

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 261**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01987011 .2**
- 96 Fecha de presentación: **19.11.2001**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1364044**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2003**

54 Título: **Composiciones y métodos para la detección de afecciones precancerosas en muestras de células y tejidos utilizando 5, 10, 15, 20-tetrakis(carboxifenil)porfina.**

30 Prioridad:
17.11.2000 US 249505 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.05.2012

73 Titular/es:
**BIOMODA, INC.
8301 WASHINGTON NE, SUITE 5
ALBUQUERQUE, NEW MEXICO 87113, US**

72 Inventor/es:
GARWIN, Jeffrey, L.

74 Agente/Representante:
Durán Moya, Luis Alfonso

ES 2 380 261 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la detección de afecciones precancerosas en muestras de células y tejidos utilizando 5, 10, 15, 20-tetrakis (carboxifenil) porfina

Sector de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de ciertas porfirinas para detectar células displásicas, precancerosas y cancerosas a partir de diferentes muestras de tejidos, tanto *in vitro* como *in situ*.

Antecedentes de la invención

Se hace referencia a varios artículos científicos y académicos entre paréntesis en la presente solicitud.

Los patólogos, que examinan la progresión de la enfermedad y analizan muestras de tejidos para detectar anomalías, tales como cáncer, han determinado que una afección celular denominada displasia, que se refiere a la formación o maduración anormal de las células, puede potencialmente identificar células en una condición precancerosa. Si no se controla, la displasia puede progresar a las etapas leve, moderada y grave y eventualmente al cáncer. Aproximadamente uno de cada siete casos moderados de displasia se convertirán en cáncer y se ha informado que hasta un 83% de los casos con displasia grave se convierten en cáncer, dependiendo de los tipos de células involucradas. Sin embargo, la eliminación de displasias leves y moderadas reduce en gran medida el desarrollo del cáncer. En el pulmón, la eliminación de células displásicas no sólo reduce en gran medida la formación de células cancerosas, sino que en algunos casos el tejido pulmonar volverá a una morfología normal.

En general, mientras más temprano se detecta el cáncer, mejor será el pronóstico para la supervivencia del paciente. Si el cáncer de mama se detecta temprano, cuando todavía está localizado en una sola masa, la tasa de supervivencia hasta cinco años es más del 96%. Cuando se ha extendido a un lugar distante, la tasa de supervivencia hasta cinco años es inferior al 20%. Para el cáncer de pulmón, cuando se detecta como una sola masa, la supervivencia hasta 5 años es más del 46%. Cuando se ha diseminado, la supervivencia hasta cinco años es inferior al 14%. Para el cáncer de cuello de útero, se produce una mejoría adicional en la supervivencia cuando se detectan cambios precancerosos y se tratan antes de desarrollarse a una etapa más grave (Boring y Squires 1993, CA Cancer J Clin 43: 7-26 y Ferguson 1990, Hematología Oncol Clin Nam 4: 1053-1168).

El carcinoma de pulmón es actualmente la principal causa de mortalidad por cáncer en hombres y mujeres en los Estados Unidos (Wingo y otros. 1995, CA J Clin Clínica 45: 8-30). En 1997, se estimaba que habían 160.000 muertes por cáncer de pulmón, lo que representa el 12% de las muertes por cáncer en hombres de Estados Unidos y el 2% en las mujeres de Estados Unidos (Boring & Squires 1993, supra). El cáncer de pulmón es también uno de los tipos más letales de cáncer, como se refleja en una tasa de supervivencia hasta cinco años de sólo el 14%. El mal pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón, en relación con otros tipos de cáncer humanos, se debe en gran parte a la falta de métodos eficaces de detección precoz. En el momento de la presentación clínica (sintomática), más de dos tercios de todos los pacientes tienen afectación de nódulos regionales o metástasis a distancia, las cuales son, por lo general, incurables. En estudios de pacientes con cáncer de pulmón localizado (Etapa 0 ó 1), sin embargo, las tasas de supervivencia hasta 5 años han variado desde un 40% a un 70% (Boring y Squires, 1993, supra; Ferguson, 1990, supra).

Históricamente, las únicas pruebas de diagnóstico utilizadas para detectar cáncer de pulmón antes presentar síntomas han sido la citología de esputo y la radiografía de tórax. Como consecuencia, la eficacia de estas pruebas como herramientas de cribado poblacional ha sido ampliamente evaluada en estudios en los últimos decenios. Ambas pruebas detectan carcinoma en etapa temprana presintomático, en particular, el carcinoma de células escamosas.

Las mejoras en los métodos de cribado se han centrado principalmente en torno a mejorar la utilidad de la citología de esputo a través de los avances tecnológicos en microscopía. La citología de esputo requiere un examen visual de una muestra de células durante el que se utiliza el tamaño de la célula, la forma, la organización y una relación entre el tamaño del núcleo de la célula y el citoplasma para determinar la morfología de la célula. Debido a que esta evaluación de la morfología celular requiere una inspección visual y clasificación, la técnica requiere una cantidad significativa de conocimientos adquiridos por el observador clínico. Se han realizado diversas investigaciones con resultados que sugieren que el análisis de imágenes de alta resolución asistido por ordenador permite la detección de cambios subvisuales en los núcleos visualmente normales asociados con varios tipos de tejidos (Montag y otros. 1991, Anal Quant Cytol Histol 13: 159-167; Haroske y otros. 1988, Arch. Geschwulstforsch, 58: 159-168; Hutchinson y otros. 1992, Anal Quant Cytol Estol 4: 330-334). El análisis asistido por ordenador de la distribución de ADN en muestras de células ha proporcionado un 74% de clasificación morfológica correcta de los núcleos sin revisión humana del material y sin la necesidad de que estén presente núcleos visualmente anormales cuando se compara con las pruebas citológicas estándar.

La evaluación morfológica de las muestras citológicas también ha mejorado debido a los avances en la comprensión de la patología del tumor de pulmón. Gran parte de este trabajo se ha centrado en la identificación de "biomarcadores". Biomarcadores se refiere a una amplia gama de anomalías fenotípicas y genéticas progresivas de la mucosa respiratoria que pueden ser utilizadas para determinar el potencial del epitelio bronquial para transformarse completamente en un tumor maligno. Los marcadores han sido ampliamente clasificados como de cambios morfológicos, marcadores inmuno/histoquímicos de proteínas expresadas diferencialmente, marcadores de inestabilidad genómica, marcadores de cambio epigenético (por ejemplo, metilación anormal), y de mutaciones genéticas (Hirsch y otros. 1997, Lung Cancer 17: 163-174).

Los niveles de expresión de estos marcadores están siendo evaluados en muestras de tejido cito/histológicas displásicas y neoplásicas colectadas de poblaciones de alto riesgo. Entre las muestras que en la actualidad están siendo objeto de análisis de marcador exploratorio se encuentra el esputo. El interés en las muestras de esputo para la investigación de biomarcadores se ha generado a partir de la creencia largamente sostenida de que las células exfoliadas recuperadas en el esputo pueden ser la indicación más temprana posible de un carcinoma incipiente, ya que el cáncer de pulmón se desarrolla con más frecuencia en el epitelio bronquial. Mediante la aplicación de sofisticadas técnicas de genética molecular (por ejemplo, ensayos basados en PCR), los estudios están aportando evidencia de que los biomarcadores seleccionados pueden ser detectados en el esputo (Mao y otros. 1994, Cancer Res. 54: 1634-1637; Mao y otros. 1994, Proc Natl Acad Sci USA. 91: 9871-9875; Sidransky 1995, J Natl Cancer Inst 87: 1201-1202; Tockman y otros. 1988, J. Clin Oncol, 11: 1685-1693; Tockman y otros. 1994, Chest, 106: 385s-390s).

Los servicios de cribado o detección de cáncer comercialmente disponibles se basan en ensayos basados en el diagnóstico citomorfológico por clínicos entrenados que observan cada muestra y determinan la extensión y la identidad de los tipos de células anormales. Este proceso no sólo es caro y requiere de mucho tiempo, sino también introduce el juicio humano y, por lo tanto, error en el procedimiento. Recientemente, ha sido desarrollado un método para la detección de células cancerosas de pulmón a través de la utilización de 5, 10, 15, 20-tetrakis (carboxifenil) porfina (TCPP) (Patente de EE.UU. Núm. 5.162.231 de Cole y otros.) Este método se basa en la propensión de las células cancerosas a acumular TCPP de su entorno en una cantidad mayor que las células no cancerosas. Tras la incubación de una muestra de células durante 6-24 horas con 200 µg/ml de TCPP, TCPP entra en las células y se une a la membrana perinuclear y a las mitocondrias de las células neoplásicas. La TCPP fluoresce bajo luz ultravioleta, y de esta manera las células cancerosas pueden ser diagnosticadas únicamente por la intensidad de fluorescencia, sin hacer referencia a la morfología. La Patente de EE.UU. Núm. 6.190.877 de Adair y otros da a conocer un método similar. La extensión de la utilización de este compuesto para la identificación de condiciones precancerosas del tejido (por ejemplo, células displásicas) permitiría el cribado en poblaciones de alto riesgo para identificar aquellos individuos cuyos tejidos están progresando hacia condiciones de cáncer invasivo y, de esta manera, facilitar la identificación del cáncer o displasia en la etapa más tratable. Las características deseables de dicho método de cribado serían un procedimiento que sea rápido, barato y que requiera un mínimo de conocimientos técnicos.

Por las razones anteriores, existe la necesidad de una técnica y metodología para la detección de células displásicas en sus primeras etapas. Además, existe la necesidad de una técnica que pueda proporcionar resultados de diagnóstico altamente fiables y que no se base en el análisis subjetivo del clínico que realiza el diagnóstico.

Características de la invención

La presente invención se deriva del descubrimiento de que se puede utilizar TCPP para detectar células displásicas y precancerosas así como células cancerosas, en conjunto con un método nuevo y más eficiente de solubilización de TCPP, procedimientos mejorados de tinción y una variedad de estrategias de clasificación de células. La TCPP es un compuesto fluorescente que se ha descubierto ahora que se une a los componentes de células precancerosas vivas o fijadas, así como a células cancerosas, de una manera que permite clasificar el estado de las células y del tejido del que provienen en una progresión continua de la enfermedad. Este método de detección de tejidos precancerosos se adapta bien al diagnóstico *in vitro* de muestras de tejido o células, así como al diagnóstico *in situ*.

Un aspecto de la presente invención es un método para detectar células precancerosas, que en su forma más simple comprende incubar células vivas o fijadas (es decir, muertas) en una solución de TCPP durante un tiempo suficiente para que se una a los componentes celulares y detectar la TCPP unida mediante fluorimetría. Este método tiene muchas variantes. En una variante, las células se fijan sobre una superficie, preferentemente un portaobjetos de microscopio, y más preferentemente en una monocapa. En otra variante, las células se tratan con formalina u otra solución fijadora adecuada, se mantiene en suspensión, y se trata con TCPP, las células se separan de la TCPP no unida y, a continuación, se analizan y clasifican mediante citometría de flujo.

Realizaciones preferentes de la etapa de incubación incluyen la utilización de una solución de TCPP con aproximadamente 4 µg/ml a 400 µg/ml de TCPP, una temperatura aproximadamente entre 23°C y aproximadamente 42°C y un tiempo entre aproximadamente 0,2 minutos y 2 horas. La TCPP no unida se elimina y la TCPP restante se detecta fluorimétricamente. En una realización preferente, la TCPP se detecta aproximadamente entre 1 y 24 horas después que se lleva a cabo el ensayo.

En otra realización de la presente invención, se calcula el porcentaje de células fluorescentes en una muestra de células. Realizaciones preferentes comprenden el análisis de las células fluorescentes para determinar su intensidad de fluorescencia y otras características citomorfológicas. En una realización particularmente preferente, las células fluorescentes se clasifican de acuerdo con un conjunto de características de intensidad de la fluorescencia y citomorfológicas predeterminadas, lo que facilita la caracterización de las células en una gama continua que va desde normales a metaplásicas a displásicas (de leve a grave) a carcinómicas (de leve a grave) y aumenta la eficiencia y la fiabilidad de los diagnósticos y pronósticos hechos utilizando los métodos de la presente invención. Otras realizaciones de la presente invención comprenden la separación de las células normales o metaplásicas en una muestra de las células displásicas o carcinómicas, utilizando criterios de intensidad de fluorescencia (por ejemplo, mediante citometría de flujo fluorimétrica).

A fin de facilitar la práctica del método de detección mencionado anteriormente, otro aspecto de la presente invención da a conocer un método para preparar una solución de TCPP que comprende disolver TCPP en aproximadamente un 50% hasta aproximadamente un 90% de alcohol a un pH superior aproximadamente a pH 8,5 e inferior aproximadamente a pH 12,5. En una realización preferente, el alcohol es isopropanol y en otra realización preferente, el pH de la solución se ajusta con bicarbonato de sodio o hidróxido de amonio.

Otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende TCPP en aproximadamente desde un 50% hasta aproximadamente un 90% de alcohol a un pH superior a aproximadamente pH 8,5 e inferior a aproximadamente pH 12. En una realización preferente, el alcohol es isopropanol y en otra realización preferente, el pH de la solución se ajusta con bicarbonato de sodio o hidróxido de amonio. En una realización, la composición se prepara mediante el método de preparación de una solución de TCPP. En una realización relacionada, la solución de TCPP utilizada en el método de detección se diluye.

En otro aspecto de la presente invención, las células están *in situ* dentro de un paciente mamífero. Las células son expuestas a la solución de TCPP y se detecta la fluorescencia mediante la utilización de técnicas endoscópicas.

Otro aspecto de la presente invención es un kit para la detección de células precancerosas, que comprende la composición de la presente invención en un recipiente. En otra realización, el kit comprende uno o más componentes adicionales, tales como instrucciones y reactivos para llevar a cabo el método de detección de la presente invención, o controles positivos y negativos.

Otras características y ventajas de la presente invención se comprenderán mejor en referencia a los dibujos, descripción detallada y ejemplos que siguen a continuación.

Descripción detallada de la invención

La presente invención comprende composiciones y métodos para detectar condiciones precancerosas en células humanas utilizando 5, 10, 15, 20-tetrakis (carboxifenil) porfina (TCPP). La presente invención se deriva del descubrimiento de que TCPP se une específicamente a las células anormales precancerosas además de a las células cancerosas, pero no se une a las células normales (no cancerosas). Además, esta unión diferencial se observa en las células fijadas, así como en células vivas. Además de esta característica nueva y útil de la TCPP, la presente invención incorpora adicionalmente un método mejorado para solubilizar TCPP que conserva su actividad en un grado mayor, así como varios aspectos novedosos que hacen que el método más adecuado para el cribado y la automatización. Utilizando los métodos de la presente invención, se requiere menos tiempo para que las células se unan a TCPP cuando se compara con el método descrito en la Patente de EE.UU. Núm 5.162.231 (por ejemplo, de 0,2 min a 2 horas frente a 24 horas) y también es necesaria una menor concentración de TCPP (por ejemplo, 40 µg/ml frente a 200 µg/ml). Además, se pueden utilizar una monocapa de células en lugar de una solución de células, aunque también se puede utilizar una solución de células.

La clave para la conveniencia y la eficiencia del método de detección es el nuevo método de solubilización de TCPP. Los anteriores métodos utilizaban NaOH 1 M para disolver la porfirina. Este método requiere la valoración con HCl 1 M, que es inexacta y requiere que cada solución se analice para buscar TCPP no disuelta. Además, el método con NaOH coloca la porfirina en un ambiente oxidante con un pH tan alto como 13,0, exponiendo así la porfirina a un alto riesgo de degradación. El método de solubilización de la presente invención utiliza un pH de 9,1, en conjunto con la novedosa adición de un 90% de alcohol para llevar a cabo una solubilización más completa y fiable. Finalmente, el método de la presente invención utiliza un tampón para estabilizar el pH de la solución de trabajo final de TCPP en el intervalo preferente de 5,8 a 6,8.

La presente invención implica la detección de células precancerosas y cancerosas en muestras de tejidos humanos utilizando la propensión única de estas células para unirse a TCPP en una cantidad mayor que las células sanas. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "precancerosa" o "precancerosa anormal" se refieren a células que exhiben displasia leve a grave y el término "canceroso" se refiere a células que exhiben carcinoma leve a grave. Estos estados citológicos se definen morfológicamente en el presente documento mediante los criterios utilizados para determinar la morfología celular utilizando citología por tinción de Papanicalou ("tinción PAP").

También se pueden definir por otros indicadores comúnmente utilizados en la técnica para una célula o tejido en particular (por ejemplo, indicadores de inflamación pulmonar en el pulmón o muestras de esputo). De "normal" a "carcinómica grave", las etapas de una célula se clasifican en el presente documento como (1) normal (sin anomalías significativas), (2) metaplasia (metaplasia escamosa), (3) displasia leve (atipia escamosa), (4) displasia moderada (atipia escamosas), (5) displasia grave (atipia escamosa marcada), (6) carcinoma de células escamosas *in situ* (CIS, no invasivo) (también conocido como carcinoma de leve a moderado) y (7) carcinoma de células escamosas (bien diferenciado queratinizante de tipo invasivo) (también conocido como carcinoma de moderado a grave). Según la presente invención, se ha determinado que tras la exposición a TCPP, las células displásicas y carcinómicas muestran fluorescencia de TCPP, mientras que las células normales muestran poca o ninguna fluorescencia de TCPP. Algunas células metaplásicas pueden mostrar fluorescencia de TCPP baja a moderada, pero en muchos casos no lo hacen, por lo que la fluorescencia de TCPP no es tan fiable como indicador de metaplasia, y sí lo es para displasia y carcinoma.

El método comprende (1) incubar una muestra de células vivas o fijadas con TCPP durante un tiempo suficiente para permitir que la TCPP se una a los componentes celulares de células precancerosas o cancerosas anormales, si están presentes en la muestra, (2) eliminar la TCPP no incorporada, (3) determinar por fluorimetría la cantidad de TCPP que queda en la muestra, si lo hubiere; y, opcionalmente, dependiendo de los resultados de la etapa (3), (4) evaluar las células fluorescentes de TCPP para determinar su estado de divergencia hacia cáncer a partir del estado normal (o metaplásico anormal, pero no displásico). Específicamente, tal como se ha descrito anteriormente, el método de la presente invención permite una determinación de que una muestra de células contiene células que son displásicas (de leve a grave) o carcinómicas (de leve a grave).

En una realización a modo de ejemplo, pero sin constituir limitación, el método de detección comprende las siguientes etapas:

1. fijar las células en una monocapa sobre un portaobjetos de microscopio;
2. exponer las células a una solución de TCPP aproximadamente a 40 µg/ml en una solución tamponada a un pH aproximadamente de 6,1 (por ejemplo, por inmersión del portaobjetos en la solución o mediante la colocación de gotas de solución sobre los portaobjetos) aproximadamente a 36°C durante un tiempo especificado, tal como se describe a continuación;
3. lavar los portaobjetos con una solución tamponada a un pH aproximadamente de 6,1;
4. esperar, como mínimo, 1 hora, pero no más de 24 horas, y
5. cuantificar la fluorescencia de las células aproximadamente a 610-740 nm cuando se excita con luz aproximadamente de 380-450 nm.

Las variaciones de este método a forma de ejemplo se explican con mayor detalle a continuación.

Cuando se utiliza en el presente documento para describir los componentes de las mezclas de ensayo u otros parámetros de la presente invención, el término "aproximadamente" significa dentro de un margen de error comúnmente aceptable, para la determinación hecha, utilizando métodos estándar.

La primera etapa, la incubación de las células con fijador, es opcional, pero preferente, ya que se ha encontrado que reduce el tiempo requerido para la incubación, así como la concentración TCPP en la solución de trabajo, en esta realización a modo de ejemplo y en otras.

Las siguientes secciones establecen una variedad de otras realizaciones de la presente invención.

Los métodos de la presente invención pueden utilizarse en una variedad de tipos de células tal como se describe a continuación y además son aplicables a las aplicaciones de diagnóstico y pronóstico veterinarias, así como humanas. Por consiguiente, el término "paciente" o "individuo", tal como se usa en el presente documento, se entiende que se aplica a un humano o a un animal.

El método de detección se puede utilizar para detectar células precancerosas y cancerosas en muestras de células *in vitro*. Las muestras de células se pueden adquirir mediante cualquiera de los métodos actualmente utilizados en el sector de la citopatología. Por ejemplo, las células se pueden recoger a partir de muestras de esputo (ver Ejemplo 1), hisopos cervicales, lavados bronquiales, aspiración con aguja fina y biopsias de núcleo de tiroides y de mama, lavados de vejiga, orina, lavados bucales, enemas y otras biopsias conocidas en la técnica. Otras fuentes de muestras de células incluyen sangre o fracciones de la misma, linfa, líquido cefalorraquídeo, hueso y médula ósea, por nombrar algunos. El método de la presente invención es aplicable a cualquier muestra de células de cualquier tejido u órgano en el cuerpo.

Opcionalmente, las células pueden fijarse mediante procedimientos estándar antes de la exposición a TCPP, incluyendo pero sin constituir limitación, soluciones que contienen formaldehído, metanol, etanol o isopropanol. En una realización, las células se fijan en etanol al 95%.

5 El ensayo puede realizarse en solución mediante la medición de fluorescencia total por densidad celular, o mediante la adhesión de las células sobre una superficie. Las células no necesitan ser tratadas con un fijador, pero la fijación de las células es preferente en algunas realizaciones, en particular aquellas en las que las células se adhieren a un soporte sólido. En una realización, las células se adhieren como una monocapa a un portaobjeto. En otras realizaciones, se utiliza el sistema de preparación de portaobjetos en base a líquidos MonoPrep2 o MonoPrepG (MonoGen, Inc., Herndon, Virginia) o el ThinPrep Processor (Cytoc Corporation, Marlborough, MA).

15 El método de la presente invención también puede utilizarse para detectar células precancerosas y cancerosas *in situ*, así como una ayuda en la cirugía de resección. Por ejemplo, el método puede ser utilizado para detectar células displásicas en el pulmón *in situ* mediante inyección de TCPP en un medio adecuado seguido por broncoscopia de fluorescencia. Un método similar también se puede utilizar para detectar células anormales para la escisión durante la cirugía. Se pueden encontrar aplicaciones *in situ* para cualquiera de los órganos del cuerpo, incluyendo sin constituir limitación, mama, próstata, pulmón, cuello del útero, garganta, vejiga, orofaringe, piel y tracto gastrointestinal mediante la utilización de un dispositivo endoscópico similar. La cantidad de TCPP preferente para uso en esta realización está determinada por el modo de administración y el sitio de aplicación. Por ejemplo, si la TCPP se inyecta en el torrente sanguíneo, la concentración eficaz de TCPP dependerá de su solubilidad máxima en solución salina o sangre (por ejemplo, aproximadamente 100 µg/ml). Para la inyección directamente en el tejido afectado, una cantidad eficaz de TCPP dependerá del tejido diana y la proximidad de la inyección al tejido (por ejemplo, aproximadamente de 1-20 mg). En el pulmón, un suministro de aerosol, por ejemplo, de 5-10 ml, a una concentración de 20-50 µg/ml debe ser adecuado. Los métodos para determinar dichas cantidades de TCPP a ser administradas como agente de diagnóstico son bien conocidos para los químicos y otros expertos en la materia.

20 La concentración de TCPP en la solución de trabajo y la duración del tiempo en que las células son expuestas a la solución de TCPP son dos variables que pueden ser alteradas de una forma coordinada. La concentración de TCPP es preferentemente de 4-100 µg/ml, más preferentemente de 4-40 µg/ml y más preferentemente de 20-40 µg/ml. El tiempo de exposición puede variar aproximadamente de 0,2 minutos a aproximadamente 2 horas en una realización, y de 10 a 60 minutos en una realización más preferente. Cuando se utilizan bajas concentraciones de solución de TCPP, es apropiado un mayor tiempo de exposición, y cuando se utilizan concentraciones elevadas de TCPP, es adecuado un tiempo de exposición más corto. Por ejemplo, en realizaciones preferentes, los portaobjetos se exponen durante 10 minutos en 40 µg/ml de TCPP y, alternativamente, durante 60 minutos en 4 µg/ml de TCPP. El método para optimizar la concentración de TCPP en la solución de trabajo y el tiempo de exposición es bien conocido por los expertos en la técnica de la citología, con el objetivo de lograr la máxima unión específica de TCPP a los componentes celulares a la vez que se minimiza el fondo y otras absorciones y fluorescencias no específicas.

30 La solución de TCPP comprende TCPP en un medio acuoso tamponado aproximadamente a 36°C. En una realización, la capacidad de tamponado se debe a 100 mM de MES, sin embargo, se puede utilizar un intervalo de concentración de 20 a 200 mM en el método con igual eficacia. En una realización, la solución tiene un pH de aproximadamente 6,1; sin embargo, se puede utilizar un intervalo de pH de 5,8 a 6,7 con eficacia suficiente. También se pueden utilizar otros compuestos tampones que son eficaces en el intervalo de pH 5,8-6,7. Mientras que la etapa de exposición no es particularmente sensible a la temperatura, una temperatura algo superior a la temperatura ambiente es deseable para la optimización. El intervalo de temperatura adecuado para la etapa de exposición es aproximadamente de 23°C a aproximadamente 42°C en una realización preferente y aproximadamente de 30°C a aproximadamente 40°C en una realización más preferente.

45 Otros compuestos pueden añadirse a la solución de trabajo para reducir la fluorescencia de fondo, aumentar la estabilidad, o reducir autofluorescencia o la extinción. Por ejemplo, se pueden utilizar detergentes para disminuir la fluorescencia de fondo y se pueden utilizar reductores, antioxidantes y otros inhibidores de la generación o difusión de especies de oxígeno activo para prevenir la oxidación de TCPP o reducir el fotoblanqueado. Los compuestos de interés incluyen, pero sin constituir limitación, glicoles de polietileno, tritones, ditiotreitól, ditioeritritól, 2-mercaptoetanol, o los "kits Antifade" suministrados por Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, 7481-P, S-2828, S-7461). Además, puede incluirse hematxilina con TCPP, para actuar como contratinción y facilitar la microscopía de luz blanca.

50 La solución de lavado generalmente es similar a la solución acuosa utilizada para la solución de trabajo de TCPP, pero sin TCPP. Si se utilizan portaobjetos de microscopio, los portaobjetos se debe lavar, como mínimo, una vez, más preferentemente tres veces y preferentemente con agitación de la solución de lavado en exceso. Si el ensayo se realiza en solución, la TCPP no unida se puede eliminar por centrifugación de las células, decantar el sobrenadante y resuspender las células en tampón fresco. Esta etapa puede repetirse si es necesario. También pueden utilizarse medios alternativos de separación de células de la solución de tinción, tales como filtración con captura de las células sobre una membrana o diálisis rápida (incluida diálisis giratoria). Las condiciones adecuadas de lavado se pueden determinar mediante el control de la fluorescencia de las células. El lavado debe ser suficiente para eliminar el fondo y otras uniones no específicas, pero no tan excesivo como para eliminar al TCPP

específicamente unida a los componentes celulares. La optimización de la etapa de lavado es bien conocida para los expertos en la técnica de la citología. Las composiciones que pueden añadirse a la solución de lavado para mejorar la eficacia o la estabilidad incluyen, sin constituir limitación, alcoholes, detergentes o soluciones salinas de baja molaridad.

5 Una etapa importante en el método de detección es permitir que el tiempo entre que el portaobjetos se ha expuesto a la solución de trabajo de TCPP al momento en que se lee el portaobjetos sea más de 1 hora, pero menos de 24 horas. Cuando el portaobjetos se lee después de 24 horas, puede haber demasiado deterioro de la TCPP para obtener un resultado preciso. Cuando las células se leen antes de 1 hora, el nivel de fluorescencia de fondo puede ser excesivamente alto.

15 Las longitudes de onda utilizadas para la etapa de detección están dentro de amplios intervalos en los que los intervalos de picos específicos serán más eficiente. El pico de excitación de TCPP en una solución acuosa de pH 5,0-7,0 se produce aproximadamente a 415 nm, mientras que un pico de emisión se produce aproximadamente a 645 nm y un pico secundario de emisión se produce aproximadamente a 706 nm. En general, se puede detectar TCPP mediante la iluminación de la muestra con luz ultravioleta (UV) y la detección de la luz emitida desde la muestra por encima aproximadamente de 500 nm. Las longitudes de onda utilizadas para excitar la TCPP en el método de la presente invención preferentemente pueden abarcar parte o la totalidad del intervalo aproximadamente de 380 a aproximadamente 450 nm, y lo más preferentemente una banda estrecha de longitudes de onda cercana a aproximadamente 415 nm. Asimismo, las longitudes de onda detectadas pueden abarcar parte o la totalidad del intervalo aproximadamente de 610 nm a aproximadamente 740 nm y más preferentemente un intervalo estrecho cercano a aproximadamente 650 nm. Bajo ciertas circunstancias evidentes para los expertos en la técnica de la microscopía de fluorescencia, puede ser preferente para detectar emisiones en un intervalo estrecho cercano a aproximadamente 706 nm. La selección de la longitud de onda puede lograrse de forma más fácil mediante filtros ópticos. Conjuntos de filtros para los tintes fluorescentes populares por ejemplo son fácilmente disponibles de Molecular Probes (Eugene, OR). La selección de la longitud de onda adecuada para excitar y detectar TCPP en el método de la presente invención puede obtenerse de la forma más fácil mediante la utilización de un conjunto de filtros diseñados para la detección de isotiocianato de fluoresceína (en adelante "FITC"), que generalmente tiene un filtro de excitación de 400 a 490 nm y un filtro de barrera para emisión por encima de 500 nm. La selección de otros sistemas de filtros es bien conocida por los expertos en la técnica de la microscopía.

35 La fluorescencia se puede detectar visualmente o mecánicamente, manualmente o por medios automáticos. Las células que tienen fluorescencia incluso moderada en comparación con las células no fluorescente son fácilmente distinguibles por el ojo humano. Por lo tanto, ciertas realizaciones de la presente invención comprenden simplemente observar las células tratadas con TCPP en un microscopio de fluorescencia y cuantificar el porcentaje de células fluorescentes en la muestra manualmente. Sin embargo, las realizaciones preferentes comprenden métodos automatizados bien conocidos en la técnica, y la cuantificación mecánica en el que una célula es "contada" como fluorescente si muestra fluorescencia sobre un nivel umbral predeterminado programado en el dispositivo de conteo, tal como es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, en las realizaciones que comprenden una monocapa de células adheridas a un portaobjetos de microscopio, se puede programar un lector de placas automático para contar como fluorescente cualquier célula que tiene fluorescencia predeterminada que sea de significación estadística en comparación con una célula equivalente normal, tal como se determina por métodos estadísticos estándar (dichos dispositivos también se pueden programar para contar las células de una forma determinada, que puede suministrar un segundo indicador de anomalías precancerosas o cancerosas). De forma alternativa, para realizaciones que comprenden un ensayo basado en solución, se pueden analizar muestras de células teñidas con TCPP y lavadas para clasificar las células activadas por fluorescencia (FACS), en la que el FACS está programado para separar las células que tienen un nivel predeterminado de fluorescencia, tal como puede determinarse estadísticamente por comparación con las células normales.

50 El número total de células presentes en una muestra se determina con el fin de calcular un porcentaje de ese total que son fluorescentes por TCPP. Esta determinación se puede realizar en una variedad de maneras conocidas en la técnica. En una realización, todas las células se tiñen con hematoxilina y se cuentan por microscopía de luz blanca. En otra realización, las células se tiñen con un colorante contador fluorescente adecuado (por ejemplo, uno que tiñe las membranas externas o internas de una célula) que presenta fluorescencia a una longitud de onda diferente de TCPP. En esta última realización, se cuantifica la relación de fluorescencia de TCPP con respecto a la fluorescencia del marcador celular.

60 Tal como se ha mencionado anteriormente, la novedad de los métodos de la presente invención reside en la apreciación de los presentes inventores que la tinción con TCPP identifica no sólo las células cancerosas, como ya se conoce, sino que también identifica células displásicas precancerosas. Debido a esto, el método descrito anteriormente produce mucha más información de lo que previamente se creía posible. En consecuencia, los resultados de la cuantificación de fluorescencia de TCPP serán determinantes para decidir si se llevan a cabo etapas analíticas posteriores y en que forma.

65 Por ejemplo, el método identificará un porcentaje de células en una muestra que son fluorescentes por TCPP. Si aproximadamente un 1-3%, más particularmente aproximadamente un 2-3%, de las células en una muestra son

fluorescentes, entonces la muestra contiene células que son, como mínimo, precancerosas anormales (displásicas) o cancerosas. Por consiguiente, un esquema analítico sencillo consiste en determinar si una muestra contiene, como mínimo, aproximadamente un 1% de células fluorescentes por TCPP. Si no es así, la muestra se diagnostica como negativa (normal). Si lo hace, se recomiendan pruebas adicionales para el paciente. Cabe señalar en relación con esta realización que, incluso si una muestra contiene menos de un 1% de células fluorescentes, otros factores (por ejemplo, predisposición del paciente al cáncer, o un cáncer preexistente en otro tejido) pueden sugerir que se realicen más pruebas. Una ventaja de la presente invención, que se describe en mayor detalle a continuación, es que una población enriquecida de células fluorescentes puede ser obtenida del paciente a través de FACS.

Además, se ha encontrado que el nivel de fluorescencia de una célula dada en una muestra se correlaciona con el estado asociado al cáncer de esa célula (véase Ejemplo 1). En consecuencia, las células individuales o grupos de células pueden ser evaluadas por su intensidad de fluorescencia en general y una determinación de si se requieren pruebas adicionales puede estar basada en parte en esta evaluación.

Los términos fluorescencia "alta", "media" y "baja" y términos relacionados tal como se utiliza en el presente documento, se entenderán por un experto en la materia que son términos comparativos en los que la intensidad de fluorescencia de una sola célula o grupo de células en una muestra de ensayo se compara, como mínimo, con células procedentes de una fuente equivalente (por ejemplo, esputo) que se conoce que son normales con respecto al cáncer (control negativo). Esta comparación puede realizarse por estimación visual, o, en sistemas automatizados, puede programarse utilizando parámetros estadísticos tales como la variación de la fluorescencia mediana de una población de muestra, tal como se describe en el Ejemplo 2. En realizaciones preferentes, las células de una muestra de ensayo se comparan por intensidad de fluorescencia con células de control adicionales cuyo estado canceroso ha sido predeterminado y precorrelacionado con una intensidad de fluorescencia de TCPP (por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 1).

Los términos "fluorescente" y "no fluorescente" también se utilizan en el presente documento. De acuerdo con las definiciones mencionadas anteriormente de varios niveles de intensidad de fluorescencia, los términos "no fluorescente" y "fluorescente" se utilizan como términos comparativos, en los que la fluorescencia se compara con las células normales de un origen equivalente, y/o contra la fluorescencia de fondo en general resultante de los reactivos o equipos utilizados en la detección de fluorescencia. Por lo tanto, si una célula o muestra de células se determina como "fluorescente", entonces está presente la fluorescencia en alguna intensidad por encima de la fluorescencia de fondo o de la fluorescencia observada en las células normales conocidas. Si una célula o muestra de células se determina como "no fluorescente", entonces la fluorescencia observada es mínimamente o nada en absoluto en exceso con respecto a la fluorescencia de fondo o la fluorescencia observada en las células normales. Esta comparación es obvia para un experto en la materia.

Una evaluación citomorfológica combinada con fluorescencia por TCPP es particularmente útil con cultivos de células que tienen un bajo nivel de fluorescencia debido a que una evaluación visual de las células con las técnicas de evaluación estándar puede diferenciar fácilmente la célula metaplásica ligeramente fluorescentes (no cancerosa) de las células displásicas (precancerosas). Una realización del método comprende una etapa adicional de evaluación citomorfológica además de la cuantificación de la fluorescencia, especialmente utilizando una tinción citológica estándar tal como hematoxilina para ayudar a visualizar la célula y los contornos nucleares. Otra realización emplea la evaluación citomorfológica como una etapa posterior, si se cumplen ciertos requisitos de umbral, por ejemplo, la muestra contiene más de 1% de células fluorescentes.

En una realización particularmente preferente de la presente invención, se combinan las características citomorfológicas seleccionadas con la intensidad de fluorescencia para producir un sistema de clasificación que es muy útil para el diagnóstico eficiente y reproducible de las diversas etapas de metaplasia, displasia y carcinoma que pueden estar presentes en una muestra de células. Dicho sistema de clasificación se describe en detalle en el Ejemplo 1. En esta realización, las células fluorescentes por TCPP se asignan a una o más clases numéricas, en base a la intensidad de fluorescencia y características morfológicas simples que incluyen la forma y tamaño celular, el número o tamaño de los núcleos, la presencia de grupos de células y la degeneración de las células o grupos de células, la presencia de células anisoides irregulares, la visibilidad de la membrana celular y la presencia y la naturaleza de los desechos nucleares. El técnico o científico que realiza la evaluación citomorfológica de células fluorescentes por TCPP puede utilizar la clasificación como una lista de verificación, es decir, una célula que se examina puede ser marcada para indicar "más" o "menos" con respecto a cada una de las clases numéricas. El número de clases numéricas asignadas a una célula particular y el patrón de clases específicas asignadas a una célula son informativos de la condición cancerosa o precancerosa de esa célula. A modo de ilustración, el Ejemplo 1 muestra un sistema de clasificación que comprende 14 clases numéricas. Tal como se muestra en la Tabla 2 de ese ejemplo, que presenta los ensayos de muestras de esputo, las células negativas o metaplásicas generalmente se pueden asignar a algunas de las clases, mientras que las células gravemente carcinómicas son asignables a varias. Como ilustración adicional, las células negativas o metaplásicas con frecuencia se asignan a la clase 11, mientras que las células moderadamente displásicas a carcinómicas no, y las células carcinómicas con frecuencia se asignan a la clase 6, mientras que las células displásicas o metaplásicas normales no.

5 En otra realización de la presente invención, las células tratadas con TCPP en solución de un solo paciente se determinaron como carcinómicas se pueden separar por citometría de flujo en función de su nivel de fluorescencia. Las células que muestran un mayor nivel de fluorescencia se consideran cancerosas mientras que las células con moderado a bajo nivel de fluorescencia se consideran displásicas y las células sin fluorescencia se consideran normales. Este tipo de separación permite que las células displásicas o cancerosas de un paciente puedan ser comparadas con las células normales propias del paciente, proporcionando de esta manera una población de control "interno" ideal.

10 En otra realización, mediante la separación de las células cancerosas y normales del mismo paciente, pueden ensayarse para probar la eficacia de diversos agentes quimioterapéuticos. Las células separadas se dispensan en alícuotas. Un agente terapéutico seleccionado se puede mezclar a la misma concentración con una alícuota de células altamente fluorescentes y una alícuota de células de bajo nivel de fluorescencia. Esta etapa se puede repetir con alícuotas frescas y un agente terapéutico diferente. Las tasas de muerte celular se pueden evaluar utilizando técnicas conocidas en la técnica. A continuación, se puede determinar el agente terapéutico más preferente para el tratamiento mediante la elección del agente quimioterapéutico en el que murieron el mayor número de células determinadas como cancerosas (es decir, células altamente fluorescentes) y destruyeron el menor número de células normales (es decir, las células con poca o ninguna fluorescencia después del tratamiento con TCPP).

20 En conjunto con el cribado o el método de detección de diagnóstico de la presente invención, se ha desarrollado un método para disolver TCPP para su utilización en el método, así como otras aplicaciones. Este método comprende disolver TCPP en aproximadamente un 50% hasta aproximadamente un 90% de alcohol con un pH superior a aproximadamente pH 8,5 e inferior a aproximadamente pH 12,5. Son preferente para su utilización en la presente invención alcoholes inferiores tales como metanol, etanol, isopropanol y n-propanol. Más preferentemente, el alcohol es isopropanol y su pH se ajusta con bicarbonato de sodio o hidróxido de amonio a un pH superior a 8,5 e inferior a 25 10,0. La concentración de isopropanol puede estar entre un 50% y un 90% y el bicarbonato de sodio puede estar entre 20 mM y 100 mM en algunas realizaciones. La concentración de TCPP puede ser de hasta aproximadamente 2 mg/ml. En una realización, TCPP se disuelve a 1 mg/ml en una solución de bicarbonato sódico 50 mM en isopropanol al 50%.

30 La presente invención también comprende una composición útil para su utilización en cualquier método que utiliza TCPP que comprende TCPP en alcohol con un pH mayor que 7. Esta solución preferentemente se prepara mediante por el método de disolver TCPP detallado anteriormente. Esta composición debe almacenarse preferentemente aproximadamente a 4°C en la oscuridad.

35 La presente invención abarca, además, los kits para la detección de células precancerosas y cancerosas que comprenden TCPP en un recipiente, opcionalmente con instrucciones. En una realización, el kit está diseñado para ser utilizado con el método de detección de la presente invención. En una realización, el kit comprende la composición de la presente invención que comprende TCPP solubilizado en base a alcohol en un recipiente. Esta solución de TCPP puede utilizarse como una solución madre que se diluye en una solución acuosa tamponada con el fin de detectar células precancerosas y cancerosas. El kit puede comprender componentes de recogida de la muestra de células, tal como el recipiente de recogida de esputos del Ejemplo 1, o alternativamente puede comprender artículos para la detección de células precancerosas en muestras ya adquiridas. El kit puede ser adaptado para su utilización con sistemas de preparación de portaobjetos, por ejemplo, MonoPrep2 o MonoPrepG (Monogen, Inc., Herndon, VA) o el ThinPrep Processor (Cytoc Corporation, Marlborough, MA), por citar tres. Estos kits también se pueden diseñar para ser utilizados con otros formatos diferentes de portaobjetos de microscopio, tales como placas de microtitulación o dispositivos de citometría de flujo. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el kit puede comprender controles positivos o negativos, o ambos, tal como se emplearía por un experto en la materia en la realización de los ensayos de la presente invención.

50 Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la presente invención con mayor detalle. Están destinados a ilustrar la presente invención y no constituyen una limitación de la misma.

EJEMPLO 1

55 Ensayo de portaobjetos de vidrio para la detección de células precancerosas y cancerosas con TCPP

En este ejemplo se comparan los resultados de los diagnósticos obtenidos mediante el análisis citomorfológico estándar de portaobjetos de esputo con tinción PAP con portaobjetos tratados con TCPP y analizados mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados indican que la técnica de detección con TCPP de la presente invención es equivalente a la citología de esputo convencional en la detección de células neoplásicas (displasia y carcinoma *in situ*) y carcinomas puros. Los resultados también indican que un experto en la materia puede utilizar el método, en conjunto con normas de clasificación simples, para estimar el grado de displasia presente en una muestra de tejido.

Métodos

Procedimientos de procesamiento de esputos utilizados en la preparación de portaobjetos de monocapa. Todos los portaobjetos de monocapa seleccionados para el análisis en este estudio se prepararon a partir de muestras de esputo recogidas de pacientes que realizaron la técnica de tos espontánea por la mañana temprano. Específicamente, se instruyó a los pacientes para expectorar cualquier material al toser lo largo de tres mañanas consecutivas en un recipiente lleno con un fijador que consistió en Carbowax al 2% en alcohol al 50% / fluido Saccomanno al 50% con 0,03-0,05 mg/ml de rifampicina. Se añadió rifampicina a la solución fijadora para servir como profiláctico contra pacientes portadores de *M. tuberculosis* o aquellos pacientes que pueden ser portadores asintomáticos de *N. meningitis*.

La solución de Carbowax al 2% se preparó mediante la adición de 2 ml de Carbowax (150) fundido a 98 ml de etanol al 50% y se mezcló durante 30 minutos. La cristalería utilizada para preparar la solución se mantuvo caliente para prevenir el endurecimiento de la cera sobre la superficie durante la preparación, lo cual puede causar mediciones inexactas. Se separó Carbowax antes de la exposición a la solución de trabajo de TCPP por inmersión en alcohol al 95% durante, como mínimo, 15 minutos.

La solución de rifampicina (3 mg/ml) se preparó disolviendo 300 mg de cápsulas de rifampicina en 100 ml de alcohol etílico y se mezcló en una mezcladora Waring a alta velocidad. Un ml de esta solución se añadió a cada 30 ml de solución Saccomanno o 20 ml por litro de solución Saccomanno y se mezcló vigorosamente. La preparación de la solución Saccomanno se llevó a cabo mediante métodos estándar bien conocidos por los expertos en la técnica de la citología.

Dos portaobjetos de microscopio "Thin-prep" (Cytoc Corporation, Marlborough, MA) y un tubo de centrifuga de plástico de 50 ml fueron etiquetados con la información del paciente. La muestra de esputo se vertió en un tubo de centrifuga de 50 ml de plástico y se añadió solución de alcohol etílico al 50% adicional para llevar el volumen a 50 ml si es necesario. El contenido del tubo de centrifuga se vertió en un recipiente de semi-microlicuadora Eberbach de 250 ml y se homogeneizó durante 10 a 60 segundos, dependiendo del examen visual de la muestra y del contenido de mucosa. Las muestras con mucosa espesa requirieron a veces mayores tiempos de licuación. La muestra se vertió de nuevo en el tubo de centrifuga y se centrifugó a 1850 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, dejando de 1 a 2 ml en el tubo de centrifuga para mezclar con el sedimento (centrifugado). El tubo se agitó en un mezclador rotatorio durante aproximadamente 10 segundos. Se colocaron de una a tres gotas del sedimento en un vial PreservCyt (Cytoc Corporation, Milford, MA). La muestra se incubó durante 5 minutos para desactivar todos los organismos microbianos y virales.

Se fijaron las capas monocelulares de las muestras en los portaobjetos utilizando el Thinprep Processor (Cytoc Corporation, Milford, MA) según las instrucciones del fabricante. En el Thinprep Processor, las células se recogieron sobre un filtro de policarbonato (tamaño de poro de 0,5 mm) y se transfirieron a un portaobjetos de vidrio. A continuación, el Thinprep Processor se depositó inmediatamente el portaobjetos en un baño fijador que contenía etanol al 95%.

Solución madre de TCPP. Se añadieron 400 mg de bicarbonato de sodio aproximadamente a 90 ml de isopropanol al 50% (50 mM de bicarbonato de sodio) y se mezclaron hasta su completa disolución para preparar base de isopropanol al 50%. Se añadieron lentamente cien miligramos de TCPP a la base de isopropanol al 50% (50 mM de bicarbonato de sodio) y se mezcló durante 3 a 5 minutos hasta que se disolvió. La solución de TCPP se llevó hasta 100 ml volumétricamente con la base de isopropanol al 50%, se mezcló bien y se almacenó en una botella de reactivo de color ámbar cubierta con papel de aluminio en un área refrigerada. La concentración final de TCPP en la solución madre fue de 1 mg/ml.

Solución de trabajo de TCPP. Se preparó solución de trabajo de TCCP fresca cada día. Aproximadamente 10 ml de solución madre de TCPP con una concentración de 1 mg/ml se llevó a temperatura ambiente. Se colocaron ocho mililitros de la solución madre de TCPP (1 mg/ml) en un matraz aforado de 200 ml y se añadieron lentamente aproximadamente 100 ml de tampón MES. La solución se mezcló suavemente. Se añadió tampón MES adicional para llevar la solución a 200 ml volumétricamente. La solución se mezcló durante 3 a 5 minutos y se almacenó a 2-4°C en un frasco de color ámbar. La concentración final de TCPP en la solución de trabajo fue 40 µg/ml.

Procedimiento de exposición a TCPP. Los portaobjetos se fijaron en alcohol al 95% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se expusieron a TCPP inmediatamente después de la fijación o hasta 3 días después. Los portaobjetos se sumergieron en la solución de TCPP a 40 µg/ml durante 10 minutos a 36°C, a continuación se lavaron tres veces en tampón MES 100 mM, un minuto cada vez, a temperatura ambiente con agitación. Los portaobjetos se observaron después de más de 1 hora pero no más de 24 horas después.

Información del microscopio. El microscopio utilizado para la observación de los portaobjetos con células del esputo tratadas con TCPP fue un microscopio Olympus modelo BH-1 con un iluminador en la parte superior y una lámpara de mercurio superior para la microscopía de fluorescencia de luz reflejada. La lámpara de mercurio tiene líneas de emisión primarias a 365 nm, 405 nm, 436 nm y 545 nm. El filtro de fluorescencia ensamblado consistía en

dos cubos dicróticos. El cubo verde (490 nm) contenía un sistema de filtro con un filtro de excitación pasando 400-490 nm y un filtro de barrera de emisión pasando por encima de 500 nm.

Procedimientos de tinción portaobjetos de esputo mediante técnica de tinción PAP modificada. Secuencia de procedimiento (núm.), reactivo y tiempo (min.: seg.) fueron los siguientes: (1) alcohol al 95% 15:00, (2) agua de grifo 1:00, (3) Gil-i hemotox 2:30, (4) agua del grifo 1:00; (5) reactivo azulado :30; (6) agua del grifo 1:00; (7) alcohol al 95% :10; (8) og-6 1:30; (9) alcohol al 95 % :10; (10) alcohol al 95% :10; (11) EA-50 1:15; (12) alcohol al 95% :20; (13) alcohol al 95% :30; (14) alcohol al 100% 1:00; (15) alcohol al 100% 1:00; (16) alcohol al 100% 1:30; (17) xileno 1:00; (18) xileno 1:00; y (19) xileno 1:00.

Métodos de análisis citopatológico de rutina de portaobjetos con tinción de Papanicolaou. Los portaobjetos con tinción PAP se sometieron a evaluación citomorfológico semicuantitativa. (1) las células displásicas y neoplásicas fueron identificadas mediante la utilización de criterios morfológicos tradicionales, y (2) se cuantificaron los niveles de expresión de siete indicadores fundamentales de inflamación pulmonar (macrófagos alveolares, neutrófilos, células columnares, moco, espirales mucosas, macrófagos pigmentados, células metaplásicas). La metodología para la cuantificación de estos indicadores de inflamación ha sido previamente discutida en la literatura (Roby y otros, 1989, Acta Cytol 34: 147-154; Roby y otros, 1990, Acta Cytol 34: 140-146; Schumann y otros, 1989, Am Rev Respr Dis 139: 601-603). Los criterios utilizados para determinar la morfología de las células utilizando citología por tinción PAP se discuten a continuación.

No hay anomalías significativas. Las células se identificaron sin anomalías significativas si se cumplen los siguientes requisitos:

1. células epiteliales ciliadas basófilas mezcladas con macrófagos con pigmento grado 1-2 junto con células inflamatorias;

2. núcleos redondos del epitelio orientado de forma basal;

3. cromatina uniformemente dispersa;

4. membranas nucleares apenas visibles;

5. nucléolos apenas visibles; y

6. no están presentes células metaplásicas ni displásicas.

Metaplasia escamosa (sin displasia). Las células se identificaron como metaplásicas escamosas sin displasia si se cumplen los siguientes requisitos:

1. grupos de células basófilas sin cilios;

2. célula y tamaño nuclear uniforme;

3. baja relación núcleo / citoplasma (N/C);

4. cromatina nuclear finamente granular; y

5. pueden estar presentes pequeños nucléolos redondeados (por lo general solos).

Displasia leve (atipia escamosa). Las células se identificaron como displasia leve si se cumplen los siguientes requisitos:

1. más pequeñas que las células metaplásicas;

2. se ven en grupos cohesivos, o singularmente;

3. las células parecen planas (hojas) tanto los núcleos como el citoplasma en el enfoque;

4. las células varían ligeramente en tamaño;

5. el citoplasma puede ser eosinofílico o basofílico;

6. bordes citoplasmáticos finos;

7. los núcleos varían ligeramente en tamaño, generalmente de redondos a ovalados, si se dividen en 2 mitades de núcleo son imágenes especulares, la relación N/C puede variar ligeramente;

8. membrana nuclear lisa;
- 5 9. cromatina nuclear finamente granular (ligeramente aumentada), cromocentro ocasional; y
- 10 10. células en forma de fibras, células alargadas con citoplasma y núcleo alargados membrana nuclear diferente - citoplasma reticular fino a granular por lo general de color amarillo naranja brillante -queratinizante simple, pueden formar remolinos alrededor del núcleo central de queratina para hacer perlas epiteliales.
- 10 **Displasia moderada (atipia escamosa).** Las células fueron identificadas como moderadamente displásicas si se cumplen los siguientes requisitos:
1. variación en el tamaño, generalmente más grande, pero puede ser menor que en la displasia leve;
- 15 2. más variación en la forma y la relación N/C que en la displasia leve;
3. citoplasma denso, predomina acidofilia; aumento del número de células atípicas;
- 20 4. el núcleo puede tener dos mitades desiguales (no son imágenes especulares);
5. están presentes lobulaciones nucleares, grietas y nódulos; y
6. el material nuclear puede mostrar hiper cromasia con más patrón de la cromatina de tipo punteada.
- 25 **Displasia grave (atipia escamosa marcada).** Las células se identificaron como displasia grave si se cumplen los siguientes requisitos:
1. las células varían mucho en tamaño y forma;
- 30 2. por lo general ligeramente mayor tamaño de la célula que en la displasia moderada;
3. la relación N/C es alta, pero variable (con extremos);
- 35 4. predominan las células individuales, el núcleo es más central que en CIS;
5. el núcleo puede seguir la forma del citoplasma; el núcleo muestra menos distorsión que en CIS;
6. el pleomorfismo nuclear se incrementa con presencia de cromatina gruesa y condensación a lo largo de la envoltura nuclear;
- 40 7. paracromatina, núcleo grande, membrana nuclear multiagrupada focalmente engrosada; y
8. las células muestran citoplasma acidófilo predominante.
- 45 **Carcinoma de células escamosas *in situ* (CIS, no invasivo).** Las células se identificaron como carcinoma de células escamosas *in situ* si se cumplen los siguientes criterios:
1. células individuales o en agregados (grupos);
- 50 2. tamaño de célula variable -puede ser menor o mayor que las células de displasia marcada por lo general más pequeños que el carcinoma de células escamosas invasivo;
3. las células son grandes, redondeadas con núcleo situados simétricamente;
- 55 4. puede estar presente degeneración de las células;
5. escaso citoplasma, distribuido uniformemente puede estar queratinizado o no queratinizado concéntricamente alrededor del núcleo, (orangiofílico o basofílico);
- 60 6. relación N/C variable -mayor o menor de lo normal;
7. gránulos de la cromatina nuclear densos gruesos pueden estar interrumpidos por zonas claras;
- 65 8. borde cromatínico uniformemente engrosado con ondulación de la membrana nuclear;
9. se pueden observar lobulaciones de los núcleos;

- 10. se puede observar canibalismo, pero es inusual;
- 11. pueden estar presentes células multinucleadas;
- 12. sin nucléolos en el núcleo, puede estar presente una célula mitótica; y
- 13. fondo claro.

10 **Carcinoma de células escamosas (bien diferenciado queratinizante de tipo invasivo).** Las células se identificaron como carcinoma de células escamosas si se cumplen los siguientes criterios:

- 1. células por lo general individuales, orangeofílicas, pero pueden estar en grupos y degeneradas;
- 15 2. células grandes o pequeñas, angulares, con núcleos bien conservados y bordes celulares bien definidos;
- 3. células generalmente más grandes que *in situ*, y pueden ser pleomórficas, amplia gama de tamaño y forma;
- 20 4. se puede observar formación de perlas (perlas de cáncer);
- 5. moderada cantidad de citoplasma con "cola" anormal (en consonancia con invasión); células extrañas en forma de renacuajo, estrella, eje, una cromatina nucleara angular, con agrupamiento impredecible con hiper cromasia y compensación de paracromatina y cromatina claramente definida, interfaz de paracromatina;
- 25 6. la cromatina está grumosa, especialmente a lo largo de la membrana nuclear;
- 7. los nucleolos son grandes y acidofílicos, si están presentes;
- 30 8. la membrana nuclear en sí puede estar engrosada e irregular; irregularidad de espesor del borde de la cromatina nuclear;
- 9. la relación N/C es muy alta;
- 35 10. irregularidad nucleolar marcada en forma, tamaño, número (nucleolos hijas); mitosis anormales, multinucleación;
- 11. es común el canibalismo y la multinucleación; y
- 12. es común el material necrótico de fondo.

40 **Resultados**

En un estudio a ciegas en el que se examinaron 60 muestras, los resultados indican que las células anormales (displasia leve, moderada o grave o cancerosas) se pueden detectar con precisión con el procedimiento de detección con TCPP en comparación con el procedimiento de tinción PAP (tabla 1). Si el 2-3% de las células expuestas a TCPP fueron fluorescentes, entonces la muestra correlacionaba de forma fiable, como mínimo, con el diagnóstico de ligeramente displásicas. Cincuenta de las cincuenta muestras de esputo determinadas mediante el procedimiento de tinción PAP citomorfológico estándar que eran ligeramente displásicas a cancerosas también fueron identificadas como anormales mediante la detección con TCPP. Entre las diez muestras caracterizadas como normales o metaplásicas en base al procedimiento de tinción PAP, cuatro muestras demostraron la misma morfología mediante el método con TCPP. Las muestras diagnosticadas como normales mostraron una captación de TCPP mínima o nula.

La captación de TCPP en las células determinadas como negativas o metaplásicas por citomorfología tuvo una intensidad de fluorescencia característica y patrones que eran reconocibles y de diagnóstico. La tabla 2 presenta una comparación entre la morfología celular y la fluorescencia tal como se determina por citomorfología de tinción PAP y técnicas de TCPP, respectivamente. En base a la intensidad de fluorescencia y el patrón en muestras de células tratadas con TCPP, las células se clasificaron con uno de las 14 posibles clasificaciones numeradas relativas a una descripción morfológica. Si las células eran de clase 11 utilizando la determinación con TCPP y menos de un 2-3% de las células en el portaobjetos fueron fluorescentes por encima de los niveles de fondo, entonces se determinó que esa muestra era metaplásica y no displásica. Las células metaplásicas se diferencian fácilmente de las células normales por su fluorescencia moderada con una membrana celular apenas visible. De las diez muestras de células que se determinaron que eran negativas o metaplásicas por la tinción PAP, 6 fueron designadas con una descripción celular de clase 11 en base a la fluorescencia con TCPP. De las seis muestras de TCPP con designación de clase 11, tres también indicaron fluorescencia de los desechos nucleares (es decir, ya sea una clase 13 ó 14), y dos también mostraron una designación de clase 10 (fluorescencia del núcleo solamente).

Otro patrón que se muestra en la tabla 2 se refiere a la clasificación numérica 6 – células anisoides irregulares, fluorescencia baja a media. Es notable que se asignaron relativamente pocas células displásicas a esta clasificación, mientras que la mayoría de las células carcinómicas recibieron la clasificación 6. Por lo tanto, se espera que esta clasificación sea de particular importancia para distinguir carcinomas de displasias utilizando los métodos de la presente invención.

Otra observación importante revelada en la tabla 2 es que, como la morfología celular progresó de normal a carcinómica grave, el número total de las clasificaciones numéricas que fueron asignables a cada célula examinada también aumentó. A modo de ilustración, las células que tienen una morfología negativa o metaplásicas se les asignó un promedio de 2 clasificaciones numéricas, mientras que las células que mostraron adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y de células pequeñas se les asignó un promedio de 5 clasificaciones numéricas. Dado que las clasificaciones numéricas contienen descripciones de los diferentes tipos de anomalías celulares, es lógica una correlación positiva entre el grado de displasia o el carcinoma y el número de diferentes anomalías observadas en las células. Sin embargo, esta correlación hasta el momento no se ha sistematizado y utilizado para diagnosticar las condiciones precancerosas y cancerosas en una muestra de células.

Tabla 1. Correlación entre los resultados de TCPP y los resultados citomorfológicos.

Descripción del diagnóstico	N=60	
	Portaobjetos con morfología utilizando TCPP /	Portaobjetos con morfología utilizando citomorfología
Negativo o metaplásico	4/10	
Displasia leve	12/12	
Displasia moderada	9/9	
Displasia grave	8/8	
Carcinoma <i>in situ</i>	11/11	
Adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y células pequeñas	10/10	

Tabla 2. Descripciones de las células: Características citomorfológicas y fluorescencia de TCPP.

Número de clasificación= descripción celular	Número de muestras con células que tienen descripción numérica por microscopía de fluorescencia con TCPP / Número de muestras con descripción celular por citomorfología					
	Negativo o metaplásico (n=10)	Displasia leve (n=12)	Displasia moderada (n=9)	Displasia grave (n=8)	Carcinoma <i>in situ</i> (n=11)	Adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y células pequeñas (n=10)
1=núcleo o núcleos grandes, fluorescencia baja a media	3/10	12/12	9/9	7/8	10/11	6/10
2=células binucleares simétricas, fluorescencia media	0/10	5/12	5/9	3/8	3/11	2/10
3=células ovoides pequeñas, fluorescencia media a alta	0/10	4/12	4/9	2/8	6/11	6/10
4=células redondas pequeñas, fluorescencia baja	0/10	0/12	0/9	0/8	0/11	2/10
5=células multinucleadas, fluorescencia media	0/10	0/12	3/9	6/8	9/11	7/10
6=células anisoides irregulares, fluorescencia baja a media	0/10	0/12	1/9	1/8	10/11	7/10

(Continuación)

Número de muestras con células que tienen descripción numérica por microscopía de fluorescencia con TCPP / Número de muestras con descripción celular por citomorfología

Número de clasificación= descripción celular	Negativo o metaplásico (n=10)	Displasia leve (n=12)	Displasia moderada (n=9)	Displasia grave (n=8)	Carcinoma <i>in situ</i> (n=11)	Adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y células pequeñas (n=10)
7=grupos celulares, fluorescencia media a alta	0/10	0/12	1/9	0/8	1/11	3/10
8=células individuales degeneradas, fluorescencia media a alta	0/10	0/12	0/9	0/8	4/11	7/10
9=grupos celulares degenerados, fluorescencia media a alta	0/10	0/12	0/9	0/8	1/11	4/10
10=células uniformes en tamaño con núcleo redondeado pequeño, fluorescencia media (núcleo solamente)	2/10	2/12	2/9	1/8	1/11	2/10
11=membrana celular casi invisible, fluorescencia media	6/10	6/12	2/9	2/8	2/11	0/10
12=restos nucleares agrupados, sin fluorescencia	0/10	1/12	0/9	0/8	0/11	0/10
13=fondo de restos nucleares, sin fluorescencia	6/10	5/12	8/9	2/8	5/11	3/10
14=fondo de restos nucleares, fluorescencia media	1/10	2/12	2/9	1/8	1/11	0/10
Núm. promedio de descripciones numéricas por célula examinada	1,80	3,08	4,11	3,13	4,82	4,90

Cada muestra de células puede designarse con más de una de las 14 descripciones celulares numéricas para las células tratadas con TCPP

EJEMPLO 2

Ensayo de suspensión para la detección y separación de células precancerosas y cancerosas utilizando TCPP

5

En este ejemplo se describe la utilización de la tinción con TCPP en conjunto con citometría de flujo de fluorescencia en combinación con microscopía de portaobjetos citomorfológica para determinar la anormalidad de células que se encuentran en las muestras de esputo. En virtud de la especificidad de la tinción con TCPP, la combinación de la

citometría de flujo seguida por microscopía de portaobjetos es particularmente potente, proporcionando un control interno para las comparaciones de diapositivas citomorfológico.

Métodos

- 5 **Procedimientos de procesamiento de esputos utilizados en la preparación de suspensiones y portaobjetos de monocapa.** Todas las suspensiones y los portaobjetos de monocapa se prepararon a partir de muestras de esputo recogidas de pacientes que realizaron la técnica de tos espontánea por la mañana temprano. Específicamente, se instruyó a los pacientes para expectorar cualquier material al toser lo largo de tres mañanas consecutivas en un recipiente lleno con un fijador que consistió en Carbowax al 2% en alcohol al 50% /fluido Saccomanno al 50% con 0,03-0,05 mg/ml de rifampicina. Se añadió rifampicina a la solución fijadora para servir como profiláctico contra pacientes portadores de *M. tuberculosis* o aquellos pacientes que pueden ser portadores asintomáticos de *N. meningitis*.
- 10
- 15 La solución de Carbowax al 2% se preparó mediante la adición de 2 ml Carbowax (150) fundido a 98 ml de etanol al 50% y se mezcló durante 30 minutos. La cristalería utilizada para preparar la solución se mantuvo caliente para prevenir el endurecimiento de la cera sobre la superficie durante la preparación, lo cual puede causar mediciones inexactas. Se separó Carbowax antes de la exposición a la solución de trabajo de TCPP por inmersión en alcohol al 95% durante, como mínimo, 15 minutos.
- 20
- La solución de rifampicina (3 mg/ml) se preparó disolviendo 300 mg de cápsulas de rifampicina en 100 ml de alcohol etílico y se mezcló en una mezcladora Waring a alta velocidad. Un ml de esta solución se añadió a cada 30 ml de solución Saccomanno o 20 ml por litro de solución Saccomanno y se mezcló vigorosamente. La preparación de la solución Saccomanno se llevó a cabo mediante métodos estándar bien conocidos por los expertos en la técnica de la citología.
- 25
- La muestra de esputo se vertió en un tubo de centrifuga de 50 ml de plástico y se añadió solución de alcohol etílico al 50% adicional para llevar el volumen a 50 ml si es necesario. El contenido del tubo de centrifuga se vertió en un recipiente de semi-microlicuadora Eberbach de 250 ml y se homogeneizó durante 10 a 60 segundos, dependiendo del examen visual de la muestra y del contenido de mucosa. Las muestras con mucosa espesa requirieron a veces mayores tiempos de licuación. La muestra se vertió de nuevo en el tubo de centrifuga y se centrifugó a velocidad lenta durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, dejando de 1 a 2 ml en el tubo de centrifuga para mezclar con el sedimento celular. El tubo se agitó en un mezclador durante aproximadamente 10 segundos. La mezcla se resuspendió en 100 ml de tampón MES, pH ~6,15. Las células se centrifugaron y se lavaron dos veces más con 100 ml de tampón MES, dejando la última vez ~1 ml en el tubo de centrifuga en el que se resuspendieron las células. A continuación, las células se resuspendieron en 15 ml de etanol al 95% (5% de tampón MES 100 mM) a temperatura ambiente (~ 20°C) durante 30 minutos, con agitación suave. A continuación, el tubo de centrifuga se centrifugó a velocidad lenta durante 10 minutos. Se eliminó todo el sobrenadante excepto 1-2 ml.
- 30
- 35
- 40 **Solución madre de TCPP.** Se añadieron 400 mg de bicarbonato de sodio aproximadamente a 90 ml de isopropanol al 50% (50 mM de bicarbonato de sodio) y se mezclaron hasta su completa disolución para preparar base de isopropanol al 50%. Se añadieron lentamente cien miligramos de TCPP a la base de isopropanol al 50% (50 mM de bicarbonato de sodio) y se mezcló durante 3 a 5 minutos hasta que se disolvió. La solución de TCPP se llevó hasta 100 ml volumétricamente con la base de isopropanol al 50%, se mezcló bien y se almacenó en una botella de reactivo de color ámbar cubierta con papel de aluminio en un área refrigerada. La concentración final de TCPP en la solución madre fue de 1 mg/ml.
- 45
- Solución de trabajo de TCPP.** Se preparó solución de trabajo de TCCP fresca cada día. Aproximadamente 10 ml de solución madre de TCPP con una concentración de 1 mg/ml se llevó a temperatura ambiente. Se colocaron ocho mililitros de la solución madre de TCPP (1 mg/ml) en un matraz aforado de 200 ml y se añadieron lentamente aproximadamente 100 ml de tampón MES. La solución se mezcló suavemente. Se añadió tampón MES adicional para llevar la solución a 200 ml volumétricamente. La solución se mezcló durante 3 a 5 minutos y se almacenó a 2-4°C en un frasco de color ámbar. La concentración final de TCPP en la solución de trabajo fue 40 µg/ml.
- 50
- 55 **Procedimiento de exposición a TCPP.** Las suspensiones celulares previamente expuestas a alcohol al 95% durante 30 minutos a temperatura ambiente, se expusieron a TCPP inmediatamente después de la fijación o hasta 3 días después. Las células se resuspendieron en 10 ml de la solución de TCPP a 40 µg/ml durante 10 minutos a 36°C con agitación suave, a continuación se lavaron tres veces con 20 ml de tampón MES 100 mM, utilizando centrifugación a mínima velocidad para sedimentar las células durante 10 minutos. El precipitado celular lavado se resuspendió en 15-10 ml de tampón MES. Estas suspensiones, o alícuotas de las mismas, se pasan a través de un aparato de citometría de flujo por fluorescencia.
- 60
- Citometría de flujo por fluorescencia.** Primer Pase. Un mínimo de 10.000 células se hacen pasar a través de un citómetro de flujo con capacidad de clasificación de células. El citómetro de flujo debe estar equipado con una fuente de luz que proporcione radiación aproximadamente a 415 nm, con filtros que permiten el paso de la luz entre aproximadamente 390 nm y 490 nm. La emisión de fluorescencia se debe controlar entre aproximadamente 630 nm
- 65

y 730 nm (emisión máxima a 645 nm y 706 nm). Un filtro de barrera que deja pasar luz por encima de 500 nm es satisfactorio. En el primer pase, se cuentan las células individuales y se mide su fluorescencia específica. Se calcula la fluorescencia media y se calcula la desviación estándar de esa media. Además, se determina el valor de la mediana (el valor de fluorescencia específica que es menor que la mitad de los valores y mayor que la mitad de los valores).

Citometría de flujo por fluorescencia con clasificación de células. Segundo pase. Un mínimo de 100.000 células se hacen pasar a través del citómetro de flujo de fluorescencia con capacidad de clasificación de células, equipado de la misma forma que para el primer pase. Las células con menos fluorescencia que la fluorescencia mediana + 1,3 desviaciones estándar de la media (aproximadamente un 90% de las células) se definen funcionalmente como que tienen baja fluorescencia, y se guardan en un tubo de ensayo, y las células con fluorescencia específica mayor o igual a la fluorescencia mediana + 1,3 desviaciones estándar de la media (aproximadamente un 10% de las células) se definen funcionalmente como que tienen alta fluorescencia y se guardan en otro tubo de ensayo. Alternativamente, las células se pueden clasificar en tubos de acuerdo con su fluorescencia relativa a la fluorescencia mediana específica que se obtiene en el primer pase. Las celdas con menos de dos veces la fluorescencia específica mediana serían "normales" o de fluorescencia baja, y a continuación las células se pueden combinar con 2-4x la fluorescencia mediana, 4-6x y mayor que 6x la fluorescencia mediana. Cada uno de los conjuntos de fluorescencia con intensidad mayor se espera que estén más enriquecidos en células anormales. Si hay más de un 2-3% de células que poseen más de 3 veces la fluorescencia mediana, habría soporte para presumir, como mínimo, una condición precancerosa avanzada.

Preparación de portaobjetos monocapa. Las muestras de células de baja y alta fluorescencia se centrifugaron durante 10 minutos a bajas rpm para sedimentar las células. El sobrenadante se retiró, dejando 1-2 ml en el tubo de centrifuga para mezclar con el sedimento celular. El tubo se agitó en un mezclador rotatorio durante aproximadamente 10 segundos. Se colocaron de una a tres gotas del sedimento en un vial PreservCyt (Cytoc Corporation, Marlborough, MA). La muestra se incubó durante 5 minutos para desactivar todos los organismos microbianos y virales.

Las capas monocelulares de las muestras se fijaron en portaobjetos utilizando el Thinprep Processor (Cytoc Corporation, Marlborough, MA) según las instrucciones del fabricante. En el ThinPrep Processor, las células se recogen en un filtro de policarbonato (tamaño de poro de 0,5 mm) y se transfieren a un portaobjetos de vidrio. El ThinPrep Processor a continuación deposita inmediatamente los portaobjetos en un baño fijador que contiene etanol al 95% (se mantiene durante 30 minutos).

Procedimientos de tinción portaobjetos de esputo mediante técnica de tinción PAP modificada. Secuencia de procedimiento (núm.), reactivo y el tiempo (min.: seg.) fueron los siguientes: (1) alcohol al 95% 15:00; (2) agua de grifo 1:00; (3) Gil-i hemotox 2:30; (4) agua del grifo 1:00; (5) reactivo azulado :30; (6) agua del grifo 1:00; (7) alcohol al 95% :10; (8) og-6 1:30; (9) alcohol al 95 % :10; (10) alcohol al 95% :10; (11) EA-50 1:15; (12) alcohol al 95% :20; (13) alcohol al 95% :30; (14) alcohol al 100% 1:00; (15) alcohol al 100% 1:00; (16) alcohol al 100% 1:30; (17) xileno 1:00; (18) xileno 1:00; y (19) xileno 1:00.

Métodos de análisis citopatológico de rutina de portaobjetos con tinción de Papanicolaou. Los portaobjetos con tinción se sometieron a evaluación citomorfológico semicuantitativa. (1) las células displásicas y neoplásicas fueron identificadas mediante la utilización de criterios morfológicos tradicionales, y (2) se cuantificaron los niveles de expresión de siete indicadores fundamentales de inflamación pulmonar (macrófagos alveolares, neutrófilos, células columnares, moco, espirales mucosas, macrófagos pigmentados, células metaplásicas). La metodología para la cuantificación de estos indicadores de inflamación ha sido previamente discutida en la literatura (Roby y otros, 1989, Acta Cytol 34: 147-154; Roby y otros, 1990, Acta Cytol 34: 140-146; Schumann y otros, 1989, Am Rev Respr Dis 139: 601-603). Los criterios utilizados para determinar la morfología de las células utilizando citología por tinción PAP se discuten a continuación.

No hay anomalías significativas. Las células se identificaron sin alteraciones significativas si se cumplen los siguientes requisitos:

1. células ciliadas epiteliales basofílicas mezcladas con macrófagos con pigmento grado 1-2 junto con células inflamatorias;
2. núcleos redondos del epitelio orientado basalmente;
3. cromatina uniformemente dispersa;
4. membranas nucleares apenas visibles;
5. nucléolos apenas visibles; y no están presentes células metaplásicas ni displásicas.

Metaplasia escamosa (sin displasia). Las células se identificaron como metaplásicas escamosas sin displasia si se cumplen los siguientes requisitos:

- 5 1. grupos de células basófilas sin cilios;
2. célula y tamaño nuclear uniforme;
3. baja relación núcleo / citoplasma (N/C);
- 10 4. cromatina nuclear finamente granular; y
5. pueden estar presentes pequeños nucleolos redondeados (por lo general solos).

Displasia leve (atipia escamosa). Las células se identificaron como displasia leve si se cumplen los siguientes requisitos:

- 15 1. más pequeñas que las células metaplásicas;
- 20 2. se ven en grupos cohesivos, o singularmente;
3. las células parecen planas (hojas) tanto los núcleos como el citoplasma en el enfoque;
4. las células varían ligeramente en tamaño;
- 25 5. el citoplasma puede ser eosinofílico o basofílico;
6. bordes citoplasmáticos finos;
7. los núcleos varían ligeramente en tamaño, generalmente de redondos a ovalados, si se dividen en 2 mitades de núcleo son imágenes especulares, la relación N/C puede variar ligeramente;
- 30 8. membrana nuclear lisa;
9. cromatina nuclear finamente granular (ligeramente aumentada), cromocentro ocasional;
- 35 10. células en forma de fibras, células alargadas con citoplasma y núcleo alargados membrana nuclear diferente - citoplasma reticular fino a granular por lo general de color amarillo naranja brillante -queratinizante simple, pueden formar remolinos alrededor del núcleo central de queratina para hacer perlas epiteliales.

Displasia moderada (atipia escamosa). Las células se identificaron como moderadamente displásicas si se cumplen los siguientes requisitos:

- 40 1. variación en el tamaño, generalmente más grande, pero puede ser menor que en la displasia leve;
- 45 2. más variación en la forma y la relación N/C que en la displasia leve;
3. citoplasma denso, predomina acidofilia; aumento del número de células atípicas;
- 50 4. el núcleo puede tener dos mitades desiguales (no son imágenes especulares);
5. están presentes lobulaciones nucleares, grietas y nódulos, y
6. el material nuclear puede mostrar hiper cromasia con más patrón de la cromatina de tipo punteada.

Displasia grave (atipia escamosa marcada). Las células se identificaron como displasia grave si se cumplen los siguientes criterios:

1. las células varían mucho en tamaño y forma;
- 60 2. por lo general ligeramente mayor tamaño de la célula que en la displasia moderada;
3. la relación N/C es alta, pero variable (con extremos);
4. predominan las células individuales, el núcleo es más central que en CIS;
- 65 5. el núcleo puede seguir la forma del citoplasma; el núcleo muestra menos distorsión que en CIS;

6. el pleomorfismo nuclear se incrementa con presencia de cromatina gruesa y condensación a lo largo de la envoltura nuclear;

5 7. paracromatina, núcleo grande, membrana nuclear multiagrupada focalmente engrosada, y

8. las células muestran citoplasma acidófilo predominante.

10 **Carcinoma de células escamosas *in situ* (CIS, no invasivo).** Las células se identificaron como carcinoma de células escamosas *in situ* si se cumplen los siguientes criterios:

1. células individuales o en agregados (grupos);

15 2. tamaño de célula variable -puede ser menor o mayor que las células de displasia marcada por lo general más pequeños que el carcinoma de células escamosas invasivo;

3. las células son grandes, redondeadas con núcleo situados simétricamente;

20 4. puede estar presente degeneración de las células;

5. escaso citoplasma, distribuido uniformemente puede estar queratinizado o no queratinizado concéntricamente alrededor del núcleo, (orangiophilico o basofílico);

25 6. relación N/C variable -mayor o menor de lo normal;

7. gránulos de la cromatina nuclear densos gruesos pueden estar interrumpidos por zonas claras;

8. borde cromatínico uniformemente engrosado con ondulación de la membrana nuclear;

30 9. se pueden observar lobulaciones de los núcleos;

10. se puede observar canibalismo, pero es inusual;

35 11. pueden estar presentes células multinucleadas;

12. sin nucléolos en el núcleo, puede estar presente una célula mitótica, y

13. fondo claro.

40 **Carcinoma de células escamosas (bien diferenciado queratinizante de tipo invasivo).** Las células se identificaron como carcinoma de células escamosas si se cumplen los siguientes criterios:

1. células por lo general individuales, orangeofílicas, pero pueden estar en grupos y degeneradas;

45 2. células grandes o pequeñas, angulares, con núcleos bien conservados y bordes celulares bien definidos;

3. células generalmente más grandes que *in situ*, y pueden ser pleomórficas, amplia gama de tamaño y forma;

50 4. se puede observar formación de perlas (perlas de cáncer);

5. moderada cantidad de citoplasma con "cola" anormal (en consonancia con invasión); células extrañas en forma de renacuajo, estrella, eje, una cromatina nucleara angular, con agrupamiento impredecible con hiper cromasia y compensación de paracromatina y cromatina claramente definida, interfaz de paracromatina;

55 6. la cromatina está grumosa, especialmente a lo largo de la membrana nuclear;

7. los nucleolos son grandes y acidofílicos, si están presentes;

60 8. la membrana nuclear en sí puede estar engrosada e irregular; irregularidad de espesor del borde de la cromatina nuclear;

9. la relación N/C es muy alta;

65 10. irregularidad nucleolar marcada en forma, tamaño, número (nucleolos hijas); mitosis anormales, multinucleación;

11. es común el canibalismo y la multinucleación; y

12. es común el material necrótico de fondo.

5 **Análisis de citopatología.** Debido a que las muestras de esputo contienen células de muchos lugares en el pulmón, entremezclados unos con otros, hay poco contexto para juzgar la normalidad o anormalidad de una célula en particular (a diferencia del caso de la tinción de sección delgada). La disponibilidad de una recogida de células de baja fluorescencia proporciona una muestra de control interno de las células del paciente normales o casi normales, con las que se comparan las células de alta fluorescencia teñidas con TCPP. Utilizando la tinción PAP estándar, un
10 citopatólogo experto en la materia puede determinar fácilmente el grado de anormalidad de las células de TCPP con alta fluorescencia, que están 10 veces enriquecidas de células anormales en comparación con una monocapa no fraccionada.

La presente invención no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas anteriormente, sino que es posible hacer variaciones y modificaciones dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.
15

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar si una muestra de células contiene células displásicas o carcinómicas, comprendiendo el método:
- 5 a) poner en contacto la muestra con una solución de 5, 10, 15, 20-tetrakis (carboxifenil) profina (TCPP) bajo condiciones que permiten la unión de TCPP a los componentes de las células displásicas o carcinómicas, si están presentes, en el que la solución de TCPP comprende TCPP disuelto con anterioridad en base de alcohol y diluido en una solución acuosa tamponada;
- 10 b) eliminar el TCPP no unido de la muestra; y
- c) detectar la fluorescencia de TCPP en la muestra, siendo indicativa la presencia de fluorescencia de TCPP de que la muestra contiene células displásicas o carcinómicas.
- 15 2. Método, según la reivindicación 1, en el que la muestra se selecciona del grupo que comprende muestras de esputo, hisopos cervicales, lavados bronquiales, aspiración con aguja fina o biopsias de núcleo de tiroides o de mama, lavados de vejiga y lavados bucales.
- 20 3. Método, según la reivindicación 1, en el que la muestra se fija en un fijador seleccionado del grupo que comprende formaldehído, metanol, etanol, isopropanol y cualquier combinación de los mismos.
4. Método, según la reivindicación 3, en el que el fijador es etanol al 95%.
- 25 5. Método, según la reivindicación 1, en el que la muestra está adherida a un soporte sólido.
6. Método, según la reivindicación 5, en el que el soporte sólido es un portaobjetos de microscopio.
7. Método, según la reivindicación 1, en el que la muestra se suspende en un medio líquido.
- 30 8. Método, según la reivindicación 1, en el que la solución de TCPP está tamponada a un pH entre aproximadamente 5,8 y aproximadamente 6,7.
9. Método, según la reivindicación 1, en el que la solución comprende además uno o más reactivos que reducen la fluorescencia de fondo, evitan la oxidación de TCPP o evitan la extinción de la fluorescencia de TCPP.
- 35 10. Método, según la reivindicación 1, en el que la concentración de TCPP en la muestra está entre aproximadamente 4 y aproximadamente 100 µg/ml.
- 40 11. Método, según la reivindicación 1, en el que la muestra se pone en contacto con TCPP durante entre aproximadamente 0,2 minutos y aproximadamente 2 horas.
12. Método, según la reivindicación 1, en el que durante la puesta en contacto, la muestra se mantiene a una temperatura entre aproximadamente 23°C y aproximadamente 42°C.
- 45 13. Método, según la reivindicación 5, en el que la fluorescencia de TCPP en la muestra se detecta visualmente.
14. Método, según la reivindicación 5, en el que la fluorescencia de TCPP en la muestra se detecta con un lector de portaobjetos.
- 50 15. Método, según la reivindicación 7, en el que la fluorescencia de TCPP se detecta con un citómetro de flujo fluorométrico.
16. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de detección se lleva a cabo entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 24 horas después de la etapa de eliminación.
- 55 17. Método, según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de determinación del porcentaje de células en la muestra que son fluorescentes con TCPP.
- 60 18. Método, según la reivindicación 17, en el que las muestras que comprenden más de aproximadamente un 1% de células fluorescentes se clasifican como que contiene células anormales precancerosas o cancerosas.
19. Método, según la reivindicación 17, en el que la etapa de determinación del porcentaje de células en la muestra que son fluorescentes con TCPP comprende cuantificar la intensidad de fluorescencia de TCPP en la muestra de una manera que correlaciona la intensidad de fluorescencia con un porcentaje de células en la muestra que contiene TCPP.
- 65

- 5 20. Método, según la reivindicación 19, en el que la fluorescencia de TCPP se cuantifica poniendo en contacto la muestra con un marcador detectable que se une a todas las células en la muestra, eliminando el marcador detectable no unido y estableciendo una relación de fluorescencia de TCPP y la cantidad del marcador detectable en la muestra.
21. Método, según la reivindicación 20, en el que el marcador detectable es un compuesto fluorescente.
- 10 22. Método, según la reivindicación 1, que comprende además, tras la detección de la fluorescencia de TCPP en la muestra, la caracterización de las células fluorescentes en metaplasia, displasia o carcinoma.
- 15 23. Método, según la reivindicación 22, en el que la caracterización comprende clasificar la intensidad de fluorescencia de las células fluorescentes y correlacionar la intensidad de fluorescencia con el estado metaplásico, displásico o carcinómico de las células.
- 20 24. Método, según la reivindicación 22, en el que la caracterización comprende clasificar las células fluorescentes en una o más características morfológicas seleccionados del grupo que comprende la forma celular, tamaño de la célula, agrupamiento de las células, cantidad de degeneración de las células o grupos de células, el número de núcleos, el tamaño de los núcleos, visibilidad de la membrana celular y la presencia de residuos nucleares, y correlacionar las características morfológicas con el estado metaplásico, displásico o carcinómico de las células.
- 25 25. Método, según la reivindicación 22, en el que la caracterización comprende clasificar las células fluorescentes por la intensidad de fluorescencia y por una o más características morfológicas seleccionadas del grupo que comprende la forma celular, tamaño de la célula, agrupamiento de las células, la cantidad de la degeneración de las células o grupos de células, el número de núcleos, el tamaño de los núcleos, visibilidad de la membrana celular y la presencia de residuos nucleares, y correlacionar la intensidad de fluorescencia y las características morfológicas con el estado metaplásico, displásico o carcinómico de las células.
- 30 26. Método, según la reivindicación 25, en el que el número total de las características morfológicas y la intensidad de fluorescencia que muestran las células fluorescentes se utilizan como un factor en la caracterización de las células fluorescentes en metaplasia, displasia o carcinoma.
- 35 27. Método, según la reivindicación 25, en el que el patrón de las características morfológicas y la intensidad de fluorescencia se utilizan como un factor en la caracterización de las células fluorescentes en metaplasia, displasia o carcinoma.
- 40 28. Método, según la reivindicación 22, en el que las células fluorescentes en la muestra se comparan con las células no fluorescentes de la misma muestra o de una segunda muestra del mismo paciente.
- 45 29. Método, según la reivindicación 28, en el que las células fluorescentes se separan de las células no fluorescentes por citometría de flujo fluorométrico.
- 50 30. Método de detección de cáncer en estadio temprano o de una condición precancerosa de un tejido u órgano seleccionado, comprendiendo el método:
- 55 a) determinar si la muestra de células, obtenida a partir del tejido u órgano seleccionado, contiene células anormales precancerosas o cancerosas mediante el método según la reivindicación 1, una determinación positiva de la misma es indicativo de una detección positiva de cáncer en etapa temprana o una condición precancerosa del tejido u órgano seleccionado.
- 60 31. Método de detección de células displásicas o carcinómicas en un tejido diana seleccionado, comprendiendo el método:
- a) introducir en la muestra de tejido diana una solución de TCPP bajo condiciones que permiten la unión de TCPP a los componentes de las células displásicas o carcinómicas, si están presentes, en el que la solución de TCPP comprende TCPP disuelto con anterioridad en base de alcohol y diluido en una solución acuosa tamponada;
- b) eliminar TCPP no unido del tejido diana; y
- c) detectar la fluorescencia de TCPP en las células del tejido diana, siendo indicativa la presencia de fluorescencia de TCPP en las mismas de que el tejido diana contiene células displásicas o carcinómicas.
32. Método, según la reivindicación 31, en el que el tejido diana se selecciona del grupo que comprende pulmón, mama, glándula prostática, cuello del útero, garganta, vejiga, orofaringe, piel y tracto gastrointestinal.