encontrado nos núcleos das células apresenta absorção muito mais elevada nesta faixa de comprimento de onda do que para proteínas de (vide Figura 4).

O núcleo contendo tanto proteínas como DNA, portanto, absorverá mais luz do que o resto da célula, que contém principalmente

proteínas, porém sem dúvida nenhum DNA.

Utilizando-se preferivelmente um microscópio de varredura laser confocal pode-se medir a reflexão da luz UV por material dentro do núcleo e compará-la com a reflexão pelo material da célula fora do núcleo.

- 5 Calculando-se a relação da luz UV absorvida pelo núcleo com a luz UV absorvida pelas regiões fora do núcleo, pode-se obter assim um sinal que é uma medição para a densidade do DNA dentro de um único plano, conforme obtida por uma varredura confocal.

- Assim, a medição da absorbância de UV nuclear é, de acordo com a invenção, obtenível, entre outras coisas, calibrando-se o sinal de absorbância de UV no núcleo. O sinal (calibrado) de um único plano pode ser adotado como medição da absorção UV se somente sinais do mesmo plano forem comparados. Pode-se, entretanto, também sumariar os sinais (calibrados) dos vários planos que foram usados para determinação do volume do núcleo (vide acima) e assim obter uma medição para absorção UV do inteiro núcleo.

- Tudo isto é preferivelmente realizado utilizando-se microscópio de varredura laser confocal com luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm. Em uma forma de realização particularmente preferida, utiliza-se luz UV de aproximadamente 250 nm, 255 nm ou 260 nm.

A pessoa hábil na técnica é, naturalmente, bem familiarizada com os métodos de registrar os sinais de absorbância de UV, bem como utilizar estes sinais para calcular imagens, p. ex., do núcleo da célula.

- 25 A determinação das intensidades dos sinais, isto é, a quantidade da luz absorvida ou luz transmitida, será realizada empregando-se instrumentos como tipicamente usados para estas finalidades.

Para detecção dos sinais pode-se usar um microscópio que é capaz de detectar sinais de absorção UV. Em uma forma de realização

preferida da invenção, o mesmo microscópio pode prover os necessários dispositivos para ver a(s) célula(s) a serem examinadas também na fase de contraste. Um tipo de microscópio que pode preferivelmente ser usado para detectar o sinais de absorção UV pode ser um microscópio de varredura laser
5 confocal.

A microscopia confocal oferece diversas vantagens em relação à microscopia óptica convencional, uma das mais importantes sendo a eliminação da informação fora de foco, que distorce a imagem, profundidade controlável do campo e resolução sub-micrônica. Uma outra vantagem da
10 microscopia confocal é que a fluorescência de várias partes do espécime que estão fora de foco pode ser filtrada e assim não interfere com as partes ou seções que estão em foco, desse modo produzindo uma imagem que é consideravelmente mais nítida e apresenta uma melhor resolução do que uma imagem comparável, obtida por microscopia óptica clássica.

O princípio básico da microscopia de varredura confocal é o uso de uma tela com um furo de alfinete no ponto focal do sistema de lentes do microscópio que é “conjugado” com o ponto em que a lente objetiva é focalizada. Somente luz vindo do ponto focal da objetiva é focalizada no furo de alfinete e pode passar através do detector, que, p. e., pode ser uma
15 dispositivo acoplado por carga (CCD). A luz vindo de uma seção fora de foco da amostra será quase completamente filtrada.

Assim, um microscópio confocal tem uma resolução significativamente melhor do que um microscópio convencional para as direções x e y. Além disso, ele tem uma menor profundidade de campo na
20 direção-z. Varrendo-se o ponto focal através da amostra, é assim possível visualizar diferentes planos de uma amostra e então reconstruir uma imagem 3-dimensional da amostra. Além disso, a microscopia confocal é compatível com diferentes comprimentos de onda de luz.

Para localização do núcleo, o microscópio de varredura

confocal pode usar luz monocromática ou policromática; entretanto, a luz UV monocromática, com um comprimento de onda entre 240 nm e 280 nm, pode ser preferida. Particularmente preferida pode ser a luz UV de um comprimento de onda de 250 nm, 255 nm ou 260 nm.

5 Como um microscópio de varredura laser confocal pode-se usar um microscópio tal como LEICA DMLM e tendo uma unidade de câmara Qimaging Retiga 2000R FASTCooled Mono 12-bit (www.qimaging.com) para medir a intensidade do sinal do sinal de fluorescência.

10 A determinação das intensidades do sinal, isto é, a quantidade de luz absorvida ou transmitida, será feita usando-se instrumentos como tipicamente usados para estas finalidades.

 Assim, pode-se, p. ex., usar um dispositivo acoplado por carga ou uma câmara digital sendo ligada à abertura do microscópio que é usada
15 para visualizar as células, quando excitadas com as fontes de luz acima mencionadas. Pode-se, naturalmente, utilizar filmes etc.

 As unidades de detecção podem, p. ex., ser câmara Optronics DEI-700 CE three-chip CCD conectada ao computador via uma prancha com garra mecânica de estrutura BQ6000. Alternativamente, pode-se usar uma
20 câmara Hitachi HV-C20 de três chips CCD. Pacotes de software para análise de imagem podem, p. ex., ser o Bioquant True Color Windows 98 v3.50.6 image analysis software package (R&M Biometrics, Nashville, TN) or Image-Pro Plus 3.0 image analysis software. Outro sistema que pode ser usado é o Bio View Duet system (Bio View Ltd, Rehovot, Israel, que é baseado em um
25 microscópio totalmente automatizado de duplo modo (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena, Germany), um estágio de 8-lâminas motorizado XY (Marzhauser, Wetzler, Alemanha) uma câmara colorida de varredura progressiva 3CCD (DXC9000, Sony, Tokyo, Japão) e um computador para controle e análise do sistema e dos dados.

Uma das vantagens da presente invenção é que a determinação dos limites do núcleo de célula e a medição da absorção nuclear UV são realizadas com o mesmo instrumento, tal como um microscópio de varredura laser confocal.

5 Outra vantagem é que a presente invenção não requer visualização do DNA nuclear com, p. ex., marcadores fluorescentes (embora estes possam ser usados), reações químicas ou colorações imuno-histoquímicas visto que o comprimento de onda UV de 240 nm a 280 nm e, particularmente, 250 nm, 255 nm e/ou 260 nm é suficiente para
10 confiavelmente identificar o núcleo e os valores de absorção UV que podem ser usados para calcular a quantidade de DNA nuclear presente.

Forma de Realização 2 – Determinação da quantidade de ácidos nucleicos

Como mencionado, a presente invenção em uma forma de
15 realização é dirigida a um método para determinar in vitro a quantidade de ácidos nucleicos nucleares em pelo menos uma célula estando presente em pelo menos uma amostra biológica compreendendo as etapas de:

a) contatar dita pelo menos uma célula com pelo menos um marcador fluorescente que é capaz de interagir com os ácidos nucleicos de
20 duplo filamento dentro de dita pelo menos uma célula;

b) determinar a intensidade do sinal de dito pelo menos um marcador fluorescente sendo ligado aos ácidos nucleicos de duplo filamento com o sinal sendo obtido por excitação com uma fonte de luz adequada;

c) determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de
25 dita pelo menos uma célula por microscopia de contraste de fase;

d) determinar a intensidade do sinal nuclear do marcador fluorescente sendo ligado a ácidos nucleicos de duplo filamento, correlacionando-se a intensidade de sinal obtida em b) com a posição e/ou dimensões do núcleo obtido em c)

Em uma forma de realização alternativa da invenção, a etapa c) pode seguir à etapa a) e a etapa d) pode seguir à etapa b).

Uma vez as células incluindo a pelo menos uma célula (putativamente cancerosa) da pelo menos uma amostra biológica a ser
5 examinada tenham sido preparadas em uma maneira adequada, as células imobilizadas e opcionalmente permeabilizadas e fixadas podem ser contatadas com o pelo menos um marcador fluorescente sendo capaz de especificamente interagir com os ácidos nucleicos de duplo filamento dentro das células.

Para esta finalidade, os pelo menos um marcador fluorescente
10 pode ser formulado em um tampão de incubação adequado. Em princípio, qualquer tampão isotônico de pH neutro pode ser usado.

As amostras celulares podem ser incubadas com tal marcador fluorescente contendo solução por pelo menos 10 segundos, em uma temperatura de pelo menos 4°C. Tipicamente e em alguns exemplos
15 preferivelmente, a incubação será realizada por diversos minutos em temperatura ambiente (p. ex., 20 – 25°C).

Uma vez tenha contatado a pelo menos uma célula (putativamente cancerosa) da amostra celular, como obtida da pelo menos uma amostra biológica com o pelo menos um marcador fluorescente que é
20 capaz de especificamente interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento, determina-se em uma segunda etapa, que foi designada acima como etapa b), a intensidade do sinal de dito pelo menos um marcador fluorescente sendo especificamente ligado aos ácidos nucleicos de duplo filamento dentro das células incubadas, conforme obtidas por excitação com uma fonte de luz
25 adequada.

Antes de a intensidade do sinal ser medida, pode-se opcionalmente lavar a amostra celular que foi incubada com o marcador fluorescente contendo solução de incubação, a fim de aumentar a relação de sinal para segundo plano do sinal. Tais soluções de lavagem podem

compreende tampões com concentrações de sal fisiológicas mais elevadas e/ou detergentes tais como NP-40, Tween 20, Tween 80, Triton X100 etc., a fim de reduzir interações não específicas e sinais de fundo. Tal tampão de lavagem pode compreender, p. ex., PBS pH 7,5 com 0,05 % Tween 20.

- 5 Qualquer tampão isotônico de pH fisiológico pode ser usado. A etapa de lavagem é opcional, visto que os marcadores fluorescentes apresentam intensidade de sinal aumentada quando ligados a ácidos nucleicos de duplo filamento versus os marcadores não ligados. Entretanto, para uma relação de sinal para fundo melhorada uma etapa de lavagem pode ser preferida.

- 10 A excitação será realizada com uma fonte de luz que é capaz de excitar o marcador fluorescente. Em geral, a fonte de luz emitirá um comprimento de onda entre aproximadamente 100 nm a aproximadamente 800 nm. O comprimento de onda de excitação dependerá da natureza do marcador fluorescente sendo usado. No caso de brometo de Etídio, Iodeto de
- 15 Propídio e DAPI utilizar-se-á tipicamente luz ultravioleta variando de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 550 nm. Esta última faixa de comprimento de onda pode também ser preferida para outros marcadores, tais como Iodeto de Propídio etc.

- Dependendo do espectro de absorção dos marcadores
- 20 fluorescentes sendo usados, a fonte de luz pode emitir luz monocromática ou policromática.

- Deve ser entendido que a intensidade do sinal do marcador fluorescente é medida para diferentes células individualmente, o que torna necessário que um microscópio seja usado a fim de permitir separação
- 25 espacial das células.

Para detecção do sinal pode-se usar um microscópio que seja capaz de detectar sinais fluorescentes. Em uma forma de realização preferida da invenção, o mesmo microscópio pode prover os dispositivos requeridos para visualizar a(s) célula(s) a serem examinadas também em contraste de

fase. Um tipo de microscópio que pode ser usado para detectar o sinal fluorescente pode ser um microscópio de varredura laser confocal. Entretanto, para as aplicações que são tipicamente consideradas para os métodos inventivos, um microscópio de contraste de fase que seja equipado
5 com os necessários filtros, unidades de detecção, software etc. pode ser suficiente.

A determinação das intensidades de sinal, isto é, a quantidade de luz absorvida ou transmitida será realizada usando-se instrumentos como tipicamente usados para estas finalidades. Alguns destes instrumentos já
10 foram descritos acima no contexto da Forma de Realização 1.

Assim, pode-se, p. ex., usar também um dispositivo acoplado por carga ou uma câmera digital sendo ligada à abertura do microscópio que é usado para ver as células quando excitadas com as fontes de luz acima mencionadas. Pode-se, naturalmente, também usar filmes etc.

15 As medições de fluorescência pode novamente ser feita com qualquer cubo de filtro padrão (consistindo de um filtro barreira, filtro de excitação e espelho dicróico) ou qualquer cubo de filtro personalizado para aplicações especiais, desde que o espectro de emissão esteja dentro da faixa espectral da sensibilidade do sistema. A bio-formação de imagem espectral
20 pode também ser usada em conjunto com quaisquer métodos de filtragem espacial padrão, tais como campo escuro e contraste de fase e mesmo com microscopia óptica polarizada.

As leituras ópticas de fluorescência dos sinais gerados pelos marcadores fluorescentes podem ser registradas, como citado acima, usando-se, p. ex., dispositivos acoplados por carga (CCD) que, para a finalidade de
25 diferenciação qualitativa dos efeitos ópticos (dispersão, reflexão), obtenham excitação dos fluoróforos e do campo escuro (por meio de microscopia óptica refletida ou microscopia óptica transmitida). Neste processo, a formação de imagem das células ocorre por exposição ou por restauração com o uso de

óptica de resolução elevada. Os sistemas de varredura confocal, tais como descritos na US 5.304.810, torna também possível avaliar os sinais de fluorescência dos planos selecionados de uma amostra. Eles são baseados na seleção dos sinais de fluorescência ao longo do eixo geométrico óptico dos furos de alfinete e são com frequência equipados com um sistema de auto-foco poderoso. Tais sistemas permitem localizar precisamente os sinais originando-se dos marcadores fluorescentes e medir suas intensidades de sinal.

As unidades de detecção podem, repetindo, p. ex., ser câmera Optonics DEI-700 CE três-chips CCD conectada a um computador via uma prancha de garra mecânica de estrutura BQ6000. Alternativamente, pode-se usar uma câmera Hitachu FIV-C20 três-chips CCD. Os pacotes de software para análise de imagem pode, p. ex., ser o Bioquant True Color Windows 98 v3.50.6 image analysis software package (R&M Biometrics, Nashville, TN) ou Image-Pro Plus 3.0 image analysis software. Outro sistema que pode ser usado é o Bio View Duet system (Bio View Ltd, Rehovot, Israel, que é baseado em um microscópio totalmente automatizado de duplo modo (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha), um estágio de 8-lâminas motorizadas XY (Marzhauser, Wetzler, Alemanha) uma câmera de varredura progressiva 3CCD (DXC9000, Sony, Tokyo, Japão) e um computador para controle e análise do sistema e dos dados.

Pode-se, assim, também utilizar um microscópio tal como LEICA DMLM com constraste de fase e tendo uma unidade de câmera de 12-bits Qimaging Retiga 2000R FASTCooled Mono (www.qimaging.com) para medir a intensidade do sinal do sinal fluorescente.

Como é bem sabido que as unidades de detecção para medir a intensidade do sinal dos sinais fluorescentes podem alcançar um limite de saturação, pode ser necessário diluir as soluções de marcador fluorescente, que são usadas para contatar as amostras celulares, com os marcadores

fluorescentes e/ou diluir as amostras celulares correspondentemente.

Em uma terceira etapa que foi designada acima como etapa c), a posição e/ou dimensões do núcleo das células da amostra biológica, incluindo a pelo menos uma célula (putativa cancerosa), são determinadas usando-se microscopia de contraste de fase. Para esta finalidade, uma microscopia típica, tal como uma LEICA DMLM com contraste de fase, pode ser usada.

Uma pessoa hábil na técnica é bem familiarizada com a análise microscópica de células fixadas e imobilizadas pela microscopia de contraste de fase.

Para fins da presente invenção, pode ser desejável que um microscópio seja usado que permita detectar sinais gerados pelo marcador fluorescente e, ao mesmo tempo, permita visualização das mesmas células e, assim, determinação da posição e/o dimensões do núcleo por microscopia de contraste de fase. Neste caso, microscópio de varredura laser confocal, tal como os microscópios acima mencionados, pode ser usado. Microscópios que ao mesmo tempo permitem registrar sinais fluorescentes e imagens de contraste de fase incluem, entre outros, microscópio tal como LEICA DMLM com objetiva NPlan 20x/0,40 PH1 ou objetiva Nplan 40x/0,65 PH2. Entretanto, a detecção dos sinais fluorescentes e determinação da posição e/ou dimensões do núcleo de célula por microscopia de contraste de fase podem ser realizadas utilizando-se diferentes dispositivos.

Uma vez tenha-se determinado a intensidade do sinal do marcador fluorescente após excitação com uma fonte de luz adequada e determinado a posição e/ou dimensões do núcleo das células observadas na amostra, em uma quarta etapa, que foi designada acima como etapa d), pode-se determinar a intensidade do sinal nuclear do marcador fluorescente sendo especificamente ligado aos ácidos nucleicos de duplo filamento e preferivelmente DNA nuclear, correlacionando-se a intensidade do sinal

obtida na etapa supracitada b) com a posição e/ou dimensões do núcleo obtido na acima mencionada etapa c) do método acima descrito. Esta etapa é necessária, visto que não se pode tipicamente detectar o núcleo de célula no modo para determinar a intensidade do sinal de fluorescência.

5 A expressão “intensidade do sinal nuclear” refere-se à intensidade de sinal que resulta dos marcadores fluorescentes que são ligados aos ácidos nucleicos (de duplo filamento) dentro do núcleo de célula.

 A frase “correlacionando-se a intensidade de sinal obtida na etapa b) acima mencionada [ou etapa c) no contexto do método de diagnóstico
10 mencionado a seguir] com a posição e/ou dimensões do núcleo obtido na etapa supracitada c) [ou etapa d no contexto do método de diagnóstico mencionado a seguir]” significa superpor-se a imagem obtida para uma célula, quando medindo-se a intensidade do sinal de fluorescência com a imagem de contraste de fase da mesma célula e então determinar a
15 intensidade de sinal do sinal do marcador fluorescente sendo emitido pelo núcleo. Superposição das respectivas imagens e determinação da intensidade do sinal nuclear podem, naturalmente, ser realizadas com pacotes de software de análise de imagem bem conhecidos, como mencionado acima.

 Na correlação, que pode ser realizada usando-se algoritmos
20 baseados em computador e software que é tipicamente provido com, p. ex., microscópios de varredura a laser confocais, somente aqueles sinais sendo emitidos pelo núcleo das células são assim considerados. A determinação das dimensões e/ou posição do núcleo usando-se microscopia de contraste de fase é necessária a fim de prover o algoritmo baseado em computador com a
25 necessária informação para desconsiderar todas as intensidades de sinal, como determinado na etapa b), que não se originam do núcleo de célula, porém, sem dúvida de outras estruturas celulares, tais como o citoplasma.

 A razão para fazer esta correlação é que os marcadores fluorescentes de acordo com a invenção, que são capazes de especificamente

interagirem com os ácidos nucleicos de duplo filamento, resultarão em sinal de fluorescência não somente do núcleo da célula, mas por toda a célula, embora o sinal originando-se do núcleo da célula será mais forte, dado que a maioria dos ácidos nucleicos de duplo filamento são encontrados na forma de DNA cromossomal dentro do núcleo da célula.

Visto que os sinais surgindo, p. ex., das moléculas de ácido nucleico de duplo filamento do citoplasma de uma célula, impactarão negativamente a determinação de, p. e, o teor de CNA de um núcleo de célula, os métodos da presente invenção utilizam somente sinais que são emitidos pelo núcleo da célula. Isto aumenta significativamente a precisão de, p. ex., a medição do teor de DNA.

Entretanto, como a dimensão e/ou posição do núcleo da célula não são determinadas usando-se métodos de coloração um tanto trabalhosos, como tem sido feito na técnica anterior, mas microscopia de contraste de fase, o tempo necessário para realizar o método de acordo com a presente invenção é significativamente reduzido.

Assim, a combinação de utilização de marcadores fluorescentes, que especificamente podem interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento, e microscopia de contraste de fase, a fim de determinar a posição e/ou dimensões de um núcleo de célula e a subsequente limitação do sinal fluorescente, que é para ser considerado para tais sinais de fluorescência que são emitidos pelo núcleo de célula, permite uma rápida e fácil determinação da quantidade de ácidos nucleicos de duplo filamento dentro de um núcleo de célula e, conseqüentemente, detecção das células cancerosas dentro de uma amostra biológica.

Restringindo-se a intensidade do sinal para ser considerada como a intensidade de sinal emitida pelo núcleo de uma célula potencialmente cancerosa dentro de uma amostra biológica empregando-se microscopia de contraste de fase, o método de acordo com a presente invenção permite uma

rápida e precisa determinação da quantidade de ácidos nucleicos de duplo filamento dentro um núcleo de célula, como será explicado a seguir.

Os marcadores discutidos aqui podem ser exatamente aqueles marcadores que foram mencionados acima em detalhes. O marcador
5 fluorescente selecionado do grupo compreendendo agentes de ligação ligando-se ao sulco maior ou menor do DNA, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Iodeto de Propídio (PI), brometo de Etídio ou SYBR green podem ser preferidos. O Brometo de Etídio pode ser particularmente preferido, visto que ele permite, entre outras coisas, detectar células cancerosas que são
10 associadas com o câncer epitelial em uma amostra de biópsia por escova biológica.

O método de detectar pelo menos uma célula cancerosa em uma amostra biológica utilizando-se marcadores fluorescentes que são específicos de ácidos nucleicos de duplo filamento, em combinação com
15 microscopia de contraste de fase como descrito acima, permite acelerar os métodos de citometria de DNA, em comparação com, p. ex., o método de coloração Feulgen.

Através da etapa de microscopia de contraste de fase é possível precisamente localizar o núcleo e determinar sua dimensão e então
20 utilizar esta informação para mais determinação do teor de DNA, considerando-se somente o sinal fluorescente quando é emitido pelo núcleo das células sob exame. Quando microscopia de contraste de fase é usada para determinar a posição e/ou dimensões do núcleo, não é necessário colorir o núcleo em uma segunda reação, que também será demorada e trabalhosa.

25 Dado que o tamanho e posição do núcleo são determinados por microscopia de contraste de fase, a medição do teor de DNA pode ser baseada no sinal fluorescente sendo emitido pelo núcleo e, assim, nenhuma precisão da medição da citometria de DNA é perdida. Como os métodos de coloração de fluorescência são uma questão de minutos e como a microscopia de

contraste de fase é uma questão de segundos, as medições da citometria de imagem de DNA são realizadas em uma trajetória de tempo significativamente mais rápida do que as abordagens de citometria de imagem de DNA conhecidas anteriormente. Em algumas formas de realização da presente invenção, a presente invenção assim possibilita a medição do teor de DNA de células mesmo em um consultório médico.

Em uma forma de realização da presente invenção, as células cancerosas podem ser associadas com um câncer selecionado do grupo compreendendo leucemia, linfoma, câncer cerebral, câncer cerebrosespinal, câncer da bexiga, câncer de próstata, câncer de mama, câncer cervical, câncer do útero, câncer ovariano, câncer dos rins, câncer oral e da garganta, câncer esofágico, câncer do pulmão, câncer colo retal, câncer pancreático e melanoma.

A presente invenção assim provê, inter alia, um método para detectar pelo menos uma célula cancerosa em uma amostra biológica, pela utilização de um marcador fluorescente que é capaz de interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento dentro de uma célula. Realizando-se microscopia de contraste de fase determina-se a posição e/ou dimensões do núcleo. Esta última informação pode então ser correlacionada, p. ex., utilizando-se pacotes de software apropriados com a intensidade de sinal do marcador fluorescente, como obtido para a inteira célula em, p. ex., imagens de revestimento, de modo que somente o sinal originando-se do núcleo da célula é usado para mais cálculos. Uma vez tenha-se obtido a intensidade do sinal nuclear do marcador fluorescente da putativa pelo menos uma célula cancerosa, esta intensidade do sinal nuclear é referenciada com uma intensidade do sinal nuclear padrão, obtida pelo mesmo método para um comparável ou idêntico tipo de célula, que é sabido ser não-canceroso e para o qual o estado de ploidia (2 ou 4) é conhecido na forma de um densitograma. Um significativo desvio dos valores de 2 ou 4 ou das áreas de pico do

densitograma de referência é então considerado ser indicativo de desenvolvimento canceroso.

Uma pessoa hábil na técnica estará ciente de que a ordem das etapas como examinado acima pode ser mudada, Assim, pode-se começar primeiro contatando-se e incubando-se a amostra com marcadores fluorescentes, realizando-se a microscopia de contraste de fase e então determinando-se a intensidade do sinal de fluorescência. Em certas circunstâncias, pode também ser possível, p. ex., primeiro realizar microscopia de contraste de fase, em seguida contatar e incubar a amostra com o marcador fluorescente e, finalmente, medir as intensidades do sinal fluorescente.

Alternativamente, a etapa c) pode ter seguimento à etapa a) e a etapa d) pode seguir à etapa b).

Determinação do estado de ploidia

A seguir, será descrito como a absorbância de UV/intensidades dos sinais nucleares como obtidas na Forma de Realização 1, Forma de Realização 2 ou de acordo com qualquer uma das outras formas de realização mencionadas acima, podem ser usadas para determinar o estado cancerígeno (putativo) de uma célula.

É conhecimento comum que a maioria das células mamíferas compreendem um duplo conjunto de cada cromossoma. Assim, o número de cromossomas pode ser calculado como $2n$, com n sendo o número de cromossomas. Entretanto, à medida que as células se replicam elas dobram o número de cromossomas antes que a separação dos cromossomas nas células filhas ocorra.

Durante a replicação do DNA e antes da divisão celular, as células mamíferas compreenderão assim numerosos cromossomas que podem ser calculados como $4n$ com n sendo novamente o número de cromossomas.

Se a quantidade de DNA de uma célula mamífera for

referenciada com o número de cromossomas, o teor de DNA de uma célula-não-cancerosa, que pode também ser designada como uma célula “saudável” ou “normal”, pode assim ter os valores 2 ou 4, dependendo do estado de replicação da célula.

5 A expressão “estado de ploidia” no contexto da presente invenção refere-se ao teor de DNA de uma célula normal, não-cancerosa e pode ter os valores de 2 a 4 como explicado acima.

 É também conhecimento comum na técnica como determinar o estado de ploidia de uma núcleo de célula, p. ex., utilizando-se o método de coloração Feulgen acima mencionado. Neste contexto, a publicação de
10 Hardie et al. (The Journal of Histochemistry & Cytochemistry (2002), 50(6), 735 – 7949) é incorporada por referência até o ponto em que descreve a determinação do teor de DNA de uma célula empregando-se métodos de coloração de DNA.

15 Na seção “Image Analysis Densitometry” (Densitometria de Análise de Imagem) na pág. 738 da referência de Hardie et al., é explicado como as intensidades de sinal obtidas por, p. ex., o método de coloração Feulgen ou marcadores fluorescentes ou sinal de absorbância de UV podem ser convertidas nos valores densitométricos. Como explicado acima, uma
20 célula-não-cancerosa, saudável compreenderá cromossomas $2n$ ou $4n$ com n sendo o número de cromossomas. Assim, análise densitométrica das intensidades de sinal, como obtidas pelos sinais de absorbância de UV nuclear como usados na presente invenção resultarão em um perfil densitométrico com duas áreas de pico.

25 A estas duas áreas de pico serão atribuídos os valores de 2 ou 4, respectivamente (se a célula for proliferativa). Um exemplo de tal perfil densitométrico é provido na Figura 1. No caso específico, uma população de células não proliferativas foi analisada, que explica por que não há pico correspondendo a 4. Se for uma população de células do mesmo tecido que

tipicamente é também conhecido ser não-proliferativo, um valor de 4 seria observado, este seria indicativo de proliferação e nesta situação estado canceroso.

Resumidamente, para densitometria de análise de imagem, o campo do microscópio que se utiliza para ver as células e medir o sinal UV nuclear é capturado por um dispositivo de detecção CCD (dispositivo acoplado por carga) fixado no microscópio ou uma câmara digital que é conectada a um computador. As imagens sendo imagens digitalizadas são registradas como uma série de pixéis, a cada pixel sendo atribuída uma cor e intensidade características. As intensidades são então tipicamente convertidas por algoritmos baseados em computador em valores de absorbância, que por sua vez são exibidos por um software de análise de imagem, como os densitogramas acima mencionados.

A pessoa hábil na técnica está, naturalmente, cônica de que um densitograma significativo e confiável de células normais, não-cancerosas deve ser preferivelmente calculado de uma população de numerosas células, com um número de preferivelmente 25 – 100 células tipicamente sendo suficiente. Em uma forma de realização preferida da invenção, a quantidade de DNA nuclear será assim determinada por medição da absorbância de UV nuclear, como descrito acima, de aproximadamente pelo menos 30, 40, 50 ou 60 células.

Em uma outra forma de realização da presente invenção, a absorbância de UV nuclear pode ser usada para detectar células cancerosas em pelo menos uma amostra biológica. A intensidade do sinal nuclear do marcador fluorescente sendo ligado aos ácidos nucleicos de duplo filamento nucleares, como obtidos de acordo com a Forma de Realização 2 acima mencionada, pode, naturalmente, também ser usada para detectar pelo menos uma célula cancerosa em pelo menos uma amostra biológica.

Isto é conseguido determinando-se o teor do DNA nuclear ou

o estado de ploidia das células cancerosas putativas, usando-se os métodos acima descritos de acordo com a invenção. O estado de ploidia determinado é então comparado com o estado de ploidia das células-não-cancerosas, cujo estado de ploidia foi determinado pelas intensidades do sinal nuclear obtidas por método idêntico.

Para determinar se uma célula cancerosa putativa é na realidade uma célula tendente a câncer, determinar-se-á assim um densitograma como descrito acima. O densitograma observado para as células-não-cancerosas será designado como o densitograma “padrão” ou “de referência”.

Preferivelmente, tais densitogramas de referência serão medidos usando-se o mesmo método que para detectar as células cancerosas, porém assegurar-se-á que somente células-não-cancerosas sejam usadas. Isto pode ser conseguido utilizando-se células do mesmo indivíduo, porém de outros sítios de tecido que não aqueles que são suspeitos de ser cancerosos. Alternativa ou adicionalmente, pode-se usar idênticos ou comparáveis tipos de célula, porém de um diferente indivíduo que seja sabido não ser afligido por câncer. Se as células do mesmo indivíduo forem usadas, deve-se preferivelmente utilizar tipos de células comparáveis, contanto que seja assegurado que estas células não são cancerosas. O número e tipo de células a serem estudadas, a fim de obter-se um densitograma padrão (isto é, histograma), estão bem dentro do conhecimento da pessoa hábil na técnica e variarão entre 25 e 100 células e preferivelmente em torno de 30, 40, 50 ou 60 células.

Para fins da presente invenção, a expressão “tipo de célula comparável” assim refere-se a um tipo de célula que é de origem comparável e tem características celulares comparáveis às das células suspeitas de câncer. Se, por exemplo, uma célula mucosa for testada quanto ao desenvolvimento de câncer, a célula de referência padrão deve também ser de origem mucosa.

Se, por outro lado, células linfóides forem testadas quanto ao desenvolvimento de câncer, a célula de referência padrão deve também ser de origem linfóide, a fim de ser um tipo de célula comparável.

Tipos de célula padrão ou comparáveis típicas podem, assim,
5 ser linfócitos, granulócitos, células epiteliais normais ou células estromais.

A absorvância de UV nuclear/intensidade nuclear do tipo de célula comparável, que é sabido ser não-canceroso e que é usado como uma referência padrão para a intensidade de sinal nuclear obtida para a célula cancerosa putativa, devem ser medidas sob condições altamente similares se
10 não idênticas, se possível.

Assim, o tipo de célula comparável, que pode também ser designado como célula padrão ou de referência, deve ser preparado e isolado por uma sonda biológica comparável e fixado e permeabilizado (se necessário) substancialmente idêntico às células sob análise. Além disso, as
15 células de referência devem ser analisadas durante a mesma análise das células cancerosas verdadeiras, empregando-se as mesmas condições de microscópio.

Se para uma certa célula, um estado de ploidia for determinado, que se desvia dos valores supracitados de 2 ou 4, isto é
20 indicativo de outras substanciais duplicações, inserções, deleções ou rearranjos cromossomais e, assim, de células cancerosas. Como neste caso, o estado de ploidia de tal célula desvia-se dos valores de 2 e 4; pode-se também falar do estado de aneuploidia. Este, naturalmente, admite que se considera um tipo de célula que é tipicamente proliferativa, mesmo em seu estado
25 normal.

Assim, o valor de ploidia de 4 pode ser indicativo de desenvolvimento do câncer, se forem examinadas as células que são usualmente sabidas serem não-proliferativas.

Se forem examinadas as células que são proliferativas em seu

estado normal, um valor de 4 não será considerado ser indicativo de desenvolvimento de câncer. Neste caso, somente desvios dos valores de 2 e 4 serão indicativos de desenvolvimento de câncer.

5 A expressão “estado de aneuploidia”, no contexto da presente invenção, assim refere-se a uma quantidade anormal de DNA nuclear dentro de uma célula.

Para ser confiável, a quantidade de DNA nuclear e, assim, o densitograma (histograma) das células cancerosas putativas serão calculados de uma população de células e uma preferivelmente medirá aproximadamente 10 100 a 700 e preferivelmente em torno de 100 a 300 células.

Se forem examinadas, p. ex., células cancerosas do tecido do fígado, obter-se-á, por exemplo, um densitograma com dois picos principais, a que são atribuídos os valores de 2 e 4. Entretanto, exceto no caso de células-não-cancerosas, o densitograma dos dois picos principais não será tão 15 pronunciado e estreito, porém um tanto largo. Adicionalmente, observar-se-á picos e sinais no densitograma que são abaixo de 2, acima de 2, abaixo de 4 e acima de 4. Um exemplo é fornecido na Figura 2.

Uma vez que a maioria das células de qualquer amostra terá um teor de DNA de 2, desvio da maioria poderia também ser considerado 20 como anormal ou suspeito. No evento de uma amostra cancerosa, onde células normais são em minoria, haverá ainda uma grande variação no teor de DNA que pode ser usado para rotular a amostra como suspeita.

Uma célula, portanto, será classificada como cancerosa se o densitograma que é calculado com base na absorbância de UV nuclear, que é 25 obtida de acordo com a invenção como descrito acima, apresentar sinais de pico fora dos picos correspondendo aos valores 2 (e 4, dependendo do estado proliferativo da célula em seu estado normal).

Entretanto, os picos correspondendo aos valores de 2 (e 4) podem eles próprios serem indicativos de potencial canceroso de uma célula

se eles apresentarem uma curvatura um tanto larga. A fim de decidir se um densitograma é na realidade indicativo de desenvolvimento de câncer ou não, em vista da forma de pico correspondendo aos valores 2 (e 4), superpor-se-á o densitograma de uma amostra de célula cancerosa putativa com um densitograma padrão ou de referência como descrito acima.

As áreas sob a curva (AUC) dos picos dos densitogramas sendo indicativas dos valores 2 e 4 do densitograma padrão são admitidas como sendo indicativas de uma célula-não-cancerosa e quaisquer desvios das AUCs dos correspondentes picos do densitograma da célula cancerosa putativa em pelo menos 10% serão considerados ser indicativos de uma célula ou estado canceroso. Em uma forma de realização preferida, o desvio será de pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou pelo menos 50%.

Pode-se também aplicar os padrões expostos na publicação de Haroske et. al. "1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry", Analytical Cellular Pathology 17 (1998) 189-200, onde é explicado em detalhes quando uma célula será considerada ser normal ou cancerosa.

Assim, um desvio significativo da absorbância de UV nuclear/intensidade do sinal nuclear de uma célula cancerosa suspeita (população), em comparação com a absorbância de UV nuclear obtida para um tipo de célula-não-cancerosa comparável, é indicativo de desenvolvimento câncer em andamento ou provavelmente futuro.

Para as finalidades da presente invenção, uma aberração significativa do teor de DNA será considerada ser indicativa de desenvolvimento de câncer, se o estado de ploidia das células cancerosas suspeitas desviar-se dos valores de ploidia de 2 (e 4, se a célula seu estado saudável estiver proliferando) em pelo menos 10%. Em uma forma de realização preferida, o desvio será de pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo

menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou pelo menos 50%. Um pico em um densitograma terá atribuído um valor de 2 ou 4 para esta parte do pico que é idêntica aos picos correspondentes de um densitograma de referência.

5 De acordo com a prática estabelecida, pode-se designar o teor de DNA de uma célula como peridiplóide se o pico correspondendo ao valor de pico 2 do densitograma de referência variar de 1,8 a 2,2.

O teor de DNA de uma célula será considerado ser peritetraplóide se o pico correspondendo ao valor de pico 4 do densitograma
10 de referência variar de 3,6 a 4,4.

Quaisquer valores fora destas faixas serão considerados como X-plóide.

As células e tecidos com valores peridiplóides, peritetraplóides e x-plóide serão consideradas como células cancerosas para
15 fins da presente invenção.

Assim, o método acima descrito pode ser usado para calcular o estado de ploidia (aneuploidia) de uma célula cancerosa putativa de uma amostra biológica, referenciando-se a absorbância de UV nuclear, como obtida de acordo com o método da invenção para a célula cancerosa putativa,
20 com uma absorbância de UV nuclear empregando-se a mesma abordagem para um tipo de célula comparável, que é sabido ser não-canceroso.

Para fins da presente invenção, a expressão “não-cancerosa” refere-se a uma célula que é sabida não apresentar indicações de desenvolvimento de câncer.

25 Em uma forma de realização da presente invenção, as células cancerosas podem sr associadas com um câncer selecionado do grupo compreendendo leucemia, linfoma, câncer de cérebro, câncer cerebrospinhal, câncer de bexiga, câncer da próstata, câncer da mama, câncer cervical, câncer de útero, câncer ovariano, câncer dos rins, câncer oral e da garganta, câncer

esofágico, câncer do pulmão, câncer retal do cólon, câncer pancreático e melanoma.

Métodos de diagnóstico

Como mencionado acima, a presente invenção também refere-se a um método in vitro de diagnosticar e/ou prognosticar câncer em um indivíduo humano ou animal, que compreende as etapas de:

a) fornecer uma amostra biológica de um indivíduo humano ou animal;

b) determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de pelo menos uma célula de dita amostra in vitro,

c) medir in vitro a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo, como determinado em a),

d) calcular pela intensidade do sinal nuclear obtida na etapa d) o estado de ploidia de dita pelo menos uma célula,

e) decidir sobre a presença e/ou provável futura ocorrência de um câncer, dependendo do estado de ploidia.

Os métodos de diagnóstico de acordo com a presente invenção também compreendem várias formas de realização que realizam a concepção básica de determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de uma célula e determinar a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo. Para determinar a posição e/ou dimensões do núcleo que é equivalente a determinar os limites do núcleo, pode-se novamente utilizar microscopia de contraste de fase com luz visível, bem como abordagens de detecção com luz UV. Para determinar a absorbância de UV do núcleo, pode-se contar somente com medições UV sem adicionar marcadores fluorescentes que são capazes de interagir com os ácidos nucleicos de duplo filamento ou pode-se usar tais marcadores.

A seguir, aspectos gerais destes métodos de diagnóstico serão examinados. Outros problemas serão discutidos com respeito a duas formas

de realização específicas. A pessoa hábil entende que certos aspectos destas duas formas de realização, que serão examinados em detalhes minuciosos, podem contudo similarmente ser aplicados a outras das formas de realização consideradas acima.

5 Com respeito à etapa a), uma amostra biológica pode ser obtida de um indivíduo humano ou animal empregando-se métodos convencionais, tais como, por exemplo, biópsias por escova, aspirados, biópsias de aspirado por agulha fina, biópsias endoscópicas etc.

10 As etapas b), c) e d) podem então ser realizadas como etapas a) e b) do método acima descrito de determinar in vitro a quantidade de ácidos nucleicos de duplo filamento nucleares dentro de uma célula que pode ser aplicada para detectar pelo menos uma célula cancerosa dentro de uma amostra biológica.

15 Em uma última etapa que foi designada acima como etapa e), decide-se sobre a presença ou provável ocorrência futura de câncer, dependendo do teor de DNA nuclear ou estado de ploidia das células sob exame. Esta última etapa será examinada em detalhes minuciosos após as duas formas de realização terem sido apresentadas.

20 Naturalmente, as explicações dadas acima quanto à determinação dos densitogramas para a célula cancerosa putativa e referência de densitogramas padrão, o significado dos termos tais como “in vitro”, “aproximadamente”, “ploidia”, “aneuploidia”, “peridiploidia”, “peritetraplóide”, “X-plóide”, “AUC” etc. igualmente aplicam-se no contexto do método de diagnóstico e/ou prevenção do câncer, de acordo com a
25 invenção.

O termo “in vitro” significa que todas as etapas do método acima de diagnóstico são realizadas sem contato direto com o corpo humano ou animal.

Forma de Realização 1 – Método de diagnostico

Em uma forma de realização exemplar a presente invenção refere-se a um método in vitro de diagnosticar e/ou prognosticar câncer em um indivíduo humano ou animal, que compreende as etapas de:

a) obter uma amostra biológica compreendendo pelo menos uma célula do indivíduo;

b) determinar in vitro a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita célula;

c) determinar in vitro a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo, como determinado em b), usando-se luz UV;

d) calcular pela absorbância de UV nuclear obtida na etapa c) o teor de DNA nuclear ou estado de ploidia de dita pelo menos uma célula e

e) decidir sobre a presença ou provável futura ocorrência de câncer, dependendo do teor de DNA nuclear ou estado de ploidia.

As etapas b) e c) podem ser realizadas como etapas a) e b) da forma de realização 1 acima descrita de determinar in vitro a quantidade de ácidos nucleicos de duplo filamento nucleares dentro de uma célula que pode preferivelmente ser aplicada para detectar pelo menos uma célula cancerosa dentro de uma amostra biológica.

Em uma forma de realização preferida destes aspectos da invenção, utiliza-se luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm para medir a absorbância de UV nas etapas a) e/ou b). Particularmente preferidos são os comprimentos de onda tais como aproximadamente 250 nm, 255 nm ou 260 nm.

A Etapa d) pode também ser realizada como descrito acima.

Em uma última etapa que foi designada cima como etapa e), decide-se sobre a presença ou provável ocorrência futura de câncer, dependendo do teor de DNA nuclear ou estado de ploidia das células sob exame.

Ao realizar este método de diagnóstico e/ou de prognosticar câncer, podem ser usados os mesmos procedimentos para isolar a amostra biológica, para preparar as amostras celulares, para contatar as células em questão possivelmente com um marcador fluorescente e para determinar as intensidades de sinal.

Assim, em uma forma de realização preferida utilizar-se-á microscópio de varredura laser confocal para identificar os limites do núcleo e medir a absorbância de UV nuclear. Para este fim, pode-se usar, p. ex., os instrumentos descritos acima.

Forma de Realização 2 – Método de diagnóstico

Em outra forma de realização exemplar, a presente invenção refere-se a um método in vitro de diagnosticar e/ou prognosticar câncer em um indivíduo humano ou animal, cujas etapas são:

a) obter uma amostra biológica do indivíduo;

b) contatar dita pelo menos uma célula com pelo menos um marcador fluorescente, que é capaz de interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento dentro de dita pelo menos uma célula fora do corpo do indivíduo;

c) determinar a intensidade de sinal de dito pelo menos um marcador fluorescente sendo ligado a ácidos nucleicos de duplo filamento com o sinal sendo obtido por excitação com uma fonte de luz adequada;

d) determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita pelo menos uma célula por microscopia de contraste de fase;

e) determinar a intensidade do sinal nuclear do marcador fluorescente sendo ligado aos ácidos nucleicos de duplo filamento nucleares, correlacionando-se a intensidade de sinal obtida em c) com a posição e/ou dimensões do núcleo obtido em d).

f) calcular pela intensidade do sinal nuclear obtida na etapa e) o teor de DNA nuclear ou estado de ploidia de dita pelo menos uma célula

g) decidir sobre a presença ou provável futura ocorrência de um câncer, dependendo do teor de DNA nuclear ou do estado de ploidia.

As etapas b) a e) podem ser realizadas como etapas a) a d) da Forma de Realização 2 acima descrita de determinar a quantidade de ácidos nucleicos de duplo filamento nucleares dentro de uma célula que podem preferivelmente ser aplicados para detectar pelo menos uma célula cancerosa dentro de uma amostra biológica.

A etapa f) pode também ser realizada como descrito acima.

Em uma última etapa que foi designada acima como etapa g), decide-se sobre a presença ou provável futura ocorrência de câncer, dependendo do teor de DNA nuclear ou estado de ploidia das células sobre exame.

Ao realizar este método de diagnóstico e/ou prognóstico de câncer, podem ser usados os mesmos procedimentos para isolar a amostra biológica, para preparar as amostras celulares, para contatar as células em questão com o marcador fluorescente, para determinar as intensidades de sinal, para realizar a microscopia de contraste de fase como resumido acima para o método para determinar a quantidade de ácidos nucleicos de duplo filamento dentro de um núcleo de célula.

Assim, o marcador fluorescente pode ser qualquer molécula que seja capaz de especificamente interagir com os ácidos nucleicos de duplo filamento e que forneça um sinal fluorescente na excitação com uma fonte de luz adequada.

Tais marcadores fluorescentes podem ligar-se, p. ex., aos maiores ou menores sulcos de DNA. Eles podem ser agentes de intercalação-base de ácido nucleico e podem ser selecionados do grupo compreendendo 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI), Iodeto de Propídio (PI) e brometo de Etídio (EtBr). Os marcadores fluorescentes também incluem SYBR green.

Uma pessoa hábil na técnica estará ciente de que a ordem de

etapas como examinado acima pode ser mudada. Assim, pode-se iniciar primeiro contatando-se e incubando-se a amostra com marcadores fluorescentes, realizando-se microscopia de contraste de fase e então determinando-se a intensidade do sinal de fluorescência. Em certas

5 circunstâncias, pode também ser possível, p. ex., realizar primeiro microscopia de contraste de fase, em seguida contatar e incubar a amostra com o marcador fluorescente e, finalmente, medir as intensidades do sinal de fluorescência.

Em uma forma de realização da invenção, o método para

10 diagnosticar e/ou prognosticar câncer em um indivíduo humano ou animal baseia-se em essência nas etapas acima mencionadas com a etapa d) precedendo as etapas b) a c) e etapa c) sendo seguida pelas etapas e), f) e g).

Método de diagnóstico – Avaliação

Nos métodos acima mencionados, na última etapa e) (ou g) no

15 caso da Forma de Realização 2) uma decisão é feita sobre a presença ou provável futura ocorrência de câncer.

Um diagnóstico de câncer pode sr considerado como positivo se o teor de DNA nuclear ou valores de ploidia, como determinado para as células da amostra biológica obtida do indivíduo, desviar-se em pelo menos

20 10% do teor de DNA nuclear ou valores de ploidia 2 (e 4, se a célula em seu estado normal estiver proliferando) de um tipo de célula comparável, para o qual a intensidade do sinal nuclear foi medido sob uma condição altamente comparável ou uma condição idêntica e que for sabido ser não-canceroso. Em uma forma de realização preferida, o desvio será de pelo menos 15%,

25 pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou pelo menos 50%.

As áreas sob a curva (AUC) dos picos sendo indicativas dos valores 2 e 4 de um densitograma padrão são admitidas como sendo indicativas de uma célula-não-cancerosa e quaisquer desvios das AUCs dos

correspondentes picos do densitograma da célula cancerosa putativa em pelo menos 10% serão considerados ser indicativos de uma célula cancerosa e, assim, resultará em um diagnóstico positivo. Em uma forma de realização preferida, o desvio será de pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou pelo menos 50%.

De acordo com a prática estabelecida, designar-se-á o teor de DNA de uma célula como peridiplóide se o pico correspondendo ao valor de pico 2 do densitograma de referência variar de 1,8 a 2,2.

O teor de DNA de uma célula será considerado ser peritetraplóide se o pico correspondendo ao valor de pico 4 do densitograma de referência variar de 3,6 a 4,4.

Quaisquer valores foras destas faixas serão considerados como X-plóide.

As células com valores peridiplóide, peritetraplóide e x-plóide serão considerados como células cancerosas para os fins da presente invenção e, portanto, um diagnóstico de câncer positivo será feito se o teor de DNA for considerado ser peridiplóide, peritetradiplóide ou X-plóide.

O método in vitro de diagnosticar e/ou prognosticar câncer pode ser usado para diagnosticar e/ou prognosticar um câncer selecionado do grupo compreendendo leucemia, linfoma, câncer do cérebro, câncer cerebrospinhal, câncer da bexiga, câncer da próstata, câncer da mama, câncer cervical, câncer do útero, câncer ovariano, câncer dos rins, câncer oral e da garganta, câncer esofágico, câncer do pulmão, câncer retal do cólon, câncer pancreático e melanoma.

O método para diagnosticar e/ou prognosticar câncer pode ser usado para analisar amostras selecionadas do grupo compreendendo células de medula óssea, células de linfonodo, linfócitos, eritrócitos, células neurais, células musculares, fibroblastos, ceratinócitos, amostras mucosas, amostras de sangue periférico, amostras de fluido cerebrospinhal, amostras de urina,

amostras de efusão, aspirados por agulha fina, biópsias de aspiração por agulha fina, raspagens de sangue periférico, raspagens de pele, esfregaços de células esfoliadas, preparações citocentrifugadas de fluidos corporais, espécime de separação de célula (após dispersões mecânicas e/ou enzimáticas), tecidos embutidos em parafina e seções congeladas.

A seguir, certos aspectos da invenção relativos às formas de realização acima descritas 1 e 2 são expostas especificamente:

Forma de Realização 1 – certos aspectos

1. Método de determina in vitro a quantidade de ácidos nucleicos nucleares em pelo menos uma célula estando presente em pelo menos uma amostra biológica, compreendendo as etapas de:

a) determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita célula in vitro,

b) medir in vitro a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo, como determinado em a), empregando-se UV.

2. Método de acordo com 1.,

em que a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita pelo menos uma célula são determinadas utilizando-se luz UV e/ou microscopia de contraste de fase.

3. Método de acordo com 1. ou 2.,

em que a luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm é usada na etapa a) e/ou b).

4. Método de acordo com 3.,

em que a luz UV de um comprimento de onda de aproximadamente 250 nm, 255 nm ou 260 nm é usada na etapa a) e/ou b).

5. Método de acordo com qualquer um dos números 1. a 4., em que os ácidos nucleicos nucleares não são visualizado com uma coloração imuno-histoquímica, uma reação química ou um marcador fluorescente.

6. Método de acordo com qualquer um dos números 1. a 5.,
em que o método é usado para detectar pelo menos uma célula
cancerosa putativa em dita pelo menos uma amostra biológica.

5 7. Método de acordo com qualquer um dos números 1. a 6.,
em que a pelo menos uma célula cancerosa é associada com
um câncer selecionado do grupo compreendendo leucemia, linfoma, câncer
do cérebro, câncer cerebrospectral, câncer da bexiga, câncer da próstata,
câncer da mama, câncer cervical, câncer do útero, câncer ovariano, câncer dos
rins, câncer oral e da garganta, câncer esofágico, câncer do pulmão, câncer
10 retal do cólon, câncer pancreático e melanoma.

8. Método de acordo com 6.,
em que a absorbância de UV nuclear da etapa b) é usada para
calcular o teor de DNA nuclear ou estado de ploidia da célula cancerosa
putativa, comparando-se a absorbância de UV nuclear obtida na etapa b) com
15 a absorbância de UV nuclear de pelo menos uma célula não-cancerosa, que
foi analisada também empregando-se as etapas a) e b) da reivindicação 1.

9. Método de acordo com 8.,
em que um desvio no estado de ploidia ou teor de DNA
nuclear de pelo menos 10% dos valores de 2 é indicativo de uma célula
20 cancerosa.

10. Método de acordo com 8.,
em que um estado de ploidia ou teor de DNA nuclear de 1.8 a
2.2 é indicativo de um estado peridiplóide, um estado de ploidia ou teor de
DNA nuclear de 3.6 a 4.4 é indicativo de um estado peritetraplóide e um
25 estado de ploidia ou teor de DNA nuclear fora destas faixas é indicativo de
um estado X-plóide.

Forma de Realização 2 – certos aspectos

1. Método para determinar a quantidade de ácidos nucleicos
nucleares de duplo filamento em pelo menos uma célula estando presente em

pelo menos uma amostra biológica, compreendendo as etapas de:

a) contatar dita pelo menos uma célula com pelo menos um marcador fluorescente, que é capaz de interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento dentro de dita pelo menos uma célula;

5 b) determinar a intensidade do sinal de dito pelo menos um marcador fluorescente sendo ligado a ácidos nucleicos de duplo filamento, com o sinal sendo obtido por excitação com uma fonte de luz adequada;

c) determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita pelo menos uma célula por microscopia de contraste de fase;

10 d) determinar a intensidade do sinal nuclear do marcador fluorescente estando ligado aos ácidos nucleicos nucleares de duplo filamento, correlacionando-se a intensidade de sinal obtida em b) com a posição e/ou dimensões do núcleo obtido em c).

2. Método de acordo com 1.,

15 em que o método é usado para detectar pelo menos um célula cancerosa putativa em dita pelo menos uma amostra biológica.

3. Método de acordo com 2.,

em que a intensidade do sinal nuclear obtida na etapa d) é usada para calcular o teor de DNA nuclear ou estado de ploidia da célula,
20 comparando-se a intensidade de sinal obtida na etapa d) com a intensidade do sinal nuclear de uma célula não-cancerosa, que foi obtida também empregando-se as etapas a) a d) da reivindicação 1.

4. Método de acordo com 1.,

em que o desvio do estado de ploidia ou teor de DNA nuclear
25 em pelo menos 10% dos valores de 2 ou 4 é indicativo de uma célula cancerosa.

5. Método de acordo com 4.,

em que um estado de ploidia ou teor de DNA nuclear de 1,8 a 2,2 é indicativo de um estado peridiplóide, um estado de ploidia ou teor de

DNA nuclear de 3,6 a 4,4 é indicativo de um estado tetradiplóide e um estado de ploidia ou teor de DNA nuclear fora destas faixas é indicativo de um estado X-plóide.

6. Método de acordo com 2.,

5 em que a pelo menos uma célula cancerosa é associada com um câncer selecionado do grupo compreendendo leucemia, linfoma, câncer do cérebro, câncer cerebrosespinhal, câncer de bexiga, câncer de próstata, câncer de mama, câncer cervical, câncer de útero, câncer ovariano, câncer dos rins, câncer oral e da garganta, câncer esofágico, câncer do pulmão, câncer
10 colo retal, câncer pancreático e melanoma.

7. Método de acordo com 1.,

em que a amostra biológica é selecionada do grupo compreendendo células da medula óssea, células de linfonodos, amostras mucosas, sangue periférico, fluido cerebrosespinhal, urina, efusões, aspirados
15 por agulha fina, raspagens de sangue periférico, raspagens de pele, tecidos embutidos em parafina e seções congeladas.

8. Método de acordo com 1., em que o marcador fluorescente é

selecionado do grupo compreendendo agentes ligando-se ao sulco maior ou menor de DNA, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Iodeto de Propídio (PI),
20 brometo de Etídio, SYBR green, SYTOX Blue, SYTOX Green, SYTOX Orange, POP-I, BOBO-I, YOYO-I, TOTO-I, JOJO-I, POPO-2, LOLO-I, BOBO-I, YOYO-3, TOTO-3, PO-PRO-I, BO-PRO-I, TO-PRO-I, JO-PRO-I, PO-PRO-3, LO-PRO-I, B0-PR0-3, Y0-PR0-3, T0-PR0-3, TO-PRO-5, coloração de ácido nucleico fluorescente azul SYTO 40, coloração de ácido
25 nucleico fluorescente azul SYTO 41, coloração de ácido nucleico fluorescente azul SYTO 42, coloração de ácido nucleico fluorescente azul SYTO 43, coloração de ácido nucleico fluorescente azul SYTO 44, coloração de ácido nucleico fluorescente azul SYTO 45, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 9, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde

SYTO 10, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 11, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 12, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 13, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 14, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 15, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 16, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 20, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 21, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 22, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 23, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 24, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 25, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 26, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO 27, coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO BC, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 80, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 81, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 82, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 83, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 84, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 85, coloração de ácido nucleico fluorescente-laranja SYTO 86, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 17, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 59, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 61, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 17, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 62, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 63, coloração de ácido nucleico fluorescente-vermelha SYTO 64, Homodímero de acridina, Acridina laranja, 7-AAD (7-amino-actinomicina D), Actinomicina D, ACMA, DAPI, Dihidroetídio, Brometo de Etídio, homodímero de Etídio-1 (EthD-1), Homodímero de Etídio-2 (EthD-2), Etídio monoazida, iodeto de iodeto de Hexídio, Hoechst 33258 (bis-benzimida), Hoechst 33342, Hoechst 34580, Hidroxistibamidina, LDS 751 e amarelo Nuclear.

9. Método de acordo com 1.,

em que o marcador fluorescente Brometo de Etídio é usado para detectar uma célula cancerosa que é associada com câncer epitelial oral em uma amostra biológica de biópsia por escova.

5 10. Método para diagnosticar e/ou prognosticar câncer em um indivíduo humano ou animal, compreendendo as etapas de:

a) obter uma amostra biológica do indivíduo;

b) contatar dita pelo menos uma célula com pelo menos um marcador fluorescente que seja capaz de interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento dentro de dita pelo menos uma célula fora do corpo do indivíduo;

c) determinar a intensidade do sinal de dito pelo menos um marcador fluorescente sendo ligado aos ácidos nucleicos de duplo filamento, com o sinal sendo obtido por excitação com uma fonte de luz adequada;

15 d) determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita pelo menos uma célula por microscopia de contraste de fase;

e) determinar a intensidade do sinal nuclear do marcador fluorescente sendo ligado aos ácidos nucleicos nucleares de duplo filamento, correlacionando-se a intensidade de sinal obtida em c) com a posição e/ou dimensões do núcleo obtido em d).

20 f) calcular pela intensidade do sinal nuclear obtida na etapa e) o estado de ploidia de dita pelo menos uma célula

decidindo sobre a presença ou provável ocorrência futura de um câncer dependendo do estado de ploidia.

25 A seguir, a invenção é ilustrada em vista de certos exemplos experimentais. Estes exemplos, entretanto, não se destinam de forma alguma a limitar a invenção quanto a seu escopo, porém sem dúvida servem para ilustrar a invenção por meio de algumas de suas formas de realização exemplares.

Experimentos

Experimento 1 – Medição da citometria de imagem de DNA em células semi-fixadas.

Em uma primeira etapa, uma amostra pode ser retirada, PESSOAL, via uma biópsia por escova (vide Fig. 3).

Em uma segunda etapa, as células são então eluídas da escova enxaguando-se a unidade de retirada de amostra com, p. ex., tampão fisiológico, tal como PBS pH 7,4.

Em uma terceira etapa, as células podem ser tornadas permeáveis para coloração pela adição de um detergente suave como Triton X-100. Para esta finalidade, pode-se, por exemplo, empregar um tampão compreendendo PBS pH 7,4, 0,05% (p/v) Triton X-100. No caso de uma abordagem de célula (semi)-fixada, a suspensão de célula pode ser aplicada a uma lâmina de microscopia e ser permitida secar para imobilização.

Na etapa seguinte, pode-se então realizar, p. ex., uma medição de fluorescência, iluminando-se as lâminas microscópicas com uma fonte de luz LEICA EL6000 emitindo comprimento de onda de 300 a 600 nm. Pode-se, por exemplo, usar uma fonte de 450 nm.

Varrendo-se através da célula pode-se determinar a posição do núcleo.

A absorbância de UV nuclear pode então ser registrada usando-se unidade de câmera Qimaging Retiga 2000R FASTCooled Mono 12-bit (www.quimaging.com).

Se esta absorbância de UV nuclear for comparada com o teor de DNA como obtido sob condições idênticas para uma célula que é sabida ser não-cancerosa, pode-se calcular o estado de ploidia das células sob exame e decidir se as células são prováveis desenvolver câncer ou não.

Experimento 2 – Medição de citometria de imagem DNA em células semi-fixadas.

Em uma primeira etapa, uma amostra pode ser retirada, por exemplo, via uma biópsia por escova (vide Fig. 3).

Em uma segunda etapa, as células são então eluídas da escova enxaguando-se a unidade de retirada de amostra com, p. ex., um tampão fisiológico, tal como PBS pH 7.4.

Em uma terceira etapa, as células podem ser tornadas permeáveis para coloração, pela adição de um detergente suave como Triton X-100. Para esta finalidade, pode-se, por exemplo, usar um tampão compreendendo PBS pH 7.4, 0,05% (p/v) Triton X-100. No caso de uma abordagem de célula (semi)-fixa, a suspensão celular pode ser aplicada a uma lâmina de microscopia e ser permitida secar para imobilização.

O DNA celular pode então ser colorido pela adição de um corante intercalador de fluorescência, tal como brometo de Etídio. Como este e muitos outros corantes fluorescentes têm uma fluorescência muito mais forte quando ligados ao DNA, pode não ser necessário retirar o corante livre por lavagem. Entretanto, a lavagem pode ser realizada se permitir melhorar a relação de sinal para fundo.

Na etapa seguinte, pode-se então realizar, p. ex., uma medição de fluorescência iluminando-se as lâminas microscópicas com uma fonte de luz LEICA EL6000 emitindo comprimento de onda de 300 a 600 nm. Pode-se, por exemplo, usar uma fonte de 488 nm (vide Fig. 6).

O sinal de fluorescência emitido pode então ser registrado usando-se uma câmera Qimaging Retiga 2000R FASTCooled Mono 12-bit (www.qimaging.com).

Em outra etapa, as mesmas amostras são então registradas sob microscopia de contraste de fase a fim de identificar a posição e/ou dimensões do núcleo (vide Fig. 7).

Em uma outra etapa, as imagens obtidas pela fluorescência e microscopia de contraste de fase são fundidas, de modo que somente o sinal

de fluorescência originando-se do núcleo é registrado (vide Fig. 7).

Se este sinal for comparado com o teor de DNA, como obtido sob idênticas condições para uma célula que é sabida não ser cancerosa, pode-se calcular o estado de ploidia das células sob exame e decidir se é provável as células desenvolver câncer ou não.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar in vitro a quantidade de ácidos nucleicos nucleares em pelo menos uma célula estando presente em pelo menos uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

c) determinar a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita célula in vitro,

d) medir in vitro a absorbância de UV dentro dos limites do núcleo, como determinado em a).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita pelo menos uma célula são determinadas utilizando-se luz UV e/ou microscopia de contraste de fase.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de a luz UV de um comprimento de onda entre aproximadamente 240 nm e aproximadamente 280 nm ser usada na etapa a) e/ou b).

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de a luz UV de um comprimento de onda de aproximadamente 250 nm, 255 nm ou 260 nm ser usada na etapa a) e/ou b).

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de dita pelo menos uma célula ser contatada com pelo menos um marcador fluorescente, que é capaz de interagir com ácidos nucleicos de duplo filamento dentro de dita pelo menos uma célula e de que a intensidade do sinal nuclear de dito pelo menos um marcador fluorescente sendo ligado aos ácidos nucleicos de duplo filamento ser determinada com o sinal sendo obtido por excitação com uma fonte de luz adequada.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de os ácidos nucleicos nucleares não serem visualizados com uma coloração imuno-histoquímica, uma reação química ou

um marcador fluorescente.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de ser usado para detectar pelo menos uma célula cancerosa putativa em dita pelo menos uma amostra biológica.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de dita pelo menos uma célula cancerosa ser associada com um câncer selecionado do grupo compreendendo leucemia, linfoma, câncer do cérebro, câncer cerebrosespinal, câncer da bexiga, câncer da próstata, câncer da mama, câncer cervical, câncer do útero, câncer ovariano, câncer dos rins, câncer oral e da garganta, câncer esofágico, câncer do pulmão, câncer retal do cólon, câncer pancreático e melanoma.

9. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de a absorbância de UV nuclear da etapa d) ser usada para calcular o teor de DNA nuclear ou estado de ploidia da célula cancerosa putativa, comparando-se a absorbância de UV nuclear obtida na etapa b) com a absorbância de UV nuclear de pelo menos uma célula não-cancerosa, que foi analisada também empregando-se as etapas a) e b) da reivindicação 1.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de um desvio do estado de ploidia ou teor de DNA nuclear em pelo menos 10% dos valores de 2 ser indicativo de uma célula cancerosa.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de um estado de ploidia ou teor de DNA nuclear de 1,8 a 2,2 ser indicativo de um estado de periploidia, um estado de ploidia ou um teor de DNA nuclear de 3,6 a 4,4 ser indicativo de um estado peritetraplóide e um estado de ploidia, ou um teor de DNA nuclear fora destas faixas ser indicativo de um estado X-plóide.

11. Método para diagnosticar e/ou prognosticar câncer em um indivíduo humano ou animal, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

a) prover uma amostra biológica compreendendo pelo menos uma célula de um indivíduo humano ou animal;

b) determinar in vitro a posição e/ou dimensões do núcleo dentro de dita célula;

5 c) determinar in vitro a absorvância de UV dentro dos limites do núcleo, como determinado em b);

d) calcular da absorvância de UV nuclear obtida na etapa c) o teor de DNA nuclear ou estado de ploidia de dita pelo menos uma célula, e

10 e) decidir sobre a presença ou provável ocorrência futura de câncer, dependendo do teor de DNA nuclear ou do estado de ploidia.

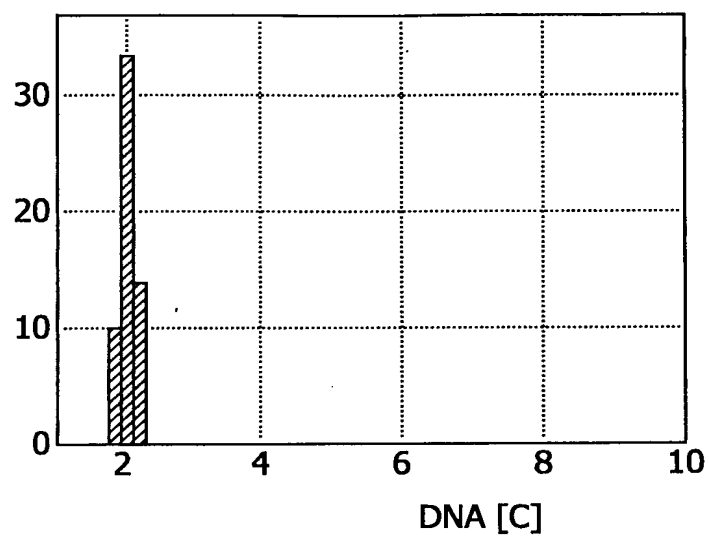


FIG. 1

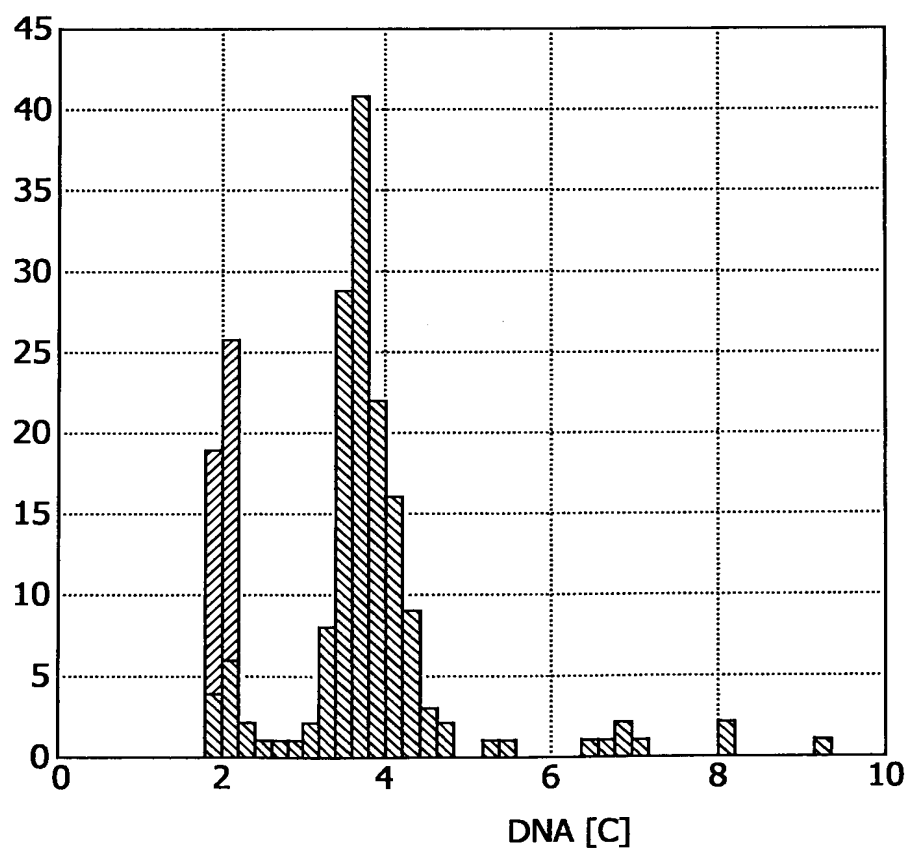


FIG. 2

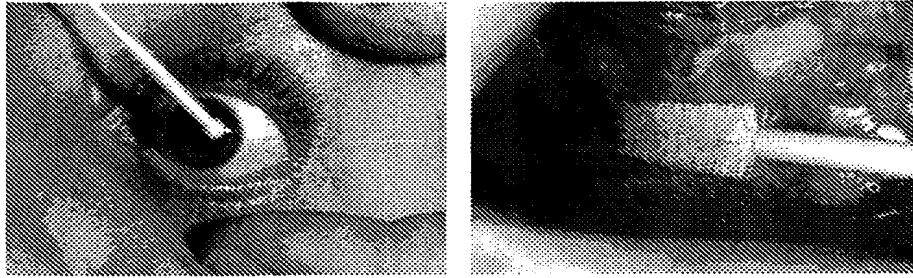


FIG. 3



FIG. 6

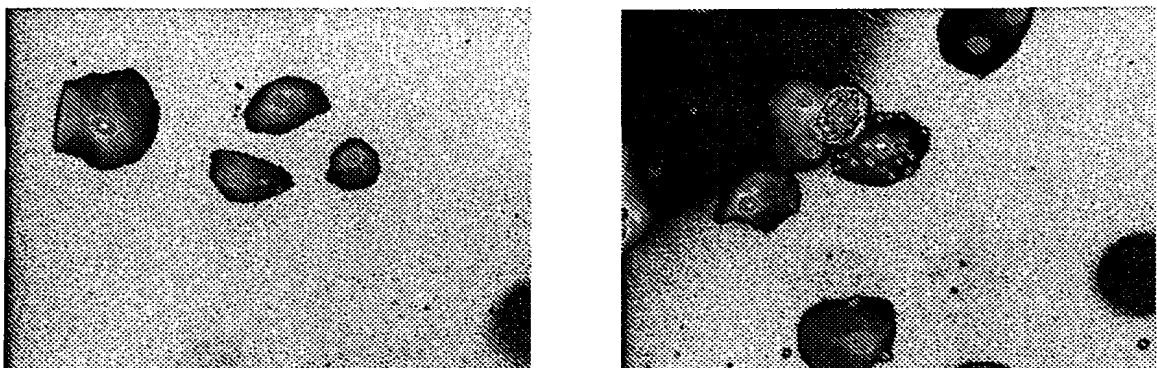


FIG. 7

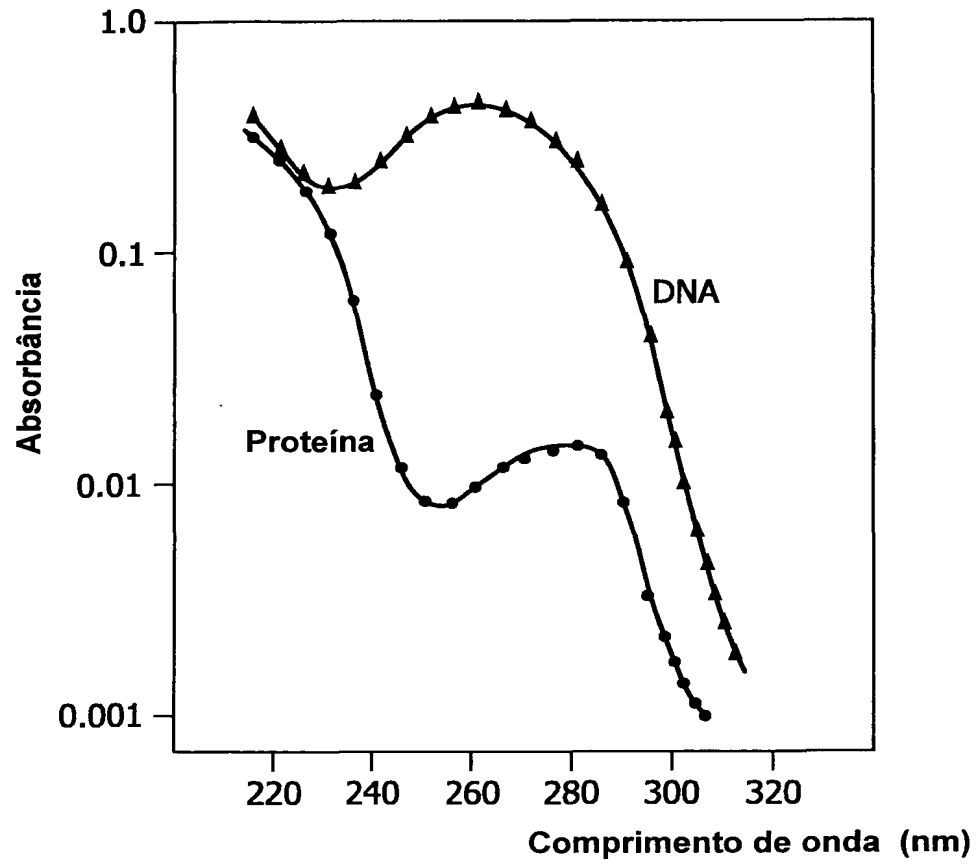


FIG. 4

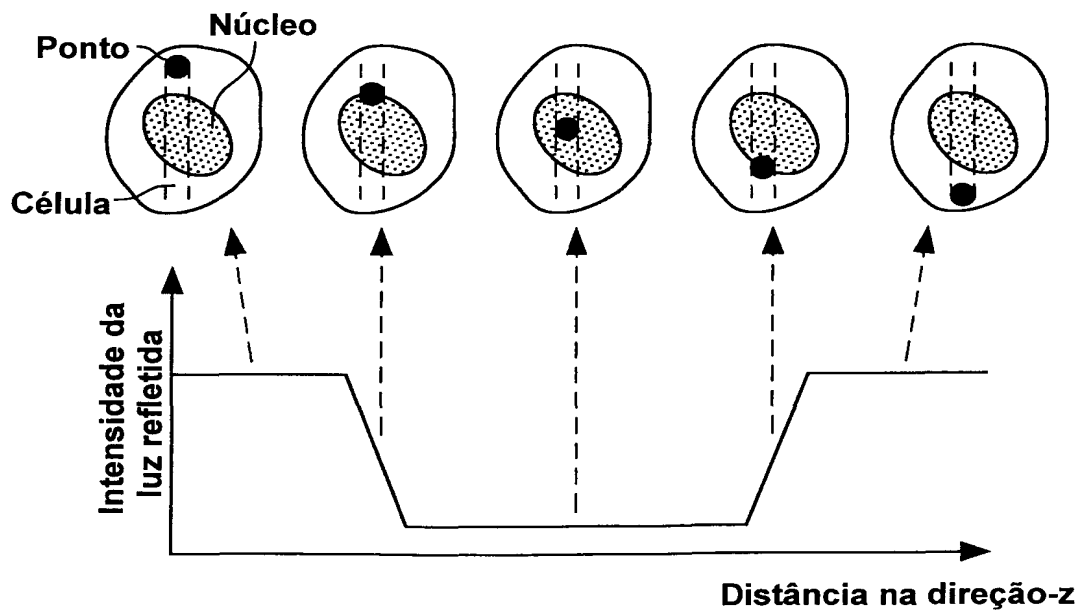


FIG. 5

RESUMO

“MÉTODOS PARA DETERMINAR IN VITRO A QUANTIDADE DE
ÁCIDOS NUCLEICOS NUCLEARES EM PELO MENOS UMA CÉLULA,
E PARA DIAGNOSTICAR E/OU PROGNOSTICAR CÂNCER EM UM
5 INDIVÍDUO HUMANO OU ANIMAL”

A invenção refere-se a um método para determinar in vitro a
quantidade de DNA nuclear dentro de uma célula humana ou animal,
empregando-se medição de absorção UV com luz UV. A invenção também
refere-se a um método para detectar in vitro células cancerosas em uma
10 amostra biológica com base nos princípios acima mencionados. A invenção
também se refere a um método in vitro de diagnosticar ou prognosticar a
ocorrência provável de câncer em um indivíduo humano ou animal.