

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

(21) **PI 1006319-6 A2**

(22) Data de Depósito: 03/11/2010

(43) Data da Publicação: 26/02/2013
(RPI 2199)



(51) *Int.Cl.:*

G01N 33/50

G01N 33/52

C07K 14/42

C07D 219/04

C07D 219/06

C07D 219/08

(54) **Título:** Sonda molecular para
identificação de tecidos

(73) **Titular(es):** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

(72) **Inventor(es):** Agenor Tavares Jácome Júnior, Eduardo
Isidoro Carneiro Beltrão, Ivan da Rocha Pitta, Luiz Bezerra de
Carvalho Junior, Maria do Carmo Alves de Lima, Suely Lins Galdino

(57) **Resumo:** Sonda molecular para identificação de tecidos. A presente invenção relata uma sonda molecular histoquímica e o processo de obtenção desta. A sonda é construída pela conjugação de um derivado de acridina, cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester, à lectinas, em particular a Concanavalina A e a Peanut Aglutinine, que permite identificações de carboidratos específicos de superfície celular reconhecidos pelas lectinas conjugadas. Este procedimento pode ser estendido a outras proteínas como enzimas, anticorpos, antígenos e receptores e permite a identificação dos complexos específicos que irão formar nas células, nos tecidos ou fluidos biológicos. Entre as vantagens da invenção tem-se a classificação/caracterização de tecidos normais e transformados de forma objetiva e semi-quantitativa levando em consideração a intensidade da luz, localização da marcação e a proporção de células marcadas; diagnóstico mais rápido; uso de amostras também de tecidos ou invés de apenas moléculas; e a versatilidade na leitura da luminescência o que permite a utilização de amostra líquidas ou sólidas.

SONDA MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE TECIDOS

Campo da Invenção

A presente invenção tem aplicação na área de saúde e prática forense.

Particularmente a invenção auxilia na identificação de tecidos baseada na expressão de carboidratos.

Pode ser usada tanto para diagnóstico de patologias como na identificação de tecidos sadios, específicos de cada região do corpo humano.

Sumário

A presente invenção relata uma sonda molecular histoquímica construída pela conjugação de um derivado de acridina à lectinas que permitirá as identificações dos carboidratos específicos de superfície celular reconhecidos pelas lectinas conjugadas. Este procedimento poderá ser estendido a outras proteínas como enzimas, anticorpos, antígenos e receptores permitindo a identificação dos complexos específicos que irão formar nas células, nos tecidos ou fluidos biológicos.

Anterioridades: Estado da Técnica

Entre os principais documentos encontra-se as patentes WO/2004/024058, US 2,010,255,500 e US 2,010,233,185.

A Patente WO/2004/024058 descreve o problema que azolidinas e acridinas são compostos efetivos contra doenças infecciosas podendo ser utilizados como agentes anticâncer e resolve desenvolvendo tiazacridinas e imidazacridinas com atividade antitumoral, utilizando síntese química e testes antitumorais com camundongos. Mas, não resolve o problema da

marcação de proteínas uma vez que não é testada as propriedades luminescentes nem a capacidade de ligação a proteínas para uso como revelador de sonda molecular da molécula de "cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester" a qual é citada apenas como precursora para obtenção das moléculas antitumorais testadas.

A Patente US 2,010,255,500 descreve um método de detecção de moléculas de glicoproteínas que apresentam uma alteração na glicosilação utilizando lectinas. Mas, a identificação de glicoproteínas modificadas durante o desenvolvimento e progressão do câncer, não utiliza um revelador que venha a facilitar a detecção. Além disso, o uso da espectrometria de massa aumenta os custos do processo de estimulação e detecção da luz gerada. O teste é feito apenas para glicoproteínas anômalas no câncer.

A Patente US 2,010,233,185 descreve o problema do diagnóstico de doenças sistêmicas ou a determinação dos níveis terapêuticos de drogas como os esteroides e resolve o problema de diagnóstico não invasivo desenvolvendo um método de detecção em moléculas através de análises salivares utilizando duas ou mais lectinas. Mas, a análise apresentada nem descreve qualquer método de detecção específicos para a leitura das lectinas.

O uso da acridina DMAE-NHS como substância reveladora de lectinas foi utilizado por Campos et al., na revista Biomarkers, no ano de 2006, volume 5, páginas 480 a 484, como ferramenta histoquímica em tecido mamário. A metodologia apresentou como desvantagem a leitura do revelador que detecta a luminescência apenas por estimulação quimioluminescente. O uso de um sistema de detecção da luz gerada eleva os custos do processo.

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

Com se viu, os principais problemas apresentados são a falta de um revelador específico de lectinas, a não versatilidade dos sistemas de detecção e a impossibilidade de ligação do identificador de lectinas a qualquer tipo de proteína (enzimas, anticorpos, antígenos e receptores).

Objetivos da Invenção

O objetivo da presente invenção é apresentar uma nova sonda molecular histoquímica que permitirá as identificações dos carboidratos específicos de superfície celular reconhecidos pelas lectinas conjugadas, tendo um revelador específico de lectinas que é versátil com relação aos sistemas de detecção e que torna possível a ligação do identificador de lectinas a qualquer tipo de proteína (enzimas, anticorpos, antígenos e receptores).

É também objetivo desta invenção permitir que sejam utilizadas amostras de tecidos, células ou fluidos biológicos, ou seja, amostras líquidas ou sólidas, para identificação de tecidos e patologias, dado que o processo de identificação pode utilizar-se de mais de uma forma de detecção (quimioluminescência ou fotoluminescência).

Solução

A atividade inventiva relacionada a presente patente de invenção é a ligação do "cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester" com lectinas e seu uso como revelador na construção de sondas a base de proteínas para a identificação de tecidos humanos.

Vantagens

As vantagens da invenção apresentada são elas: 1) A classificação/caracterização de tecidos normais e transformados de forma objetiva e semi-quantitativa levando em consideração a intensidade da luz, localização da marcação e a proporção de células marcadas o que gerava, antes da invenção apresentada, uma variação inter-observador (falsos positivos ou falso negativos); 2) Diagnóstico mais rápido (tempo entre a retirada do tecido e o resultado do exame) comparado com as técnicas histoquímicas existentes; 3) uso de amostras também de tecidos ou invés de apenas moléculas; e 4) a versatilidade na leitura da luminescência o que permite a utilização de amostra líquidas ou sólidas.

A novidade e o efeito técnico alcançado

Resumindo, a novidade da presente invenção é a ligação do "cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester" com lectinas e seu uso como revelador na construção de sondas a base de proteínas para a identificação de tecidos humanos. Esta ligação permite versatilidade no processo de detecção e no uso de amostras.

20 Descrição Detalhada

As substâncias obtidas conforme esta invenção compõem uma nova sonda molecular histoquímica formada a partir da conjugação de um novo derivado de acridina luminescente "cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester" (IP29) à lectinas com uso diagnóstico em patologias clínicas e identificação de tecidos. Trata-se, assim, de uma nova sonda com capacidade de reconhecer e se ligar a carboidratos localizados em superfícies celulares e reveladas por fotoluminescência ou quimioluminescência.

O "cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester" (IP29) tem sua rota sintética exposta no PCT Int. Appl. (2004), WO 2004024058 A2, que é descrita na Figura 1.

A conjugação dos compostos inventados foi adaptada de Weeks et al., que publicou na revista *Methods in Enzymology* no ano 1986, volume 133, p.366-387.

De uma forma geral, a conjugação pode ser obtida com uma quantidade de 200 a 700 µL de lectinas, concentrado de 400 a 1200 µg/mL, com quantidades do composto IP29 que podem variar de 0,05 a 5mg, diluídos em um solvente formando uma quantidade de 5 a 30 µL do composto dissolvido, incubados a uma temperatura de 4°C a 40°C por um tempo entre 4 horas e 15 minutos, incluindo os limites deste intervalo, obtendo-se as sondas de lectinas. As sondas são então purificadas e poderão ser caracterizadas e utilizadas conforme já descrito.

A melhor conjugação utilizada, até o momento, para obter o composto inventado (Figura 2), inicia-se com a incubação de 500µL de lectinas (800µg/mL) com 15µL de solução de IP29DMSO (0,2mg de IP29 diluído em 400µL de dimetilsulfóxido - DMSO) ou IP29DMF (0,2mg diluído de IP29 em 400µL de N,N-Dimetilformamida - DMF) , durante 1 hora, à temperatura de 25°C, obtendo-se sondas das lectinas Concanavalina A (ConA) ou Peanut Aglutinine (PNA) conjugadas ao IP29 (ConA-IP29DMSO, ConA-IP29DMF, PNA-IP29DMSO e PNA-IP29DMF). As mesmas foram aplicadas em uma coluna de Sephadex G-25, equilibrada com tampão fosfato de sódio com NaCl 0,15M, pH 7,2, (PBS) para obter amostras purificadas. 60 alíquotas de 1mL foram coletadas a partir da eluição da coluna com PBS, num fluxo de 1mL/min.

Caracterização

De uma maneira geral a caracterização é feita determinando-se os comprimentos de onda de excitação e emissão dos compostos inventados o que determina sua capacidade de detecção das expressões de carboidrato dos tecidos.

Na determinação dos comprimentos de onda dos picos de excitação, da melhor forma de implementação dos compostos, as amostras foram submetidas a uma fluorimetria de emissão, sendo estimuladas nas faixas de comprimentos de onda 200-500nm, em fluorímetro ISSK2. A detecção de emissão foi fixada no comprimento de onda 540nm, baseada nos resultados obtidos através de microscopia confocal. Além das sondas inventadas, foram analisados ainda padrões comerciais (rodamina, FITCDMF, FITCDMSO) a fim de gerar comparativos qualitativos e quantitativos.

De maneira a ser obtida a determinação dos comprimentos de onda dos picos de emissão de padrões comerciais (rodamina, FITCDMF, FITCDMSO), sondas inventadas (ConA-IP29DMSO, ConA-IP29DMF, PNA-IP29DMSO e PNA-IP29DMF) e das soluções IP29DMF e IP29DMSO, foi fixado o comprimento de onda de excitação no valor com maior intensidade de luminescência para cada substância e realizada uma fluorimetria de excitação, na faixa de 400-700nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os comprimentos de onda de excitação e emissão observados nos testes anteriores foram utilizados para determinar a intensidade de luminescência das sondas inventadas (ConA-IP29DMSO e ConA-IP29DMF) e padrões comerciais (rodamina, FITCDMSO, FITCDMF), IP29DMSO, IP29DMF, Tampão fosfato-IP29DMSO e Tampão fosfato-IP29DMF. A análise foi realizada em fluorímetro ISSK2, em triplicata.

Para a avaliação de decaimento de fluorescência, em fluorímetro ISSK2, foram fixados os comprimentos de onda de excitação e emissão com maior intensidade de luminescência, sendo as amostras submetidas à exposição durante um período de 30 minutos (1800s). Foram submetidas à análise as amostras referentes à solução IP29DMF, IP29DMSO, rodamina, FITCDMF e FITCDMSO, além das sondas purificadas, correspondentes aos conjugados ConA-IP29DMSO, ConA-IP29DMF, PNA-IP29DMSO e PNA-IP29DMF. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A interação Lectina-IP29 foi avaliada através da espectroscopia de Infra-Vermelho por modo vibracional utilizando pastilha de KBr em infravermelho com transformada de Fourier Bruker IFS66 (12.000cm⁻¹ a 400cm⁻¹). Foram submetidas à espectroscopia de infravermelho as amostras de ConA, PNA, IP29 e as sondas formadas a partir dos mesmos.

Aplicação/Testes

Cortes de tecidos mamários diagnosticados como Fibroadenoma (Fib) e Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) foram desparafinizados, hidratados e incubados com os conjugados ConA-IP29 (DMSO ou DMF) e PNA-IP29 (DMSO ou DMF), com posterior lavagem com Tampão PBS. As intensidades de emissão de luminescência dos conjugados e dos tecidos marcados foram medidas por CTS/S em triplicata por espectrofluorímetro de alta resolução temporal nanosegundo ISSK2 e medidas por Unidades relativas de luz (RLU) em luminômetro modelo Modulus.

Resultados

Para avaliação das propriedades, capacidade de ligação e marcação das sondas inventadas aos tecidos, foram selecionados as alíquotas eluídas que apresentavam sobreposição de picos de concentração proteica e

fluorescência demonstrado nas figuras 3 e 4. Os comprimentos de onda de excitação e emissão, a intensidade de luminescência, quimioluminescência e decaimento de luminescência das sondas inventadas, padrões comerciais, lectinas e IP29 estão descritos na tabela 1.

5

Tabela 1

Analitos	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Intensidade de Luminescência (CTS/S) ¹	Intensidade de Quimioluminescência (RLU)	Decaimento de Luz (%)
Tampão-IP29 _{DMF}	367	441	1.958.856,66 ± 57.077,94	100.302,3 ± 19.991,71	30,24
Tampão-IP29 _{DMSO}	362	440	520.991,7,65 ± 14.425,04	7.328,667 ± 951,50	10,5
Tampão-DMAE-NHS _{DMF}	277	540	518.474 ± 17.560	Aparelho Saturou!	19,61
Con A TM	0	0	0	156 ± 9,67	-
PNA	0	0	0	113,36 ± 8,36	-
Rodamina*	447	631	223.861 ± 1.823,5	26.413,33 ± 1.376,15	1,9
FITC _{DMF} *	442	418	617.711,67 ± 5.434,1	11.261 ± 108,29	13,6
FITC _{DMSO} *	485	418	1.110.767 ± 23.614	13.794 ± 60,73	1,72
Con A-IP29 _{DMF}	359	435	3.241.957,33 ± 50.035,8	622.424 ± 33.949,55	6,61
Con A-IP29 _{DMSO}	356	433	878.386,67 ± 51.707,36	14.608 ± 836,03	0,78
PNA-IP29 _{DMF}	360	441	3.242.717,333 ± 17.052,77	595.902,7 ± 22.588,84	0,53
PNA-IP29 _{DMSO}	363	440	1.259.974,67 ± 73.164,1	12.860 ± 225,262	4,67
ConA- DMAE-NHS _{DMF}	356	435	404.100 ± 6.536,63	12.322.852 ± 201.181	5,97
Con A- FITC _{DMSO}	492	530	3.107.290,7 ± 12.356	11.594 ± 545	2,38

A espectroscopia de Infra-Vermelho por modo vibracional das sondas inventadas, lectina ConA e IP29 estão descritos na figura 5 e os picos

obtidos na tabela 2. A espectroscopia de Infra-Vermelho por modo vibracional do IP29 e do produto de conjugação entre o aminoácido lisina e o IP29 (Lisina-IP29DMF e Lisina IP29DMSO) está descrito na figura 6. A presença dos picos de nitrila ($2078,89 \text{ cm}^{-1}$) na sonda ConA-IP29, de amidas secundárias ($1633,41 \text{ cm}^{-1}$) na conjugação lisina-IP29 e o não surgimento de esteres alifáticos ($1097,3 \text{ cm}^{-1}$) na sonda inventada sugere a interação entre a lectina e o IP29, pelo fato da predominância do aminoácido lisina na Con A que possui grupos NH_2 livres para a formação da ligação. Wang et al., The Journal Of Biological Chemistry.1975, v. 250 (4), p.1490-1502. Weeks et al., Methods in Enzymology.1986, v.133, p.366-387. Pereira & Costa, Rev. Nutr. 2002, v.15(1), p.5-14.

A capacidade de marcação dos tecidos Carcinoma Ductual Infiltrante (CDI) e Fibroadenoma (FA) pelas sondas inventadas (ConA-IP29DMF(S1), ConA-IP29DMSO(S2), PNA-IP29DMF(S3) e PNA-IP29DMSO(S4)), sonda comercial (ConA –DMAENHS (S5)) e o derivado de acridina (IP29DMSO(S6) e IP29DMF(S7)) foi evidenciada pelas intensidades de fotoluminescência (CTS/S) e Quimioluminescência (RLU) demonstradas na tabela 3. Tecidos não tratados com a sonda receberam a sigla (S0).

20

Tabela 2

Con A (cm^{-1})	IP29 (cm^{-1})	Con A-IP29 _{DMF} (cm^{-1})	Con A-IP29 _{DMSO} (cm^{-1})	Grupo Funcional
3432,67	3432,67	3432,67	3432,67	OH livre em ligação intermolecular
-	3073,98	-	-	Alcenos
-	2985,27	-	-	Alceno Cis
2375,87	-	-	-	Aminas (Sais de amônio primário)
-	2231,24	2078,89	2078,89	Nitrila
-	1866,76	-	-	Benzeno
	1735,62			Alceno Cis

10/11

1633,41	-	1633,41	1633,41	Amidas Secundárias
-	1619,91	-	-	Alceno Cis
-	1542,77	-	-	Nitrocompostos Aromáticos
-	1515,77	-	-	Nitrocompostos Aromáticos
-	1436,71	-	-	Nitrocompostos Aromáticos
1415,5	1411,64	1415,5	1415,5	Nitrocompostos Aromáticos
-	1369,21	-	-	-
-	1321	-	-	Ácidos Carboxílicos
-	1261,22	-	-	Ácidos Carboxílicos
-	-	-	1230,36	Alcool Primário
-	1174,44	-	-	Esteres alifáticos
-	1145,51	-	-	Esteres alifáticos
-	1116,58	-	-	Alcool Primário
1097,3	1097,3	-	-	Esteres; Ácidos Carboxílicos
-	1060,66	-	-	Esteres; Ácidos Carboxílicos
-	1012,44	-	-	Esteres; Ácidos Carboxílicos
-	-	-	1006,66	Alcool primário
-	881,31	-	-	Ácidos Carboxílicos
-	856,24	-	-	Ácidos Carboxílicos
796,46	-	-	-	Aromáticos
-	771,39	-	-	Alceno Cis
-	755,96	-	-	Alceno Cis
-	736,67	-	-	Alceno Cis
-	-	-	-	Alceno Cis
-	-	-	-	Alceno Cis
466,69	541	532,26	532,26	Alceno Cis

Tabela 3

Amostras	Quimioluminescência (RLU)		Fotoluminescência (CTS/S)	
	FA	CDI	FA	CDI
S1	12.170 ± 325	8.731 ± 569	415.850 ± 3.893	763.020 ± 9.001
S2	16.456 ± 342	11.113 ± 843	480.839 ± 10.420	659.457 ± 5.433
S3	14.362 ± 436	9.843 ± 184	431.302 ± 1.498	667.972 ± 1.142

11/11

S4	15.194 ± 1.186	3.630 ± 156	459.517 ± 8.762	683.562 ± 6.754
S5	$2.231.614 \pm 183.450$	$1.820.957 \pm 61.240$	178.009 ± 4.411	195.972 ± 5.216
S6	31.386 ± 1.827	13.686 ± 294	28.228 ± 776	25.050 ± 677
S7	244.049 ± 23.412	173.914 ± 9.816	27.093 ± 386	36.734 ± 517
S₀	4.119 ± 331	4.452 ± 267	24.470 ± 257	13.883 ± 724

REIVINDICAÇÕES

1. **SONDA MOLECULAR** caracterizada por ser composta de moléculas de cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester conjugadas à lectinas.
- 5 2. **SONDA MOLECULAR** conforme reivindicação 1 caracterizada pela lectina ser a Concanavalina A.
3. **SONDA MOLECULAR** conforme reivindicação 1 caracterizada pela lectina ser a Peanut Aglutinine.
4. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE SONDA MOLECULAR**
10 caracterizado por conjugar uma quantidade de 200 a 700 µL de lectinas, concentrada de 400 a 1200 µg/mL, com quantidades do composto cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester que podem variar de 0,05 a 5mg, diluídos em um solvente formando uma quantidade de 5 a 30 µL do composto dissolvido, incubados a uma temperatura de 4°C a 40°C por um
15 tempo entre 4 horas e 15 minutos, incluindo os limites deste intervalo, sendo a substância obtida posteriormente purificada.
5. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE SONDA MOLECULAR** conforme reivindicação 4 caracterizado pela dita conjugação ter uma quantidade de 500 µL de lectinas, concentrada a 800 µg/mL.
- 20 6. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE SONDA MOLECULAR** conforme reivindicação 4 caracterizado pela dita conjugação ter uma quantidade do composto cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester igual a 0,2 mg.
7. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE SONDA MOLECULAR** conforme reivindicação 4 caracterizado pela dita incubação ocorrer a 25°C durante 1
25 hora.
8. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE SONDA MOLECULAR** conforme reivindicação 4 ou 5 ou 6 ou 7 caracterizado pela dita lectina ser a Concanavalina A.

9. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE Sonda Molecular** conforme reivindicação 4 ou 5 ou 6 ou 7 ou 8 caracterizado pela dita lectina ser a Peanut Aglutinine.

10. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE Sonda Molecular** conforme reivindicação 4 ou 5 ou 6 ou 7 ou 8 ou 9 caracterizado pelo solvente ser o dimetilsulfóxido.

11. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE Sonda Molecular** conforme reivindicação 4 ou 5 ou 6 ou 7 ou 8 ou 9 caracterizado pelo solvente ser o N-Dimetilformamida.

12. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE Sonda Molecular** conforme reivindicação 5, 6 7 e 8 caracterizado pela quantidade de 15µL do composto dissolvido ser formado por 0,2mg de cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester diluído em 400µL de dimetilsulfóxido.

13. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE Sonda Molecular** conforme reivindicação 5, 6 7 e 9 caracterizado caracterizado pela quantidade de 15µL do composto dissolvido ser formado por 0,2mg de cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester diluído em 400µL de dimetilsulfóxido.

14. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE Sonda Molecular** conforme reivindicação 5, 6 7 e 8 caracterizado pela quantidade de 15µL do composto dissolvido ser formado por 0,2mg de cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester diluído em 400µL de N-Dimetilformamida.

15. **PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE Sonda Molecular** conforme reivindicação 5, 6 7 e 9 caracterizado caracterizado pela quantidade de 15µL do composto dissolvido ser formado por 0,2mg de cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester diluído em 400µL de N-Dimetilformamida.

16. **USO DA Sonda Molecular** conforme reivindicações 1 ou 2 ou 3 para identificação de tecidos de partes do corpo humano.

17. **USO DA Sonda Molecular** conforme reivindicações 1 ou 2 ou 3 para o diagnóstico de câncer.

18. **USO DA Sonda Molecular** conforme reivindicações 1 ou 2 ou 3 para a diferenciação de microrganismos.

5 19. **USO DA Sonda Molecular** conforme reivindicações 1 ou 2 ou 3 para o diagnóstico de patologias clínicas de qualquer tipo de célula ou tecido animal ou vegetal.

20. **USO DA Sonda Molecular** conforme reivindicações 1 ou 2 ou 3 para o diagnóstico de patologias clínicas de qualquer tipo de célula ou
10 tecido animal ou vegetal.

21. **USO DA Sonda Molecular** conforme reivindicações 1 ou 2 ou 3 para a identificação de qualquer tipo de célula ou tecido animal ou vegetal.

1/3

FIGURA 1

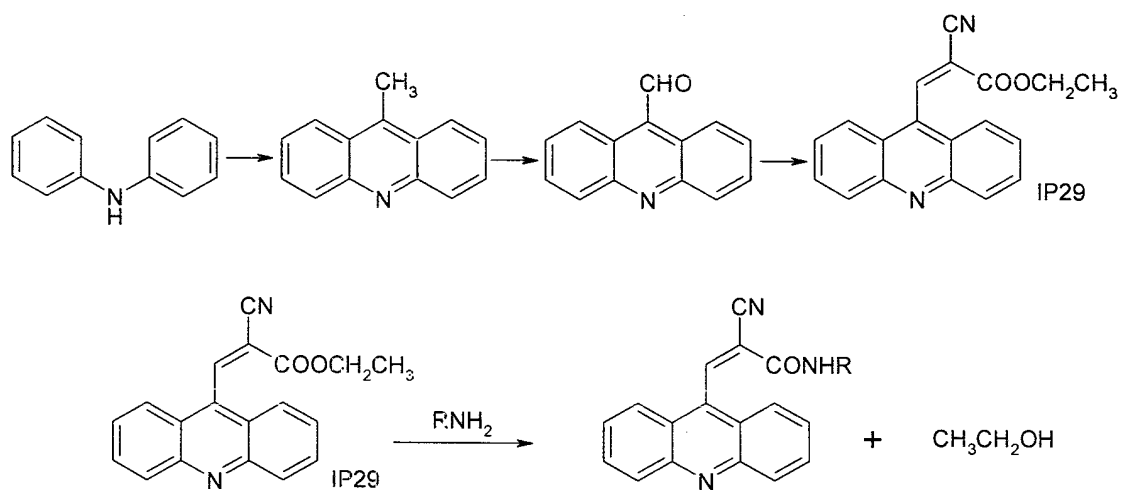


FIGURA 2

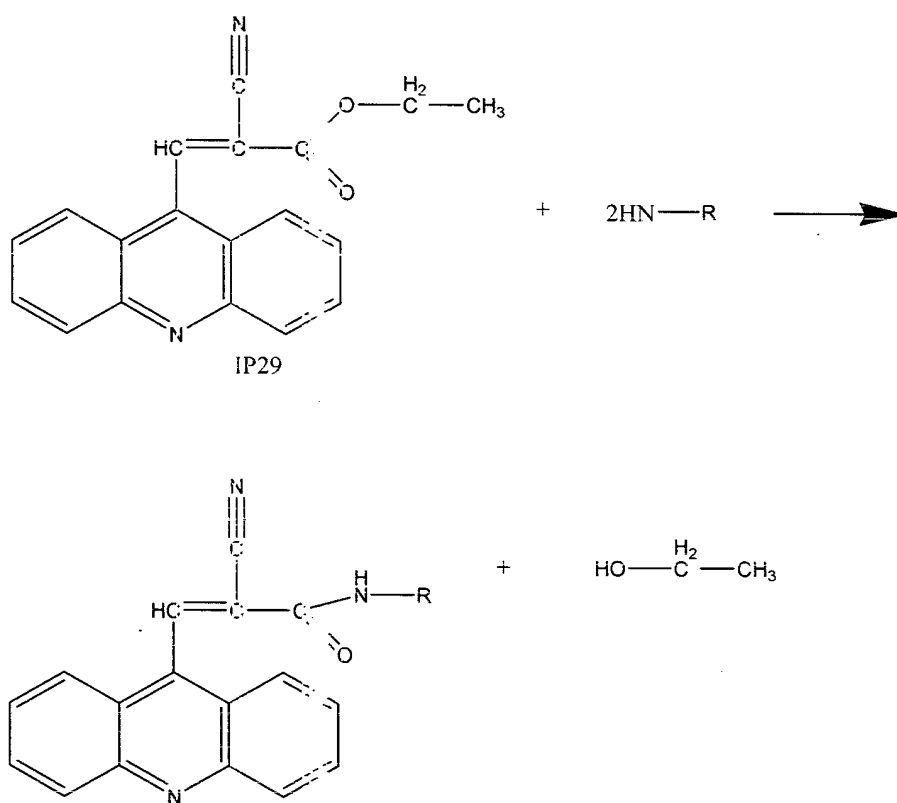


FIGURA 3

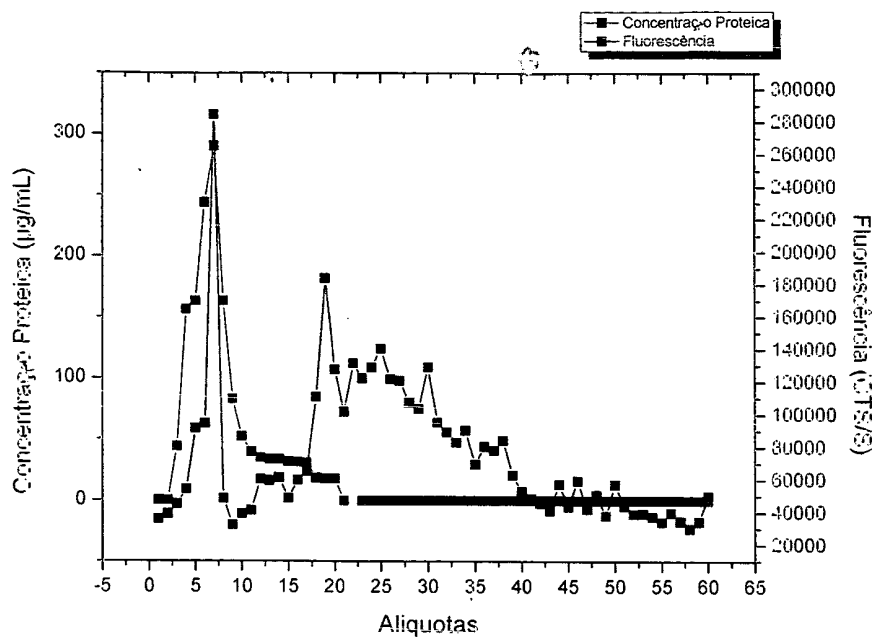


FIGURA 4

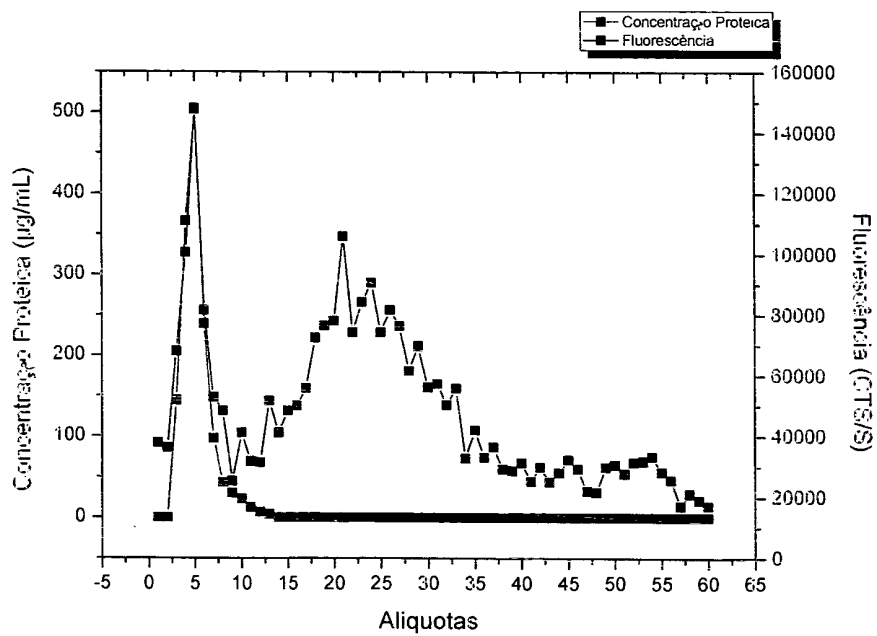


FIGURA 5

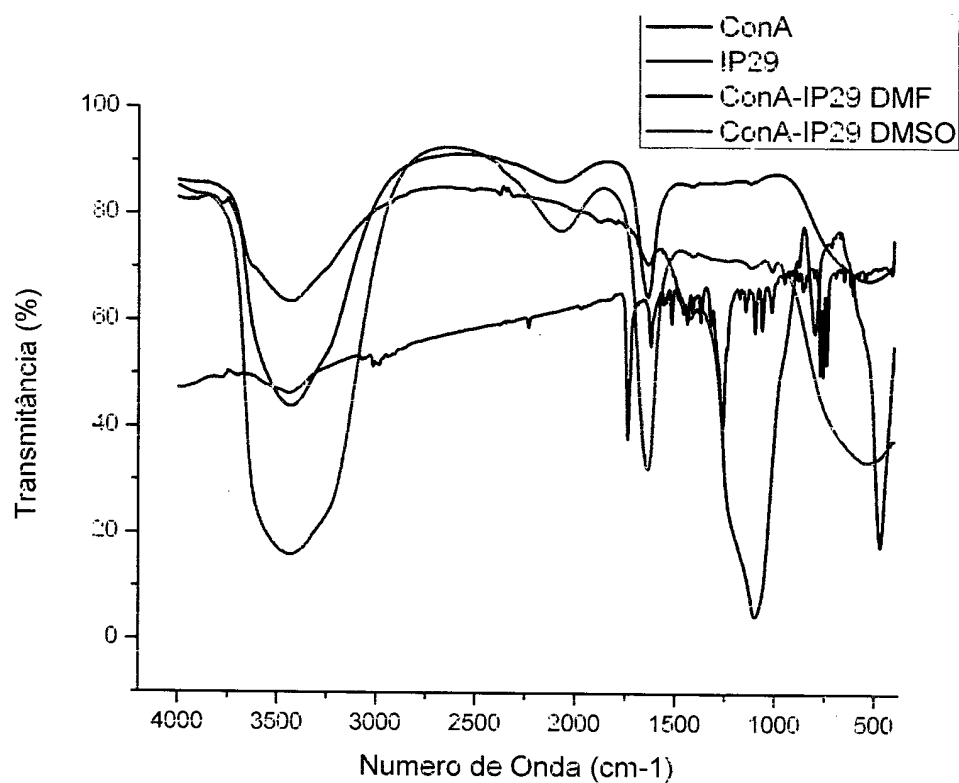
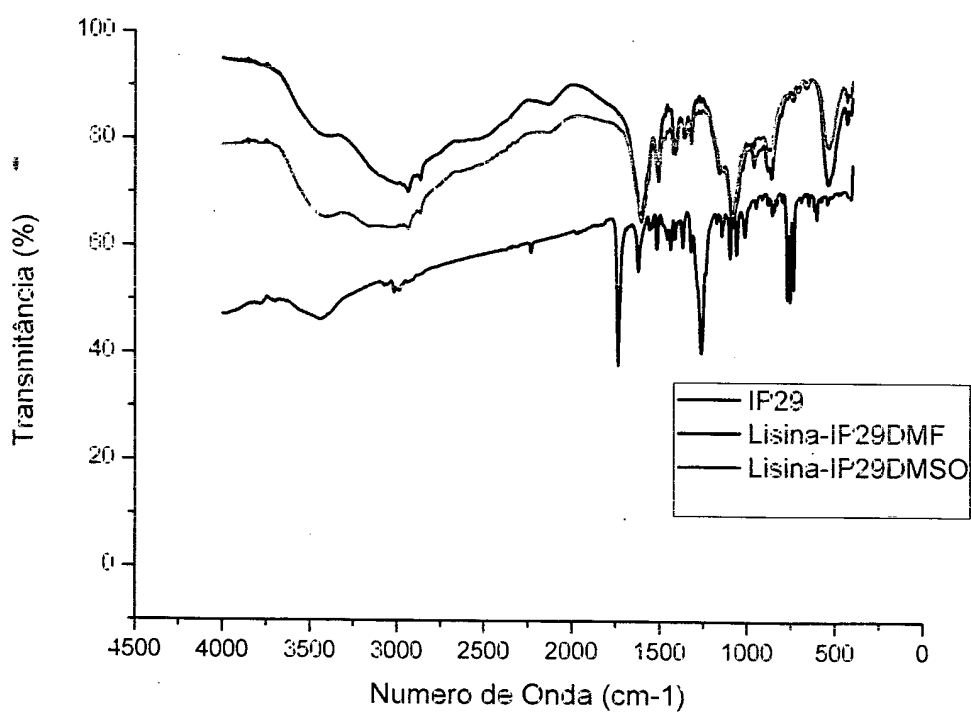


FIGURA 6



RESUMO

SONDA MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE TECIDOS

5 A presente invenção relata uma sonda molecular histoquímica e o processo de obtenção desta. A sonda é construída pela conjugação de um derivado de acridina, cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester, à lectinas, em particular a Concanavalina A e a Peanut Agglutinine, que permite identificações de carboidratos específicos de superfície celular reconhecidos pelas lectinas
10 conjugadas. Este procedimento pode ser estendido a outras proteínas como enzimas, anticorpos, antígenos e receptores e permite a identificação dos complexos específicos que irão formar nas células, nos tecidos ou fluidos biológicos. Entre as vantagens da invenção tem-se a classificação/caracterização de tecidos normais e transformados de forma
15 objetiva e semi-quantitativa levando em consideração a intensidade da luz, localização da marcação e a proporção de células marcadas; diagnóstico mais rápido; uso de amostras também de tecidos ou invés de apenas moléculas; e a versatilidade na leitura da luminescência o que permite a utilização de amostra líquidas ou sólidas.