

66 808

SKB CASE 14347

PATENTE Nº. 86 030



"Método para a detecção celular
in vivo"

para que
SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION,
pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

A presente invenção refere-se a métodos de detecção de células in vivo e de determinação in vivo da vida das células. Marcam-se as células com corante de cianina e faz-se a detecção por medição da fluorescência, absorvância ou por detecção das sondas de ressonância magnética nuclear incluídas nos corantes de cianina. Utilizando os métodos da presente invenção, determinam-se as vidas dos glóbulos vermelhos e das plaquetas. As células são também detectadas para determinar os locais de tumores metastáticos ou primários ou os locais de infecção oculta. Além disso, as velocidades a que as células passam nos vasos é utilizada para determinar a desobstrução dos vasos sanguíneos e a agregação das plaquetas.

-2-

MEMÓRIA DESCRITIVA

ENQUADRAMENTO DA INVENÇÃO

Domínio da Invenção

Esta invenção refere-se a métodos de detecção de células in vivo e métodos para determinar o tempo de vida das células in vivo.

Informação Anterior

A determinação do tempo de vida e a detecção celular in vivo requerem que as células sejam identificadas com um marcador que se mantenha estável na célula, i.e., que não saia da célula e que não afecte a sua função de modo significativo. Os marcadores presentemente disponíveis não possuem estas características necessárias. Os anticorpos fluorescentes, por exemplo, não são adequados porque se separam imediatamente da célula. Não se podem utilizar outros marcadores potenciais porque interferem com a função da célula.

Têm-se utilizado corantes de cianina em diversas aplicações biológicas. Os corantes de dioxacarbocianina têm sido utilizados na realização de contagens diferenciais de glóbulos brancos. Gunter Valet, Max Planck Ges Wissensch; Patent Accession Number 84-102307/17, Simultaneous Quantitative Determination of Blood Cells by Selective Staining and Measuring Volume and Fluorescent. Contudo, os corantes utilizados nestes estudos são corantes de carbocianina de cadeia curta (menos de dez átomos de carbono) e reagem a variações nos potenciais de membrana. Além disso, os corantes de carbocianina de cadeia curta penetram nas mitocôndrias da célula, são citotóxicos, e quando as células são lavadas estes corantes saem facilmente da célula quer o potencial da membrana celular seja ou não modificado. Utilizam-se outros corantes de cianina de cadeias curtas alifáticas em muitos outros testes biológicos. Contudo, as moléculas de cadeia curta reagem aos potenciais de membrana e atra



-3-

vessam a membrana da célula penetrando nas mitocôndrias. H. M. Shapiro, Patente americana nº. 4, 343, 782 de 10, Agosto, 1982. Os corantes de cadeia curta também são tóxicos para as células e não podem ser utilizados para detectar células in vivo.

Corantes de tricarbocianina (Fox, I. J., et al., Proc. Mayo Clinic, 32:478-484, 1957) e o corante azul de Evans (Schad, H., et al., Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol., 370(2):139-144, 1977) têm sido utilizados in vivo para avaliar o débito cardíaco por um método de diluição. Dow (Dow, P., Physiol. Rev., 36:77-102, 1956) descreve o método como uma injeção, de uma quantidade conhecida de um indicador intravascular, no lado venoso dos pulmões e medição do tempo decorrido para concentração arterial do indicador, para determinar o volume entre os pontos de injeção e de recolha de amostras. Não se utilizam estes corantes para corar as células.

Resumo da Invenção

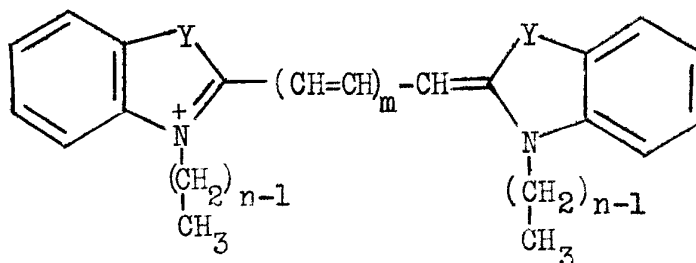
A presente invenção refere-se a novos processos para detectar células in vivo e para determinar o tempo de vida das células in vivo.

De acordo com os novos processos de detecção de células agora inventados, marcam-se primeiro as células com um corante de cianina, injectam-se num paciente e utiliza-se, então, o corante de cianina para localizar as células. Noutra concretização determina-se o tempo de vida das células pela medição da velocidade de desaparecimento das células marcadas.

Descrição da Invenção

Nos métodos de detecção de células in vivo e de determinação in vivo da vida das células a que se refere a presente invenção, marcam-se as células com corantes de cianina.

Os compostos aqui referidos como corantes de cianina têm a seguinte estrutura:



na qual:

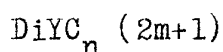
Y é oxigénio, enxofre, metileno ou metileno parcialmente substituído por alquilo;

m é 0-3; e

n é 12-22.

Aqui o metileno substituído por alquilo refere-se a metileno mono ou di-substituído que tenha qualquer combinação dos substituintes metilo, etilo ou propilo.

Os compostos da estrutura indicada são representados pela seguinte fórmula abreviada:



Sims, P. J. et al., Biochem, 13:3315 (1974). Assim, por exemplo, o composto em que Y é enxofre e que tem três átomos de carbono a ligar os anéis e duas cadeias alifáticas de carbono 14 é representado como $\text{DiSC}_{14} (3)$. De modo semelhante, $\text{DiIC}_{14} (5)$ indica o composto em que Y é isopropilo e que tem cinco átomos de carbono a ligar os anéis e duas cadeias alifáticas de carbono 14.

Incluídos nos compostos aqui referidos como corantes de cianina estão compostos da estrutura mencionada que tenham uma ou mais substituições desde que tais compostos substituídos sejam solúveis no meio de marcação da célula durante, pelo menos, o tempo necessário à marcação e tenham um coeficiente de partição da membrana suficientemente elevado para se manterem associados com as membranas das células marcadas. Estes compostos, nas concentrações necessárias à marcação, também não devem afectar de modo significativo a viabilidade da



-5-

célula. Determina-se a solubilidade no meio de marcação celular, tal como adiante se demonstra, disseminando um corante de cianina no meio de marcação e medindo a intensidade de fluorescência por meio de técnicas espectrofluorométricas padronizados. A diminuição da intensidade de fluorescência indica precipitação e aderência do corante às paredes dos vasos. Para determinar se os corantes se mantêm associados às membranas das células utilizam-se, por exemplo, processos citométricos em fluxo conhecido para controlar a intensidade de fluorescência dos glóbulos vermelhos injectados depois da marcação no animal dador. Fundamentalmente, a intensidade constante de fluorescência das células marcadas após injeção determina a estabilidade do corante nas membranas das células.

Também incluídos nos compostos aqui referidos como corantes de cianina estão compostos da estrutura indicada que têm um átomo que pode ser detectado por imagem de ressonância magnética. Preparam-se estes compostos utilizando técnicas conhecidas, por exemplo, por incorporação de um átomo de flúor num dos grupos metilo das cadeias alifáticas. Também são aqui referidos como corantes de cianina os compostos de estrutura já indicada marcados com um emissor gama como o ^{125}I .

Os corantes de cianina utilizados na presente invenção podem ser adquiridos a vários fornecedores tais como Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, e podem ser preparados a partir de substâncias iniciais disponíveis. Hamer, F. M., The Cyanine Dyes and Related Compounds, Interscience Publishers (1964).

Utilizando os processos inventados qualquer célula viável pode ser marcada com corantes de cianina. Aqui, o termo célula inclui células encariótas nucleadas tais como glóbulos brancos, vários células tumorais, outras células de mamíferos (por exemplo células de tecido cultivado de ovários de criceto da China), levedura; e células não nucleadas como os glóbulos vermelhos e as plaquetas. Uma célula nucleada é viável se é essencialmente capaz de crescer ou funcionar como se espera das células do seu tipo; uma célula não-nucleada

-6-

é viável se é capaz de desempenhar as funções que dela se esperam, por exemplo um glóbulo vermelho viável é capaz de transportar oxigénio e dióxido de carbono; e as plaquetas viáveis actuam essencialmente como se espera nos ensaios de, por exemplo, agregação e libertação.

A marcação das células é realizada num meio não-letal para as células e que proporciona a marcação reproduzível de células. Para dar ao meio as características necessárias utilizam-se agentes de regulação de osmolaridade com os quais os corantes de cianina formam soluções estáveis durante, pelo menos, o tempo necessário à marcação. Os agentes de regulação de osmolaridade aceitáveis incluem agentes tais como os açúcares, por exemplo monossacáridos como a glicose, frutose, sorbose, xilose, ribose, e dissacáridos como a sacarose, açúcar-álcoois, tais como manitol, glicerol, inositol, xilitol, e adonitol, aminoácidos tais como a glicina e arginina e alguns tampões de Good tais como ácido N-tris-hidroximetil)-metil-3-aminopropanossulfónico. Good, N. E., et al., Biochem, 15, 467-477 (1966), e S. Izawa, Methods Enzymol., 24, Parte B, 53 (1968), Ferguson, W. J., et al., Anal. Biochem. 104:301-310 (1980). Contudo, algumas linhas de células podem ser sensíveis a um ou mais agentes de regulação da osmolaridade, especialmente aos açúcar-álcoois. Assim, antes da marcação, efectuam-se testes padronizados para certificar que as células são viáveis no agente de regulação de osmolaridade que se pretende utilizar. Como complemento, podem juntar-se pequenas quantidades de agentes tampão ao meio de marcação para regular a concentração iónica do hidrogénio.

Determinou-se o efeito da exposição a uma variedade de agentes de regulação da osmolaridade sobre a viabilidade das células pela medição do tempo de duplicação das células Yac, depois de as células terem sido expostas durante 30 minutos a uma variedade de agentes de regulação de osmolaridade. As células Yac são uma linha de células de cultura de tecido de linfoma de rato disponíveis no American Type Culture Collection,

-7-

Rockville, Maryland, e descritas no European Journal of Immunology 5:112-117 (1975). Como demonstram os dados apresentados na tabela 1, quando comparada com a exposição a solução salina tamponada com fosfato, a exposição à sacarose, glicose e aos tampões de Good: TAPS, CAPS, EPPS, HEPPSO, e DIPSO mostrou efeitos sem importância sobre o tempo de duplicação da célula o que indica ausência de toxicidade celular relacionada com a exposição.

-8-

Tabela 1

<u>Agente de Regulação da Osmolaridade</u>	<u>Tempo de Duplicação (Horas)</u>
Solução salina tamponada com fosfato	31,0
Sacarose	41,0
Glicose	34,5
TAPS	32,7
CAPS	45,8
EPPS	32,2
HEPPSO	23,4
DIPSO	36,7
Ácido 3-amino-1-propanossulfônico	99,6
Ácido 3-(N-morfolino)propanossul- fônico de sódio (MOPS)	A
2-amino-2-metil-1,3-propanodiol	B
2-amino-2-metil-1-propanol	B

A- Sem crescimento ou parcialmente citotóxico
B- Bastante citotóxico

-9-

Tabela 1 (Continuação)

<u>Agente de Regulação da Osmolaridade</u>	<u>Tempo de Duplicação (Horas)</u>
Ácido N-tris (hidroximetil) metilaminoetanossulfônico (TES)	B
Ácido N,N-bis (2-hidroxietil)- -2-aminoetanossulfônico (BES)	A
Ácido 3-(ciclo-hexilamino)-2-hidroxi- -1-propanossulfônico (CAPSO)	A
Trietanoamina	B
Tris(hidroximetil)aminometano (TRISMA)	B
Bis-tris-propano	B
2-(N-morfolino)	
Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico(MES)	B
N,N-bis(2-hidroxietil)glicina(BICINE)	57,7
3-[-3-Colamidopropil)dimetilamônio]- -1-propanossulfonato (CHAPS)	B
Ácido 3-[- N-tris(hidroximetil)metil- amino]-2-hidroxiopropanossulfônico (TAPSO)	63,6

A- Sem crescimento ou parcialmente citotóxico

B- Bastante citotóxico

Tabela 1 (Continuação)

<u>Agente de Regulação da Osmolaridade</u>	<u>Tempo de Duplicação (Horas)</u>
Ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxiopropanossulfônico (MOPSO)	178,4
Ácido 2-[(2-amino-2-oxoetil)amino]etanossulfônico	1038,4
Bis (2-hidroxietil) imino-tris-(hidroximetil-metano (BIS-TRIS)	A
Ácido 2-(N-ciclo-hexilamino)etanossulfônico (CHES)	51,5
N-tris-(hidroximetil)metilglicina (TRICINE)	A
Glicosamina	288,4
Imidazol	B
Glicilglicina	66,9

A- Sem crescimento ou parcialmente citotóxico

B- Bastante citotóxico



-11-

A Tabela II apresenta vários agentes de regulação da osmolaridade que foram examinados em relação à solubilidade do corante de cianina. Fizeram-se todas as medições de concentração após remoção dos precipitados por centrifugação e dissolveram-se em etanol pequenas alíquotas de agentes de regulação de osmolaridade contendo corantes de cianina para análise espectrofluorométrica. Os corantes utilizados foram $\text{DiSC}_{14}(5)$ e $\text{DiOC}_{14}(3)$, e os agentes de osmolaridade estavam em concentrações isosmóticas. Reduções na intensidade da fluorescência da solução de etanol correspondiam directamente a reduções na solubilidade do corante de cianina.

-12-

Tabela IIIntensidade de Fluores-
cência Relativa (CONC)

<u>Agente de Regulação da Osmolaridade</u>	<u>DiSC₁₄(5)</u>	<u>DiOC₁₄(3)</u>
Etanol	100	100
Glicose	31	100
Frutose	35	100
Sorbose	40	100
Sacarose	41	100
Xilose	36	19-52
Ribose	24	100
Lixose	0,12	1,8
Glicina	31	93
Arginina	17	17,2
Glicerol	39	99,5
Inositol	42	92
Xilitol	34	76,4
Manitol	29	*
Adonitol	34	ND
Ácido tris (hidroximetil)-metil- -aminopropanossulfônico (TAPS)	18	ND

* Precipitado em etanol, não se obtiveram dados

** Artefacto devido a grandes cristais que não pelletizaram

***Precipitado em etanol (dados questionáveis).

ND-Não determinado

Tabela II (Continuação)

<u>Agente de Regulação da Osmolaridade</u>	<u>Intensidade de Fluorescência</u> <u>Relativa (CONC.)</u>	
	<u>DiSC₁₄(5)</u>	<u>DiOC₁₄(3)</u>
Ácido 3-(ciclo-hexilamino)-1- -propanossulfônico (CAPS)	40	ND
Ácido N-(2-hidroxietil)pipera- zina-N'-3-propanossulfônico (EPPS)	18	ND
Ácido N-2-hidroxietilpiperazina- -N'-2-hidroxiopropanossulfônico (HEPPSO)	20	ND
Ácido 3-[N-N-bis (2-hidroxietil) amino]-2-hidroxiopropanossulfônico	43***	ND
NaCl	6	1,7
Solução Salina Tamponada com Fosfato	2,1	6,5
Na ₂ SO ₄	7,4	1,6
NaI	1,1	0,14
Cloreto de Colina	11**	6,3
Iodeto de Colina	0,16	2,3

* Precipitado em etanol, não se obtiveram dados

** Artefacto devido a grandes cristais que não pelotizaram

*** Precipitado em etanol (dados questionáveis)

ND- Não determinado

-14-

Como se pode observar os corantes de cianina são muito menos solúveis em presença de sais clássicos do que na presença de açúcares, excepto a lixose, açúcar-álcoois, aminoácidos e os tampões de Good, TAPS, HEPPSO, DIPSO, CAPS e EPPS. Adicionalmente, determinou-se a estabilidade de soluções DiSC₁₄(5) em açúcares como a glicose, frutose, ribose, sorbose, sacarose, e xilose, açúcar-álcoois tais como glicerol, inositol, xilitol, e adonitol, e aminoácidos como a glicina e a arginina. A cianina foi estável nas soluções testadas durante pelo menos vinte minutos, o que é tempo suficiente para a marcação reproduzível, e em muitos agentes a quantidade de corante de cianina na solução não teve decréscimo significativo aos sessenta minutos.

Avaliou-se ainda a solubilidade dos corantes de cianina num meio contendo sais clássicos e reguladores de osmolaridade em que os corantes são solúveis. A solubilidade de DiSC₁₄(5) numa solução de glicose isosmótica não foi significativamente afectada pela diluição em água destilada. No entanto, a solubilidade de DiSC₁₄(5) em solução de glicose isosmótica foi significativamente reduzida pela diluição em apenas 20% aproximadamente numa solução de cloreto de sódio isosmótica. Assim, a marcação reproduzível de células com corantes de cianina pode ser realizado num meio que contenha não mais do que pequenas quantidades de sais clássicos tais como cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, acetato de sódio, sulfato de potássio, cloreto de colina, ou iodeto de colina e é, preferivelmente, realizada num meio em que não se utilizem sais clássicos para regular a osmolaridade.

Utilizando o processo agora inventado analisaram-se células marcadas com corante de cianina para determinar o efeito da marcação na viabilidade das células. Marcaram-se células V79, que estão disponíveis na American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, e descritos em Prescott D. M., Ann. New York Acad. Sci., 397:101-109 (1982), com uma solução contendo DiOC₁₄(3) numa concentração de 10^{-5} ou 4×10^{-5} M e

-15-

o crescimento cinético das células coradas foi comparado com o das células não-coradas e em mistura igual de células coradas e não-coradas. O tempo de duplicação das células não foi afectado pela marcação com corante de cianina. Assim, a marcação não teve qualquer efeito no crescimento das células. Também vários outros testes de viabilidade de células padronizados, como a exclusão com azul de tripano e a exclusão com iodeto de propídio confirmaram a ausência de efeitos sobre a viabilidade das células, da marcação com corantes de cianina de acordo com os processos descritos.

Também se determinou o efeito da marcação com corante de cianina na viabilidade da célula pela medição da fragilidade dos glóbulos vermelhos. Puseram-se glóbulos vermelhos marcados e não-marcados em suspensão num meio de cloreto de sódio com várias pressões osmóticas por variação da concentração de sal. Mediram-se as distribuições de volume das células utilizando um Coulter Counter[®] com um acessório classificador. Determinaram-se e registaram-se os volumes médios por cada concentração de sal, e aumentaram-se os volumes à medida que a concentração de cloreto de sódio diminuía até cerca de 0,5 g/100 ml, altura em que o volume apresenta uma queda brusca. Neste ponto dá-se a lise dos glóbulos vermelhos. Além disso as variações de volume foram as mesmas quer as células estivessem ou não marcadas com corante de cianina. Da mesma forma, controlou-se a hemólise em amostras semelhantes como uma função da concentração do cloreto de sódio. Depois de se colocarem os glóbulos vermelhos no cloreto de sódio durante aproximadamente 2-3 minutos, centrifugaram-se as soluções para pelotizar quaisquer células em que a lise não se tenha dado. Submeteram-se então as soluções sobrenadantes a análises espectrofotométricas para determinar as concentrações de hemoglobina. Determinou-se a percentagem da lise por comparação de concentração de hemoglobina em cada amostra com um controlo totalmente lisado. A concentração de hemoglobina livre era relativamente baixa até ser alcançada a de 0,5 gramas de clo-

reto de sódio/100 ml, aproximadamente, e aqui a hemoglobina foi libertada de imediato. Por comparação com os resultados da fragilidade dos glóbulos vermelhos, as alterações de volume foram directamente correlacionadas com a libertação da hemoglobina. Além disso, a libertação de hemoglobina foi a mesma em células marcadas ou não-marcadas.

Para testar in vivo a estabilidade das células marcadas com corantes de cianina de acordo com o método agora inventado, recolheram-se glóbulos vermelhos de coelho, marcaram-se com $\text{DiSC}_{14}(5)$ e reinjectaram-se. Depois, periodicamente, obtiveram-se amostras de sangue e analisaram-se para percentagem de células marcadas e intensidade de fluorescência das células marcadas. O número de glóbulos vermelhos em circulação diminui linearmente em função do tempo e o número medido aos 52 dias de vida das células marcadas relacionaram-se estritamente com a média de tempo de vida de 40 a 60 dias dos glóbulos vermelhos de coelho. Assim, o corante de cianina não afecta a taxa de eliminação dos glóbulos vermelhos.

Em todos, excepto num dos cinco coelhos testados, a intensidade de fluorescência das células coradas permaneceu, essencialmente, imutável durante 60 dias após a marcação e reinjecção. No quinto animal, não mais do que 20% do corante de cianina migrou das células marcadas, após 60 dias em circulação no coelho. Estes dados associados com os dados da cultura de tecidos que mostram não haver transferência de corante de células marcadas para células não-marcadas, demonstram que as células são marcadas com corantes de cianina de um modo estável.

Utilizam-se células viáveis marcadas com corantes de cianina em pacientes mamíferos incluindo seres humanos, para a detecção celular in vivo e análise do tempo de vida das células in vivo a que se refere a presente invenção. A detecção celular in vivo aqui utilizada inclui a determinação da localização das células no corpo do paciente e a medição da velocidade a que as células passam num certo ponto, por exemplo,

-17-

a velocidade a que as células fluem num vaso sanguíneo.

Determina-se o tempo de vida dos glóbulos vermelhos transfundidos incluindo na transfusão uma alíquota de glóbulos vermelhos marcados com corante de cianina. Imediatamente a seguir à transfusão faz-se a determinação da fracção de glóbulos vermelhos na circulação sistemática utilizando técnicas padronizadas. Utilizam-se as determinações subsequentes da percentagem de células marcadas para calcular o tempo de vida das células transfundidas. Posteriormente, distingue-se a hemorragia pós-transfusão da reacção imunológica pela comparação das variações na fracção das células marcadas com as variações no hematócrito. Taxas equivalentes de reduções de células aeróbias e da percentagem das células marcadas indicam perda de sangue causada por hemorragia enquanto que, comparativamente, índices elevados de redução nas contagens das células marcadas indicam uma reacção imunológica às células transfundidas. Para evitar a autofluorescência e a auto-extinção pela hemoglobina, marcam-se os glóbulos vermelhos de preferência com um corante de cianina que seja estimulado dentro dos comprimentos de onda do vermelho e que emita mais ao vermelho do que os comprimentos de onda do estímulo da hemoglobina. $\text{DiC}_{14}^{(5)}$ e $\text{DiSC}_{14}^{(3)}$ incluem-se nos exemplos de tais corantes.

Empregando técnicas semelhantes às utilizadas com os glóbulos vermelhos, fazem-se medições in vivo do tempo de vida das plaquetas e distinções entre hemorragia e reacção imunológica causadoras da trombocitopenia. Uma vez que as plaquetas necessitam de moléculas que absorvam ou emitam luz nos comprimentos de onda utilizados, utiliza-se, contudo, uma variedade maior de corantes de cianina em medições de plaquetas. Essas medições do tempo de vida das plaquetas são utilizadas para distinguir hemorragias pós-transfusão das reacções imunológicas, empregando-se a metodologia anteriormente descrita para os glóbulos vermelhos, e para diagnosticar a aterosclerose ou outras doenças em que o tempo de vida das plaquetas do paciente afectado difira do dos pacientes não-afectados pela

-18-

doença. Adicionalmente, utilizam-se os métodos descritos para determinar o tempo de vida de outras células, incluindo glóbulos brancos.

Nas análises de detecção celular *in vivo*, marcam-se as células com corantes de cianina que sejam externamente detectáveis. Estes corantes externamente detectáveis incluem corantes de cianina tal como o $\text{DiOC}_7(3)$ marcado com ^{125}I . Também se pode realizar a detecção de células utilizando corantes de cianina que tenham uma sonda de ressonância magnética nuclear permitindo, assim, a utilização da imagem de ressonância magnética nuclear para localizar as células marcadas. Adicionalmente, utiliza-se a fluorescência dos corantes de cianina para detectar células em áreas do corpo visíveis do exterior do corpo. É muito vulgar a utilização da fluorescência para detectar células na mácula, retina e vasos sanguíneos do olho. As utilizações da detecção das células *in vivo*, tal como descritas nos exemplos que se seguem, incluem a detecção de malignizações primárias e células malignas metastáticas, detecção de focos de infecção, visualização de constricções arteriais e determinação da rejeição de transplante.

Os exemplos que se seguem ilustram a presente invenção e não pretendem limitar o seu âmbito anteriormente descrito e mais adiante reivindicado.

EXEMPLO 1

Método para corar Células de Cultura de Tecidos

I. Preparação das Células

Utilizam-se células de cultura de tecidos em fase logarítmica para se obter melhores resultados. Retiram-se as culturas em suspensão dos vasos de cultura e colocam-se em tubos de centrífugador em propileno. Quando se utilizam culturas em monocamadas, devem retirar-se os sobrenadantes e lavar as células aderentes com uma solução salina temponada com fosfato livre de magnésio e cálcio para remover as proteínas de soro do frasco. Adiciona-se uma solução de Tripsina-EDTA

(Gibco Laboratories, Grand Island, New York, # 610-5300) para cobrir o fundo do frasco e pode incubar-se à temperatura ambiente até que a monocamada de células seja desalojada e desagregada. Transfere-se a suspensão de células resultante para um tubo de centrifugador em polipropileno e adiciona-se um volume igual ao do meio de cultura contendo 10% de Soro Fetal de Bovino (FBS) (Hazelton) para fixar a acção enzimática da tripsina. Centrifugam-se as células a 400 xg durante 10 minutos à temperatura ambiente. Aspiram-se os sobrenadantes e repõe-se um volume igual de manitol isosmótico para se colocar de novo em suspensão as células pelotizadas. Esta lavagem com manitol serve para retirar as proteínas de plasma da suspensão de células e preparar as células para corar. Centrifugam-se as células mais uma vez a 400 xg durante 10 minutos à temperatura ambiente. Aspiram-se os sobrenadantes e a pelota de células resultante é de novo colocada em suspensão numa solução de manitol numa concentração de 2×10^6 células/ml para coloração. Contudo, alguns tipos de células são sensíveis à utilização de um açúcar-álcool (manitol); nestes casos deve utilizar-se uma solução de glicose isosmótica (PM 180,16, 54,05 g/l).

II. Preparação de solução de corantes concentrados

Preparam-se soluções concentradas de 2×10^{-3} M em etanol puro do seguinte modo:

DiO-C ₁₄ (3)	PM 800	(1,600 mg/ml)
DiS-C ₁₄ (5)	PM 814	(1,628 mg/ml)
DiO-C ₁₈ (3)	PM 936	(1,872 mg/ml)
DiI-C ₁₄ (5)	PM 850	(1,700 mg/ml)

Todos os corantes foram obtidos na Molecular Probes, Eugene, Oregon.

Os concentrados de corante são submetidos a sonicação para assegurar a completa solubilidade do corante e minimizar a aderência aos tubos. Utilizam-se tubos de poliestireno na

-20-

preparação de soluções concentradas para que se possa observar a solubilidade do corante. No entanto, utilizam-se tubos de polipropileno para corar as células pois os corantes de cianina em meio aquoso são muito menos aderentes ao propileno do que ao poliestireno.

III. Coloração das células

Ajusta-se o número de células para uma concentração de 2×10^6 células/ml em manitol isosmótico. Adiciona-se uma solução de corante concentrado às soluções corantes com $5 \mu\text{l}$ de corante para 1 ml de suspensão de células. A amostra para corar é colocada em pipeta ou em rotação para misturar completamente a amostra. Colocam-se as células com corante em incubação durante 10 minutos, após o que se retira uma pequena alíquota para se examinar ao microscópio e verificar se se deu uma coloração intensa e uniforme. As séries de corante DiO utilizam filtros de microscópio de luz de estímulo selectiva em 488 nm, enquanto que as séries de corante DiS e DiI requerem estímulo perto dos 575 nm para observação da fluorescência.

Após o período de incubação adiciona-se à suspensão de células coradas um volume igual de PBS. Centrifugam-se as células a 400 xg durante dez minutos a 20°C. Aspira-se o sobrenadante e a colheita é colocada de novo em suspensão em PBS. Repete-se o processo de centrifugação e observa-se a presença de corante no sobrenadante resultante. Se o corante aparece no sobrenadante repete-se a lavagem até que os sobrenadantes estejam isentos de corantes libertos quando medidos por espectrofluorometria. Após a lavagem final, retira-se o sobrenadante e coloca-se a pelota de novo em suspensão à concentração desejada num meio de cultura apropriado. Todos os processos são realizados em condições de esterilidade.

EXEMPLO 2

Coloração de Glóbulos Vermelhos

I. Preparação do Reagente

-21-

A. Anticoagulante de citrato

1,66 g	Citrato de Sódio
0,206 g	Ácido Cítrico
0,140 g	NaH_2PO_4
1,61 g	Glicose

Dissolvem-se os componentes listados em 63 ml de água destilada e ajusta-se o pH da solução a 5,6. Passa-se a solução final por um filtro de 0,22 micron para esterilização.

B. Solução de Glicose isosmótica

Dissolve-se a glicose (54,05 g) num litro de água destilada. Verifica-se a osmolaridade utilizando um osmómetro de Fiske e ajusta-se a 320 mOsm, se necessário.

II. Preparação de corante concentrado

Prepara-se uma solução concentrada de $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ $\text{DiIC}_{14}(5)$ dissolvendo 1,628 mg/ml de corante em etanol puro. Pode ser necessário sonicação para solubilizar completamente o corante.

III. Processo de Coloração

Recolhe-se, assepticamente, sangue completo utilizando recipientes de vácuo contendo citrato de sódio ou uma seringa com anticoagulante de citrato preparado numa quantidade igual a um décimo do volume total da seringa. Reserva-se uma pequena alíquota para citometria do fluxo ou para testar a funcionalidade. Centrifuga-se o sangue a 100 xg durante dez minutos à temperatura ambiente para pelotizar os glóbulos vermelhos. Retira-se o plasma que contém plaquetas e reserva-se; lavam-se os glóbulos vermelhos por adição de glicose isosmótica numa quantidade igual a cinco vezes o volume da pelota de glóbulos vermelhos. Devem centrifugar-se, de novo, as células a 100 xg durante dez minutos à temperatura ambiente e aspirar as sobrenadantes. Repete-se mais uma vez esta lavagem que retira as proteínas do plasma e permite uma coloração mais inten

sa e uniforme. Após a centrifugação final e a aspiração do sobrenadante colocam-se, de novo, os glóbulos vermelhos em suspensão em glicose isosmótica numa concentração de 4×10^8 células/ml.

Antes da adição do corante, a amostra é colocada pipetada ou vortexada para se assegurar que não se deu sedimentação. Adicionam-se quinze microlitros de $\text{DiSC}_{14}(5)$ concentrado (2mM em ETOH) a cada mililitro da suspensão de glóbulos vermelhos. Mistura-se imediatamente a amostra para assegurar a distribuição rápida e uniforme do corante na solução. Após aproximadamente cinco minutos retira-se uma pequena alíquota para observação microscópica. Desenha-se um anel numa lamela de microscópio em vidro utilizando um lápis de cera e coloca-se dentro do anel de cera uma pequena amostra de células em solução colorante. Põe-se uma protecção sobre a lamela e observa-se a amostra. A utilização do anel de cera diminui a transformação discócito-equinócito devida à lamela de vidro e sua protecção. Pode também evitar-se esta transformação com a utilização de lamelas e respectivas protecções em plástico. Pode, assim, assegurar-se que a estrutura dos glóbulos vermelhos se mantém durante todo o processo de coloração enquanto se assegura que se deu a coloração intensa e uniforme. As células devem estar uniformemente coradas após cinco minutos e não devem ser necessários tempos de exposição para além de dez minutos. Depois de se determinar que as células foram uniformemente coradas, adiciona-se à suspensão de coloração um volume igual de uma solução salina tamponada com fosfato. Centrifugam-se as células a 400 xg durante dez minutos à temperatura ambiente e retira-se o sobrenadante. Depois da centrifugação há, geralmente, vestígios de corante libertado presente de modo visível nos sobrenadantes e por isso deve repetir-se o processo de lavagem utilizando uma solução salina tamponada com fosfato contendo cálcio e magnésio até que os sobrenadantes estejam isentos de corante libertado quando medidos por espectrofluorometria.

-23-

Neste ponto podem pôr-se as células em suspensão tanto numa solução apropriada à experimentação como em plasma pobre em plaquetas para reinjecção num animal receptor.

O método comum para a reinjecção é o de colocar os glóbulos vermelhos corados de novo em suspensão no volume de plasma recuperado da primeira centrifugação do sangue completo colhido e que foi centrifugado a 4000xg para remoção das plaquetas. Utilizaram-se técnicas de esterilização em todos os processos realizados.

EXEMPLO 3

Coloração de Plaquetas

I. Preparação das células

Recolhe-se sangue completo em recipientes de vácuo contendo citrato de sódio ou em seringas com anticoagulante de citrato de sódio preparado numa quantidade igual a um décimo do total do volume da seringa. Centrifugam-se as células a 100 xg por dez minutos à temperatura ambiente para obter plasma rico em plaquetas. Utilizam-se pipetas de plástico e tubos de centrifugador em polipropileno em todos os processos que envolvam plaquetas para evitar a activação.

Aspira-se o plasma rico em plaquetas e transfere-se para outro tubo de centrifugador. Pelotizam-se, então, as plaquetas directamente do plasma por centrifugação a 1000 xg durante dez minutos a 20°C. Então, recolhe-se e reserva-se o plasma quer para testar a funcionalidade quer para utilização como meio de suspensão para reinjecção. Deve centrifugar-se este plasma a 4000 xg durante dez minutos para assegurar que sejam retiradas quaisquer plaquetas residuais antes de ser utilizado como meio de segunda suspensão, e é referido como plasma pobre em plaquetas (PPP).

A colheita de plaquetas obtida da centrifugação a 1000 xg deve ser ressuspense cuidadosamente, num pequeno volume de anticoagulante de citrato para obter uma suspensão uniforme concentrada. Depois de se alcançar esta fase pode

juntar-se glicose isosmótica como diluente, numa quantidade igual à do plasma originalmente presente. Centrifugam-se, então, as plaquetas a 300 xg durante cinco minutos e aspiram-se os sobrenadantes. Esta lavagem em glicose retira as proteínas do plasma residual e proporciona uma coloração uniforme e mais intensa. Ressuspende-se a pelota de plaquetas na solução de glicose e está agora pronta para a coloração.

Ajusta-se a concentração de plaquetas a 4×10^8 de células/ml e adicionam-se 15 μ l de $\text{DiOC}_2(3)$ concentrado (2mM em ETOH puro) por cada mililitro de suspensão de plaquetas. Mistura-se imediatamente a suspensão mas com cuidado e por completo para assegurar a distribuição regular do corante. Observam-se as plaquetas utilizando um microscópio de fluorescência para confirmar se a coloração uniforme se deu e, em caso afirmativo, estão, então, prontas para a separação do corante livre em suspensão.

II. Utilização da Coluna de Sephadex G-100 para Separação das Plaquetas marcadas

A Sepharose 2-B tem sido tradicionalmente utilizada para isolar plaquetas de plasma rico em plaquetas. Descobrimos que o Sephadex G-100 também resulta bem no isolamento de plaquetas. Esta técnica é aplicada na tecnologia de coloração e funciona do modo a seguir descrito. Coloca-se uma suspensão de plaquetas com corante na coluna. As moléculas de corante de baixo peso molecular ficam presas nas partículas enquanto que as plaquetas grandes passam directamente através da coluna. Deste modo, pode utilizar-se o Sephadex G-100 para separar plaquetas marcadas com fluorescência do corante livre em suspensão.

A. Preparação da Coluna

Hidrata-se o Sephadex G-100 (Pharmacia Laboratories, Piscataway, New Jersey) de acordo com as indicações do fabricante, e lava-se em acetona (100%) como preparação para a sua utilização como meio de separação de plaquetas. Realiza-se o

-25-

processo de lavagem por centrifugação do Sephadex a 300 xg durante dez minutos à temperatura ambiente, por remoção do sobrenadante e por ressuspensão em Solução Salina Equilibrada de Hanks. O Sephadex deve ser lavado repetidas vezes com a Solução Salina Equilibrada de Hanks até que já não se detecte o cheiro da acetona. A solução resultante é desgaseificada por inserção num banho de água a ferver ou por vácuo.

Utiliza-se, então, a pasta fluida de Sphadex para formar uma coluna. Utiliza-se uma seringa de 10 cc sem êmbolo como suporte da coluna. Fixa-se um tubo de silicone ao centro da seringa e utiliza-se uma pequena braçadeira de tubo ajustável para regular o fluxo de fluido através da coluna. Como suporte para a base da seringa utiliza-se uma malha de nylon de 47 micra para reter as pérolas de Sephadex. Deve evitar-se a utilização de colunas de vidro convencional com suportes de filtros de vidro de frita visto que podem servir para activar as plaquetas. Enche-se a coluna com Hanks e adicionam-se pequenas quantidades da pasta fluida de Sphadex à coluna. Abre-se a braçadeira o suficiente para proporcionar um fluxo lento mas consistente. Este processo compacta o Sephadex de modo regular e uniforme e impede a formação de canais e espaços de ar. Repete-se o processo de adição de HBSS e pasta fluida de Sephadex até se obter a coluna compacta do tamanho desejado. Deve enxaguar-se completamente a coluna com HBSS (2 volumes em vazio) antes de se utilizar.

B. Separação das plaquetas

Coloca-se, cuidadosamente, o corante das plaquetas e a suspensão em camadas sobre o Sephadex. A braçadeira ao fundo da coluna deve estar aberta e o nível de fluido na coluna deve proporcionar o gotejar até que atinja o topo do fluido de Sephadex. Recomeçar o fluxo para permitir à suspensão a penetração no Sephadex. Diminuir o fluxo de novo quando o nível atingir o topo do Sephadex. Adicionar cuidadosamente HBSS suficiente ao topo da coluna para criar um tampão para se poder adicionar facilmente mais HBSS sem perturbar o Sepha

-26-

dex. Recomeçar de novo o fluxo da coluna. A utilização deste método permite à suspensão de plaquetas formar uma faixa compacta no gel e migrar a uma velocidade uniforme e regular ao longo do comprimento da coluna. Deste modo obtêm-se um eluente mais concentrado de plaquetas. Continuar o fluxo através da coluna. Recolhendo fracções de 0,5 a 1,0 ml. As fracções que contêm as plaquetas serão visíveis pela sua opacidade e podem ser associadas. Centrifugam-se, então, as fracções reunidas a 300 xg durante dez minutos. Aspira-se o sobrenadante e pode ressuspender-se a colheita num meio adequado para experimentação ou análise, ou utiliza-se o sobrenadante de plasma pobre em plaquetas para determinações da funcionalidade ou para reinjecção.

EXEMPLO 4

Distinção da Hemorragia Pós-transfusão das Reacções Imunológicas

Antes da infusão marca-se com uma forma fluorescente da molécula de marcação um pequeno número de glóbulos vermelhos de cada unidade de sangue a ser transfundido. Imediatamente após cirurgia e transfusão sanguínea retira-se uma pequena alíquota de sangue venoso e faz-se a determinação da percentagem das células marcadas (percentagem de fluorescência) por processos padronizados de citometria de fluxo ou espectrofluorimetria. A intervalos regulares, após a primeira recolha de líquido venoso, recolhem-se alíquotas adicionais de sangue e analisam-se do mesmo, modo. Se estiver a acontecer uma hemorragia interna a proporção das células marcadas em relação às células não-marcadas não varia, ainda que o hematócrito esteja a diminuir. Se o paciente estiver a sofrer uma reacção pós-transfusão, então as células marcadas (que são as células transfundidas) são preferencialmente destruídas e a proporção das células marcadas em relação às células não-marcadas diminui. Estas medições tornam possível a discriminação entre hemorragia e reacções imunológicas pós-transfusão.

-27-

EXEMPLO 5Diagnóstico da Trombocitopenia Idiopática

A metodologia é a mesma do Exemplo 4, com a exceção de que se determinam as taxas do tempo de vida e produção das plaquetas. Assim, antes da infusão, marcam-se, as plaquetas (veja-se Exemplo 3) do próprio paciente. Imediatamente após a infusão de plaquetas retira-se uma pequena alíquota de sangue venoso e determina-se o número de plaquetas marcadas (percentagem de fluorescência) por ml por processos padronizados de citometria de fluxo ou espectrofluorometria. A intervalos reguladores após a recolha inicial de líquido venoso, recolhem-se alíquotas adicionais de sangue e analisam-se para percentagem de fluorescência positiva. A representação da percentagem de plaquetas marcadas e plaquetas não marcadas como uma função de tempo dá ao clínico a medida da velocidade de destruição das plaquetas marcadas e da velocidade de produção das plaquetas não-marcadas. A velocidade de produção ou destruição das plaquetas é uma medida dinâmica do processo de trombocitopenia. Deste modo, o clínico determina se a trombocitopenia idiopática como síndrome está ao nível da produção de plaquetas ou do tempo de vida das plaquetas.

Também se marcam as plaquetas transfundidas com estes corantes. Além disso, fazem-se medições do tempo de vida das plaquetas do doador do mesmo modo descrito para plaquetas autólogas.

EXEMPLO 6Diagnóstico da Aterosclerose

O diagnóstico da aterosclerose utilizando este método baseia-se na hipótese de que o tempo de vida das plaquetas de um aterosclerótico é mais curto do que o tempo de vida de plaquetas normais. Marca-se (de acordo com o protocolo do Exemplo 3) um pequeno número de plaquetas do paciente com a forma fluorescente, NMR ou com a forma de radio-marcação do corante de marcação de células.

Reinjectam-se plaquetas marcadas (veja-se o método no Exemplo 3) com a forma fluorescente da molécula e determina-se o tempo de vida das plaquetas por picadas periódicas na veia e determinação do número restante de plaquetas marcadas, como uma função do tempo (veja-se no Exemplo 5).

As medições do tempo de vida das plaquetas que indicam tempo de vida reduzido são diagnóstico para a aterosclerose.

Outra abordagem de diagnóstico é a utilização de uma forma radio-isotópica da molécula (emissor gama) e a marcação das células dos pacientes in vitro (utilizando métodos do Exemplo 3). Reinjectam-se as plaquetas marcadas e ou mede-se o tempo de vida das plaquetas utilizando métodos padronizados de contagem de isótopos ou o paciente é sujeito a visualização utilizando uma câmara de raios gama padronizada para determinar se as plaquetas estão a aderir às paredes dos vasos.

EXEMPLO 7

Deteção de Tumores Primários ou Metástases

Utilizam-se duas metodologias celulares diferentes combinadas com uma forma da molécula emissora de raios gama ou sensível a RMN. Em ambas as metodologias utilizam-se células pesquisadoras de células tumorais. Uma das metodologias utiliza linfócitos activados ou não-activados e a outra metodologia utiliza a detecção de monocitos, neutrófilos ou plaquetas. Activam-se in vitro linfócitos ou células NK por processos conhecidos que utilizam interleuquina-2 ou uma molécula equivalente. Marcam-se então estas células com a forma radioactiva ou a forma RMN da molécula utilizando os métodos do Exemplo 1 e reinjectam-se no paciente. Coloca-se, então, o paciente sob o aparelho de visualização e monitoriza-se a direcção dos linfócitos para localizar tumores de origem desconhecida.

Uma metodologia similar utiliza monócitos do paciente em vez de linfócitos. Nesta abordagem os monócitos são

marcados com um anticorpo monoclonal humano ou de rato que seja específico do tipo de tumor para que se mantenha o reconhecimento das células tumorais. Foris, G., et al., Cell. Immuno. 78:276-284 (1983). Marcam-se, então, estas células com a forma radio-isotópica ou com a forma visualizável por RMN da molécula de marcação e reinjectam-se no paciente. A visualização sequencial revela a localização do percurso dos monócitos alvo.

Numa outra metodologia para localizar tumores ou metástases, marcam-se os monócitos, os neutrófilos ou as plaquetas como se descreveu no Exemplo 3 e utilizam-se para encontrar tumores ou metástases. Como estas células aparecem logo no local do tumor, a visualização permite a localização dos tumores.

EXEMPLO 8

Deteção do foco de Infecção

Nesta aplicação detectam-se os neutrófilos. Recolhem-se neutrófilos do paciente e marcam-se com a forma da molécula de marcação radio-isotópica ou de visualização por RMN (utilizam-se os métodos de marcação dos Exemplos 1 e 2). Reinjectam-se, então, estas células e a visualização da direcção dos neutrófilos utilizando uma câmara de raios gama ou técnicas de visualização Magnética Nuclear identifica o foco da infecção. Utilizam-se imagens sequenciais para identificação das alterações dinâmicas na combinação de neutrófilos e para controlo das alterações resultantes da intervenção terapêutica.

EXEMPLO 9

Monitorização da Retinopatia Diabética por monitorização da Degeneração da Mácula

Marca-se um pequeno número de glóbulos vermelhos (tipo O, ou células autólogas) (veja-se os métodos do Exemplo 2) com uma forma de molécula de marcação a qual é estimulada por um comprimento de onda de luz fora do espectro do

-30-

visível para o humano (maior do que 700 nm). Injectam-se, então, as células no paciente por via intra-venosa. Utilizando câmaras retiniais de fluorescência padronizadas, tiram-se fotografias seriadas aos vasos da retina. Estimulam-se as células que transportam marcadores fluorescentes com um comprimento de onda apropriado e regista-se a fluorescência emitida no filme fotográfico. Visto que o corante está preso no glóbulo vermelho e os glóbulos vermelhos não migram do sistema vascular, as imagens de fluorescência são apenas dos vasos da retina. Noutro contexto mede-se a velocidade da corrente sanguínea utilizando um aparelho padronizado para estímulo a laser de duplo feixe que estimula a mesma célula dentro de um vaso em dois pontos diferentes dentro desse vaso. Estabelece-se a distância entre os dois pontos de estimulação. Mede-se a fluorescência em cada ponto de estimulação e a duração de tempo necessária entre os dois pontos de estimulação é a medida da velocidade do fluxo das células no vaso. Para medir a degeneração da mácula utiliza-se o índice de integridade dos vasos sanguíneos e a velocidade do fluxo sanguíneo. Este controlo é utilizado para avaliar o grau de prejuízos da vista e o êxito do tratamento em pacientes diabéticos.

EXEMPLO 10

Detecção da apoplexia eminente em pacientes imediatamente após uma apoplexia

Marcam-se as plaquetas do paciente a ser visualização (veja-se os métodos do Exemplo 3) com uma forma da molécula de marcação estimulada com um comprimento de onda de luz fora do espectro humano visível (maior do que 700 nm). Injectam-se as células marcadas no paciente por via intravenosa. Dirige-se uma fonte de luz focalizada padronizada (no comprimento de onda da estimulação) para um vaso sanguíneo simples do leito retinal. Mede-se a fluorescência utilizando aparelhos ópticos da focalização e um fotomultiplicador padronizado.

-31-

Os dados resultantes do fotomultiplicador são digitados e registados em computador. A intensidade de fluorescência é uma medida do número de plaquetas simples, duplas ou triplas encontradas na veia. O aumento da agregação das plaquetas indica alto risco de segunda apoplexia.

EXEMPLO 11

Visualização da constrição arterial

Utiliza-se uma forma radio-isotópica da molécula (emissor gama) para marcar in vitro as plaquetas do paciente (utilizando os métodos do exemplo 2). Injectam-se as células marcadas e sujeita-se o paciente a visualização utilizando uma câmara de raios gama padronizada para se poder determinar se lúmen dos vasos sanguíneos está constrito. A marcação dos glóbulos vermelhos pode ser feita com células de qualquer dador autólogas ou do tipo O.

EXEMPLO 12

Diagnóstico e determinação do estadio da artrite

Utilizam-se para marcar os linfócitos, monócitos, ou neutrófilos do paciente, formas da molécula, radio-isotópicas ou de visualização por RMN (pelos métodos dos Exemplo 1 ou 2). Reinjectam-se, então, estas células e observa-se a combinação utilizando equipamento de visualização padronizado. Na artrite a detecção dos monócitos é mais útil enquanto que na Doença Degenerativa das articulações é mais útil a detecção dos linfócitos. Isto permite a determinação do número de articulações radioactivas e, avaliação dos efeitos da terapia no estado do doente.

EXEMPLO 13

Determinação rápida de rejeição do transplante

Os linfócitos, neutrófilos ou plaquetas desempenham uma parte importante no transplante ou na rejeição de órgãos. Recolhem-se células do paciente e marcam-se com formas da molécula radio-isotópicas ou de visualização por RMN. Reinjec-

tam-se as células marcadas e faz-se a visualização sequencial do paciente. No momento ou antes da refeição eminente, há uma localização aumentada do tipo de células injectadas no transplante, que é detectada por esta metodologia.

EXEMPLO 14

Diagnóstico da Esclerose múltipla

Esta aplicação tem a mesma metodologia utilizada no Exemplo 13, excepto no facto de se determinar a localização das células na região da espinhal medula ou noutras regiões com muita mielina.

EXEMPLO 15

Medição da duração de vida dos glóbulos vermelhos, do volume dos glóbulos vermelhos e do volume sanguíneo

Determina-se a duração de vida dos glóbulos vermelhos do mesmo modo como se descreve atrás para a distinção entre a hemorragia e a reacção pós-transfusão (Exemplo 4). A única diferença está em se marcar e reinjectar os glóbulos vermelhos do próprio paciente. Determina-se (utilizando métodos de fluxocitometria ou espectrofluorometria) o número de glóbulos vermelhos por cada mililitro, como uma função de tempo após injeção para se determinar a duração da vida destas células.

Determina-se a massa dos glóbulos vermelhos e o volume sanguíneo pela coloração de um dado número de glóbulos vermelhos (autólogos ou de tipo O) com a forma fluorescente do corante. Injecta-se no paciente um dado número de glóbulos vermelhos corados em tempo zero e cinco minutos mais tarde retira-se uma alíquota de sangue. Determina-se a fracção de células marcadas por fluxocitometria ou por espectrofluorometria. A massa dos glóbulos vermelhos e o volume sanguíneo são determinados a partir do factor de diluição e conhecimento do número total de células por mm^3 .

As aplicações preferidas nesta invenção são as des-



-33-

critas acima, contudo a invenção não se limita às instruções
expostas aqui e reserva-se o direito a todas as alterações
neste âmbito.

-34-

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1ª. - Método para a detecção de células in vivo num paciente caracterizado por compreender a determinação da localização das células marcadas com corante de cianina administradas previamente ao paciente.

2ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina constituírem a pesquisa da célula de tumor de tal maneira que as células de tumor metastáticas ou primárias sejam detectadas.

3ª. - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem linfócitos ou células destruidoras naturais.

4ª. - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por os linfócitos ou as células destruidoras naturais serem activadas antes da administração ao paciente.

5ª. - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina que pesquisam a célula de tumor serem monócitos.

6ª. - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as células que pesquisam a célula de tumor serem monócitos que possuem anticorpos monoclonais específicos de tumor ligados aos monócitos de forma a manter-se a identificação da célula de tumor.

7ª. - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina que pesquisam a célula de tumor serem plaquetas.

8ª. - Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina que pesquisam a célula de tumor serem neutrófilos.

9ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o corante de cianina utilizado ser DISC₁₄(5) ou DIOC₁₄(3).

10ª. - Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o corante de cianina ser etiquetado com um emissor gama.

11ª. - Método de acordo com a reivindicação 9, ca-

-35-

racterizado por o corante de cianina ser etiquetado com uma sonda de ressonância magnética nuclear.

12ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina interaccionarem especificamente com um organismo que infecta o paciente de forma a determinar-se o local da infecção.

13ª. - Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por o organismo ser uma bactéria ou um fungo.

14ª. - Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem neutrófilos.

15ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem glóbulos vermelhos.

16ª. - Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por a retina do paciente ser examinada em relação à presença dos glóbulos vermelhos marcados com corante de cianina para se detectar a retinopatia ou a degeneração dos vasos sanguíneos.

17ª. - Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por se medir a velocidade à qual os glóbulos vermelhos marcados com corante de cianina fluem nos vasos sanguíneos.

18ª. - Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por o comprimento de onda de excitação do corante de cianina se encontrar fora do espectro visível.

19ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem plaquetas.

20ª. - Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por os agregados de plaquetas marcadas com corante de cianina serem detectados nos vasos sanguíneos da retina.

21ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem monócitos, neutrófilos, linfócitos ou plaquetas.

22ª. - Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por o corante de cianina ser etiquetado com um emissor gama.

23ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o corante de cianina possuir uma sonda de ressonância magnética nuclear.

24ª. - Método para a determinação in vivo da vida da célula caracterizado por compreender a medição da velocidade à qual as células marcadas com corante de cianina desaparecem do paciente.

25ª. - Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem glóbulos vermelhos.

26ª. - Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por a velocidade de desaparecimento dos glóbulos vermelhos marcados com corante de cianina ser comparada com as variações do hematócrito para se distinguir entre sangria e reacção imunológica relativamente aos glóbulos vermelhos.

27ª. - Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por o volume total de sangue ser determinado por injeção de um número fixo de células completamente marcadas e por medição do factor de diluição após equilíbrio.

28ª. - Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por os glóbulos vermelhos marcados com corante de cianina serem preparados por marcação das células do paciente.

29ª. - Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por os glóbulos vermelhos marcados com corante de cianina serem preparados por marcação de glóbulos vermelhos de dadores aleatórios do tipo O.

30ª. - Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem plaquetas.

31ª. - Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por a velocidade de desaparecimento das plaquetas

-37-

marcadas com corante de cianina ser comparada com as contagens totais de plaquetas para se distinguir entre sangria ou diminuição na produção de plaquetas e reacção imunológica relativamente às plaquetas.

32ª. - Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por o corante de cianina utilizado ser DISC₁₄⁽⁵⁾ ou DIOC₁₄⁽³⁾.

33ª. - Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por a vida das plaquetas marcadas com corante de cianina ser determinada como uma medida da aterosclerose.

34ª. - Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por os neutrófilos marcados com corante de cianina serem utilizados para detectar o local da infecção.

35ª. - Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por as plaquetas marcadas com corante de cianina serem medidas por via intra-ocular para detectar a microembolia.

36ª. - Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem utilizadas com métodos de imagem para determinar a constrição arterial.

37ª. - Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem utilizadas para evidenciar a artrite.

38ª. - Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem utilizadas para evidenciar a artrite.

39ª. - Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por as células marcadas com corante de cianina serem utilizadas para orientar o transplante ou a rejeição do órgão.

40ª. - Método para a detecção de células in vivo num paciente, caracterizado por compreender:

a obtenção de células para serem marcadas com corante de cianina,

-38-

: a marcação das células com corante de cianina,
: a administração de células marcadas com corante de
? cianina ao paciente, e
: a detecção das células marcadas com corante de cianina.

Lisboa, 29 OUT 1967

Por SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION

- O AGENTE OFICIAL -

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. B. ...', written over a horizontal line.