

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 378**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 31/409 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2001** **E 11159888 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014** **EP 2372361**

54 Título: **Composiciones y métodos para detectar afecciones precancerosas en muestras celulares y de tejidos mediante 5, 10, 15, 20-tetrakis (carboxifenil) porfina**

30 Prioridad:

17.11.2000 US 249505 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.11.2014

73 Titular/es:

BIOAFFINITY TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
25000 Network Blvd., No. 308
San Antonio, TX 78249, US

72 Inventor/es:

GARWIN, JEFFREY, L.

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 523 378 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 detectar afecciones precancerosas en muestras celulares y de tejidos mediante 5, 10, 15, 20-tetrakis (carboxifenil) porfina

Sector de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de ciertas porfirinas para detectar la presencia de células cancerosas, precancerosas y displásicas en varias muestras de tejido *in vitro*.

Antecedentes de la invención

En el presente documento se hace referencia entre paréntesis a varios artículos científicos y académicos.

Los patólogos, expertos que examinan la progresión de la enfermedad y analizan muestras de tejido en busca de anomalías, entre ellas el cáncer, han determinado que una afección celular que se conoce como displasia, que consiste en una formación o maduración anormal de las células, puede identificar potencialmente células en afecciones precancerosas. Si no se trata, la displasia puede avanzar del estado, leve, moderado hasta grave, y en ocasiones puede llevar a la aparición del cáncer. Aproximadamente uno de cada siete casos moderados de displasia llega a provocar cáncer, y hasta un 83% de casos de displasia grave han llevado sus enfermos a desarrollar cáncer, en función de las células implicadas en el proceso. Sin embargo, la eliminación de células displásicas en estado leve y moderado reduce significativamente el desarrollo de cáncer. En el caso concreto de los pulmones, la eliminación de células displásicas no solamente disminuye notablemente la formación de células cancerosas, sino que además en algunos casos el tejido pulmonar recupera su morfología normal.

En general, cuanto antes se detecta un cáncer, más probabilidades tendrá el paciente de sobrevivir. Si el cáncer de mama se detecta de forma temprana cuando todavía se encuentra en una única masa, la tasa de supervivencia a 5 años es del 96%. Cuando este cáncer se ha extendido a una ubicación más alejada, dicha tasa es inferior al 20%. En el caso del cáncer de pulmón cuando se detecta una única masa la tasa de supervivencia a 5 años es superior al 46%. Cuando dicho cáncer se ha extendido, la tasa pasa a ser inferior al 14%. En lo que se refiere al cáncer de cérvix la tasa de supervivencia aumenta cuando se detectan cambios precancerosos y se tratan antes de llegar a un estado más grave (Boring y Squires 1993, CA Cancer J Clin 43:7-26 and Ferguson 1990, Hematol Oncol Clin N Am 4:1053-1168).

Actualmente el carcinoma pulmonar es la principal causa de mortalidad debida al cáncer en hombres y mujeres en los Estados Unidos (Wingo y otros 1995, CA Clinical J Clin 45:8-30). En 1997 murieron aproximadamente 160.000 personas a causa del cáncer de pulmón, cifra que representa el 12% de todas las muertes debidas al cáncer en Estados Unidos en hombres y el 2% en mujeres (Boring y Squires 1993, *supra*). El cáncer de pulmón también es uno de los cánceres más letales, tal y como se desprende de la tasa de supervivencia a 5 años de tan solo el 14%. El mal pronóstico de los pacientes de cáncer de pulmón, en comparación con otros tipos de cáncer que afectan al ser humano, se debe en gran medida a la falta de métodos de detección en sus primeros estadios. Cuando se presentan síntomas clínicos, más de dos tercios de los pacientes tiene afectación de los ganglios regionales o metástasis distantes, y habitualmente ambos casos son incurables. Sin embargo, en estudios realizados en pacientes con cáncer de pulmón localizado (Estadio 0 o 1), las tasas de supervivencia a 5 años oscilaban entre el 40 y el 70% (Boring y Squires, 1993, *supra*; Ferguson 1990, *supra*).

Históricamente, la única prueba de diagnóstico que se utilizaba para detectar el cáncer de pulmón antes de la aparición de sus síntomas era la citología de esputo y radiografías de tórax. Como consecuencia se ha evaluado mucho la eficacia de dichas pruebas, realizando estudios durante las últimas décadas. Ambas pruebas eran capaces de detectar carcinomas presintomáticos en los primeros estadios de desarrollo, en especial el carcinoma de células escamosas.

Las mejoras en los métodos de control se han centrado especialmente en la mejora de la utilización de la citología de esputo gracias a los avances tecnológicos en microscopia. Para realizar la citología de esputo se precisa de un análisis visual de la muestra celular en el que se utilizan el tamaño, forma, organización de la célula, y relación entre el tamaño del núcleo celular y su citoplasma, para determinar la morfología de la célula. Teniendo en cuenta que para esta evaluación de la morfología celular se precisa de una inspección y clasificación visual, el encargado de la observación clínica que desempeña esta técnica debe disponer de un alto grado de experiencia. Se han realizado diversas investigaciones cuyos resultados sugieren que un método de análisis de imágenes de alta resolución asistido por ordenador permite la detección de cambios subvisuales en núcleos de apariencia normal en varios tipos de tejido (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). Los análisis asistidos por ordenador de distribución del ADN en muestras celulares clasificaron correctamente el 74% de los núcleos según su morfología sin necesidad de que un experto revisara el material y sin la presencia de núcleos visualmente anormales cuando se comparó con el test citológico estándar.

La evaluación morfológica de las muestras citológicas también ha mejorado gracias a los avances realizados en la comprensión del cáncer de pulmón. Gran parte de este trabajo se ha centrado en la identificación de los "biomarcadores". Los biomarcadores son una amplia gama de anomalías genéticas y fenotípicas progresivas de la mucosa respiratoria que se pueden utilizar para determinar el potencial del epitelio bronquial para convertirse en su totalidad en un tumor maligno. Los marcadores se han clasificado de forma amplia como cambios morfológicos, marcadores inmunohistoquímicos de varias proteínas expresadas, marcadores de inestabilidad genómica, marcadores de cambios epigenéticos (por ejemplo, metilación anormal), y mutaciones genéticas (Hirsch y otros 1997, Lung Cancer 17:163-174).

Actualmente se están evaluando los niveles de expresión de dichos marcadores en muestras de tejido cito/histológico displásico y neoplásico procedentes de poblaciones de riesgo elevado. De entre estas muestras, actualmente se ha seleccionado el esputo para realizar análisis de marcadores. El interés que suscitan las muestras de esputo en la investigación de biomarcadores procede de la antigua creencia de que las células exfoliadas que se recuperan en el esputo pueden ser la indicación más temprana de un carcinoma incipiente, ya que en la mayoría de los casos el cáncer de pulmón se desarrolla en el epitelio bronquial. Mediante el uso de sofisticadas técnicas de genética molecular (por ejemplo, ensayos basados en PCR), los resultados de ciertos estudios demuestran que los biomarcadores seleccionados se pueden detectar en 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 control y detección del cáncer disponibles en el mercado se fundamentan en pruebas basadas en diagnósticos citomorfológicos realizados por médicos expertos que observan cada una de las muestras y determinan la extensión e identifican los tipos de células anormales. Este proceso no tan solo es costoso y lento, sino que además incluye el criterio de un experto y por lo tanto un factor de error en el procedimiento. Recientemente se ha desarrollado un método para detectar células cancerosas en el pulmón mediante la utilización de 5, 10, 15, 20-tetrakis (carboxifenil)-porfina (TCPP) (patente de los Estados Unidos 5.162.231 a Cole y otros). Dicho método se basa en la tendencia de las células cancerosas a acumular una mayor cantidad de TCPP procedente de su entorno que las células no cancerosas. Tras incubar una muestra celular durante 6-24 horas con 200 µg/ml de TCPP, dicha TCPP entró en las células y se unió a la membrana perinuclear y las mitocondrias de las células neoplásicas. La TCPP es fluorescente con luz ultravioleta, y por lo tanto se pueden identificar las células cancerosas simplemente por su intensidad de fluorescencia, sin necesidad de observar la morfología. La utilización más amplia de este compuesto para identificar afecciones de tejido precanceroso (por ejemplo, células displásicas) permitiría el control en poblaciones de alto riesgo para identificar aquellos individuos cuyos tejidos se dirijan a una afección de tipo cáncer invasivo, y por lo tanto permitir la detección del cáncer o la displasia en un estadio donde se pueda tratar. Las características que se esperan de tal método de control serían que se tratara de un procedimiento rápido, económico, y que precise de un conocimiento mínimo de la técnica.

Debido a las razones anteriores, se necesita una técnica y metodología capaces de detectar células displásicas en los primeros estadios de desarrollo. Además, se necesita una técnica que proporcione resultados para elaborar diagnósticos altamente fiables y que no se base en un análisis subjetivo del médico que lleve a cabo el diagnóstico.

Características de la invención

La presente invención se deriva del hallazgo según el que la TCPP se puede utilizar para detectar células displásicas y precancerosas, así como células cancerosas, juntamente con un nuevo método de solubilización de TCPP más eficiente, técnicas de tinción mejoradas, y varias estrategias de clasificación de células. La TCPP es un compuesto fluorescente y recientemente se ha descubierto que dicho compuesto se une a componentes de células cancerosas así como a células precancerosas vivas o fijadas, de manera que permite categorizar el estado de las células y del tejido del que proceden en una progresión continua de la enfermedad. Este método de detección de tejidos precancerosos se adapta bien al diagnóstico *in vitro* de muestras de tejidos o de células así como al diagnóstico *in situ*.

Un aspecto de la presente invención es un método de detección de células precancerosas, que en su forma más simple comprende la incubación de células vivas o fijadas (es decir, muertas) en una solución de TCPP durante el tiempo necesario para que este compuesto se una a los componentes celulares, y detectar la unión con TCPP mediante fluorometría. Se pueden realizar muchas variaciones a este método de base. Según una de dichas modificaciones las células se fijan sobre una superficie, preferentemente un portaobjetos de microscopio, y más preferentemente en forma de monocapa. En otra modificación las células se tratan con formalina u otra solución de fijación adecuada, se mantienen en suspensión y se tratan con TCPP, posteriormente se separan de la TCPP que no se haya unido a sus componentes, y finalmente se analiza y clasifica mediante citometría de flujo.

Las realizaciones preferentes de la etapa de incubación comprenden la utilización de una solución de TCPP con aproximadamente de 4 µg/ml a 400 µg/ml de TCPP, a una temperatura de aproximadamente 23°C a aproximadamente 42°C, y durante aproximadamente de 0,2 minutos a 2 horas. La TCPP que no se haya unido a los componentes celulares se elimina, y la TCPP restante se puede detectar mediante fluorometría. En una realización preferente, se detecta la TCPP entre aproximadamente 1 y 24 horas después de realizar en ensayo.

En otra realización de la presente invención, se calcula el porcentaje de células fluorescentes de la muestra celular. Las realizaciones preferentes comprenden análisis de las células fluorescentes para analizar la intensidad de su fluorescencia y otras características citomorfológicas. En una realización particularmente preferente, las células fluorescentes se clasifican según una serie de intensidades de fluorescencia y características citomorfológicas predeterminadas, lo que permite clasificar las células a lo largo de una progresión continua que va desde célula normal hasta metaplásica, displásica (de leve a grave) y carcinómica (de leve a grave), y aumenta la eficacia y fiabilidad de los diagnósticos realizados por los métodos de la presente invención. Otras realizaciones de la presente invención comprenden la separación de las células normales o metaplásicas de las displásicas o carcinómicas en una muestra, mediante criterios de intensidad de fluorescencia (es decir, mediante la utilización de la citometría de flujo por fluorescencia).

Para facilitar la utilización del método de detección citado previamente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar una solución de TCPP en el que se disuelve TCPP en aproximadamente del 50% hasta aproximadamente el 90% de alcohol a un pH superior a aproximadamente 8,5 e inferior a aproximadamente 12,5. En una realización preferente, dicho alcohol es isopropanol, y en otra realización preferente el pH de la solución se ajusta con bicarbonato sódico o hidróxido de amonio.

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

En otro aspecto de la presente invención, las células se encuentran *in situ* en un mamífero. Dichas células se exponen a una solución de TCPP y se detecta su fluorescencia mediante la utilización de técnicas endoscópicas.

Otro aspecto de la presente invención es un kit para detectar 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 realizar el método de detección descrito en la presente invención, o controles positivos y negativos.

Gracias a las ilustraciones, la descripción detallada y los ejemplos que se encuentran a continuación, se podrán comprender más fácilmente otras características y ventajas de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención comprende composiciones y métodos para detectar afecciones precancerosas en células humanas mediante la utilización de 5, 10, 15, 20-tetrakis (carboxifenil) porfina (TCPP). La presente invención se deriva del hallazgo según el que la TCPP se une específicamente a células anormales precancerosas así como a las células cancerosas, pero no se une a las células normales (no cancerosas). Además, dicha unión diferencial se puede observar tanto en células fijadas como en células vivas. Además de esta nueva y útil característica de la TCPP, la presente invención también incorpora un método mejorado para solubilizar TCPP que permite que este compuesto conserve su actividad durante un plazo de tiempo más largo, así como diversos aspectos novedosos que hacen que este método esté mejor adaptado a los métodos control y la automatización. Si se utilizan los métodos de la presente invención las células se enlazan con la TCPP más rápidamente que en el método descrito en la patente de Estados Unidos No 5.162.231 (por ejemplo, 0,2 minutos-2 horas frente a 24 horas), y se necesita una menor concentración de TCPP (por ejemplo, 40 µg/ml frente a 200 µg/ml). Además, se puede utilizar una monocapa de células en lugar de una solución de células, a pesar de que también se puede utilizar una solución de células.

El factor clave de la adecuación y eficacia de detección del método de la presente invención es el nuevo método de solubilización de la TCPP. En los métodos anteriores se utilizaba NaOH 1M para disolver la porfirina. En dichos métodos de tenía que valorar con HCl 1M, que es poco preciso, y en cada solución se debía comprobar la presencia de TCPP no disuelta. Además con el método de NaOH la porfirina se encontraba en un medio oxidante con un pH de hasta 13, con lo que había un elevado riesgo de degradación de la porfirina. En el método de solubilización de la presente invención el pH es de 9,1 conjuntamente con la nueva adición de alcohol al 90% para que la solubilización sea más fiable. En último lugar, el método de la presente invención utiliza un tampón para estabilizar el pH de la solución de TCPP de trabajo final en un intervalo preferente de 5,8 a 6,8.

La presente invención comprende la detección de células cancerosas y precancerosas en muestras de tejido humano utilizando la tendencia única de dichas células de unirse a TCPP en mayor grado que las células sanas. Tal como se utiliza en el presente documento los términos "precanceroso" y "precanceroso anormal" se refieren a células que presentan signos de leves a graves de displasia, y el término "canceroso" se refiere a células que presentan signos de leves a graves de carcinoma. Dichos estadios citológicos se definen morfológicamente en el presente documento mediante los criterios que se utilizan para determinar la morfología celular en citología mediante

tinción de Papanicalou (“tinción PAP”). También se pueden definir mediante otros indicadores habituales en la técnica para definir una célula o tejido particular (por ejemplo indicadores de inflamación pulmonar en el pulmón o muestras de esputo). De “normal” a “gravemente carcinómico” en el presente documento los estadios de la célula se clasifican de la forma siguiente (1) normal (sin anomalías significativas), (2) metaplasia (metaplasia escamosa), (3) displasia leve (atipia escamosa), (4) displasia moderada (atipia escamosa), (5) displasia grave (atipia escamosa intensa), (6) carcinoma escamoso *in situ* (CIS, no invasivo) (también se conoce como carcinoma de leve a severo), y (7) carcinoma celular escamoso (queratinización bien diferenciada de tipo invasivo) (también se conoce como carcinoma de moderado a severo). Según la presente invención se ha determinado que tras la exposición a TCPP, las células displásicas y carcinómicas muestran fluorescencia por TCPP, mientras que en las células normales dicha fluorescencia es muy reducida o inexistente. Algunas células metaplásicas pueden mostrar una fluorescencia por TCPP entre baja y moderada, pero muy en la mayoría de ocasiones no es así; por consiguiente, la fluorescencia por TCPP no es un indicador de metaplasia tan fiable como lo es para displasia y carcinoma.

El método comprende (1) la incubación de una muestra de células fijadas o vivas en TCPP durante el tiempo suficiente para que la TCPP pueda unirse a los componentes celulares de células cancerosas o precancerosas anormales, si están presentes en la muestra, (2) la eliminación de la TCPP que no se haya incorporado a las células, (3) la determinación de la cantidad de TCPP restante en la muestra mediante fluorometría, si se encuentra en la muestra; y, opcionalmente en función del resultado de la etapa (3), (4) la evaluación de las células fluorescentes por TCPP para conocer su derivación hacia el cáncer respecto al estado normal (o anormal metaplásica, pero no displásica). Específicamente, tal y como se ha descrito anteriormente, el método de la presente invención permite determinar si una muestra celular contiene células displásicas (de leve a grave) o carcinómicas (de leve a grave).

En una realización a modo de ejemplo, pero no limitante, el método de detección comprende las etapas siguientes:

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

A continuación se detallan más ampliamente las variaciones de este método de ejemplo.

Cuando se utiliza para describir los componentes de mezclas de ensayo u otros parámetros de la presente invención, el término “aproximadamente” se refiere a dentro de los límites de error que se aceptan habitualmente para la determinación que se realiza, utilizando los métodos estándar.

La primera etapa, la incubación de las células con una solución fijadora, es opcional, pero preferente, ya que se ha demostrado que dicha solución reduce el tiempo de incubación, así como la concentración de TCPP en la solución de trabajo, en esta realización de ejemplo y en el resto.

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

Los métodos de la presente invención se pueden utilizar en varios tipos de células, tal como se describe a continuación y además se pueden utilizar en aplicaciones de diagnóstico veterinario además de en el ser humano. Por este motivo los términos “paciente” o “sujeto” tanto se pueden referir al ser humano como a animales.

El método de detección se puede utilizar para detectar células precancerosas o cancerosas en muestras celulares *in vitro*. Dichas muestras se pueden obtener mediante cualquiera de los métodos utilizados actualmente en citopatología. Por ejemplo, las células se pueden obtener de muestras de esputo (véase 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 otros tipos de biopsia conocidos en la materia. Otras fuentes de muestras celulares puede ser la sangre o fracciones de la misma, es decir, linfa, fluido cerebroespinal, hueso o médula ósea, por nombrar algunos ejemplos. El método de la presente invención se puede utilizar con cualquier muestra celular de cualquier tejido u órgano del organismo.

De forma opcional, las células se pueden fijar mediante procedimientos estándar antes de exponerlas a TCPP, incluyendo pero sin limitarse a las mismas, soluciones que contengan formaldehído, metanol, etanol o isopropanol. En una realización, las células se fijan con etanol al 95%.

Este ensayo se puede realizar en solución midiendo la fluorescencia total en función de la densidad celular, o adhiriendo las células a una superficie. No es necesario tratar las células con un agente fijador, pero en ciertas realizaciones es preferente fijar las células, especialmente en aquellas en las que las células se adhieren a un soporte sólido. En una realización, las células se adhieren a un portaobjetos en forma de monocapa. En otras realizaciones, se utiliza el sistema de preparación de portaobjetos de base líquida MonoPrep2 o MonoPrepG (MonoGen Inc., Herndon, Va) o el Thinprep Processor (Cytoc Corporation, Marlborough, MA).

El método de la presente invención también se puede utilizar para detectar células precancerosas y cancerosas *in situ* así como un soporte en la cirugía de resección. Por ejemplo, el método se puede utilizar para detectar células displásicas en el pulmón *in situ* si se inyecta TCPP en el medio adecuado y a continuación se realiza una broncoscopia de fluorescencia. También se puede utilizar un método similar para detectar células con anomalías por escisión durante la realización de cirugía. Las aplicaciones *in situ* se pueden utilizar con cualquier órgano del cuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a las mismas, mama, próstata, pulmones, cérvix, garganta, vejiga, orofaringe, piel y tracto gastrointestinal mediante la utilización de un dispositivo endoscópico similar. La cantidad de TCPP preferente para utilizar en esta realización se determina en función del modo de administración y del 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). Si esta solución se inyecta directamente en el tejido afectado, la cantidad eficaz de TCPP dependerá del tejido diana y de la proximidad de la inyección a dicho tejido (por ejemplo, aproximadamente de 1-20 mg). En el pulmón, si se suministra en aerosol, por ejemplo, de 5 a 10 ml, a una concentración de 20-50 µg/ml, deberían ser adecuados. Los médicos químicos y otros expertos en la materia conocen bien los métodos para determinar las cantidades de TCPP que se deben administrar como agente de diagnóstico.

La concentración de TCPP en la solución de trabajo y el tiempo durante el cual se exponen las células a dicha solución son dos variables que se pueden modificar de forma coordinada. La concentración de TCPP es preferentemente 4-100 µg/ml, más preferentemente 4-40 µg/ml, y de la forma más preferente 20-40 µg/ml. El tiempo de exposición puede variar de entre aproximadamente 0,2 minutos hasta aproximadamente 2 horas en una realización, y entre 10 y 60 minutos en una realización más preferente. Cuando se utilizan bajas concentraciones de TCPP, es adecuado que el tiempo de exposición sea prolongado, y cuando se utilizan altas concentraciones de TCPP, es adecuado que el tiempo de exposición sea breve. Por ejemplo, en realizaciones preferentes, los portaobjetos se exponen durante 10 minutos a TCPP a una concentración de 40 µg/ml, y de forma alternativa durante 60 minutos a una concentración de 4 µg/ml. Los expertos en citología conocen el método para optimizar la concentración de TCPP en la solución de trabajo y el tiempo de exposición, y su objetivo es el de conseguir el máximo de unión específica entre la TCPP y los componentes celulares a la vez que se minimiza fluorescencia de fondo y captación y fluorescencia no específicas.

La solución de TCPP consta de TCPP en un medio acuoso tamponado a aproximadamente 36°C. En una realización, la capacidad tamponadora procede de 100 mM de MES; sin embargo, en este método se puede utilizar un intervalo de concentración que oscile entre 20 y 200 mM, conservando la misma eficacia. En una realización, la solución tiene un pH de aproximadamente 6,1; sin embargo, en este método se puede utilizar un intervalo de pH de 5,8 a 6,7, conservando la misma eficacia. También se pueden utilizar otros compuestos tampón que son eficaces en el intervalo de pH 5,8-6,7. Mientras que la etapa de exposición no es especialmente sensible a la temperatura, para optimizar dicho proceso es preferente una temperatura superior a la temperatura ambiente. El intervalo de temperatura adecuada para la etapa de exposición es de aproximadamente 23°C a aproximadamente 42°C en una realización preferente y de aproximadamente 30°C a aproximadamente 40°C en una realización más preferente.

Se pueden añadir otros compuestos a la solución de trabajo para reducir la fluorescencia de fondo, aumentar la estabilidad o reducir la autofluorescencia o *quenching*. Por ejemplo, se pueden utilizar detergentes para disminuir la fluorescencia de fondo y se pueden utilizar agentes reductores, antioxidantes, y otros inhibidores de la generación o difusión de especies de oxígeno activo para evitar la oxidación de la TCPP o reducir el fotoblanqueo. Entre los compuestos de interés se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, polietilenglicoles, tritones, ditiotreitól, 2-mercaptoetanol, o los kits "Antifade" de Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, P-7481, S-2828, S-7461). Además, se puede añadir hematoxilina a la TCPP, como colorante de contraste y así facilitar la microscopía de luz blanca.

La solución de lavado generalmente es similar a la solución acuosa que se utiliza en la solución de trabajo de TCPP pero sin dicho compuesto. Si se utilizan portaobjetos, dichos portaobjetos se deben lavar una vez, como mínimo, preferentemente tres veces y preferentemente con agitación en solución de lavado en exceso. Si el ensayo se realiza en solución, la TCPP no unida se puede eliminar mediante centrifugación de las células, decantación del sobrenadante y resuspensión de las células en una nueva solución tampón. Se puede repetir esta etapa si es necesario. También se pueden utilizar medios alternativos para separar las 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 suficientemente eficaz como para eliminar el material de fondo y otras uniones no específicas, pero no demasiado excesivo como para eliminar la TCPP con uniones específicas con los componentes celulares. Los expertos en citología conocen ampliamente la optimización de la etapa de lavado. Las composiciones que se

pueden añadir a la solución de lavado para mejorar su eficacia o estabilidad incluyen, sin limitarse a los mismos, alcoholes, detergentes o soluciones salinas de baja molaridad.

5 Una etapa importante del método de detección es dejar más de 1 hora pero menos de 24 horas entre el momento en que el portaobjetos se expone a la solución de trabajo de TCPP y el momento en que se lee el portaobjetos. Si el portaobjetos se lee tras 24 horas, el deterioro puede ser demasiado importante como para obtener un resultado preciso. Si las células se observan antes de 1 hora, el nivel de fluorescencia de fondo puede ser excesivamente alto.

10 Las longitudes de onda que se utilizan en la etapa de detección se comprenden en amplios intervalos, dentro de los cuales se encuentran intervalos de picos específicos más eficientes. 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 la TCPP al iluminar la muestra con luz ultravioleta (UV) y detectar 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 que comprende aproximadamente de 380 nm a aproximadamente 450 nm, y de forma más preferente una banda estrecha de longitudes de onda próxima 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 próximo a aproximadamente 650 nm. En ciertas circunstancias evidentes para los expertos en la técnica de la microscopía de fluorescencia, puede ser preferente detectar emisiones en un intervalo estrecho próximo a aproximadamente 706 nm. La selección de la longitud de onda se puede conseguir más fácilmente mediante filtros ópticos. Los conjuntos de filtros para los tintes fluorescentes más habituales están disponibles en Molecular Probes (Eugene, OR), por ejemplo. La selección de la longitud de onda adecuada para excitar y detectar TCPP según el método de la presente invención se puede obtener fácilmente 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 superior a 500 nm. Los expertos en microscopía conocen bien la selección de otros sistemas de filtros.

30 La fluorescencia se puede detectar de forma visual o mecánica, manual o utilizando medios automáticos. Incluso las células que tienen fluorescencia moderada se pueden distinguir fácilmente en comparación con las células no fluorescentes a simple vista. Por este motivo, ciertas realizaciones de la presente invención consisten simplemente en observar células tratadas con TCPP en un microscopio de fluorescencia y cuantificar el porcentaje de células fluorescentes en la muestra de forma manual. Sin embargo, las realizaciones preferentes comprenden métodos automatizados bien conocidos en la materia, y cuantificación mecánica en la que una célula se cuenta como fluorescente si su fluorescencia supera un 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 tenga una fluorescencia predeterminada que tenga 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 células de una forma específica, lo que puede representar un segundo indicador de anomalías precancerosas o cancerosas). De forma alternativa, para realizaciones en las que los ensayos se basan en soluciones, se pueden analizar muestras de células teñidas con TCPP y lavadas mediante la clasificación de las células activadas por fluorescencia (FACS), en las que dicha FACS está programada para separar las células con un nivel predeterminado de fluorescencia, que se puede determinar estadísticamente por comparación con células normales.

50 Se determina el número total de células presentes en una muestra para calcular qué porcentaje de ese total son fluorescentes por TCPP. Esta determinación se puede realizar según varios métodos bien conocidos en la materia. 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 de conteo fluorescente adecuado (por ejemplo, un colorante que tiñe las membranas externas o internas de una célula) que presenta fluorescencia a una longitud de onda diferente que la TCPP. En esta última realización, se cuantifica la relación de fluorescencia por TCPP con respecto a la fluorescencia del marcador celular.

55 Tal y como se ha mencionado anteriormente, la novedad de los métodos de la presente invención reside en el reconocimiento de los presentes inventores de que la tinción con TCPP identifica no solo a las células cancerosas, tal como se sabía previamente, sino que además también identifica células displásicas precancerosas. Por este motivo, el método descrito anteriormente proporciona 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 qué forma.

60 Por ejemplo, con el método se identificará el porcentaje de células de una muestra fluorescentes por TCPP. Si aproximadamente un 1-3%, más especialmente aproximadamente un 2-3%, de las células de la muestra son fluorescentes, entonces la muestra contiene células que se clasifican, como mínimo, como 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 por el contrario se cumple este porcentaje, se recomienda al paciente realizar pruebas adicionales. En relación con esta realización se debe considerar 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 al paciente. Una ventaja de la presente invención, que se describe más ampliamente a continuación, es que se puede obtener una población enriquecida de células fluorescentes del paciente a través de FACS.

Además, se ha demostrado que el nivel de fluorescencia de una célula procedente de una muestra se correlaciona con el estado asociado al cáncer de dicha célula (véase ejemplo 1). En consecuencia, se pueden evaluar las células aisladas o grupos de células en función de la intensidad de su fluorescencia en general y determinar si se necesitan pruebas adicionales en base, en parte, a esta evaluación.

Un experto en la materia comprenderá los términos de fluorescencia "alta", "media" y "baja" y términos relacionados tal y como se utilizan en el presente documento, como términos comparativos en los que la intensidad de fluorescencia de una sola célula o grupo de células en una muestra de ensayo se comparan, como mínimo, con células procedentes de una fuente equivalente (por ejemplo, esputo) que son normales, es decir, que no presentan anomalías relacionadas con el cáncer (control negativo). Esta comparación se puede realizar mediante estimación visual o con sistemas automatizados, que se pueden programar utilizando parámetros estadísticos tales como la variación de la fluorescencia media de una población de muestra, tal y como se describe en el ejemplo 2. En realizaciones preferentes se compara la intensidad de fluorescencia de las células de una muestra de ensayo con células de control adicionales cuyo estado canceroso ha sido predeterminado y previamente correlacionado con una intensidad de fluorescencia de TCPP (por ejemplo, tal y 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 "fluorescente" y "no fluorescente" se utilizan como términos comparativos, en los que la fluorescencia se compara con las células normales de un origen equivalente, y/o con la fluorescencia de fondo en general procedente 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", significa que la intensidad de la fluorescencia es superior a la fluorescencia de fondo o a fluorescencia observada en células normales. Si una célula o muestra de células se determina como "no fluorescente", entonces la fluorescencia observada no llega a ser superior o lo es mínimamente respecto a la fluorescencia de fondo o a la fluorescencia observada en 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 celulares 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 una célula metaplásica ligeramente fluorescente (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, que utiliza una tinción citológica estándar tal como la hematoxilina para ayudar a visualizar la célula y los contornos nucleares. En otra realización la evaluación citomorfológica es una etapa posterior, si se cumplen ciertos requisitos de umbral, por ejemplo, si la muestra contiene más de 1% de células fluorescentes.

En una realización particularmente preferente de la presente invención, se combinan ciertas características citomorfológicas seleccionadas con la intensidad de fluorescencia para elaborar 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 a características morfológicas simples que comprenden 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 las células fluorescentes por TCPP puede utilizar la clasificación como una lista de verificación, es decir, la célula que se está examinando se puede marcar como "positiva" o "negativa" con respecto a cada una de las clases numéricas. Tanto el número de clases numéricas asignadas a una célula en particular como el patrón de clases específicas asignadas a una célula son informativos de la condición cancerosa o precancerosa de esa célula. A modo de ejemplo, el ejemplo 1 establece un sistema de clasificación que comprende 14 clases numéricas. Tal y como se muestra en la tabla 2 de ese ejemplo, que muestra los resultados de 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 de dichas clases. Como ejemplo 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 se asignan a dicha clase.

En otra realización de la presente invención, las células tratadas con TCPP en solución de un paciente determinadas 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 un nivel de fluorescencia de bajo a moderado se consideran displásicas, y las células sin fluorescencia se consideran normales. Este tipo de separación permite comparar las células displásicas o cancerosas de un paciente con las células normales del mismo paciente, proporcionando de esta manera una población de control "interno" ideal.

En otra realización, mediante la separación de las células cancerosas y normales del mismo paciente, se puede analizar la eficacia de diversos agentes quimioterapéuticos. Las células separadas se colocan en alícuotas. A continuación, se puede mezclar la misma concentración de un agente terapéutico seleccionado con una alícuota de células altamente fluorescentes y una alícuota de células de bajo nivel de fluorescencia. Esta etapa se puede repetir con nuevas alícuotas y otro agente terapéutico. Las tasas de muerte celular se pueden evaluar utilizando técnicas conocidas en la técnica. Entonces se puede determinar el agente terapéutico más adecuado 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 se destruyeron el menor número de células normales (es decir, células con poca o ninguna fluorescencia tras el tratamiento con TCPP).

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 presente método, así como en otras aplicaciones. Este método comprende la disolución de TCPP en desde aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 90% de alcohol con un pH superior a aproximadamente 8,5 e inferior a aproximadamente 12,5. En la presente invención se recomienda preferentemente la utilización de alcoholes bajos 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 10,0. La concentración de isopropanol puede estar entre el 50% y el 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, la TCPP se disuelve a 1 mg/ml en una solución de bicarbonato sódico 50 mM en isopropanol al 50%.

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

La presente invención comprende, además, los kits para la detección de células precancerosas y cancerosas que comprenden TCPP en un recipiente, que pueden contener 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 solubilizada en alcohol basificado en un recipiente. Dicha solución de TCPP puede utilizarse como una solución patrón que se diluye en una solución acuosa tamponada para detectar células precancerosas y cancerosas. El kit puede incluir componentes de recogida de muestras celulares, tal y como el recipiente de recogida de esputos del ejemplo 1, o por el contrario puede incluir elementos para detectar células precancerosas en muestras ya adquiridas. El kit se puede adaptar 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 ejemplos. Estos kits también se pueden diseñar para utilizarse 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 incluir controles positivos o negativos, o ambos, tal y como lo llevaría a cabo un experto en la materia en la realización de los ensayos de la presente invención.

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

50 EJEMPLO 1

Ensayo en un portaobjetos de cristal para detectar células precancerosas y cancerosas por TCPP

En este ejemplo se comparan los resultados de diagnóstico obtenidos mediante un análisis estándar de portaobjetos de esputo con tinción PAP tratados con TCPP y analizados con un microscopio de fluorescencia. Los resultados indican que en la técnica de detección por TCPP de la presente invención equivale a la citología convencional de esputo en lo que respecta a la detección de células neoplásicas (displasia y carcinoma *in situ* no según la presente invención) y carcinoma franco. Los resultados también indicaron que un experto en la materia podía utilizar el método, conjuntamente con normas de clasificación sencillas, para estimar el grado de displasia de una muestra de tejido.

Métodos**Procedimientos de procesamiento de esputo utilizados en la preparación de portaobjetos con monocapa celular.**

5 Todos los portaobjetos de monocapa seleccionados para este estudio se prepararon a partir de muestras de esputo recogidas de pacientes que realizaron la técnica de tos espontánea a primera hora de la mañana. Específicamente, se enseñó a los pacientes a expectorar cualquier material que extrajeran al toser durante tres mañanas consecutivas y depositarlo en un recipiente con una sustancia fijadora que consistía en Carbowax al 2% en un líquido compuesto por alcohol al 50% / Saccomanno al 50% con 0,03-0,05 mg/ml de rifampicina. Se añadió rifampicina a la solución fijadora para que actuara como profiláctico en pacientes portadores de *M. tuberculosis* o portadores asintomáticos de *N. meningitis*.

15 La solución de Carbowax al 2% se preparó añadiendo de 2 ml de Carbowax (150) fundido a 98 ml de etanol al 50% y mezclando durante 30 minutos. El recipiente de cristal que contenía la solución se mantuvo caliente para evitar el endurecimiento de la cera sobre la superficie durante la preparación de la solución, lo que podría llevar a mediciones inexactas. El Carbowax se eliminó 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 al disolver 300 mg de cápsulas de rifampicina en 100 ml de alcohol etílico y se mezcló en una mezcladora Waring a alta velocidad. Se añadió un ml de esta solución a cada 30 ml de solución Saccomanno o bien 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 citología.

25 Se etiquetaron dos portaobjetos de microscopio "thin-prep" (Cytoc Corporation, Marlborough, MA) y un tubo de centrifugación de plástico de 50 ml con la información del paciente. La muestra de esputo se vertió en un tubo de centrifugación de plástico de 50 ml y se añadió una solución de alcohol etílico al 50% adicional para llevar el volumen a 50 ml si fuera necesario. El contenido del tubo de centrifugación se vertió en un recipiente de semi-microbatidora Eberbach de 250 ml y se homogeneizó de 10 a 60 segundos, dependiendo del examen visual de la muestra y del contenido de mucosa. Las muestras con mucosa espesa a veces requirieron periodos más largos de agitación. La muestra se vertió de nuevo en el tubo de centrifugación y se centrifugó a 1850 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, dejando de 1 a 2 ml en el tubo de centrifugación para mezclar con el sedimento (centrifugado). El tubo se agitó en un mezclador vortex 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 eliminar todos los organismos microbianos y virales.

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

45 **Solución patrón de TCPP.** Se añadieron 400 mg de bicarbonato de sodio a aproximadamente 90 ml a isopropanol basificado al 50% (bicarbonato de sodio 50 mM) y se mezcló hasta disolverlo completamente para preparar isopropanol basificado al 50%. Se añadieron poco a poco 100 mg de TCPP al isopropanol basificado al 50% (50 mM de bicarbonato de sodio) y se mezclaron entre 3 y 5 minutos hasta que se disolvieron. La solución de TCPP se completó a un volumen de 100 ml con isopropanol basificado al 50%, se mezcló completamente y se almacenó en una botella de reactivo ámbar envuelta en papel de aluminio en una zona refrigerada. La concentración final de TCPP en la solución patrón fue de 1 mg/ml.

50 **Solución de trabajo de TCPP.** Cada día se preparó solución de trabajo de TCPP. Se llevaron a temperatura ambiente aproximadamente 10 ml de solución patrón de TCPP a una concentración de 1 mg/ml. Se añadieron 8 ml de la solución patrón de TCPP (1 mg/ml) a un matraz aforado de 200 ml y se añadieron poco a poco aproximadamente 100 ml del tampón MES. La solución se mezcló cuidadosamente. Se añadió de nuevo el tampón MES hasta llegar al volumen de 200 ml. La solución se mezcló de 3 a 5 minutos y se almacenó a 2-4°C en una botella ámbar. La concentración final de TCPP en la solución de trabajo fue de 40 µg/ml.

60 **Procedimiento de exposición a la TCPP.** Se fijaron los portaobjetos con alcohol al 95% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después de fijar los portaobjetos o hasta tres días más tarde se expusieron a la TCPP. Los portaobjetos se sumergieron en una solución de TCPP de 40 µg/ml durante 10 minutos a 36°C, y posteriormente se lavaron 3 veces en tampón MES 100 mM, durante 1 minuto cada vez, a temperatura ambiente con agitación. Los portaobjetos se observaron más de una hora más tarde pero no al cabo de más de 24 horas.

65 **Información sobre el 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 incorporado 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 de esputo en portaobjetos mediante la técnica de tinción PAP modificada. La secuencia de procedimiento (núm.), el reactivo y el tiempo (min.: s) fueron los siguientes: (1) alcohol al 95% 15:00; (2) agua de grifo 1:00; (3) gill-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 en portaobjetos con tinción de Papanicolaou. Los portaobjetos con tinción PAP se sometieron a una evaluación citomorfológica semicuantitativa. (1) Las células displásicas y neoplásicas se identificaron 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, mucosidad, espirales mucosas, macrófagos pigmentados, células metaplásicas). La metodología para la cuantificación de dichos indicadores de inflamación ya se ha discutido en la bibliografía (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). A continuación se analizan los criterios utilizados para determinar la morfología de las células mediante citología por tinción PAP.

No hay anomalías significativas. Se considera que las células no tienen anomalías significativas si cumplen los requisitos siguientes:

1. células epiteliales ciliadas basófilas combinadas con macrófagos con pigmentación de grado 1-2 junto con células inflamatorias;
2. núcleos redondos de epitelio orientado de forma basal;
3. cromatina uniformemente dispersa;
4. membranas nucleares apenas visibles;
5. nucléolos apenas visibles; y
6. no hay células metaplásicas ni displásicas.

Metaplasia escamosa (sin displasia). Se considera que las células son metaplásicas escamosas sin displasia si cumplen los requisitos siguientes:

1. grupos de células basófilas sin cilios;
2. tamaño de la célula y de su núcleo uniformes;
3. relación núcleo/citoplasma (N/C) baja;
4. cromatina nuclear ligeramente granular; y
5. pueden aparecer pequeños nucléolos redondeados (generalmente aislados).

Displasia leve (atipia escamosa). Se considera que las células tienen displasia leve si se cumplen los requisitos siguientes:

1. de menor tamaño que las células metaplásicas;
2. se unen en grupos cohesivos, o aisladas;
3. las células parecen planas (láminas) tanto los núcleos como el citoplasma en el enfoque;
4. el tamaño de las células varía ligeramente;
5. el citoplasma puede ser eosinófilo o basófilo;
6. márgenes del citoplasma finos;
7. el tamaño de los núcleos varía ligeramente, 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 ligeramente 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). Se considera que las células tienen displasia moderada si cumplen los requisitos siguientes:
- 15 1. variación del tamaño, generalmente mayor, 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;
- 20 3. citoplasma denso, acidófilo predominante; aumento del número de células atípicas;
- 20 4. el núcleo puede tener dos mitades diferentes (no son imágenes especulares);
- 20 5. hay lobulaciones nucleares, grietas y nódulos; y
- 25 6. el material nuclear puede mostrar hiper cromasia predominando el diseño de cromatina punteada.
- 25 **Displasia grave (atipia escamosa intensa).** Se considera que las células tienen displasia grave si cumplen los siguientes requisitos:
- 30 1. el tamaño y la forma de las células varía mucho;
- 30 2. el tamaño de la célula es ligeramente superior al de las células con displasia moderada;
- 35 3. la relación N/C es elevada, pero variable (con extremos);
- 35 4. predominan las células aisladas, el núcleo es más central que en CIS;
- 40 5. el núcleo puede tener la misma forma que el citoplasma; el núcleo muestra menos distorsión que en CIS;
- 40 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
- 45 8. las células muestran un predominio de citoplasma acidófilo.
- 45 **Carcinoma de células escamosas *in situ* (CIS, no invasivo).** Se considera que las células tienen carcinoma de células escamosas *in situ* si cumplen los criterios siguientes:
- 50 1. células aisladas o en agregados (grupos);
- 50 2. el tamaño de la célula es variable, puede ser menor o mayor que las células de displasia intensa, por lo general más pequeños que el carcinoma de células escamosas invasivo;
- 55 3. las células son grandes, redondeadas y sus núcleos están situados simétricamente;
- 55 4. se puede dar degeneración celular;
- 60 5. escaso citoplasma, distribuido uniformemente, puede estar queratinizado o no queratinizado concéntricamente alrededor del núcleo, (orangiófilo o basófilo);
- 60 6. relación N/C variable, superior o inferior a la normal;
- 65 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;
- 65 9. se pueden observar lobulaciones de los núcleos;

- 10. se puede dar canibalismo, pero es inusual;
- 11. se pueden detectar células multinucleadas;
- 12. no hay nucléolos en el núcleo; puede haber una célula mitótica; y
- 13. fondo claro.

10 **Carcinoma de células escamosas (queratinizante de tipo invasivo bien diferenciado).** Se considera que las células tienen carcinoma de células escamosas si cumplen los criterios siguientes:

- 1. células habitualmente aisladas, naranjofílicas, pero pueden estar agrupadas y degenerar;
- 2. células grandes o pequeñas, angulares, con núcleos bien conservados y bordes celulares bien definidos;
- 3. células generalmente de mayor tamaño que *in situ*, y pueden ser pleomórficas, amplia gama de tamaños y formas;
- 4. se puede observar la formación de perlas (perla de cáncer);
- 5. moderada cantidad de citoplasma con "cola" anormal (en consonancia con invasión); forma de las células extraña, en forma de renacuajo, estrella, eje; cromatina nuclear angular, con agrupamiento impredecible con hiperchromasia y compensación de paracromatina y cromatina claramente definida, interfaz de paracromatina;
- 6. la cromatina es grumosa, especialmente a lo largo de la membrana nuclear;
- 7. si hay nucléolos, estos son grandes y acidófilos;
- 8. la membrana nuclear puede estar engrosada y ser irregular; irregularidad de espesor del borde de la cromatina nuclear;
- 9. la relación N/C es muy alta;
- 10. elevada irregularidad nucleolar en lo que respecta a forma, tamaño, número (núcleolos hijos); mitosis anormales, multinucleación;
- 11. el canibalismo y la multinucleación son comunes; y
- 12. el material necrótico de fondo es habitual.

Resultados

En un estudio ciego en el que se examinaron 60 muestras, los resultados indican que las células anormales (con 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 tenía una correlación fiable, como mínimo, con el diagnóstico de células ligeramente displásicas. Cincuenta de las cincuenta muestras de esputo que el procedimiento de tinción PAP citomorfológico estándar determinó que eran ligeramente displásicas a cancerosas también fueron identificadas como anormales mediante la detección con TCPP. De las diez muestras clasificadas como normales o metaplásicas en base al procedimiento de tinción PAP, cuatro muestras demostraron la misma morfología mediante el método con TCPP. Las muestras clasificadas como normales tenían una captación de TCPP mínima o nula.

La captación de TCPP de las células que las pruebas de citomorfolología determinaron como negativas o metaplásicas tenía una intensidad de fluorescencia característica, y mostraba patrones que eran reconocibles y de diagnóstico. La tabla 2 muestra una comparación entre la morfología celular y la fluorescencia tal como determinan la citomorfolología de tinción PAP y técnicas de TCPP, respectivamente. En base a la intensidad de fluorescencia y los patrones en muestras de células tratadas con TCPP, las células se clasificaron con una de las 14 posibles clasificaciones numéricas relativas a una descripción morfológica. Si las células eran de tipo 11 según la clasificación con TCPP y menos del 2-3% de dichas células en el portaobjetos tenían mayor intensidad de fluorescencia que 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 de ellas también tenían fluorescencia de los desechos nucleares (es decir, o bien la clase 13 o la 14), y dos también mostraron una designación de clase 10 (fluorescencia solamente del núcleo).

Otro patrón que se muestra en la tabla 2 está relacionado con la clasificación numérica 6, células anisoides irregulares, fluorescencia de baja a media. Se debe destacar que se asignaron relativamente pocas células displásicas a esta clasificación, mientras que la mayoría de las células carcinómicas recibieron la clasificación 6. Por este motivo, se espera que esta clasificación sea de especial importancia para distinguir carcinomas de displasias utilizando los métodos de la presente invención.

Otra observación importante que se muestra en la tabla 2 es que, como la morfología celular se desarrolló de normal a carcinómica grave, el número total de las clasificaciones numéricas asignables a cada célula examinada también aumentó. A modo de ejemplo, a las células que tenían una morfología negativa o metaplásica se les asignó un promedio de 2 clasificaciones numéricas, mientras que a 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 lógico que se establezca una correlación positiva entre el grado de displasia o carcinoma y el número de diferentes anomalías observadas en las células. Sin embargo, hasta el momento no se ha sistematizado esta correlación ni se ha utilizado para diagnosticar las condiciones precancerosas y cancerosas en una muestra de células.

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

Descripción del diagnóstico	N=60	
	Portaobjetos con morfología por TCPP/	Portaobjetos con morfología mediante citomorfolología
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, célula escamosa y pequeña	10/10	
Célula del carcinoma		

Tabla 2. Descripciones de la célula: características citomorfológicas y fluorescencia por TCPP

Número de clasificación = Descripción de la célula	Número de muestras que contienen células con descripción numérica por microscopia de fluorescencia TCPP/Número de muestras que contienen células con descripción por citomorfolología					
	Negativas o metaplásicas (n=10)	Displasia leve (n=12)	Displasia moderada (n=9)	Displasia grave (n=8)	Carcinoma <i>in situ</i> (n=11)	Adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa y de células pequeñas (n=10)
1 = Núcleo o núcleos grandes, fluorescencia de baja a media	3/10	12/12	9/9	7/8	10/11	6/10
2 = Células binucleadas simétricas, fluorescencia media	0/10	5/12	5/9	3/8	3/11	2/10
3 = Células pequeñas ovaladas, fluorescencia de media a alta	0/10	4/12	4/9	2/8	6/11	6/10
4 = Células pequeñas redondeadas, 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 de baja a media	0/10	0/12	1/9	1/8	10/11	7/10

(continuación)

Número de clasificación = Descripción de la célula	Número de muestras que contienen células con descripción numérica por microscopia de fluorescencia TCPP/Número de muestras que contienen células con descripción por citomorfología					
	Negativas o metaplásicas (n=10)	Displasia leve (n=12)	Displasia moderada (n=9)	Displasia grave (n=8)	Carcinoma <i>in situ</i> (n=11)	Adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa y de células pequeñas (n=10)
7 = Grupos de células, fluorescencia de media a alta	0/10	0/12	1/9	0/8	1/11	3/10
8 = Células aisladas degeneradas, fluorescencia de media a alta	0/10	0/12	0/9	0/8	4/11	7/10
9 = Grupos de células degeneradas, fluorescencia de media a alta	0/10	0/12	0/9	0/8	1/11	4/10
10 = Células de tamaño uniforme con un núcleo pequeño y redondo, fluorescencia media (solamente el núcleo)	2/10	2/12	2/9	1/8	1/11	2/10
11 = Membrana celular apenas visible, fluorescencia media	6/10	6/12	2/9	2/8	2/11	0/10
12 = Agrupaciones de residuos nucleares, sin fluorescencia	0/10	1/12	0/9	0/8	0/11	0/10
13 = Residuos nucleares de fondo, sin fluorescencia	6/10	5/12	8/9	2/8	5/11	3/10
14 = Residuos nucleares de fondo, fluorescencia media	1/10	2/12	2/9	1/8	1/11	0/10
Número medio de descripciones numéricas por célula examinada	1.80	3.08	4.11	3.13	4.82	4.90

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

EJEMPLO 2

5

Ensayo en suspensión para detectar y separar células precancerosas y cancerosas por TCPP

10

Este ejemplo comprende la utilización de la tinción con TCPP conjuntamente con la citometría de flujo por fluorescencia y la microscopía con portaobjetos para observar la citomorfología de determinar las anomalías de células procedentes de muestras de esputo. Gracias a la especificidad de la tinción con TCPP, la combinación de la citometría de flujo y a continuación la microscopía de portaobjetos es especialmente adecuada, proporcionando así un control interno para realizar comparaciones citomorfológicas en portaobjetos.

Métodos**Procedimientos de procesamiento de esputo utilizados en la preparación de suspensiones y portaobjetos con monocapa celular.**

5 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 a primera hora de la mañana. Específicamente, se enseñó a los pacientes a expectorar cualquier material que extrajeran al toser durante tres mañanas consecutivas y depositarlo en un recipiente con una sustancia fijadora que consistía en Carbowax al 2% en un líquido compuesto por alcohol al 50% / Saccomanno al 50% con 0,03-0,05 mg/ml de rifampicina. Se añadió rifampicina a la solución fijadora para que actuara como profiláctico en pacientes portadores de *M. tuberculosis* o portadores asintomáticos de *N. meningitis*.

15 La solución de Carbowax al 2% se preparó añadiendo 2 ml de Carbowax (150) fundido a 98 ml de etanol al 50% y mezclando durante 30 minutos. El recipiente de cristal que contenía la solución se mantuvo caliente para evitar el endurecimiento de la cera sobre la superficie durante la preparación de la solución, lo que podría llevar a mediciones inexactas. El Carbowax se eliminó 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 al disolver 300 mg de cápsulas de rifampicina en 100 ml de alcohol etílico y se mezcló en una mezcladora Waring a alta velocidad. Se añadió un ml de esta solución a cada 30 ml de solución Saccomanno o bien 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 citología.

25 La muestra de esputo se vertió en un tubo de centrifugación de plástico de 50 ml y se añadió una solución de alcohol etílico al 50% adicional para llevar el volumen a 50 ml si fuera necesario. El contenido del tubo de centrifugación se vertió en un recipiente de semi-microbatidora Eberbach de 250 ml y se homogeneizó de 10 a 60 segundos, dependiendo del examen visual de la muestra y del contenido de mucosa. Las muestras con mucosa espesa a veces requirieron periodos más largos de mezcla. La muestra se vertió de nuevo en el tubo de centrifugación y se centrifugó a poca velocidad durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, dejando de 1 a 2 ml en el tubo de centrifugación para mezclar con el sedimento de células. El tubo se agitó en un mezclador vortex durante aproximadamente 10 segundos. La muestra se resuspendió en tampón MES 100 mM, a un pH ~ 6,15. Las células se centrifugan y se enjuagan dos veces más con tampón MES 100 mM, en la última ocasión se deja ~1 ml en el tubo de centrifugación para poder resuspender las células. Posteriormente se resuspenden las células en 15 ml de etanol al 95% (tampón MES 100 mM al 5%) a temperatura ambiente (~20°C) durante 30 minutos, en agitación suave. Posteriormente se centrifuga el tubo de centrifugación a baja velocidad durante 10 minutos. Se retira todo el sobrenadante salvo 1-2 ml.

40 **Solución patrón de TCPP.** Se añadieron 400 mg de bicarbonato de sodio a aproximadamente 90 ml de isopropanol al 50% (50 mM de bicarbonato de sodio) y se mezcló hasta disolverlo completamente para preparar isopropanol basificado al 50%. Se añadieron poco a poco 100 mg de TCPP al isopropanol basificado al 50% (50 mM de bicarbonato de sodio) y se mezclaron entre 3 y 5 minutos hasta que se disolvieron. La solución de TCPP se completó a un volumen de 100 ml con isopropanol basificado al 50%, se mezcló completamente y se almacenó en una botella de reactivo ámbar envuelta en papel de aluminio en una zona refrigerada. La concentración final de TCPP en la solución patrón fue de 1 mg/ml.

45 **Solución de trabajo de TCPP.** Cada día se preparó solución de trabajo de TCPP. Se llevaron a temperatura ambiente aproximadamente 10 ml de solución patrón de TCPP a una concentración de 1 mg/ml. Se añadieron 8 ml de la solución patrón de TCPP (1 mg/ml) a un matraz aforado de 200 ml y se añadieron poco a poco aproximadamente 100 ml del tampón MES. La solución se mezcló cuidadosamente. Se añadió de nuevo el tampón MES hasta llegar al volumen de 200 ml. La solución se mezcló de 3 a 5 minutos y se almacenó a 2-4°C en una botella ámbar. La concentración final de TCPP en la solución de trabajo fue de 40 µg/ml.

55 **Procedimiento de exposición a la TCPP.** Las células en suspensión, previamente expuestas a alcohol al 95% durante 30 minutos a temperatura ambiente, inmediatamente después de fijarse o hasta tres días más tarde se exponen a la TCPP. Las células se resuspenden en 10 ml de una solución de TCPP de 40 µg/ml durante 10 minutos a 36°C mediante agitación suave, y posteriormente se lavan con 20 ml a temperatura ambiente, tres veces con tampón MES 100 mM, mediante centrifugación a velocidad mínima para sedimentar las células durante 10 minutos. El pellet celular lavado se resuspende en 10-15 ml de tampón MES. Dichas suspensiones, o alícuotas de las mismas, se analizan mediante un dispositivo de citometría de flujo por fluorescencia.

60 **Citometría de flujo por fluorescencia.** Primer pase. Se hace pasar un mínimo de 10.000 células a través de un citómetro de flujo capaz de clasificar las células. Dicho citómetro de flujo debe incorporar una fuente de luz que proporcione radiación aproximadamente a 415 nm, con filtros que permitan el paso de la luz entre aproximadamente 390 nm y 490 nm. La emisión de fluorescencia se debe controlar entre aproximadamente 630 nm 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 adecuado. En el primer pase, el dispositivo cuenta las células aisladas y mide su fluorescencia específica. Se calcula la fluorescencia

65

media y la desviación estándar de dicha media. Además, se determina el valor de la media (el valor de fluorescencia específica que es menor que la mitad de los valores y mayor que la mitad de los valores).

5 Citometría de flujo por fluorescencia con clasificación de células. Segundo pase. Se hace pasar un mínimo de 100.000 células a través del citómetro de flujo de fluorescencia capaz de clasificar las células, equipado de la misma forma que para el primer pase. Las células cuya fluorescencia sea inferior a la fluorescencia media + 1,3 desviaciones estándar de la media (aproximadamente el 90% de las células) se definen funcionalmente como de baja fluorescencia, y se separan en un tubo de ensayo, y las células con fluorescencia específica mayor o igual a la fluorescencia media + 1,3 desviaciones estándar de la media (aproximadamente el 10% de las células) se definen funcionalmente como de alta fluorescencia y se separan en otro tubo de ensayo. De forma alternativa, las células se pueden clasificar en tubos de ensayo de acuerdo con su fluorescencia en relación con la fluorescencia específica media obtenida en el primer pase. Las células con una fluorescencia específica inferior al doble de la media serían "normales" o de fluorescencia baja y, a continuación, las células se pueden combinar con 2-4x la fluorescencia media, 4-6x y superior a 6x la fluorescencia media. Se espera que cada uno de los conjuntos con mayor intensidad de fluorescencia sean más ricos en células anormales. Si más del 2-3% de células poseen más de 3 veces la fluorescencia media, se podría suponer, como mínimo, una afección precancerosa avanzada.

20 **Preparación de portaobjetos monocapa.** Las muestras de células de baja y alta fluorescencia se centrifugan durante 10 minutos a bajas rpm para sedimentar las células. El sobrenadante se retira, dejando 1-2 ml en el tubo de centrifugación para mezclar con el sedimento celular. El tubo se agita en un mezclador vortex durante aproximadamente 10 segundos. Se colocan de una a tres gotas del sedimento en un vial PreservCyt (Cytoc Corporation, Marlborough, MA). La muestra se incuba durante 5 minutos para desactivar todos los organismos microbianos y virales.

25 Las monocapas celulares de las muestras se fijan 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. A continuación, el ThinPrep Processor deposita inmediatamente los portaobjetos en un baño fijador que contiene etanol al 95% (se mantiene durante 30 minutos).

30 **Procedimientos de tinción portaobjetos de esputo mediante técnica de tinción PAP modificada.** Secuencia de procedimiento (núm.), reactivo y el tiempo (min.: sec) según se describe a continuación: (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.

40 **Métodos de análisis citopatológico de rutina de portaobjetos con tinción de Papanicolaou.** Los portaobjetos con tinción PAP se sometieron a evaluación citomorfológica semicuantitativa. (1) se identificaron las células displásicas y neoplásicas 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, mucosidad, espirales mucosas, macrófagos pigmentados, células metaplásicas). La metodología para la cuantificación de estos indicadores de inflamación ya se ha discutido en la bibliografía (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). A continuación se describen los criterios utilizados para determinar la morfología de las células utilizando citología por tinción PAP.

50 **Sin anomalías significativas.** Se considera que las células no tienen anomalías significativas si cumplen los requisitos siguientes:

1. células epiteliales ciliadas basófilas combinadas con macrófagos con pigmentación de grado 1-2 junto con células inflamatorias;
2. núcleos redondos de epitelio orientado de forma basal;
3. cromatina uniformemente dispersa;
4. membranas nucleares apenas visibles;
5. nucléolos apenas visibles; y no hay células metaplásicas ni displásicas.

60 **Metaplasia escamosa (sin displasia).** Se considera que las células son metaplásicas escamosas sin displasia si cumplen los requisitos siguientes:

1. grupos de células basófilas sin cilios;

2. tamaño de la célula y de su núcleo uniformes;
3. relación núcleo/citoplasma (N/C) baja;
- 5 4. cromatina nuclear ligeramente granular; y
5. pueden aparecer pequeños nucléolos redondeados (generalmente aislados).

10 **Displasia leve (atipia escamosa).** Se considera que las células tienen displasia leve si se cumplen los requisitos siguientes:

1. de menor tamaño que las células metaplásicas;
- 15 2. se unen en grupos cohesivos, o aisladas;
3. las células parecen planas (láminas) tanto los núcleos como el citoplasma en el enfoque;
4. el tamaño de las células varía ligeramente;
- 20 5. el citoplasma puede ser eosinófilo o basófilo;
6. márgenes del citoplasma agudos;
- 25 7. el tamaño de los núcleos varía ligeramente, 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;
- 30 9. cromatina nuclear ligeramente granular (ligeramente aumentada), cromocentro ocasional; y
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.

35 **Displasia moderada (atipia escamosa).** Se considera que las células tienen displasia moderada si cumplen los requisitos siguientes:

1. variación del tamaño, generalmente mayor, pero puede ser menor que en la displasia leve;
- 40 2. más variación en la forma y la relación N/C que en la displasia leve;
3. citoplasma denso, acidófilo predominante; aumento del número de células atípicas;
- 45 4. el núcleo puede tener dos mitades diferentes (no son imágenes especulares);
5. hay lobulaciones nucleares, grietas y nódulos; y
6. el material nuclear puede mostrar hiper cromasia predominando el diseño de cromatina punteada.

50 **Displasia grave (atipia escamosa intensa).** Se considera que las células tienen displasia grave si cumplen los siguientes requisitos:

1. el tamaño y la forma de las células varía mucho;
- 55 2. el tamaño de la célula es ligeramente superior al de las células con displasia moderada;
3. la relación N/C es elevada, pero variable (con extremos);
4. predominan las células aisladas, el núcleo es más central que en CIS;
- 60 5. el núcleo puede tener la misma forma que el 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;
- 65 7. paracromatina, núcleo grande, membrana nuclear multiagrupada focalmente engrosada; y

8. las células muestran un predominio de citoplasma acidófilo.

5 **Carcinoma de células escamosas *in situ* (CIS, no invasivo).** Se considera que las células tienen carcinoma de células escamosas *in situ* si cumplen los criterios siguientes:

1. células aisladas o en agregados (grupos);

10 2. el tamaño de la célula es 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 y sus núcleos están situados simétricamente;

15 4. se puede dar degeneración celular;

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

20 6. ratio N/C variable, superior o inferior a la 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;

25 9. se pueden observar lobulaciones de los núcleos;

10. se puede dar canibalismo, pero no es habitual;

30 11. se pueden detectar células multinucleadas;

12. no hay nucléolos en el núcleo; puede haber una célula mitótica; y

13. fondo claro.

35 **Carcinoma de células escamosas (queratinizante de tipo invasivo bien diferenciado).** Se considera que las células tienen carcinoma de células escamosas si cumplen los criterios siguientes:

1. células habitualmente aisladas, orangeófilas, pero pueden estar agrupadas y degenerar;

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

3. células generalmente de mayor tamaño que *in situ*, y pueden ser pleomórficas, amplia gama de tamaños y formas;

45 4. se puede observar la formación de perlas (perla de cáncer);

5. moderada cantidad de citoplasma con "cola" anormal (en consonancia con invasión); forma de las células extraña, en forma de renacuajo, estrella, eje; cromatina nuclear angular, con agrupamiento impredecible con hiperchromasia y compensación de paracromatina y cromatina claramente definida, interfaz de paracromatina;

50 6. la cromatina es grumosa, especialmente a lo largo de la membrana nuclear;

7. si hay nucléolos, estos son grandes y acidófilos;

55 8. la membrana nuclear puede estar engrosada y ser irregular; irregularidad de espesor del borde de la cromatina nuclear;

9. la relación N/C es muy alta;

60 10. elevada irregularidad de los núcleos en lo que respecta a forma, tamaño, número (núcleolos hijos); mitosis anormales, multinucleación;

11. el canibalismo y la multinucleación son comunes; y

65 12. el material necrótico de fondo es habitual.

- Análisis citopatológico. Debido a que las muestras de esputo contienen células de muchos lugares en el pulmón, mezclados unos con otros, hay poco contexto para juzgar la normalidad o anormalidad de una célula en particular (a diferencia de lo que sucede con la tinción de sección delgada). La disponibilidad de un conjunto de células de baja fluorescencia proporciona una muestra de control interno de las células del paciente normales o prácticamente normales, con las que se comparan las células de alta fluorescencia teñidas con TCPP. Mediante la utilización de la tinción PAP estándar, un citopatólogo experto en la materia puede determinar fácilmente el grado de anormalidad de las células de TCPP con alta fluorescencia, que contienen 10 veces más células anormales en comparación con una monocapa no fraccionada.
- 5
- 10 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 reivindicaciones incluidas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Método para pronosticar la respuesta de un paciente a un tratamiento contra el cáncer, el método comprende:

- 5 a) previamente al tratamiento, poner en contacto la muestra de células *in vitro* del paciente con una solución de 5, 10, 15, 20-tetrakis (carboxifenil) porfina (TCPP) en condiciones que permitan la unión de TCPP a los componentes de las células displásicas o carcinómicas, si están presentes, en el que la solución de TCPP comprende
- 10 TCPP previamente disuelta en alcohol basificado del 50% al 90% y a un pH entre 8,5 y 12,0 y diluido en una solución acuosa tamponada;
- b) eliminar la TCPP no unida a la muestra;
- c) detectar la fluorescencia de TCPP en la muestra, la presencia de dicha fluorescencia indica que la muestra contiene células displásicas o carcinómicas;
- 15 d) realizar los pasos a-c en otra muestra de tejido u órgano que se está tratando contra el cáncer del paciente, a intervalos durante el tratamiento y tras la finalización de este; y
- e) determinar si el porcentaje de células precancerosas o cancerosas anormales de las muestras que se han analizado durante el tratamiento y tras la finalización de este es inferior al compararlo con la muestra analizada previamente al tratamiento, dicha reducción será un pronóstico de la respuesta del paciente al tratamiento contra el cáncer.

20 2. Método, según la reivindicación 1, que además comprende la separación de células mediante citometría de flujo por fluorescencia en una población que comprende células normales y una población que comprende células cancerosas y precancerosas anormales.

25 3. Método para pronosticar la respuesta de un paciente a un tratamiento contra el cáncer, en el que dicho método comprende los pasos siguientes:

- a) poner en contacto las células de una muestra de células no fijadas obtenidas, previamente al tratamiento, de tejido o un órgano que se está tratando contra el cáncer del paciente, *in vitro* con una solución de 5, 10, 15, 20-tetrakis (carboxifenil) porfina (TCPP) en condiciones que permitan 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 previamente disuelto en alcohol basificado del 50% al 90% y a un pH entre 8,5 y 12,0 y diluido en una solución acuosa tamponada;
- 30 b) eliminar la TCPP no unida a la muestra;
- c) detectar la fluorescencia de TCPP en la muestra, la presencia de dicha fluorescencia indica que la muestra contiene células displásicas o carcinómicas;
- 35 d) separar las células en células de baja o nula fluorescencia y células de elevada fluorescencia mediante citometría de flujo por fluorescencia, siendo las poblaciones de baja o nula fluorescencia normales o metaplásicas, siendo las poblaciones de elevada fluorescencia displásicas o carcinómicas;
- 40 e) tratar las poblaciones de células separadas con un agente terapéutico contra el cáncer potencial *in vitro*; y
- f) observar el efecto del agente en cada una de las dos poblaciones de células, siendo deseable observar que el efecto del agente es negativo en la población de células displásicas o carcinómicas, y que no lo es, o lo es en menor grado, en la población de células normales, lo que representa un pronóstico de la respuesta de un paciente al tratamiento contra el cáncer.

45 4. Método de detección de células displásicas o carcinómicas en un tejido diana específico del paciente, en el que dicho método comprende las etapas siguientes:

- a) introducir en el tejido diana una solución *in vitro* de TCPP en condiciones que permitan 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 previamente disuelto en alcohol basificado del 50% al 90% y a un pH entre 8,5 y 12,0 y diluido en una solución acuosa tamponada;
- 50 b) eliminar la TCPP no unida del tejido diana;
- c) detectar la fluorescencia de TCPP en la muestra, la presencia de dicha fluorescencia de TCPP indica que el tejido diana contiene células displásicas o carcinómicas;

55 5. Método, según la reivindicación 4, en el que el tejido diana se selecciona del grupo que comprenden pulmón, mama, glándula prostática, cérvix, garganta, vejiga, orofaringe, piel y tracto gastrointestinal.

60 6. Método de preparación de la solución de TCPP, que comprende la disolución de TCPP en una solución alcohólica acuosa que comprende alcohol del 50 al 90%, y cuyo pH es de 8,5 a 12.

7. Método, según la reivindicación 6, en el que el alcohol es isopropanol.

65 8. Método, según la reivindicación 6, en el que el pH se ajusta mediante bicarbonato de sodio e hidróxido de amonio.

9. Método, según la reivindicación 6, en el que la TCPP disuelta representa 2 mg/ml o menos.
- 5 10. Una composición que comprende TCPP disuelta en una solución alcohólica acuosa de alcohol del 50 al 90% a un pH entre 8,5 y 12,0.
- 10 11. Composición, según la reivindicación 10, en la que la concentración de TCPP en la solución es de 2 mg/ml o menos.
12. Composición, según la reivindicación 10, en la que el alcohol es isopropanol.
13. Composición, según la reivindicación 10, en la que el pH se ajusta mediante bicarbonato de sodio e hidróxido de amonio.
- 15 14. Composición, según la reivindicación 10, en la que se incluye 1 mg/ml de isopropanol en isopropanol al 50% y bicarbonato de sodio 50 nm.
15. Kit de detección de células displásicas o carcinómicas en una muestra, dicho kit comprende TCPP en un contenedor que comprende la composición según la reivindicación 10.