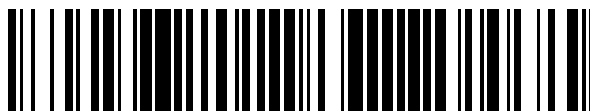


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 637**

51 Int. Cl.:

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2007** **E 07713302 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015** **EP 1991852**

54 Título: **Métodos para identificar un fenotipo celular**

30 Prioridad:

06.03.2006 US 778839 P

06.03.2006 US 778944 P

06.03.2006 US 778900 P

06.03.2006 US 778902 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2015

73 Titular/es:

ZETIQ TECHNOLOGIES LTD. (100.0%)

Building 3, 5th floor, Kiryat Atidim

Tel Aviv 61581, IL

72 Inventor/es:

GELVAN, DAN JACOB;

GOLTSMAN, LEV y

CHAUSOVSKY, ALEXANDER

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 553 637 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).

Métodos para identificar un fenotipo celular

Descripción

5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente a métodos útiles en identificar un fenotipo celular, y más específicamente a métodos útiles en diferenciar entre una célula que tiene un fenotipo maligno, una célula que tiene un fenotipo pre-maligno y una célula que tiene un fenotipo no maligno, o una célula metabólicamente alterada y una célula metabólicamente normal o una célula materna frente a fetal. Más particularmente, la invención se refiere a la tinción diferencial de células en una muestra biológica, preparación citológica o histológica. La presente invención se refiere además a métodos para diagnosticar, monitorizar farmacoterapia y monitorizar el progreso de la enfermedad.

Para el diagnóstico oncológico es necesario determinar la presencia de células tumorales, malignas o pre-malignas, entre otras células normales o reactivas, en un espécimen probado, y si es posible, determinar el tipo de tumor y el órgano del que se derivó.

La evaluación de rasgos patológicamente relevantes en células vivas se realiza comúnmente por medio de la interpretación de morfología celular o probando aspectos funcionales tales como la motilidad [Alberts et al., Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York y London (1994)], vitalidad, crecimiento independiente del anclaje [Hamburger y Salmon, Science (1976) 197:461-463] y otros. Por el contrario, las células y muestras de tejido fijadas se prestan ellas mismas a evaluación histológica. Por ejemplo, un tumor maligno o cáncer da lugar a cambios morfológicos que dan lugar a cambios fenotípicos. Tradicionalmente, estas evaluaciones se realizan por medio de microscopía óptica tras la tinción del espécimen con un colorante o una combinación de colorantes con el fin de hacer visibles las células al ojo humano. A partir de aquí se establece un oncodiagnóstico basado en las características morfológicas, tales como organización de tejidos, estructura de núcleos y citoplasma, relación de núcleos con respecto al citoplasma, etc., como se sugiere por Boyd [Boyd, "A textbook of Pathology" Philadelphia: Lea & Febiger, 8ª edición (1970)] "las principales características de la célula neoplásica, como se revelaron por el microscopio óptico, son aberraciones nucleares y cromosómicas, disminución de la relación citoplásmica-nuclear, una red de cromatina irregular gruesa y nucléolos más grandes de lo normal". Además, los trastornos metabólicos se caracterizan por la presencia de células metabólicamente alteradas que tienen un fenotipo alterado (deficiente) en comparación con el fenotipo de una célula metabólicamente normal.

Todavía, las evaluaciones citológicas no permiten la precisa identificación de células cancerosas entre la población celular normal en una preparación dada. Un motivo es que, en algunos casos, células no malignas imitan características morfológicas de células cancerosas. Por ejemplo, células de mesotelio reactivas, presentes en efusiones serosas, frecuentemente muestran características atípicas tales como multinucleación, hiper cromatismo nuclear, posición excéntrica del núcleo y basofilia citoplásmica, características que normalmente son características de células cancerosas [Brownlow et al., Equine Vet. J. (1982) 14(1):86-88; Hansen et al., Am. J. Med. (1984) 77:887; Petrova et al., Lab. Delo. (1989) 6:9-11; Bibbo et al. (1976A) en Wied et al., "Compendium on Diagnostic Cytology" Chicago: Tutorial of Cytology, 7ª edición (1976)]. En citología de esputo, por ejemplo, células vacuoladas podrían indicar cáncer, pero también células glandulares reactivas, en particular en pacientes con neumonía [Bibbo (1976B) en Wied et al., "Compendium on Diagnostic Cytology" Chicago: Tutorial of Cytology, 7ª edición (1976)]. Además, parece que algunas células malignas tienen morfología normal, por tanto, la oncocitología padece diagnósticos de negativos falsos y positivos falsos [Morell et al., Obstet. Gynecology. (1982) 60:41-45].

Así, a pesar de la larga lista de métodos citológicos clásicos, la eficiencia del diagnóstico citológico se determina en gran medida por la cualificación y experiencia del citopatólogo, y por sus capacidades para analizar los datos obtenidos.

Las técnicas citológicas clásicas están en muchos casos complementadas por un grupo de tecnologías, que se basan en compuestos de alta afinidad y especificidad, conocidos como inmunohistoquímica, inmunocitoquímica e hibridación *in situ*. Estas tecnologías se usan para la caracterización fenotípica de tumores (por ejemplo, por la implicación de anticuerpos para filamentos intermedios), detección de marcadores de tumor de valor pronóstico (por ejemplo, detección del antígeno p53), además de la detección de otras características de expresión oncogénica y secuencias de ácidos nucleicos. A pesar de la alta especificidad de estas técnicas para detectar tumores malignos, ninguna de estas técnicas proporciona una herramienta pan-maligna para oncodiagnóstico.

Los tres tipos más comunes de especímenes clínicos usados en la moderna citología de diagnóstico son especímenes de citología exfoliada, especímenes de biopsia por aspiración con aguja fina (FNAB) y frotis cervico-vaginales.

La citología exfoliativa trata el fenómeno de la exfoliación de células cancerosas de la superficie de tumores tempranos en la progresión de la enfermedad, incluso en las etapas pre-invasivas de los mismos [Boyd, "A textbook of Pathology" Philadelphia: Lea & Febiger, 8ª edición (1970)]. Las células exfoliadas pueden encontrarse en numerosos líquidos corporales tales como líquidos pleural, peritoneal, pericárdico, cefalorraquídeo, ocular, sinovial,

gastrointestinal, además de en especímenes respiratorios, muestras de piel y mucosa, y orina. Estas células exfoliadas pueden recogerse por medio de cepillados, lavado, punción directa, drenaje, preparaciones de contacto, raspados, etc.

La biopsia por aspiración con aguja fina (FNA) es una forma de biopsia de diagnóstico que usa agujas delgadas (finas) (22 de calibre o más estrechas) para obtener muestras celulares de dentro del cuerpo usando un modo invasivo mínimo de penetración en el cuerpo. Las muestras celulares de aspirado con aguja fina se examinan entonces microscópicamente para detectar la presencia de diversos procesos de enfermedad [NMLLS, "Fine Needle Aspiration Biopsy (FNAB) Techniques; Approved Guideline", NMLLS documento GP20-A (1996)]. A diferencia de la citología exfoliada, la FNAB se dirige al análisis de lesiones o masas y, por tanto, se considera un enfoque de diagnóstico más directo. La FNAB normalmente engloba lesiones y masas de la mama, glándulas tiroides, cabeza, cuello, próstata, pecho, pulmones, abdomen, etc.

Los frotis cervico-vaginales son raspados del aparato reproductor femenino que pretenden permitir el diagnóstico de numerosos tipos de atipia, algunas de naturaleza neoplásica, otras de naturaleza pre-maligna, u otros procesos patológicos.

Todos los tipos de muestras celulares deben transferirse a un portaobjetos, procesarse y teñirse con el fin de permitir la visualización por medio de microscopía óptica.

Actualmente, la citología de diagnóstico normalmente se basa en un conjunto bastante estrecho de métodos y composiciones de tinción, algunos de los cuales aparecieron hace muchos años, pero que todavía se usan ampliamente en la presente citología clínica [Kjeldsberg y Kniger, *Body fluids*, Chicago (1987); Koss, *Diagnostic cytology and its histopathologic basis*. Tercera edición, Philadelphia (1979)]. Esto se refiere principalmente a la tinción de Papanicolaou fijada en alcohol y la tinción de May-Grunwald-Giemsa secada al aire (una versión que se conoce como Romanowsky), mientras que la tinción con hematoxilina y eosina, tinción de Shorr para citología endocrina y el método de Pappenheim se usan más raramente.

El método de tinción de May-Grunwald-Giemsa (MGG) se usa ampliamente en laboratorios clínicos para el diagnóstico de células de origen hematopoyético y otras. Sin embargo, este método no expresa selectividad tintórea por células malignas.

El método de tinción de Papanicolaou se desarrolló inicialmente para el análisis de frotis vaginales [Papanicolaou y Traut, *Am. J. Obst. Gynecol.* (1941) 42:193-206; Papanicolaou "Atlas of Exfoliative Cytology" Cambridge, MA: Harvard University Press (1954)] y permite la diferenciación de tipos de células de epitelios estratificados y simples presentes en frotis fijados en alcohol. El método de Papanicolaou (frotis de Papanicolaou) permite obtener morfología detallada del núcleo y citoplasma en células normales y tumorales. Este enfoque también se ha usado ampliamente en otros campos de la citología clínica. Debe enfatizarse que el procedimiento de tinción de Papanicolaou, además de todos los otros procedimientos de tinción, no revelan ninguna selectividad tintórea por células malignas.

Ye et al. informan en *Molecular and Cellular Biochemistry* 196 (1999), 99-108, sobre los efectos citotóxicos de un novedoso extracto de proantocianidina de semilla de uva IH636 sobre células cancerosas humanas cultivadas de diferente origen. Se encontró que el extracto de proantocianidina usado presentó una citotoxicidad selectiva para algunas células cancerosas, mientras que al mismo tiempo potenció la viabilidad y crecimiento de algunas células normales.

Zhang et al. desvelan en *International Immunopharmacology* 5 (2005), 1247-1257, que la proantocianidina es capaz de aumentar la actividad antitumoral de la doxorubicina.

Nifli et al. describen en *Experimental Cell Research* 309 (2005), 329-339, un modo de acción, por medio del cual los flavanoles que existen de forma natural catequina y epicatequina pueden ejercer su actividad antitumoral.

Así, ninguno de estos protocolos de tinción citológica del estado de la técnica proporcionan selectividad heterocromática o tintórea selectiva de células pre-malignas y malignas, células metabólicamente alteradas y células fetales. Así, hay una necesidad ampliamente reconocida, y sería altamente ventajoso tener métodos de tinción citológica fiables y eficaces que detectaran, monitorizaran y validaran cambios fenotípicos en células cancerosas en comparación con células normales, en células metabólicamente alteradas en comparación con células metabólicamente normales y en célula fetal en comparación con célula materna. Aunque la práctica existente es fiable, tanto requiere tiempo como en la mayoría de los casos no es aceptada para la prueba de alto rendimiento del fenotipo celular. Además, como resultado del número creciente de nuevos genes con función desconocida, además de la necesidad de determinar la función de genes conocidos, hay una gran demanda de métodos rápidos y simples para detectar oncogenes y genes supresores de tumores. Hay una necesidad reconocida de probar sustancias químicas y fármacos para mutagenicidad, particularmente con técnicas que están fácilmente adaptadas para la automatización para cribado de alto rendimiento. Además, existe la necesidad de nuevo tipo/generación de tratamientos contra el cáncer que cambien el comportamiento/fenotipo de células de malignas a normales. También

existe la necesidad de la correcta combinación de fármacos en el tratamiento contra el cáncer. Estas solicitudes no se han cumplido debido a la ausencia de ensayos y plataformas de cribado.

RESUMEN DE LA INVENCION

Según un aspecto de la presente invención se proporciona un método de tinción o pre-tinción de al menos una célula, comprendiendo el método poner en contacto la al menos una célula con un agente de tinción que comprende un extracto de etanol de una planta *Ficus elastica*, tiñéndose o pre-tiñéndose así la al menos una célula, en el que las células no son células embrionarias humanas.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de tinción de al menos una célula, comprendiendo el método: (a) poner en contacto la al menos una célula con un agente de tinción que comprende un extracto de etanol de una planta *Ficus elastica*, de manera que se obtenga una célula pre-teñida o células; y (b) poner en contacto la célula pre-teñida o células con al menos un colorante, en el que las células no son células embrionarias humanas.

Según características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descritas más adelante, la al menos una célula comprende una población heterogéneamente diferenciada de células.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el al menos un colorante es un único colorante.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el al menos un colorante está seleccionado del grupo que consiste en un colorante básico y un colorante ácido.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, cuando: (i) el al menos un colorante es un colorante ácido, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula diferenciada; (ii) el al menos un colorante es un colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula no diferenciada; (iii) el al menos un colorante comprende el colorante ácido y el colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con el colorante ácido es indicativa de una célula diferenciada y una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con el colorante básico es indicativa de una célula no diferenciada.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, la población heterogéneamente diferenciada de células comprende una sección de tejido sólido.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, la población heterogéneamente diferenciada de célula comprende células aisladas.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, la población heterogéneamente diferenciada de células comprende células malignas o pre-malignas.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, la población heterogéneamente diferenciada de células comprende células fetales.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, la población heterogéneamente diferenciada de células comprende células metabólicamente alteradas.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el extracto de etanol de la planta *Ficus elastica* comprende un extracto de hojas.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el extracto de etanol comprende un extracto en 70% de etanol.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el extracto de etanol de la planta *Ficus elastica* comprende un extracto de planta en bruto.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el extracto de etanol de la planta *Ficus elastica* comprende un extracto de planta purificado.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el extracto de etanol de la planta *Ficus elastica* comprende un extracto diluido.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el extracto de etanol de la planta *Ficus elastica* comprende los espectros de RMN que se detallan en las Figuras 43-44.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el agente de tinción es fluorescente.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el agente de tinción emite fluorescencia a 430 nm tras la excitación a 375 nm.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el agente de tinción se biotinila.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el extracto de etanol de la planta *Ficus elastica* se complementa con iones positivamente cargados.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, los iones positivamente cargados están seleccionados del grupo que consiste en magnesio y calcio.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el al menos un colorante comprende dos colorantes.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el al menos un colorante está seleccionado del grupo que consiste en un colorante básico, un colorante ácido, un derivado de triaminotriphenilmetano, un derivado de diazo y una combinación de los mismos.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, los dos colorantes comprenden colorantes seleccionados del grupo que consiste en un colorante básico, un colorante ácido, un derivado de triaminotriphenilmetano, un derivado de diazo y una combinación de los mismos.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, la tinción con los dos colorantes se efectúa secuencialmente.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el colorante básico está seleccionado del grupo que consiste en Dahlia y New Fuchsin.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, el colorante ácido es Light Green.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, la célula diferenciada es una célula sana normal y la célula no diferenciada es una célula maligna o pre-maligna.

Según todavía otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de identificación de una célula de un estado de diferenciación de interés, comprendiendo el método: (a) teñir la célula poniendo en contacto la al menos una célula con un agente de tinción que comprende un extracto de etanol de una planta *Ficus elastica*, de manera que se obtenga una célula pre-teñida o células; y poner en contacto dicha célula pre-teñida o células con al menos un colorante; en el que las células no son células embrionarias humanas; y (b) analizar la tinción, en el que cuando: (i) el al menos un colorante es un colorante ácido, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula diferenciada; (ii) el al menos un colorante es un colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula no diferenciada; (iii) el al menos un colorante comprende el colorante ácido y el colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con el colorante ácido es indicativa de una célula diferenciada y una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con el colorante básico es indicativa de una célula no diferenciada.

Según todavía otras características en las realizaciones preferidas descritas, la célula no diferenciada es una célula maligna o pre-maligna.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método de diagnóstico de un cáncer en un sujeto, comprendiendo el método: (a) teñir células del sujeto poniendo en contacto la al menos una célula con un agente de tinción que comprende un extracto de etanol de una planta *Ficus elastica*, de manera que se obtenga una célula pre-teñida o células; y poner en contacto dicha célula pre-teñida o células con al menos un colorante; en el que las células no son células embrionarias humanas, de manera que se obtenga una población teñida de células; y (b) analizar una tinción de la población teñida de células, en el que cuando: (i) el al menos un colorante es un colorante ácido, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de célula diferenciadas; (ii) el al menos un colorante es un colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de células no diferenciadas; (iii) el al menos un colorante comprende el colorante ácido y el colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con el colorante ácido es indicativa de célula diferenciadas y una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con el colorante básico es indicativa de células no diferenciadas, por el cual una presencia o nivel de las células no diferenciadas en indicativo de células malignas o pre-malignas, diagnosticándose así el cáncer en el sujeto.

También se desvela un método de determinar un ciclo de tratamiento contra el cáncer en un sujeto en necesidad del

mismo, comprendiendo el método: (a) administrar al sujeto una terapia contra el cáncer; (b) analizar una presencia o nivel de células malignas o pre-malignas en una muestra de biopsia del sujeto tras la etapa (a) según el método anterior, por el cual la presencia o nivel de las células malignas o pre-malignas es indicativa del ciclo de tratamiento.

- 5 El método puede comprender además obtener una muestra de biopsia adicional del sujeto antes de la etapa (a) y/o concomitante con la etapa (b).

El método puede comprender además comparar el nivel de las células malignas o pre-malignas en la muestra de biopsia con la muestra de biopsia adicional.

- 10 También se desvela un método de determinar una pauta de tratamiento contra el cáncer en un sujeto en necesidad de la misma, comprendiendo el método: (a) analizar una presencia o nivel de células malignas o pre-malignas en una muestra de biopsia del sujeto; (b) administrar al sujeto una cantidad eficaz terapéutica de una terapia contra el cáncer según la presencia o nivel de células malignas en la muestra de biopsia del sujeto.

- 15 El método puede comprender además repetir la etapa (a) tras (b).

- También se desvela un método de identificar un agente capaz de invertir un fenotipo pre-maligno o maligno de una célula, comprendiendo el método: (a) someter la célula a un agente; (b) analizar un fenotipo maligno de la célula tras (a) y opcionalmente antes de (a) según el método anterior, en el que una inversión del fenotipo es indicativa de un agente capaz de invertir un fenotipo pre-maligno o maligno de una célula

El agente puede comprender una composición de prueba.

- 25 La composición de prueba puede seleccionarse del grupo que consiste en un polinucleótido, un polipéptido, una sustancia química de molécula pequeña, un hidrato de carbono, un lípido y una combinación de los mismos.

El agente puede comprender una condición de prueba.

- 30 La condición de prueba puede seleccionarse del grupo que consiste en una condición de crecimiento y una condición de radiación.

La célula puede comprender una pluralidad de células.

- 35 El método puede realizarse usando medios de alta producción.

Los medios pueden comprender un dispositivo de muestreo automatizado, un equipo de manipulación de líquidos, un teñidor automatizado, un dispensador, un robot, o cualquier combinación de los mismos.

- 40 La presente invención trata satisfactoriamente las limitaciones de las configuraciones presentemente conocidas proporcionando métodos para la tinción de células que puede usarse para distinguir entre células de diferentes niveles de diferenciación.

- 45 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen más adelante. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de patente, que incluye definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes.

- 50 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

- La invención se describe en el presente documento, a modo de ejemplo solo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los datos mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención solo, y se presentan en pro de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se ha hecho intento por mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle que lo necesario para un entendimiento fundamental de la invención, tomada la descripción con los dibujos que hacen evidente para aquellos expertos en la materia cómo las varias formas de la invención pueden ser integradas en la práctica.

En los dibujos:

- 65 Las FIG. 1A-B muestran frotis preparados a partir de un líquido pleural derivado de un paciente masculino diagnosticado, por medio de histopatología, con carcinoma de origen desconocido, teñido usando el procedimiento de tinción según la presente invención.

Las FIG. 2A-B muestran frotis preparados a partir de efusiones pleurales. La FIG. 2A representa efusiones pleurales teñidas con el protocolo de May-Grunwald-Giemsa. Se tiñeron especímenes por medios tales como con el fin de permitir la visualización de células. Estas técnicas convencionales no fueron diferenciales; y la FIG. 2B representa efusiones pleurales teñidas con el novedoso procedimiento de tinción según la presente invención. Mientras que el citoplasma de células con propiedades malignas se tiñó de rojo, el citoplasma de células epiteliales normales, macrófagos y leucocitos de todos los tipos se tiñó de verde.

La FIG. 3 muestra un frotis preparado a partir de un líquido pleural derivado de una paciente femenina diagnosticada, por medio de histopatología, con carcinoma de mama, teñido usando el procedimiento de tinción según la presente invención.

La FIG. 4 muestra un frotis preparado a partir de un líquido pleural derivado de un paciente masculino diagnosticado, por medio de histopatología, con carcinoma de origen desconocido, teñido usando el procedimiento de tinción según la presente invención. El recuadro muestra un aumento de la única célula teñida. Se encontraron un total de tres células malignas en este portaobjetos específico.

Las FIG. 5A-G muestran siete paneles (A-G) de seis (1-6) situaciones de tinción como se presentan en la Tabla 5. La FIG. 5A representa carcinoma de pulmón 3LL; la FIG. 5B representa astrocitoma C6; la FIG. 5C representa melanoma humano A375; la FIG. 5D representa eritroleucemia de Friend; la FIG. 5E representa NIH3T3; la FIG. 5F representa exudado inflamatorio peritoneal de rata; y la FIG. 5G representa un caso clínico normal.

Las FIG. 6A-D muestran una sección histológica de un paciente diagnosticado con carcinoma de colon teñido usando el procedimiento de tinción según la presente invención. La FIG. 6D representa la sección histológica entera; y las FIG. 6A-C representan el aumento de ciertos campos de la FIG. 6D según las flechas indicadas. Obsérvese que los cuadros muestran una clara asociación entre morfología y color.

Las FIG. 7A-C muestran secciones histológicas preparadas a partir de un modelo animal de cáncer de colon inducido con dimetilhidrazano y teñido con el novedoso protocolo de tinción. La FIG. 7A representa regiones correspondientes al fenotipo morfológicamente normal; la FIG. 7B representa regiones correspondientes al tejido morfológicamente hiperplásico; y la FIG. 7C representa regiones correspondientes al tejido morfológicamente displásico.

La FIG. 8 muestra un frotis preparado a partir de una paciente femenina diagnosticada, por medio de histopatología, con sarcoma de ovario, teñido usando el procedimiento de tinción según la presente invención.

Las FIG. 9A-D muestran cuatro pares de secciones de histología. El panel derecho de cada par contiene un portaobjetos teñido con el procedimiento de tinción según la presente invención y el panel izquierdo muestra un portaobjetos teñido con la técnica de hematoxilina-eosina convencional. La FIG. 9A representa carcinoma de cuello uterino; las FIG. 9B y 9D representan carcinoma de mama; y la FIG. 9C representa melanoma de piel.

La FIG. 10 muestra una impresión de tumor preparada a partir de una muestra de tejido de mama que contiene focos de carcinoma, teñida usando el procedimiento de tinción según la presente invención.

Las FIG. 11A-H muestran frotis de Papanicolaou de una mujer diagnosticada con lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HGSIL). Las FIG. 11A-D muestran un portaobjetos teñido con la tinción de Papanicolaou convencional, mientras que las FIG. 11E-H muestran un portaobjetos de la misma paciente teñido usando el procedimiento de tinción según la presente invención.

Las FIG. 12A-G muestran diversas afecciones pre-malignas y otras de importancia clínica en frotis cervical, teñido usando los procedimientos de tinción según la presente invención. La FIG. 12A representa frotis normal; Las FIG. 12B-C representan células escamosas atípicas de significancia indeterminada; las FIG. 12D-E representan células intraepiteliales escamosas de bajo grado (LGSIL); y las FIG. 12F-G representan lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HGSIL).

Las FIG. 13A-G muestran frotis de Papanicolaou teñido usando el procedimiento de tinción según la presente invención. Se muestran casos en los que el procedimiento de tinción según la presente invención dio resultados positivos a diferencia del diagnóstico convencional que dio resultados negativos. Las FIG. 13A-B representan un diagnóstico normal convencional de 41 años de edad; Las FIG. 13C-D representan un diagnóstico de inflamación convencional de 52 años de edad; la FIG. 13E representa un diagnóstico de inflamación convencional de 36 años de edad; la FIG. 13F representa un diagnóstico normal convencional de 52 años de edad; y la FIG. 13G representa un diagnóstico de inflamación convencional de 54 años de edad.

Las FIG. 14A-C muestran frotis en Cytospin secados al aire preparados a partir de líquido pleural de un paciente masculino de 65 años de edad diagnosticado con cáncer de mama. La FIG. 14A representa tinción de May-Grunwald-Giemsa; y las FIG. 14B-C representan variaciones del procedimiento de tinción según la presente invención.

Las FIG. 15A-C muestran tinción de sección de histología de cáncer de colon inducido con dimetilhidrazano en el modelo animal de rata. La FIG. 15A representa la sección de histología completa y muestra un tejido mixto que incluye juntos tejido de colon maligno y normal; la FIG. 15B representa el aumento de la FIG. 15A según las flechas indicadas; y la FIG. 15C representa tejido de colon normal. Obsérvese que regiones correspondientes al tejido morfológicamente normal y maligno son distinguibles por el patrón de tinción verde/rojo, indicado por las flechas.

Las FIG. 16A-D muestran tinción de sección de histología de cáncer de colon inducido con dimetilhidrazano en modelo animal de rata. Obsérvese que las diferencias morfológicas entre tejido normal y maligno están asociadas a cambios en el color.

Las FIG. 17A-B muestran tinción de sección histológica de un tumor de melanoma. La FIG. 17A representa tinción según las enseñanzas de la presente invención; y la FIG. 17B representa tinción por hematoxilina-

eosina.

Las FIG. 18A-C muestran un modelo de cerebro de rata con glioblastoma. La FIG. 18A representa tumor en la sección completa de la tinción del cerebro por Giemsa; la FIG. 18B representa tumor en la sección completa de la tinción del cerebro por hematoxilina-eosina; y la FIG. 18C representa tumor en la sección completa de la tinción del cerebro por el novedoso protocolo de tinción de la presente invención. Obsérvese que solo el protocolo de tinción de la presente invención diferenció entre tumor y tejido normal.

Las FIG. 19A-D muestran cambios en la tinción durante la embriogénesis fisiológica normal. Se diseccionaron secciones verticales de retina embrionaria de pollito de diferentes etapas de diferenciación de embriones de pollito. Se prepararon bloques de parafina, se cortaron y se montaron sobre portaobjetos de vidrio. La sección de retina se tiñeron según el protocolo respectivo. La FIG. 19A representa retina de embrión de 7 días [etapas 30-31 según Hamburger & Hamilton (Hamburger y Hamilton, J. Morphol. (1951) 88:49-92)]; la FIG. 19B representa retina de embrión de 9 días (etapa de diferenciación 35); la FIG. 19C representa retina de embrión de 14 días (etapa de diferenciación 40); y la FIG. 19D representa retina de embrión de 18 días (etapa de diferenciación 44). Abreviaturas: GCL = capa de células ganglionares, IPL = capa plexiforme interna, ONL = capa nuclear externa, OPL = capa plexiforme externa, PR = fotorreceptores, PE = epitelio pigmentado.

Las FIG. 20A-C muestran tinción diferencial de células normales y de adenocarcinoma. La FIG. 20A representa colonocitos primarios normales (CCD-33C0) que se sembraron en portaobjetos con cámaras; la FIG. 20B representa imágenes macroscópicas de 4 pocillos (en placa 384 de pocillos) sembradas con colonocitos normales (CCD-33C0) en los paneles izquierdos o células de cáncer de colon (HT-29) en los paneles derechos; y la FIG. 20C representa la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 que se sembró en portaobjetos con cámaras. Al final del periodo de siembra, se tiñeron los especímenes secados al aire.

La FIG. 21 muestra el crecimiento independiente de anclaje de células HT-29 después del pretratamiento con compuestos químicos de referencia. Las células HT-29 se incubaron durante tres días con medio solo (Contr), ácido fítico 30 microM (PA), 5 FU 10 microM, genisteína 100 microM, butirato 5 mM (But) o N-metilformamida 30 microM (NNE) según el protocolo de agar blando.

Las FIG. 22A-D muestran el resultado del cribado de fármacos para fenotipo en HT-29 (células de carcinoma de colon humano). La FIG. 22A representa células HT-29 sembradas en placa de 384 pocillos; la FIG. 22B representa células HT-29 sin tratar; la FIG. 22C representa células HT-29 tratadas con butirato de sodio 2,5 mM; y la FIG. 22D representa células HT-29 tratadas con butirato de sodio 5 mM. Los cambios fenotípicos se detectaron por medio de cambios de color graduales dependientes de la dosis de rojo (malignas) a azul/verde (normales).

Las FIG. 23A-C muestran el resultado del cribado de fármacos para fenotipo en HT-29 (células de carcinoma de colon humano). La FIG. 23A representa células HT-29 sin tratar, tratadas con butirato de sodio 2,5 mM o 5 mM visualizadas bajo un microscopio; y las FIG. 23B-C representan la densidad óptica de células como se midió en un espectrofotómetro. Se calculó la relación entre absorbancia a 560 nm (rojo) con respecto a 630 nm (verde).

Las FIG. 24A-C muestran el efecto de la genisteína sobre la tinción de células HT-29. Se sembraron células HT-29 en placas de 96 pocillos durante un día, se trataron con 0-120 microM, se fijaron al aire y se tiñeron. La FIG. 24A representa cambio dependiente de la dosis de la tinción; la FIG. 24B representa la cuantificación del tipo de tinción y se realizó usando la relación (R) de NF/LG (DO 560 a DO 630). Esta relación se corresponde con el equilibrio de rojo y verde en el pocillo. Células normales se tiñeron de verde con R inferior a 1, células malignas se tiñeron de rojo y presentaron R superior a 1; y la FIG. 24C representa el efecto de la genisteína sobre el número de células.

La FIG. 25 muestra el efecto del tratamiento de células sobre la tumorigenicidad de células HT-29 en ratones sin pelo. El experimento se completó según el protocolo experimental de ratones sin pelo explicado en detalle en la sección de materiales y procedimientos experimentales, más adelante en el presente documento.

Las FIG. 26A-E muestran el cambio de fenotipo transitorio inducido por butirato de células HT-29. Las células HT-29 se trataron con butirato 5 mM durante 4 días. Al final del periodo de tratamiento, el medio de crecimiento con butirato se sustituyó con medio libre de butirato durante 2, 3 o 4 días. Las células secadas al aire se tiñeron según el protocolo I. La FIG. 26A representa las células HT-29 no tratadas de control; la FIG. 26B representa células HT-29 tratadas con butirato 5 mM durante 4 días; la FIG. 26C representa células HT-29 que al final del periodo de tratamiento se cultivaron en medio libre de butirato durante 2 días; la FIG. 26D representa células HT-29 que al final del periodo de tratamiento se cultivaron en medio libre de butirato durante 3 días; y la FIG. 26E representa células HT-29 que al final del periodo de tratamiento se cultivaron en medio libre de butirato durante 4 días. Obsérvese la naturaleza transitoria del cambio del tipo de tinción que está en correlación con los resultados de agar blando (FIG. 21).

Las FIG. 27A-B muestran resultados de cribado de alta resolución (HTS). La FIG. 27A representa células HT-29 que se sembraron en placas de 384 de pocillos y se trataron con diferentes compuestos. Se usó butirato de sodio como control positivo y medio solo (sin tratamiento) sirvió de control negativo. La tinción de las células indicó la diferencia visual entre controles positivos y negativos y la visualización de un compuesto positivamente activo (acierto); y la FIG. 27B representan la dependencia de la dosis de compuestos activos detectados antes en un cribado. Se midió la actividad del compuesto de una concentración de 30 μ M y descendente.

La FIG. 28 muestra resultados de cribado de alta resolución (HTS). Se sembraron células HT-29 en placas de 384 pocillos y se trataron con una biblioteca de sustancias químicas tipo fármacos (ChemBridge Corporation) a concentraciones de 30 microM. Al final de este proceso las placas secadas al aire se tiñeron usando el

protocolo III. El cribado dio lugar a tres prototipos distintos de respuestas: efecto tóxico/estático (marcado negro), cambio de fenotipo (basado en el cambio de color de rojo a verde, fenotipo normal, marcado turquesa) y sin cambio obvio de fenotipo (tinción roja, marcado rojo). Los resultados de la tinción se registraron usando la medición de densidad óptica (DO 560 y DO 630) en cada pocillo por escáner de múltiples pocillos. La cuantificación del tipo de tinción se realizó usando la relación (R) de NF/LG (DO 560 a DO 630). Esta relación se correspondió con el equilibrio de rojo y verde en el pocillo. El grupo de interés se tiñó de verde y presentó R inferior a 1 e índice del número de células superior a 0,2. Las células malignas se tiñeron de rojo independientemente del índice del número de células.

La FIG. 29 muestra el diseño de construcciones. Se compraron el vector PCMV-Ras (proteína Ha-Ras no mutante) y el vector PCMV-Ras V12 (forma activa de Ras) de Clontech.

Las FIG. 30A-B muestran crecimiento independiente del anclaje en agar blando. Se establecieron caracterizados clones Rat2 que expresan Ras estable y se sembraron en agar blando según los protocolos (véase la sección de materiales y procedimientos experimentales en el presente documento más adelante y la Tabla 13). Al final del periodo de incubación de tres semanas, las colonias se contaron. La FIG. 30A representa vector vacío (Vec) o no mutante de Ras (Ras Vec) que indujeron la formación de pequeñas colonias (S); y la FIG. 30B representa la expresión de la forma transformante/oncogénica de Ras (Ras V12) que indujo la formación de grandes colonias (L).

Las FIG. 31A-D muestran el efecto de la transformación inducida por Ras V12 sobre el tipo de tinción. Las FIG. 31A-B representan células Rat2 sembradas y teñidas sobre cubreobjetos microscópicos (ampliados x20 y x60, respectivamente); y las FIG. 31C-D representan células Rat2 Ras V12 sembradas y teñidas sobre cubreobjetos microscópicos (ampliados x20 y x60, respectivamente). Al final del periodo de siembra, los especímenes secados al aire se tiñeron según el Protocolo IV.

Las FIG. 32A-D muestran el efecto de la inhibición de la señalización de oncogenes Ras V12 sobre el tipo de tinción. Las FIG. 32A-B representan células Rat2 Ras V12 incubadas sin tratamiento (ampliadas x20 y x60, respectivamente); y las FIG. 32C-D representan células Rat2 Ras V12 incubadas con PD98059 50 microM (inhibidor de MAPKK) durante 3 días (ampliadas x20 y x60, respectivamente). Obsérvese que se observó cambio de fenotipo (diseminación celular y restauración de la inhibición del contacto), además de tinción celular (tinción de roja a verde).

Las FIG. 33A-E muestran el cribado de fármacos para fenotipo de la vía de Ras/MAPK en células Rat1 Ras y Rat1 tratadas por diferentes concentraciones de inhibidores de la vía de señalización. La FIG. 33A representa el fenotipo de células Rat1 Ras y Rat1 sin tratar y tratadas con PD98059; la FIG. 33B representa células Rat1 Ras y Rat1 tratadas con inhibidor de la farnesilación (HR12); la FIG. 33C representa células Rat1 Ras y Rat1 tratadas con inhibidor de MAPK (PD98059); la FIG. 33D representa células Rat1 Ras y Rat1 tratadas con genisteína (inhibidor de la fosforilación de tirosinas); y la FIG. 33E representa células Rat1 Ras y Rat1 tratadas con LY294002 (inhibidor de cinasas PI3).

Las FIG. 34A-C muestran la diferenciación de células eritroleucémicas K562 inducida por Gleevec y su efecto sobre la tinción y producción de hemoglobina. La FIG. 34A representa células K562 sin tratar; la FIG. 34B representa células K562 tratadas con Gleevec 0,25 μ M (según el protocolo); y la FIG. 34C representa la detección de la producción de hemoglobina. Se trataron células K562 con Gleevec 0,25 μ M o 1,25 μ M (según el protocolo), la producción de hemoglobina se determinó por ensayo de bencidina. Obsérvese que como resultado de la diferenciación se ha detectado cambio de tipo de tinción de roja a verde. La diferenciación inducida por Gleevec se soportó por el aumento dependiente de la dosis en la producción de hemoglobina.

Las FIG. 35A-B muestran la diferenciación inducida por diferentes dosis de Gleevec y su efecto sobre la tinción, número de células y la producción de hemoglobina. La FIG. 35A representa el número de células K562 y la producción de hemoglobina tras el tratamiento con Gleevec 0-1 μ M (según el protocolo); y la FIG. 35B representa el fenotipo de células K562 tras el tratamiento con Gleevec 0-0,1 μ M. Obsérvese que el ensayo de tinción presenta la sensibilidad en el intervalo nanomolar bajo, en el que no hay efecto sobre la producción de hemoglobina o número de células.

Las FIG. 36A-B muestran la diferenciación inducida por ácido all-trans-retinoico (ATRA) de células HL-60 (línea celular de leucemia mieloide aguda humana). La FIG. 36A representa células HL-60 sin tratar; y la FIG. 36B representa células HL-60 que fueron provocadas para diferenciarse por ATRA 1 μ M durante 3 días.

Las FIG. 37A-C muestran diferenciación inducida por IFN-gamma de células U937 (línea celular de leucemia monocítica / linfoma histiocítico). La FIG. 37A representa células U937 malignas sin tratar; la FIG. 37B representa células U937 tratadas durante 4 días con 2000 U/ml de IFN-gamma humana recombinante; y la FIG. 37C representa células U937 tratadas durante 4 días con 10000 U/ml de IFN-gamma humana recombinante. Se realizó prueba de nitroazul de tetrazolio (NBT) como marcador bioquímico que detecta la diferenciación de células U937. Obsérvese el aumento dependiente de la dosis en el marcador de diferenciación bioquímico.

Las FIG. 38A-H muestran la diferenciación inducida por IFN-gamma o butirato de sodio (NaBu) de células U937. Las FIG. 38A-B representan células U937 malignas sin tratar (ampliadas x10 y x40, respectivamente); las FIG. 38C-D representan células U937 tratadas durante 4 días con NaBu 1 mM (ampliadas x10 y x40, respectivamente); las FIG. 38E-F representan células U937 tratadas durante 4 días con 2000 U/ml de IFN-gamma humana recombinante (ampliadas x10 y x40, respectivamente); y las FIG. 38G-H representan células U937 tratadas durante 4 días con 10000 U/ml de IFN-gamma humana recombinante (ampliadas x 10 y x40, respectivamente). Se realizó tinción con CamaRx.

La FIG. 39 muestra el potencial del método de cribado de fármacos para el fenotipo. El experimento se realizó

en queratinocitos humanos inmortalizados HPV 16, tratados con diferentes inhibidores como se indica en la tabla. Obsérvese que AG494 es una modificación química de AG555.

La FIG. 40 muestra la inhibición de la tinción dependiente de la concentración por extracto. Se tiñeron células Rat1 Ras V12 según el ensayo LG rapid (protocolo VIII). La dilución del extracto se realizó en 70% de EtOH. La intensidad de tinción se cuantificó por un lector de ELISA con filtro de 630 nm. Obsérvese la disminución gradual dependiente de la concentración en la potencia de inhibición del extracto.

La FIG. 41 muestra el efecto biológico de fracciones de extracto en bruto purificadas en Sephadex LH-20 sobre la inhibición de LG en células Rat2-RasV12. Obsérvese la correlación entre la modulación de la tinción y la cantidad de proantocianidinas.

La FIG. 42 muestra la huella de fluorescencia de la actividad del extracto (CST 2001) en ácido acético.

La FIG. 43 muestra huellas de RMN del polímero CST 2001 y fracciones de oligómeros.

La FIG. 44 muestra huellas de RMN de CST 2001.

La FIG. 45 muestra la estructura química de la forma oligomérica de CST 2001.

La FIG. 46 muestra la estructura química de la forma oligomérica alternativa de CST 2001.

Las FIG. 47A-C muestran la interacción diferencial de extracto de planta en bruto con células malignas y normales. La FIG. 47A representa células HT-29 que representan fenotipo celular maligno; la FIG. 47B representa células HT-29 tratadas con butirato de sodio 4 mM que presentan fenotipo normal; y la FIG. 47C representa colonocitos primarios (CCD-33CO) que presentan fenotipo normal. Se tiñeron células según el protocolo IX y se realizó detección de la fluorescencia usando un microscopio Olympus equipado con la estación de trabajo de procesamiento de imágenes digitales. Obsérvese la diferencia en la intensidad de tinción nuclear. Los núcleos malignos tienden a teñirse menos en comparación con los núcleos de células normales.

Las FIG. 48A-F muestran la interacción diferencial de CST 2001 con células de carcinoma de mama humano (MCF-7). La FIG. 48A representa células MCF-7 sin tratar incubadas en 70% de etanol como control de disolvente; las FIG. 48B y 48C representan células MCF-7 sin tratar (ampliadas x20 y x60, respectivamente); la FIG. 48D representa células MCF-7 tratadas (con butirato) incubadas en 70% de etanol como control de disolvente; y las FIG. 48E y 48F representan MCF-7 tratadas con 2,5 mM de butirato de sodio (ampliadas x20 y x60, respectivamente). Obsérvese que las células MCF-7 sin tratar representaron células fenotípicamente malignas mientras que las células MCF-7 tratadas con butirato representaron células fenotípicamente normales. El núcleo de las células fenotípicamente normales se tiñó más fuerte con CST 2001 que el homólogo maligno respectivo.

Las FIG. 49A-C muestran la interacción diferencial de CST 2001 con células de colon humanas. La FIG. 49A representa células de carcinoma de colon humano maligno (HT-29) (control, fenotípicamente malignas); la FIG. 49B representa células HT-29 tratadas con butirato de sodio 4 mM (butirato, fenotípicamente normales); y la FIG. 49C representa colonocitos primarios normales (células primarias normales, fenotípicamente normales).

Los paneles presentados más adelante muestran aumentos como se indica por las flechas. Obsérvese que el núcleo de las células fenotípicamente normales se tiñó más fuerte con CST 2001 que el homólogo maligno respectivo.

Las FIG. 50A-B muestran la interacción diferencial de CST 2001 con la línea celular K562 de leucemia humana.

La FIG. 50A representa células K562 sin tratar (fenotípicamente malignas); y la FIG. 50B representa células K562 tratadas con butirato de sodio 1 mM (fenotípicamente normales). Los paneles presentados más adelante muestran aumentos como se indica por las flechas.

Las FIG. 51A-B muestran la interacción diferencial de CST 2001 con la línea celular HL-60 leucémica humana.

La FIG. 51A representa células HL-60 sin tratar (fenotípicamente malignas); y la FIG. 51B representa células HL-60 tratadas con butirato de sodio 1 mM (fenotípicamente normales). Los paneles presentados más adelante muestran aumentos como se indica por las flechas.

Las FIG. 52A-C muestran la interacción diferencial de CST 2001 en un sistema Rat1. La FIG. 52A representa fibroblastos Rat1 (fenotípicamente normales); la FIG. 52B representa células Rat1 transformadas con Ras V12 (Rat1-Ras V12) (fenotípicamente malignas); y la FIG. 52C representa células Rat1-Ras tratadas con PD98059 (inhibidor específico de MAPKK) que bloquean la transformación maligna iniciada por Ras V12 (fenotípicamente normales). Los paneles presentados más adelante muestran aumentos como se indica por las flechas.

Las FIG. 53A-B muestran la interacción diferencial de CST 2001 (nativas) con células de leucemia U937 vivas.

La FIG. 53A representa células U937 sin tratar (control); y la FIG. 53B representa células U937 tratadas con ATRA 1,5 μ M durante 72 horas para inducir la normalización de fenotipo. La fluorescencia originada por CST 2001 se detectó por microscopio Olympus equipado con la estación de trabajo de procesamiento de imágenes digital.

La FIG. 54 muestra una ilustración del diagrama de flujo de diferentes posibilidades para el marcado de CST-2001. Las células podrían ser vivas o estar fijadas y CST 2001 podrían ser intactas o modificadas. En la figura se describen números limitados de opciones de modificación de CST 2001.

Las FIG. 55A-B muestran la visualización de CST 2001 biotiniladas en células de leucemia U937. La FIG. 55A representa un ejemplo de células nativas U937 teñidas con CST 2001; y la FIG. 55B representa un ejemplo de U937 biotiniladas teñidas con CST 2001 visualizadas con estreptavidina Cy3.

Las FIG. 56A-C muestran una señal fluorescente de CST 2001 en complejo con metales usando reactivo de Naturstoff (NR) en células U937. La FIG. 56A representa la señal fluorescente de células U937 originadas de PBS; la FIG. 56B representa la señal fluorescente de células U937 originadas de CST 2001; y la FIG. 56C representa la señal fluorescente de células U937 originadas de CST 2001 en complejo con NR. Los resultados

se detectaron por FACS (citometría de flujo activada por fluorescencia). La intensidad fluorescente media de los principales picos se indica en los gráficos debajo de cada figura.

La FIG. 57 muestra un ensayo de difusión radial del complejo formado entre CST 2001 y BSA que se visualiza mediante precipitación.

Las FIG. 58A-C muestran la tinción de células con CST biotiniladas usando avidina unida a Cy3. BSA designa BSA nativo (control). BSA-Bio designa BSA biotinilado. Los paneles inferiores muestran las células en la muestra.

Las FIG. 59A-B muestran tinción fluorescente diferencial por CST 2001 + reactivo de Naturstoff (NR) de células de adenocarcinoma MCF-7 vivas. La FIG. 59A representa células MCF-7 sin tratar (malignas, control); y la FIG. 59B representa células MCF-7 tratadas con butirato (normalizadas).

Las FIG. 60A-B muestran tinción fluorescente diferencial por CST 2001 + reactivo de Naturstoff (NR) de células Rat2 vivas. La FIG. 60A representa células Rat2 (normales) sin tratar; y la FIG. 60B representa células Rat2 Ras V12 transformadas (malignas).

Las FIG. 61A-C muestran tinción diferencial por CST 2001. La FIG. 61A representa tinción con CST 2001 de células U937 (células leucémicas); la FIG. 61B representa tinción con CST 2001 de Jar (células de coriocarcinoma humano); y la FIG. 61C representa una mezcla de U937 y células Jar teñidas por un complejo de CST 2001-reactivo de Naturstoff. Las flechas indican células U937 teñidas por complejo de CST 2001 + NR.

Las FIG. 62A-D muestran la tinción de secciones de histología preparadas a partir de modelo animal inducido con diabetes tipo II. Las FIG. 62A y 62C representan secciones de riñones de jerbos normales; y las FIG. 62B y 62D representan secciones de riñones de jerbos diabéticos. Todas las secciones se tiñeron con CAMA según el protocolo X. Imágenes de gran aumento (paneles inferiores) se basan en las estructuras glomerulares y acentúan la tinción verde asociada a tejido diabético, visualizado por este protocolo.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención se refiere a métodos de análisis del fenotipo celular que puede ser para la detección de diferenciación de células. Específicamente, la presente invención puede usarse para diagnosticar cáncer, monitorizar tratamiento, determinar la pauta de tratamiento y desarrollar novedosas modalidades de tratamiento para la enfermedad.

Los principios y operación de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o realizada de diversas formas. Por tanto, debe entenderse que la fraseología y terminología empleada en el presente documento es con el fin de descripción y no debe considerarse como limitante.

Durante décadas, la investigación de oncología se ha basado en la búsqueda de marcadores específicos del cáncer detectables, que puedan usarse para verificar la presencia o ausencia de células cancerosas de diversas líneas germinales en un espécimen biológico probado. Se encontraron y caracterizaron numerosos marcadores específicos del cáncer, que incluyen proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos. Sin embargo, ninguno mostró que fuera pan-maligno, expresado por o secretado de todas o incluso la mayoría de los tipos de células cancerosas. Por tanto, la misión continúa para un marcador universal que permita la eficaz oncodetección.

Las células normales y malignas tienen sorprendentemente diferentes fenotipos. Las diferencias incluyen la capacidad para formar tumores en modelos animales, formación de colonias en agar blando, pérdida de la inhibición por contacto y alteraciones de la diseminación, una tasa metabólica más rápida y expresión de marcadores específicos de tumor. Sería de máxima importancia discriminar entre el fenotipo normal y maligno por un simple método, no limitado a ningún tipo de célula particular.

Un posible enfoque para distinguir células malignas y normales se basa en diferencias en su estado metabólico [también conocido como el "efecto de Warburg", Warburg O. *Metabolism of Tumors*. London: Arnold Constable, 1930; Semenza G.L., Artemov D., Bedi A., Bhujwalla Z., Chiles K., Feldser D., Laughner E., Ravi R., Simons J., Taghavi P., Zhong H. 2001. 'The metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis Found Symp.*; 240:251-60; discussion 260-4; Kannagi R. 2004. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression-The Warburg effect revisited. *Glycoconj J.* 20(5):353-64].

El efecto de Warburg describe la alta tasa de glicólisis anaerobia que caracteriza células cancerosas que crecen rápidamente. El desplazamiento en la producción de energía de la fosforilación oxidativa a la glicólisis es una propiedad fundamental de las células cancerosas. Aunque Warburg creyó que el cáncer se producía por defectos en la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, ahora se sabe que este desplazamiento se produce incluso en presencia de oxígeno [Lu H., Forbes R. A., and Verma A., 2002. Hypoxia-inducible Factor 1 Activation by Aerobic Glycolysis Implicates the Warburg Effect in Carcinogenesis. *J. of Biol Chem* 277(26), 23111-23115]. Incluso sigue la validez del fenómeno hiper-glicolítico en cánceres que crecen rápidamente [Weinhouse S. *Glycolysis*, 1972.

Respiration and anomalous gene expression in experimental hepatomas. Cancer Research; 32:2007-2016].

Aunque la presente invención se reduce a la práctica, los presentes inventores tienen sin cubrir un novedoso ensayo de detección, capaz de distinguir entre diferentes fenotipos celulares metabólicos o de diferenciación, por tinción diferencial, sin comprometer la evaluación morfológica. Sin desear quedar ligado a teoría, se sugiere que la capacidad para distinguir entre diferentes estados de diferenciación o estados metabólicos (capacidades de proliferación) se basa en el efecto de Warburg anteriormente descrito. El método es capaz de producir una clara distinción tintórea entre células que tienen un estado metabólico diferencial o en un estado de diferenciación diferente, y así puede ser una herramienta útil en la detección precoz de células cancerosas.

Como se ilustra en el presente documento más adelante y en la sección de ejemplos que sigue, la presente metodología se basa en el uso de un extracto de planta (disolución de Zetiq[™]) para acentuar la tinción de células diferencial por colorantes ácidos (por ejemplo, verde) y/o básicos (por ejemplo, rojo). Se cree que las células normalmente diferenciadas tienen mayor afinidad por colorantes ácidos que las células menos diferenciadas (por ejemplo, metabólicamente alteradas o malignas). Asimismo, aquellas células menos diferenciadas presentan mayor afinidad por colorantes básicos que las células normalmente diferenciadas. La presente técnica de tinción acentúa estas diferencias en tinción (es decir, tinción diferencial).

El resultado es una respuesta cromogénica binaria, con células rápidamente metabolizantes tales como células malignas o no diferenciadas, tinción rojo/púrpura y células normales o altamente diferenciadas con un metabolismo más lento, tinción verde o verde azulado. Y, lo que es más importante, esta tinción diferencial se logra sin comprometer la precisión de la visualización de las diferencias morfológicas de subestructuras de células detectables bajo el microscopio usando métodos de tinción convencionales, permitiendo así también análisis tradicionales basados en morfológicos de las células teñidas.

El método se validó satisfactoriamente para la oncodetección de una amplia variedad de tumores malignos que incluyen carcinomas, sarcomas y otros, en tanto roedores como muestras biológicas humanas. La sensibilidad neoplásica del método se confirmó en muestras citológicas, muestras histológicas y muestras de modelos de cáncer inducido por carcinógenos en animales. Además, el método distingue claramente células normales de malignas, además de diferenciadas de no diferenciadas, en diversos sistemas *in vitro*.

Específicamente, usando la presente metodología, los presentes inventores han detectado satisfactoriamente células cancerosas de aspirados peritoneales, pleurales y pericárdicos, y diferenciado claramente entre células malignas y no malignas. Usando un procedimiento de secado de dos etapas, el citoplasma de células normales se tiñó de verde o siguió sin teñir mientras que el citoplasma de células cancerosas se tiñó de color rojo (Figuras 1A, B a Figura 4 y Figura 8). Esto fue especialmente evidente en casos difíciles en los que el procedimiento de tinción de May-Grunwald-Giemsa (MGG) no pudo diferenciar entre células malignas y normales.

Los presentes inventores también han mostrado tinción diferencial de frotis cervical. Estos resultados demuestran tinción diferencial de células normales en tonos verdes a diferencia de la tinción de células cancerosas en tonos rojos (Figuras 11A-H a Figuras 13A-G).

Los presentes inventores también han mostrado que el procedimiento de tinción de la presente invención no se limita a frotis citológicos preparados a partir de líquidos, sino que también puede aplicarse a preparaciones de contacto (Figura 10) y a otros tipos de preparaciones de células o de tejido (histológicas) tales como tejido incorporado en parafina (Figuras 6A-D y Figuras 9A-D). La presente invención distingue claramente entre células normales y células malignas en el mismo tejido, tal como en cáncer de colon (Figuras 6A-D, Figuras 7A-C, Figuras 15A-C y Figuras 16A-D) y en melanoma (Figuras 17A-B).

Los métodos y composiciones de la presente invención permiten la exigente tarea de la detección de límites de un tejido maligno después de la escisión quirúrgica (Figuras 18A-C), además de discriminar entre etapas de diferenciación, tales como en embriogénesis (Figuras 19A-D).

Así, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de tinción o pre-tinción de al menos una célula, comprendiendo el método poner en contacto la al menos una célula con un agente de tinción que comprende un extracto de etanol de una planta *Ficus elastica*, tiñéndose o pre-tiñéndose así la al menos una célula, en el que las células no son células embrionarias humanas.

Como se usa en el presente documento, el término "tinción" se refiere a resaltar visualmente células o estructuras subcelulares de las mismas. El agente de tinción de la presente invención se caracteriza por auto-fluorescencia que puede detectarse por medios apropiados. Así, el agente de tinción de la presente invención emite fluorescencia a 430 nm tras la excitación a 375 nm. Básicamente, el agente de tinción de la presente invención tiñe células de estado de metabolismo o de diferenciación normal, pero menos (o en absoluto) células de estado de metabolismo o de diferenciación alterado (como se describirá adicionalmente en el presente documento más adelante). Una tinción diferencial tal puede detectarse por medios diseñados para la detección de fluorescencia (por ejemplo, microscopio fluorescente).

Como se usa en el presente documento, el término “pre-tinción” se refiere a preparar o acondicionar células para la tinción con el fin de acentuar la tinción. Normalmente, un procedimiento de pre-tinción facilita lograr una mejor visualización de las estructuras teñidas una vez se exponen a un colorante. Según la presente invención, el procedimiento de pre-tinción facilita la clasificación de células teñidas de diferentes estados metabólicos o de diferenciación acentuando su afinidades diferenciales por colorantes ácidos y básicos.

Como se usa en el presente documento, el término “célula” se refiere a una célula eucariota de organismos multicelulares, preferentemente un ser humano, en el que las células no son células embrionarias humanas. Pueden usarse células individuales según las enseñanzas de la presente invención, además de una pluralidad de células. Así, pueden teñirse poblaciones homogéneas o heterogéneas (por ejemplo, de diferentes estados de diferenciación) de células. Normalmente, las muestras biológicas (por ejemplo, biopsias) comprenden poblaciones heterogéneas de células.

Tales poblaciones heterogéneas pueden comprender células heterogéneamente diferenciadas (tales como de una muestra o sección de tejido sólido (por ejemplo, tumor) o células aisladas, por ejemplo, en suspensión, por ejemplo, sangre). Por ejemplo la población de células puede comprender células malignas o pre-malignas, además de células sanas normales. Alternativamente, una población de células tal puede comprender células metabólicamente normales y metabólicamente alteradas. Adicionalmente o alternativamente, la población puede comprender células fetales y/o embrionarias, además de células maternas.

Las células de la presente invención pueden ser líneas celulares, cultivos primarios y muestras celulares tales como de biopsias (biopsias quirúrgicas, aspirados de aguja fina y similares). Los métodos de recuperación de biopsia son muy conocidos en la técnicas y dependen mucho del tipo de cáncer o cualquier otra afección médica que vaya a detectarse.

Como se ha mencionado anteriormente en este documento, el agente de tinción de la presente invención se aísla de plantas y fracciones activas de las mismas pueden existir de forma natural o sintética.

Plantas preferidas para el aislamiento de extractos incluyen, pero no se limitan a, plantas de *Ficus*, *Aloe* y *Lantana*, preferentemente de las plantas *Ficus elastica*, *Lantana camara* y *Aloe arborescens*. Según una realización más preferida actualmente conocida, el extracto es de *Ficus elastica*.

El extracto puede prepararse a partir de diversas porciones de la planta, por ejemplo, hojas. Las pautas para la preparación de extracto de hojas se proporcionan en la sección de detalles experimentales del Ejemplo 1 de la sección de ejemplos que sigue.

En la sección de detalles experimentales de la sección de ejemplos que sigue se describen diversos protocolos de preparación de un extracto de etanol de la presente invención. El extracto puede ser un extracto de planta purificado que comprende esencialmente los principios activos, pero que carece de contaminantes, o un extracto de planta en bruto, en tanto que se mantengan sus capacidades de tinción característica. De hecho, como se muestra en el Ejemplo 15 en el presente documento más adelante, una fracción de extracto activo, CST2001, mostró contraste e intensidad potenciados de la señal cuando se tiñeron células malignas. Las Figuras 43 y 44 describen la caracterización de una fracción activa que comprende $C_{23}H_{44}O_4$ o proantocianidinas. Las últimas, también conocidas como una clase específica de flavinoides, normalmente están en una forma oligomérica (que puede comprender 2-10-meros, por ejemplo, $C_{26}H_{32}O_{15}$, véanse la Figura 45 y la Figura 46) o forma polimérica.

El extracto de etanol de la presente invención comprende un extracto de etanol al 50%, extracto de etanol al 60%, extracto de etanol al 70%, extracto de etanol al 80%, extracto de etanol al 90% o un extracto de etanol al cien %. Preferentemente se usa un extracto diluido o no diluido. Sin embargo, deben tomarse medidas para no diluir en exceso el extracto, ya que esto puede afectar la posterior tinción (véase la Tabla 14 más adelante).

El agente de tinción de la presente invención (por ejemplo, extracto) puede complementarse con iones positivamente cargados que incluyen, pero no se limitan a, magnesio y calcio (véase el Ejemplo 15 en el presente documento más adelante).

El agente de tinción de la presente invención se pone en contacto con las células en condiciones que permiten la tinción fluorescente o la misma pre-tinción o satisfactoria. Ejemplos de tales condiciones incluyen, pero no se limitan a, condiciones de fijación; aclarados, secado al aire, incorporación en parafina y similares (véase la sección de ejemplos en el presente documento más adelante).

Las células teñidas de la presente invención pueden detectarse usando métodos de detección fluorescentes que son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en el presente documento más adelante.

Para acentuar la diferencia entre células de diferentes estados metabólicos o de diferenciación, las células se ponen en contacto con al menos un colorante.

Ejemplos de tales colorantes se proporcionan en la Tabla 1a y adicionalmente en el presente documento más adelante. Según una realización preferida el colorante ácido es Light Green y el colorante básico es New Fuchsin o Dahlia.

5

Tabla 1a

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Nombre	C.I. #	Clase	Nombre común
Acetil amarillo	13015	Nitro	Fast yellow
Ácido negro 1	20470	Azo	Amido Black 10
Ácido azul 22	42755	Triarilmetano	Water blue 1
Ácido azul 93	42780	Triarilmetano	Methyl blue
Ácido fucsina	42685	Triarilmetano	Acid fuchsin
Ácido verde	42095	Triarilmetano	Light green SF yellowish
Ácido verde 1	10020	Nitroso	Naphthol green B
Ácido verde 5	42095	Triarilmetano	Light green SF yellowish
Ácido magenta	42685	Triarilmetano	Acid fuchsin
Ácido naranja 10	16230	Azo	Orange G
Ácido rojo 4	14710	Azo	Azo-eosin
Ácido rojo 26	16150	Azo	Xylidine ponceau
Ácido rojo 29	16570	Azo	Chromotrope 2R
Ácido rojo 44	16250	Azo	Ponceau 6R
Ácido rojo 51	45430	Fluorona	Erythrosin B
Ácido rojo 66	26905	Azo	Biebrich scarlet
Ácido rojo 73	27290	Azo	Woodstain scarlet
Ácido rojo 87	45380	Fluorona	Eosin Y ws
Ácido rojo 91	45400	Fluorona	Eosin B
Ácido rojo 92	45410	Fluorona	Phloxine B
Ácido rojo 94	45440	Fluorona	Rose bengal
Ácido rojo 101	50085	Quinona-Imina	Azocarmine G
Ácido rojo 103	50090	Quinona-Imina	Azocarmine B
Ácido roseina	42685	Triarilmetano	Acid fuchsin
Ácido rubin	42685	Triarilmetano	Acid fuchsin
Ácido violeta 19	42685	Triarilmetano	Acid fuchsin
Ácido amarillo 1	10316	Nitro	Naphthol yellow S
Ácido amarillo 9	13015	Nitro	Fast yellow
Ácido amarillo 23	19140	Azo	Tartrazine
Ácido amarillo 24	10315	Nitro	Martius yellow
Ácido amarillo 36	13065	Azo	Metanil yellow
Ácido amarillo 73	45350	Fluorona	Fluorescein
Ácido amarillo S	10316	Nitro	Naphthol yellow S
Ácido amarillo T	19140	Azo	Tartrazine
Acridine naranja	46005	Acridina	Acridine orange
Acriflavina	46000	Acridina	Acriflavine
Alcian azul	74240	Phthalocianina	Alcian blue 8GX
Alcian amarillo	12840	Azo	Alcian yellow
Alcohol soluble eosin	45386	Fluorona	Ethyl eosin
Alizarin	58000	Antraquinona	Alizarin
Alizarin azul	67410	Antraquinona	Alizarin blue
Alizarin azul 2RC	58605	Antraquinona	Anthracene blue SWR
Alizarin carmin	58005	Antraquinona	Alizarin red S
Alizarin cyan BBS	58610	Antraquinona	Alizarin cyanin BBS

	Nombre	C.I. #	Clase	Nombre común
5	Alizarol cyan R	43820	Triarilmetano	Chromoxane cyanin R
	Alizarin rojo S	58005	Antraquinona	Alizarin red S
	Alizarin purpurin	58205	Antraquinona	Purpurin
	Aluminon	43810	Triarilmetano	Chrome violet CG
	Amido negro 10B	20470	Azo	Amido black 10B
10	Amidonaftol rojo	18050	Azo	Azophloxine
	Amido schwartz	20470	Azo	Amido black 10B
	Anilina azul WS	-	Triarilmetano	Aniline blue WS
	Anilina morada	-	Azin	Mauveine
15	Anthraceno azul SWR	58605	Antraquinona	Anthracene blue SWR
	Anthraceno azul SWX	58610	Antraquinona	Alizarin cyanin BBS
	Auramina O	41000	Diarilmetano	Auramine O
	Azo-eosin	14710	Azo	Azo-eosin
20	Azocarmin B	50090	Quinona-Imina	Azocarmine B
	Azocarmin G	50085	Quinona-Imina	Azocarmine B
	Azoeosin G	14710	Azo	Azo-eosin
	Diazo Azoico 5	37125	Sal de diazonio	Fast red B
25	Diazo Azoico 48	37235	Sal de diazonio	Fast blue B
	Azofloxina	18050	Azo	Azophloxine
	Azovan azul	23860	Azo	Evans blue
	Azur A	52005	Tiazin	Azure A
30	Azur B	52010	Tiazin	Azure B
	Azur C	52002	Tiazin	Azure C
	Básico azul 8	42563	Triarilmetano	Victoria blue 4R
35	Básico azul 9	52015	Tiazin	Methylene blue
	Básico azul 12	51180	Oxazin	Nile blue A
	Básico azul 15	44085	Triarilmetano	Night blue
	Básico azul 17	52040	Tiazin	Toluidine blue O
	Básico azul 20	42585	Triarilmetano	Methyl green
40	Básico azul 26	44045	Triarilmetano	Victoria blue B
	Básico marrón 1	21000	Azo	Bismarck brown Y
	Básico fucsina	-	Triarilmetano	Basic fuchsin
45	Básico verde 4	42000	Triarilmetano	Malachite green
	Básico verde 5	52020	Tiacina	Methylene green
	Básico naranja 14	46005	Acridine	Acridine orange
	Básico rojo 2	50240	Safranin	Safranin O
50	Básico rojo 5	50040	Eurhodin	Neutral red
	Básico rojo 9	42500	Triarilmetano	Pararosnilin
	Básico violeta 2	42520	Triarilmetano	New fuchsin
55	Básico violeta 3	42555	Triarilmetano	Crystal violet
	Básico violeta 4	42600	Triarilmetano	Ethyl violet
	Básico violeta 10	45170	Rhodamina	Rhodamine B
	Básico violeta 14	42510	Triarilmetano	Rosanilin
60	Básico amarillo 1	49005	Thiazole	Thioflavine T
	Básico amarillo 2	41000	Diarilmetano	Auramine O
	Biebrich escarlata	26905	Azo	Biebrich scarlet
65	Biebrich escarlata R	26105	Azo	Sudan IV

	Nombre	C.I. #	Clase	Nombre común
5	Bismarck marrón Y	21000	Azo	Bismarck brown Y
	Brasileína	75280	Natural	Brazilein
	Brasilina	75280	Natural	Brazilin
	Brillante croceína	27290	Azo	Woodstain scarlet
	Brillante cristal escarlata	16250	Azo	Ponceau 6R
10	Calcio rojo	60760	Antraquinona	Nuclear fast red
	Carmin	75470	Natural	Carmine
	Ácido Carminico	75470	Natural	Carmine
	Carmoisina 6R	16570	Azo	Chromotrope 2R
15	Celestin azul B	51050	Oxazin	Celestine blue B
	China azul	-	-	Aniline blue
	Clorantin rojo rápido 5B	28160	Azo	Sirius red 4B
	Cochineal	75470	Natural	Carmine
20	Coelestin azul	51050	Oxazin	Celestine blue B
	Chicago azul 4B	-	azo	Pontamine sky blue 5B
	Cromo violeta CG	43810	Triarilmetano	Chrome violet CG
	Cromotrope 2R	16570	Azo	Chromotrope 2R
25	Cromoxano cyan R	43820	Triarilmetano	Chromoxane cyanin R
	Congo corinth	22145	Azo	Congo corinth
	Congo rojo	22120	Azo	Congo red
	Algodón azul	42780	Triarilmetano	Methyl blue
30	Algodón rojo	22120	Azo	Congo red
	Croceína escarlata	26905	Azo	Biebrich scarlet
	Croceína escarlata 3B	27290	Azo	Woodstain scarlet
	Croceína escarlata MOO	27290	Azo	Woodstain scarlet
35	Crocin	75100	Natural	Saffron
	Cristal amapola 6R	16250	Azo	Ponceau 6R
	Cristal escarlata	16250	Azo	Ponceau 6R
	Cristal violeta	42555	Triarilmetano	Crystal violet
40	Dalia	42530	Triarilmetano	Hoffman's violet
	Diamante verde B	42000	Triarilmetano	Malachite green
	Directo azul 14	23850	Azo	Trypan blue
45	Directo azul 58	23860	Azo	Evans blue
	Directo rojo	22120	Azo	Congo red
	Directo rojo 10	22145	Azo	Congo corinth
	Directo rojo 28	22120	Azo	Congo red
50	Directo rojo 80	35780	Azo	Sirius red F3B
	Directo rojo 81	28160	Azo	Sirius red 4B
	Directo amarillo 7	49010	Tiazola	Thioflavine S
55	Durazol azul 4R	-	Azo	Durazol blue 4R
	Durazol azul 8G	-	Ftalocianino	Durazol blue 8G
	Esoina B	45400	Fluorona	Eosin B
	Esoina Azulada	45400	Fluorona	Eosin B
60	Esoina	45380	Fluorona	Eosin Y ws
	Esoina Y	45380	Fluorona	Eosin Y ws
	Esoina amarillenta	45380	Fluorona	Eosin Y ws
	Esoinaol	-	Fluorona	Eosinol
65	Erie garnet B	22145	Azo	Congo corinth

	Nombre	C.I. #	Clase	Nombre común
	Eriocromo cian R	43820	Triarilmetano	Chromoxane cyanin R
5	Eritrosin B	45430	Fluorona	Erythrosin B
	Etil Esoina	45386	Fluorona	Ethyl eosin
	Etil verde	42590	Triarilmetano	Ethyl green
	Etil violeta	42600	Triarilmetano	Ethyl violet
10	Evans azul	23860	Azo	Evans blue
	Veloz azul B	37235	Sal de diazonio	Fast blue B
	Veloz verde FCF	42053	Triarilmetano	Fast green FCF
	Veloz rojo B	37125	Sal de diazonio	Fast red B
15	Veloz amarillo	13015	Nitro	Fast yellow
	Veloz amarillo extra	13015	Nitro	Fast yellow
	Veloz amarillo G	13015	Nitro	Fast yellow
	Negro grueso HB	26150	Azo	Sudan black B
20	Fluoresceina	45350	Fluorona	Fluorescein
	Comida verde 3	42053	Triarilmetano	Fast green FCF
	Galleina	45445	Fluorona	Gallein
	Gallamina azul	51045	Oxazin	Gallamine blue
25	Gallocianina	51030	Oxazin	Gallocyanin
	Gentian violeta	-	Triarilmetano	Methyl violet 2B
	Haemateina	75290	Natural	Hematein
	Haematina	75290	Natural	Hematein
30	Haematoxilin	75290	Natural	Hematoxylin
	Helio Veloz rubin BBL	60760	Antraquinona	Nuclear fast red
	Helvetia azul	42780	Triarilmetano	Methyl blue
	Hemateina	75290	Natural	Hematein
35	Hematina	75290	Natural	Hematein
	Hematoxilin	75290	Natural	Hematoxylin
	Violeta de Hoffman	42530	Triarilmetano	Hoffman's violet
	Hidracina amarilla	19140	Azo	Tartrazine
40	Rojo Imperial	45400	Fluorona	Eosin B
	Ingrain azul 1	74240	Phthalocyanine	Alcian blue 8GX
	Ingrain amarillo 1	12840	Azo	Alcian yellow
45	INT	-	Sal de tetrazolio	Lodonitrotetrazolium
	Kermes	75460	Natural	Kermes
	Ácido Kermesico	75460	Natural	Kermes
	Kernechtrot	60760	Antraquinona	Nuclear fast red
50	Lac	75450	Natural	Laccaic acid
	Lacaico ácido	75450	Natural	Laccaic acid
	Violeta de Lauth	52000	Tiacin	Thionin
55	Verde claro	42095	Triarilmetano	Light green SF yellowish
	lissamina amarillo veloz	18965	Azo	Lissamine fast yellow
	Lissamina verde SF	42095	Triarilmetano	Light green SF yellowish
60	Luxol azul veloz	-	Ftalocianina	Luxol fast blue MBS
	Magenta 0	42500	Triarilmetano	Pararosanilin
	Magenta I	42510	Triarilmetano	Rosanilin
	Magenta II	-	Triarilmetano	Magenta II
65	Magenta III	42520	Triarilmetano	New fuchsin

	Nombre	C.I. #	Clase	Nombre común
	Malaquita verde	42000	Triarilmetano	Malachite Green
5	Manchester marrón	21000	Azo	Bismarck brown Y
	Martius amarillo	10315	Nitro	Martius yellow
	Mauve	-	Azin	Mauveine
	Mauveina	-	Azin	Mauveine
10	Merbromina	-	Fluorona	Mercurochrome 220
	Mercurocromo	-	Fluorona	Mercurochrome 220
	Metanil amarillo	13065	Azo	Metanil yellow
15	Metileno azur A	52005	Tiazin	Azure A
	Metileno azur B	52010	Tiazin	Azure B
	Metileno azur C	52002	Tiazin	Azure C
	Metileno azul	52015	Tiazin	Methylene blue
20	Metileno verde	52020	Tiazine	Methylene Green
	Metil azul	42780	Triarilmetano	Methyl blue
	Metil verde	42585	Triarilmetano	Methyl green
	Metil violeta	42535	Triarilmetano	Methyl violet 2B
25	Metil violeta 2B	42535	Triarilmetano	Methyl violet 2B
	Metil violeta 10B	42555	Triarilmetano	Crystal violet
	Molienda amarilla 3G	-	Azo	Milling yellow 3G
30	Mordaz azul 3	43820	Triarilmetano	Chromoxane cyanin R
	Mordaz azul 10	51030	Oxazin	Gallocyanin
	Mordaz azul 14	51050	Oxazin	Celestine blue B
	Mordaz azul 23	58610	Antraquinona	Alizarin cyanin BBS
35	Mordaz azul 32	58605	Antraquinona	Anthracene blue SWR
	Mordaz azul 45	51045	Oxazin	Gallamine blue
	Mordaz rojo 3	58005	Antraquinona	Alizarin red S
40	Mordaz rojo 11	58000	Antraquinona	Alizarin
	Mordaz violeta 25	45445	Fluorona	Gallein
	Mordaz violeta 39	43810	Triarilmetano	Chrome violet CG
45	Naftaleno azul negro	-	Azo	Naphalene blue black
	Naftol azul negro	20470	Azo	Amido black 10B
	Naftol verde B	10020	Nitroso	Naphthol green B
50	Naftol amarillo S	10316	Nitro	Naphthol yellow S
	Natural negro 1	75290	Natural	Hematein
	Natural rojo	58205	Antraquinona	Purpurin
	Natural rojo 3	75460	Natural	Kermes
55	Natural rojo 4	75470	Natural	Carmine
	Natural rojo 8	58205	Antraquinona	Purpurin
	Natural rojo 16	58205	Antraquinona	Purpurin
60	Natural rojo 24	75280	Natural	Brazilin
	Natural rojo 25	75450	Natural	Laccaic acid
	Natural rojo 28	-	Natural	Orcein
65	Natural amarillo 6	75100	Natural	Saffron
	NBT	-	Sal de tetrazolio	Nitro blue tetrazolium

	Nombre	C.I. #	Clase	Nombre común
	Neutral rojo	50040	Eurhodin	Neutral red
5	Nueva fucsina	42520	Triarilmetano	Newfuchsin
	Niagara azul 3B	23850	Azo	Trypan blue
	Noche azul	44085	Triarilmetano	Night blue
	Nilo azul	51180	Oxazin	Nile blue A
10	Nilo azul A	51180	Oxazin	Nile blue A
	Nilo azul sulfato	51180	Oxazin	Nile blue A
	Nilo rojo	-	Oxazone	Nile red
	Nitro BT	-	Sal de tetrazolio	Nitro blue tetrazolium
15	Nitro azul tetrazolio	-	Sal de tetrazolio	Nitro blue tetrazolium
	Nuclear veloz rojo	60760	Antraquinona	Nuclear fast red
	Aceite rojo O	26125	Azo	Oil red O
	Naranja G	16230	Azo	Orange G
20	Orceina	-	Natural	Orcein
	Pararosanilina	42500	Triarilmetano	Pararosanilin
	Violeta de Perkin	-	Azin	Mauveine
	Floxina B	45410	Fluorona	Phloxine B
25	Ácido Picrico	10305	Nitro	Picric acid
	Amapola 2R	16150	Azo	Xylidine ponceau
	Amapola 6R	16250	Azo	Ponceau 6R
	Amapola B	26905	Azo	Biebrich scarlet
30	Amapola de Xiloidina	16150	Azo	Xylidine ponceau
	Amapola S	27195	Azo	Ponceau S
	Pontamina cielo azul 5B	-	azo	Pontamine sky blue 5B
	Prímula	42530	Triarilmetano	Hoffman's violet
35	Primulina	49000	Tiazol	Primuline
	Purpurina	58205	Antraquinona	Purpurin
	Pironin B	45010	Pironina	Pyronin B
	Pironin G	45005	Pironina	Pyronin Y
40	Pironin Y	45005	Pironina	Pyronin Y
	Rodamina B	45170	Rodamina	Rhodamine B
	Rosanilina	42510	Triarilmetano	Rosanilin
45	Rosa bengala	45440	Fluorona	Rose bengal
	Saffron	75100	Natural	Saffron
	Safranin O	50240	Safranin	Safranin O
	Escarlata R	26105	Azo	Sudan IV
50	Escarlata rojo	26105	Azo	Sudan IV
	Escarlatina R	26105	Azo	Sudan IV
	Shellac	75450	Natural	Laccaic acid
55	Sirio rojo F3B	35780	Azo	Sirius red F3B
	Sirio rojo 4B	28160	Azo	Sirius red 4B
	Sirio supra Azul F3R	-	Azo	Durazol blue 4R
	Solocromo cianin R	43820	Triarilmetano	Chromoxane cyanin R
60	Soluble Azul	-	-	Aniline blue
	Solvente negro 3	26150	Azo	Sudan black B
	Solvente Azul 38	-	Ftalocianina	Luxol fast blue MBS
	Solvente rojo 23	26100	Azo	Sudan III
65	Solvente rojo 24	26105	Azo	Sudan IV

	Nombre	C.I. #	Clase	Nombre común
5	Solvente rojo 27	26125	Azo	Oil red O
	Solvente rojo 45	45386	Fluorona	Ethyl eosin
	Solvente amarillo 94	45350	Fluorona	Fluorescein
	Espiritu soluble eosina	45386	Fluorona	Ethyl eosin
10	Sudan III	26100	Azo	Sudan III
	Sudan IV	26105	Azo	Sudan IV
	Sudan negro B	26150	Azo	Sudan black B
	Sudan rojo BK	26100	Azo	Sudan III
15	Sulfuro amarillo S	10316	Nitro	Naphthol yellow S
	Suizo Azul	52015	Tiazin	Methylene blue
	Tartrazina	19140	Azo	Tartrazine
	Tioflavina S	49010	Tiazol	Thioflavine S
20	Tioflavina T	49005	Tiazol	Thioflavine T
	Tionin	52000	Tiazin	Thionin
	Toluidina Azul	52040	Tiazin	Toluidine blue O
	Toluilina rojo	50040	Eurodin	Neutral red
25	Tropaeolin G	13065	Azo	Metanil yellow
	Tripaflavina	46000	Acridina	Acriflavine
	Tripan Azul	23850	Azo	Trypan blue
	Uranina	45350	Fluorona	Fluorescein
30	Victoria Azul 4R	42563	Triarilmetano	Victoria blue 4R
	Victoria azul B	44045	Triarilmetano	Victoria blue B
	Victoria azul R	44040	Triarilmetano	Victoria blue R
	Victoria verde B	42000	Triarilmetano	Malachite green
35	Agua azul I	42755	Triarilmetano	Water blue I
	Agua soluble eosina	45380	Fluorona	Eosin Y ws
	Barniz Escarlata	27290	Azo	Woodstain scarlet
	Xilidina amapola	16150	Azo	Xylidine ponceau
40	Eosina amarillenta	45380	Fluorona	Eosin Y ws

Según una realización preferida, el colorante es un colorante básico o uno ácido, de forma que cuando:

- 45 (i) el al menos un colorante es un colorante ácido, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula diferenciada;
- (ii) el al menos un colorante es un colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula no diferenciada;
- 50 (iii) el al menos un colorante comprende el colorante ácido y el colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con el colorante ácido es indicativa de una célula diferenciada y una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con el colorante básico es indicativa de una célula no diferenciada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tinción por encima de una intensidad predeterminada" se refiere a al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 80%, 100% (es decir, dos veces), 3 veces, 5 veces o 10 veces o mayor intensidad de tinción en comparación con una célula de referencia. La célula de referencia puede ser una célula normalmente diferenciada, preferentemente del mismo tejido y espécimen que la célula probada sospechosa de un fenotipo sin diferenciar. Alternativamente, la célula de referencia es una célula no diferenciada (de estado metabólico alterado o fenotipo maligno/pre-maligno), cuando la célula probada es una célula de un fenotipo terminalmente diferenciado normal (preferentemente del mismo tejido y espécimen).

60 Para mejorar más la diferencia visual entre células de diferentes estados de diferenciación o metabólicos, se usan dos colorantes diferentes en secuencia (por ejemplo, un colorante ácido y un colorante básico). Así, por ejemplo, las células pueden teñirse primero con un colorante ácido (por ejemplo, verde) y posteriormente con un colorante básico (por ejemplo, rojo). En línea con la ejemplificación anterior, células normalmente diferenciadas se teñirán de verde (o en absoluto) mientras que células menos diferenciadas se teñirán de rojo. Otros colorantes se describen adicionalmente en el presente documento más adelante.

Las modalidades de detección por tinción se describen adicionalmente en el presente documento más adelante. Pueden efectuarse modalidades de tinción adicionales o análisis morfológicos en paralelo, ya que como se ha mencionado anteriormente en este documento, las presentes enseñanzas no comprometen la morfología de las células.

Así, es evidente que las presentes enseñanzas pueden usarse para identificar células de diferentes estados de diferenciación (o un estado de diferenciación de interés) en una muestra celular.

Así, según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de identificación de una célula de un estado de diferenciación de interés, comprendiendo el método: teñir la célula como se ha descrito anteriormente; y analizar la tinción, en el que cuando el al menos un colorante es un colorante ácido, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula diferenciada; el al menos un colorante es un colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula no diferenciada; el al menos un colorante comprende el colorante ácido y el colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con el colorante ácido es indicativa de una célula diferenciada y una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con el colorante básico es indicativa de una célula no diferenciada.

La metodología anteriormente descrita puede usarse en la clínica para diagnosticar (en el sentido muy amplio del término como se describirá adicionalmente en el presente documento más adelante) una variedad de afecciones médicas que están asociadas a células de estados de diferenciación alterados (es decir, tales células contribuyen a la aparición o son el resultado de la afección médica). Aunque lo siguiente trata principalmente enfermedades malignas, la presente invención puede usarse para diagnosticar o monitorizar el tratamiento de numerosas afecciones médicas como se detallará adicionalmente en el presente documento más adelante.

Así, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de diagnosticar un cáncer en un sujeto en necesidad del mismo.

Como se usa en el presente documento, el término “diagnosticar” se refiere a clasificar una patología (por ejemplo, un cáncer o una lesión pre-maligna) o un síntoma, determinar una gravedad de la patología (grado o etapa), monitorizar la progresión de la patología, predecir un desenlace de una patología y/o perspectivas de recuperación.

Como se usa en el presente documento, la expresión “sujeto en necesidad del mismo” se refiere a un animal o sujeto humano que está en riesgo de tener cáncer [por ejemplo, un sujeto genéticamente predispuesto, un sujeto con historia médica y/o familiar de cáncer, un sujeto que se ha expuesto a carcinógenos, riesgo ocupacional, riesgo ambiental] y/o un sujeto que presenta signos clínicos sospechosos de cáncer [por ejemplo, sangre en las heces o melena, dolor inexplicable, sudoración, fiebre inexplicable, pérdida de peso inexplicable hasta anorexia, cambios en los hábitos intestinales (estreñimiento y/o diarrea), tenesmo (sensación de defecación incompleta, para cáncer rectal específicamente), anemia y/o debilidad general]. Adicionalmente o alternativamente, el sujeto en necesidad del mismo puede ser un sujeto humano sano que se somete a un reconocimiento de bienestar rutinario.

El análisis de la presencia de células malignas o pre-malignas puede efectuarse *in vivo* o *ex vivo*, por lo que se recupera una muestra biológica (por ejemplo, biopsia). Tales muestras de biopsia comprenden células y pueden ser una biopsia incisional o escisional. Alternativamente, las células pueden recuperarse de una resección completa.

Se toman frecuentemente especímenes de biopsia de parte de una lesión cuando la causa de una enfermedad es incierta o su grado o carácter exacto está en duda. Los márgenes o límites de un espécimen de biopsia también deberán examinarse cuidadosamente para ver si la enfermedad puede haberse diseminado más allá de la biopsia del área. “Límites claros” o “límites negativos” significa que no se encontró enfermedad en los bordes del espécimen de biopsia. “Límites positivos” significa que se encontró enfermedad, y puede necesitarse tratamiento adicional. Los presentes inventores fueron capaces de demostrar la capacidad de las presentes enseñanzas para detectar los límites de un tumor de cerebro de rata (véase Ejemplo 4).

Aunque se emplean las presentes enseñanzas, puede deducirse información adicional referente a la determinación de la pauta de tratamiento, ciclo de tratamiento y/o a la medición de la gravedad de la enfermedad.

Así, según la presente divulgación, se proporciona un método de determinación de una pauta de tratamiento contra el cáncer en un sujeto en necesidad del mismo. Así, el método es muy apto para sujetos que son diagnosticados con cáncer, o puede aplicarse concomitantemente con diagnóstico. El método se efectúa analizando una presencia o nivel de células malignas o pre-malignas en una muestra de biopsia del sujeto según las enseñanzas de la presente invención; y administrando al sujeto una cantidad eficaz terapéutica de una terapia contra el cáncer según la presencia o nivel de células malignas en la muestra de biopsia del sujeto.

Como se usa en el presente documento, la expresión “pauta de tratamiento” se refiere a un plan de tratamiento que especifica el tipo de tratamiento, dosificación, programa y/o duración de un tratamiento proporcionado a un sujeto en

necesidad del mismo (por ejemplo, un sujeto diagnosticado con una patología). La pauta de tratamiento seleccionada puede ser una agresiva que se espera produzca el mejor desenlace clínico (por ejemplo, cura completa de la patología) o una más moderada, una que pueda aliviar los síntomas de la patología puede todavía producir la cura incompleta de la patología. Se apreciará que en ciertos casos la pauta de tratamiento puede asociarse a alguna molestia al sujeto o efectos secundarios adversos (por ejemplo, un daño a células sanas o tejido). El tipo de tratamiento puede incluir una intervención quirúrgica (por ejemplo, eliminación de lesión, células enfermas, tejido u órgano), una terapia de sustitución de células, una administración de un fármaco terapéutico (por ejemplo, agonistas de receptor, antagonistas, hormonas, agentes de quimioterapia) en un modo local o sistémico, una exposición a radioterapia usando una fuente externa (por ejemplo, haz externo) y/o una fuente interna (por ejemplo, braquiterapia) y/o cualquier combinación de los mismos. La dosificación, programa y duración del tratamiento puede variar, dependiendo de la gravedad, de la patología y el tipo seleccionado de tratamiento, y aquellos expertos en la materia son capaces de ajustar el tipo de tratamiento con la dosificación, programa y duración del tratamiento.

Ejemplos de terapia para el cáncer rutinariamente usadas incluyen, pero no se limitan a, radioterapia, quimioterapia (por ejemplo, CHOP, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, azatioprina, mercaptopurina, alcaloides de la vinca, etopósido, tenipósido, paclitaxel, docetaxel, irinotecan, topotecan, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido y dactinomycin), terapia con anticuerpos [por ejemplo, trastuzumab (Herceptin) y rituximab (Rituxan)] o una combinación de cualquiera de los anteriores.

Como se ha mencionado, las mismas enseñanzas descritas en el presente documento pueden usarse eficazmente para determinar un ciclo de tratamiento contra el cáncer en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método: administrar al sujeto una terapia contra el cáncer (tal como se ha descrito anteriormente); y analizar una presencia o nivel de células malignas o pre-malignas en una muestra de biopsia del sujeto tras la administración según el método anteriormente descrito, por lo que la presencia o nivel de dichas células malignas o pre-malignas es indicativa del ciclo de tratamiento.

Preferentemente, se obtienen varias muestras de biopsia tal como antes del tratamiento y tras el tratamiento (puede repetirse rutinariamente, tal como en cualquier ciclo de tratamiento). En este caso, el nivel de células malignas o pre-malignas se compara en las diferentes biopsias y una reducción en el nivel tras el tratamiento es indicativa de tratamiento (alivio y por último lugar cura).

Las presentes enseñanzas permiten identificar fenotipos celulares fácilmente. Esto puede emplearse para la identificación de agentes anticancerígenos que pueden usarse como cabezas de serie terapéuticas. De hecho, los presentes inventores han empleado las enseñanzas de la presente invención para el cribado de fármacos (Figuras 22A-D, Figuras 23A-C, Figuras 24A-C, Figuras 27A-B y Figura 28), establecimiento de sistemas celulares *in vitro* (Figuras 20A-C) y validación de dianas (Figuras 30A-B, Figuras 31A-D y Figuras 32A-D). Como se ilustra en el presente documento más adelante en la sección de ejemplos, la afectabilidad de los fármacos puede probarse en sistemas modelo, tales como para leucemia mieloide crónica (LMC) usando los métodos de tinción de la presente invención (Figuras 34A-C y Figuras 35A-B).

Así, según la presente divulgación, se proporciona un método de identificación de un agente capaz de invertir un fenotipo pre-maligno o maligno de una célula, comprendiendo el método someter la célula a un agente; y analizar un fenotipo maligno de la célula a partir de aquí según las presentes enseñanzas, en el que al menos una inversión parcial del fenotipo es indicativa de un agente capaz de invertir un fenotipo pre-maligno o maligno de la célula.

Como se usa en el presente documento, el término "maligno", también conocido como "canceroso", se refiere a la proliferación incontrolada de células que producen la formación de tumores con capacidad de invasión, también denominada metástasis.

Como se usa en el presente documento, el término "pre-maligna" se refiere a transformación celular que puede, pero no siempre, ser maligna, cancerosa. También se llama precancerosa (por ejemplo, lesión pre-maligna).

Como se usa en el presente documento, la expresión "invertir un fenotipo pre-maligno o maligno" se refiere a invertir al menos parcialmente las características proliferativas y/o invasivas de la célula pre-maligna o maligna.

Como se usa en el presente documento, el término "agente" se refiere a una molécula(s) o una condición capaz de invertir o invertir parcialmente el fenotipo celular maligno o pre-maligno.

Ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como agentes según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos, por ejemplo, polinucleótidos, ribozimas, ARNip y moléculas antisentido (incluyendo, sin limitación, ARN, ADN, híbridos de ARN/ADN, ácidos nucleicos peptídicos y análogos de polinucleótidos que tienen esqueleto alterado y/o estructuras bajas u otras modificaciones químicas); proteínas, polipéptidos (por ejemplo, péptidos, por ejemplo IFN-gamma, véanse las Figuras 37A-C y Figuras 38A-H), hidratos de carbono, lípidos y candidatos a fármaco de "molécula pequeña". "Moléculas pequeñas" pueden ser, por ejemplo, compuestos que existen de forma natural (por ejemplo, compuestos derivados de extractos de planta, caldos microbianos y similares)

o compuestos orgánicos u organometálicos sintéticos que tienen pesos moleculares inferiores a aproximadamente 10.000 daltons, preferentemente inferiores a aproximadamente 5.000 daltons, y lo más preferentemente inferiores a aproximadamente 1.500 daltons.

5 Ejemplos de condiciones adecuadas para su uso como agentes según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, condiciones de cultivo, tales como, por ejemplo, temperatura, humedad, presión atmosférica, concentraciones de gas, medios de crecimiento, superficies de contacto, exposición a radiación (tal como radiación gamma, radiación UV, radiación X) y la presencia o ausencia de otras células en un cultivo. Otra condición adecuada para su uso como agente según la presente invención incluye una infección por microorganismos invasores intracelulares tales como, pero no se limitan a: (i) bacterias intracelulares: *Mycobacterium*, *tuberculosis*,
10 *Mycobacterium leprae*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, (ii) hongos intracelulares: *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, (iii) parásitos intracelulares: *Leishmania sp.*, (iv) virus intracelulares: virus del herpes simple, viruela, virus del sarampión, retrovirus.

15 Células que pueden utilizarse incluyen líneas celulares, cultivos primarios, cultivo celular permanente, cultivos o tejidos organotípicos en los que las células no son células embrionarias humanas. Ejemplos de células cancerosas se proporcionan en la sección de ejemplos que sigue.

20 Como se ha mencionado anteriormente en este documento, la inversión del fenotipo se detecta según las presentes enseñanzas. Por ejemplo, la célula ya no se teñirá de rojo tras la exposición al agente inversor.

Para confirmación adicional de la inversión del fenotipo anormal, las células se examinan microscópicamente para cambios específicos, tales como, por ejemplo, cambios fisiológicos que incluyen apoptosis, pérdida de uniones, alargamiento o redondeo, etc.

25 Aunque el presente método puede, en teoría, ponerse en práctica con una célula individual, un método tal no es eficaz ni es deseable. Preferentemente, el presente método se usa para el cribado de alto rendimiento de agentes usando una pluralidad de células para cribar simultáneamente una variedad de agentes.

30 En un enfoque de cribado de rendimiento a gran escala tal, el agente puede ser parte de una biblioteca, tal como una biblioteca de expresión que incluye una pluralidad de construcciones de expresión que tienen cada una (i) un polinucleótido que codifica uno de una pluralidad de polipéptidos que se prueba para una capacidad para invertir un fenotipo anormal (un agente), y (ii) al menos un elemento regulador que actúa en cis para dirigir la expresión de los polipéptidos de la construcción de expresión.

35 Alternativamente, también pueden utilizarse bibliotecas químicas disponibles, por ejemplo, de empresas químicas que incluyen Merck, Glaxo, Novartis y Bristol Meyers Squib para el cribado. Opcionalmente, también pueden utilizarse por la presente invención bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, de planta y animal, que están disponibles de, por ejemplo, Pan Laboratories o Mycosearch o son fácilmente producibles por métodos conocidos en la técnica.

40 Cuando se realiza el cribado a gran escala, la población de células que está sometida a agentes individuales puede compartimentalizarse de manera que se facilite la identificación de la inversión del fenotipo anormal. Esto puede efectuarse separando en alícuotas la población de células en placas de multipocillos de fondo de vidrio planas a una densidad pre-calibrada que permite el crecimiento de solo uno o dos clones por pocillo.

45 En la etapa de cribado puede seguirse un procedimiento manual, aunque se prefiere el cribado automatizado usando robots, tales como unión a múltiples pocillos para el microscopio DeltaVision, microscopio automatizado Cellomics.

50 Una vez identificados, se recuperan agentes capaces de al menos invertir parcialmente un fenotipo celular anormal. Si el agente es un polinucleótido o un producto de expresión de polinucleótido, se aíslan células y se propagan y se usan para aislar los agentes de polinucleótido, por, por ejemplo, amplificación por PCR, como se trata anteriormente.

55 Los agentes recuperados se analizan adicionalmente para su mecanismo de acción exacto y se ajustan para el efecto óptimo usando diversos métodos bioquímicos y de biología celular. Eventualmente, el distinguir cuál del agente aislado es un posible compuesto cabeza de serie puede llevarse a cabo probando el efecto del agente en modelos farmacológicos de diversas enfermedades. Los agentes que afectan la progresión de la enfermedad o aparición constituyen cabezas de serie para el desarrollo de fármacos.

60 Tales agentes pueden aplicarse para el tratamiento de muchos estados patológicos tales como cáncer y trastornos metabólicos tales como, diabetes y obesidad.

65 Lo siguiente proporciona descripción adicional de las presentes enseñanzas. Así, la presente divulgación proporciona un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y no maligna produciendo tinción diferencial de la célula maligna y no maligna, o por tener fluorescencia diferencial en la célula maligna y no maligna. El compuesto es adicionalmente capaz de distinguir entre una célula metabólicamente alterada y una célula

metabólicamente normal produciendo tinción diferencial de la célula metabólicamente alterada y la célula metabólicamente normal, o teniendo fluorescencia diferencial en la célula metabólicamente alterada y la célula metabólicamente normal. La presente divulgación proporciona además composiciones y kits que comprenden el compuesto, y métodos de uso del compuesto para a) identificar un agente que afecta el fenotipo de una célula maligna, una célula no maligna, una célula metabólicamente alterada o una célula metabólicamente normal, en el que la célula no es una célula embrionaria humana; b) determinar si la expresión de un oncogén en una célula no maligna afecta el fenotipo no maligno de la célula; c) determinar si alterar la expresión o función de un gen supresor de tumores en una célula afecta el fenotipo de la célula; d) detectar la presencia de una célula maligna y/o una célula que tiene un trastorno metabólico en una muestra; e) diagnosticar una afección o enfermedad en un sujeto, en el que la afección o enfermedad es un trastorno metabólico o una afección caracterizada por la presencia de al menos una célula maligna; f) monitorizar la progresión de una afección o enfermedad en un sujeto, en el que la afección o enfermedad es un trastorno metabólico o una afección caracterizada por la presencia de al menos una célula maligna; g) monitorizar y/o regular una pauta de terapia para un sujeto que recibe terapia para un trastorno metabólico o una afección o enfermedad caracterizada por la presencia de al menos una célula maligna; h) obtener imágenes *in vivo* para detectar la presencia de al menos una célula maligna en un sujeto; i) identificar un agente que induce diferenciación de células neuronales o de citoblastos (citoblastos embrionarios y adultos); y j) identificar un agente que histoprotege contra el daño de órganos/tejidos. Los métodos de la presente invención pueden adaptarse a y realizarse usando medios para alta producción, proporcionando así herramientas eficaces y fiables para el descubrimiento de fármacos, validación de dianas, diagnóstico, monitorización de la farmacoterapia y monitorización del progreso de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "tinción diferencial" se refiere a una tinción que puede diferenciar entre el fenotipo de dos poblaciones de células, por ejemplo, entre el fenotipo de una célula maligna con respecto al fenotipo de una célula no maligna, o el fenotipo de una célula enferma frente a una sana, por ejemplo, el fenotipo de una célula metabólicamente alterada y una célula metabólicamente normal. Como se usa en el presente documento, el término "fluorescencia diferencial" se refiere a una fluorescencia que puede diferenciar entre el fenotipo de dos poblaciones de células, por ejemplo, entre el fenotipo de una célula maligna con respecto al fenotipo de una célula no maligna o el fenotipo de una célula enferma frente a una sana, por ejemplo, el fenotipo de una célula metabólicamente alterada y una célula metabólicamente normal.

La composición que comprende el compuesto es un extracto de planta. En otra realización, la composición es un extracto de planta en bruto. En otra realización, la composición es un extracto de planta purificado.

En otra realización, el compuesto se extrae de una planta. En otra realización, la planta es *Ficus elastica*. En otra realización más, el compuesto es un compuesto sintético, que puede sintetizarse por síntesis total o parcial. En otra realización, el compuesto se caracteriza por los espectros de RMN como se detallan en las Figuras 43-44. En otra realización, el compuesto es fluorescente. En otra realización, el compuesto emite fluorescencia a 430 nm tras la excitación a 375 nm. En otra realización, el compuesto inhibe la tinción de una célula maligna o una célula no maligna.

En una realización, el agente es un agente físico. En otra realización, el agente es un agente químico. En otra realización, el agente es un agente biológico. En otra realización, el agente es un gen. En otra realización, el agente es un gen supresor de tumores. En otra realización, el agente es un oncogén. En otra realización, el agente es cualquier combinación de un agente físico, un agente químico, un agente biológico, un gen, un gen supresor de tumores o un oncogén.

Además, en una realización, la presente divulgación proporciona un método para identificar una composición que comprende un compuesto capaz de inhibir la tinción de una célula, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende al menos una célula, poner en contacto la muestra con la composición en presencia de un colorante y detectar la inhibición de la tinción de la célula por el colorante en función de la concentración de la composición; identificando así la composición. En una realización, el método comprende además la etapa de purificar la composición para obtener el compuesto.

Como se define en el presente documento, "poner en contacto" significa que el compuesto, composición, colorante o agente que afecta un fenotipo celular se introduce en una muestra que comprende al menos una célula en un tubo de ensayo, matraz, cultivo de tejido, chip, matriz, placa, microplaca, capilar o similares, y se incuban a una temperatura y tiempo suficiente para permitir el efecto deseado, tal como teñir la célula, inhibir la tinción de una célula con un colorante, conversión de un fenotipo maligno en un fenotipo no maligno, conversión de un fenotipo no maligno en un fenotipo maligno, y similares. Métodos para poner en contacto las muestras con los compuestos, composiciones, colorantes o agentes son conocidos para aquellos expertos en la materia y pueden seleccionarse dependiendo del tipo de protocolo de ensayo que va a ejecutarse. Los métodos de incubación también son estándar y son conocidos para aquellos expertos en la materia.

El término "obtener", como se usa en el presente documento, se refiere indistintamente a proporcionar, obtener, procurar o suministrar muestra o espécimen con el fin de someter una muestra biológica contenida en su interior a una o más de las realizaciones del método de tinción de la presente invención.

El término “detectar”, como se usa en el presente documento, se refiere al acto de detectar, percibir, descubrir, exponer, visualizar o identificar una célula.

- 5 El término “muestra”, como se cita en el presente documento, engloba, pero no se limita a, una muestra biológica, por ejemplo, cualquier tejido, tejido que comprende célula, línea celular, cultivo celular, un cultivo celular primario, que se produce de o se deriva de un organismo, y procesos para formar un espécimen adecuado para la tinción de células.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término “colorante” se refiere a cualquier sustancia que confiere color a un tejido biológico, animal, planta, o de otro modo, y que es útil para visualización citológica o histológica de tejido, células, o las partes que las comprenden. Los colorantes que se han encontrado que son de utilidad inmediata con el fin de implementar la presente invención se desvelan en el presente documento, aunque otros colorantes no descritos en el presente documento también pueden ser útiles para este fin. Así, aunque la descripción de la
- 15 presente invención proporciona colorantes que manifiestan color en el intervalo visible del espectro, puede concebirse fácilmente que, mediante el uso de filtros apropiados, iluminaciones, configuraciones, o medios para la detección, los colorantes que son invisibles para dirigir la observación pueden demostrar ser equivalentes a los colorantes visibles descritos en el presente documento para implementar la presente invención.
- 20 En una realización, el colorante es un colorante ácido. En otra realización, el colorante es un colorante básico. En otra realización, el colorante es un derivado de triaminotrifetilmetano. En otra realización, el colorante es un derivado de diazo. En otra realización, el colorante es cualquier combinación de un colorante ácido, un colorante básico, un derivado de triaminotrifetilmetano, un derivado de diazo.
- 25 En otra realización, el colorante es hematoxilina Gill, Azure, A, Eosin Yellow, floxina, Light Green, New Fuchsin, Dahlia, Basic Fuchsin, violeta de metilo, violeta de genciano, violeta de metilo 6b, cristal violeta, pararosanilina, rosanilina, Magenta I, isorubina, Fuchsin NB, FIAT-764, púrpura de Spiller, marrón de Bismark R, marrón de Bismark Y, conjugado de marrón de Bismark-eosina, conjugado de marrón de Bismark-floxina, Phoenix Brown A, o cualquier combinación de los mismos.
- 30 En una realización, el colorante es un colorante rojo. Como se usa en el presente documento, el término “rojo” se refiere no solo al color rojo, sino también a sombras y tonalidades relacionadas tales como violeta, rosa o rosáceo, púrpura o purpuráceo, o magenta. En una realización, el colorante rojo es New Fuchsin.
- 35 En una realización, el colorante es un colorante verde. Como se usa en el presente documento, el término “verde” se refiere no solo al color verde, sino también a sombras y tonalidades relacionadas tales como verde claro, verde oscuro, esmeralda, oliva y lima. En una realización, el colorante verde es el colorante Light Green.
- 40 La concentración del colorante se determinará empíricamente basándose en la necesidad del ensayo. Una concentración adecuada de un colorante es una que permite la detección de la tinción de la célula con el colorante, usando cualquiera de los métodos de detección que se describen en el presente documento.
- 45 En una realización, la composición que comprende el compuesto capaz de inhibir la tinción de una célula es un extracto de planta. En otra realización, la composición es un extracto de planta en bruto. En otra realización, la composición es un extracto de planta purificado. En otra realización, el compuesto que es capaz de inhibir la tinción de una célula se extrae de una planta. En otra realización, la planta es *Ficus elastica*. En otra realización más, el compuesto es un compuesto sintético. En otra realización, el compuesto se caracteriza por un espectro de RMN como se detalla en las Figuras 43-44. En otra realización, el compuesto es fluorescente. En otra realización, el compuesto emite fluorescencia a 430 nm tras la excitación a 375 nm. En otra realización, el compuesto tiene una
- 50 fórmula molecular $C_{23}H_{44}O_4$. Además, en una realización, la presente invención proporciona un método de tinción citohistológica para identificar un agente que afecta el fenotipo de una célula maligna o una no maligna, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una célula, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, poner en contacto la segunda fracción con un agente de prueba, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con un compuesto
- 55 capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna produciendo tinción diferencial de la célula maligna y la célula no maligna como se describe anteriormente en este documento, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con al menos un primer colorante y un segundo colorante, detectar la tinción de la primera fracción con el primer colorante y el segundo colorante, detectar la tinción de la segunda fracción con el primer colorante y el segundo colorante, y comparar la tinción de la primera fracción y la segunda fracción,
- 60 identificando así el agente que afecta un fenotipo maligno o no maligno. En otra realización, el método está adaptado para identificar una combinación de agentes que afectan un fenotipo de célula maligna o no maligna.
- En una realización, una célula que tiene un fenotipo maligno se tiñe sustancialmente con un colorante, y una célula que tiene un fenotipo no maligno se tiñe sustancialmente con un segundo colorante, que es diferente del primer colorante. Como se usa en el presente documento, el término “se tiñe sustancialmente” significa que la célula se tiñe con un colorante particular a un mayor grado que la tinción con el otro colorante. En una realización, una célula que
- 65

tiene un fenotipo maligno se tiñe sustancialmente con un colorante rojo. En otra realización, una célula que tiene un fenotipo no maligno se tiñe sustancialmente con un colorante verde.

En otra realización, una célula que tiene un fenotipo maligno se tiñe sustancialmente con un colorante, y una célula que tiene un fenotipo no maligno se tiñe diferencialmente con el mismo colorante. Por ejemplo, la célula que tiene un fenotipo maligno se tiñe sustancialmente con un colorante, y una célula que tiene un fenotipo no maligno se tiñe menos intensamente con el mismo colorante.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para identificar un agente que afecta el fenotipo de una célula maligna y no maligna, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una célula, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, poner en contacto la segunda fracción con el agente, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna por tener fluorescencia diferencial en la célula maligna y no maligna, detectar la fluorescencia de la primera fracción y la segunda fracción, y comparar la fluorescencia de la primera fracción y la segunda fracción, identificando así el agente que afecta un fenotipo maligno o no maligno. En una realización, el método se repite usando diferentes concentraciones del agente. En una realización, el compuesto fluorescente es el compuesto sintético o el compuesto extraído de una planta, caracterizado por un espectro de RMN como se detalla en las Figuras 43-44, o que tiene la fórmula molecular $C_{23}H_{44}O_4$, como se ha descrito anteriormente en este documento. En otra realización, el compuesto emite fluorescencia a 430 nm tras la excitación a 375 nm. En otra realización, el método se usa para identificar una combinación de agentes que afectan un fenotipo de célula maligna o no maligna.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método de tinción citohistológica para identificar un agente que afecta el fenotipo de una célula metabólicamente alterada o una célula metabólicamente normal, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, poner en contacto la segunda fracción con el agente, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con un compuesto capaz de distinguir entre la célula metabólicamente alterada y la célula metabólicamente normal produciendo tinción diferencial de la célula metabólicamente alterada y la metabólicamente normal, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con al menos un colorante, detectar la tinción de la primera fracción con el colorante; detectar la tinción de la segunda fracción con el colorante, y comparar la tinción de la primera fracción y dicha segunda fracción, identificando así el agente que afecta el fenotipo de la célula metabólicamente alterada o la célula metabólicamente normal.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para identificar un agente que afecta el fenotipo de una célula metabólicamente alterada o una célula metabólicamente normal, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una célula, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, poner en contacto la segunda fracción con el agente, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con un compuesto capaz de distinguir entre la célula metabólicamente alterada y la célula metabólicamente normal por tener fluorescencia diferencial en la célula metabólicamente alterada y la célula metabólicamente normal, detectar la fluorescencia de la primera fracción y la segunda fracción, y comparar la fluorescencia de la primera fracción y la segunda fracción, identificando así el agente que afecta el fenotipo de la célula metabólicamente alterada o la célula metabólicamente normal.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método de tinción citohistológica para determinar si la expresión de un oncogén en una célula no maligna afecta el fenotipo no maligno de la célula, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una célula no maligna, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, que expresa un oncogén en la segunda fracción, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna produciendo tinción diferencial de la célula maligna y la célula no maligna como se ha descrito anteriormente en este documento, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con al menos un primer colorante y un segundo colorante, detectar la tinción de la primera fracción con el primer colorante y el segundo colorante, detectar la tinción de la segunda fracción con el primer colorante y el segundo colorante, y comparar la tinción de la primera fracción y la segunda fracción, determinándose así si la expresión del oncogén en la célula no maligna afecta el fenotipo no maligno de la célula.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para determinar si la expresión de un oncogén en una célula no maligna afecta el fenotipo no maligno de la célula, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una célula no maligna, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, que expresa un oncogén en la segunda fracción, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna por tener fluorescencia diferencial en la célula maligna y no maligna, detectar la fluorescencia de la primera fracción y la segunda fracción, y comparar la fluorescencia de la primera fracción y la segunda fracción, determinándose así si la expresión del oncogén en la célula no maligna afecta el fenotipo no maligno de la célula.

Como se usa en el presente documento, el término "oncogén", usado en el presente documento indistintamente con

un gen "promotor de tumores", tiene su significado comúnmente entendido en la materia, es decir, es un gen cuya expresión se correlaciona con el desarrollo de tumor.

En una realización, el oncogén promueve la conversión de la célula no maligna en una célula que tiene un fenotipo maligno. En otra realización, el oncogén se expresa en la célula transfectando químicamente, biológicamente, viralmente o bacterianamente el oncogén en la célula.

Además, en otra realización, la presente invención proporciona un método de tinción citohistológica para determinar si alterar la expresión o función de un gen supresor de tumores en una célula afecta el fenotipo de la célula, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una célula, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra; alterar la expresión o función de un gen supresor de tumores en la segunda fracción; poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna produciendo tinción diferencial de la célula maligna y la célula no maligna como se ha descrito anteriormente en este documento, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con al menos un primer colorante y un segundo colorante, detectar la tinción de la primera fracción con el primer colorante y el segundo colorante, detectar la tinción de la segunda fracción con el primer colorante y el segundo colorante; y comparar la tinción de la primera fracción y la segunda fracción, determinándose así si alterar la expresión o función del gen supresor de tumores en la célula afecta el fenotipo de la célula.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para determinar si alterar la expresión o función de un gen supresor de tumores en una célula afecta el fenotipo de la célula, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una célula, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, alterar la expresión o función de un gen supresor de tumores en la segunda fracción, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna por tener fluorescencia diferencial en la célula maligna y no maligna, detectar la fluorescencia de la primera fracción y la segunda fracción, y comparar la fluorescencia de la primera fracción y la segunda fracción, determinándose así si alterar la expresión o función del gen supresor de tumores en la célula afecta el fenotipo de la célula.

Como se usa en el presente documento, el término "gen supresor de tumores" tiene su significado comúnmente entendido en la materia, es decir, un gen cuya expresión y función normal se correlaciona con la actividad supresora de tumores.

En una realización, la célula es una célula maligna. En otra realización, alterar la expresión o modificar la función aberrante o anormal del gen supresor de tumores comprende potenciar la expresión/función del gen supresor de tumores en la célula maligna. En otra realización, potenciar la expresión del gen supresor de tumores comprende transfectar químicamente, biológicamente, viralmente o bacterianamente el gen supresor de tumores en la célula. En otra realización, normalizar la función del gen supresor de tumores comprende expresar químicamente, biológicamente, viralmente o bacterianamente la función normal del gen supresor de tumores en la célula. En otra realización, potenciar la expresión o normalizar la función del gen supresor de tumores promueve la conversión de la célula maligna en una célula que tiene un fenotipo no maligno. El término "aberrante", como se usa en el presente documento, se refiere a una función que es anormal, poco usual, desviada, irregular o atípica.

En una realización, la célula es una célula no maligna. En otra realización, alterar la expresión/función del gen supresor de tumores comprende el silenciamiento funcional del gen supresor de tumores en la célula no maligna. En otra realización, el silenciamiento funcional del gen supresor de tumores promueve la conversión de la célula no maligna en una célula que tiene un fenotipo maligno.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método de tinción citohistológica para detectar la presencia de una célula maligna en una muestra, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende al menos una célula, poner en contacto la muestra con un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna produciendo tinción diferencial de la célula maligna y la célula no maligna como se ha descrito anteriormente en este documento, poner en contacto la muestra con al menos un primer colorante y un segundo colorante, y detectar la tinción de la muestra con el primer y segundo colorante, detectándose así la presencia de una célula maligna en la muestra.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para detectar la presencia de una célula maligna en una muestra, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende al menos una célula, poner en contacto la muestra con un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna por tener fluorescencia diferencial en la célula maligna y no maligna, y detectar la fluorescencia de la muestra, detectándose así la presencia de una célula maligna en la muestra.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para detectar la presencia de una célula metabólicamente alterada en una muestra, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende al menos una célula, poner en contacto la muestra con un compuesto un compuesto capaz de distinguir

entre la célula metabólicamente alterada y la célula metabólicamente normal produciendo tinción diferencial de la célula metabólicamente alterada y la metabólicamente normal, poner en contacto la muestra con al menos un colorante, y detectar la tinción de la muestra con el colorante, detectándose así la presencia de la célula metabólicamente alterada en la muestra. Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para detectar la presencia de una célula metabólicamente alterada en una muestra, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende al menos una célula, poner en contacto la muestra con un compuesto capaz de distinguir entre la célula metabólicamente alterada y una célula metabólicamente normal que tiene fluorescencia diferencial en la célula metabólicamente alterada y la célula metabólicamente normal, y detectar la fluorescencia de la muestra, detectándose así la presencia de la célula metabólicamente alterada en la muestra.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para diagnosticar una afección o enfermedad en un sujeto, en el que la afección o enfermedad se caracteriza por la presencia de al menos una célula maligna, comprendiendo el método la etapa de detectar al menos una célula maligna en una muestra obtenida del sujeto usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento para detectar la presencia de una célula maligna en una muestra, en el que la presencia de al menos una célula maligna en la muestra es indicativa del sujeto que tiene la afección o enfermedad. En una realización, la afección o enfermedad es un cáncer o una afección o enfermedad pre-cancerosa.

Además, en una realización, la presente divulgación proporciona un método para diagnosticar un trastorno metabólico en un sujeto, comprendiendo el método la etapa de detectar al menos una célula que tiene un trastorno metabólico en una muestra obtenida del sujeto usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento para detectar la presencia de una célula que tiene un trastorno metabólico en una muestra, en el que la presencia de al menos una 20 célula que tiene un trastorno metabólico en la muestra es indicativa del sujeto que tiene el trastorno metabólico.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para monitorizar la progresión de una afección o enfermedad en un sujeto, en el que la afección o enfermedad se caracteriza por la presencia de al menos una célula maligna, comprendiendo el método las etapas de obtener una primera muestra del sujeto, determinar la presencia y/o número de células malignas en la primera muestra usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento para detectar la presencia de una célula maligna en una muestra, obtener una segunda muestra del sujeto después de un periodo de tiempo, detectar la presencia y/o número de células malignas en la segunda muestra usando el método descrito anteriormente en este documento para detectar la presencia de una célula maligna en una muestra, y comparar la presencia y/o número de células malignas en la primera muestra y la segunda muestra, monitorizándose así la progresión de la afección o enfermedad en el sujeto. En una realización, la afección o enfermedad es un cáncer o una afección o enfermedad pre-cancerosa.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para monitorizar la progresión de un trastorno metabólico en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de obtener una primera muestra del sujeto, determinar la presencia y/o número de células que tienen el trastorno metabólico en dicha primera muestra usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento para detectar la presencia de una célula que tiene un trastorno metabólico en una muestra, obtener una segunda muestra del sujeto después de un periodo de tiempo, detectar la presencia y/o número de células que tienen el trastorno metabólico en la segunda muestra usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento para detectar la presencia de una célula que tiene un trastorno metabólico en una muestra, y comparar la presencia y/o número de células que tienen el trastorno metabólico en la primera muestra y la segunda muestra, monitorizándose así la progresión de la afección o enfermedad metabólica en el sujeto.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para monitorizar una pauta de terapia para un sujeto que recibe terapia para afección o enfermedad, caracterizado por la presencia de al menos una célula maligna, comprendiendo el método las etapas de obtener una primera muestra del sujeto antes del inicio de la pauta de tratamiento, determinar la presencia y/o número de células malignas en la primera muestra usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento para detectar la presencia de una célula maligna en una muestra, iniciar la pauta de terapia, obtener una segunda muestra del sujeto después de un periodo de tiempo, determinar la presencia y/o número de células malignas en la segunda muestra usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento para detectar la presencia de una célula maligna en una muestra, y comparar la presencia y/o número de células malignas en la primera muestra y la segunda muestra, monitorizándose así la pauta de terapia para el sujeto. En una realización, la afección o enfermedad es un cáncer o una afección o enfermedad pre-cancerosa.

Además, en una realización, la presente divulgación proporciona un método para monitorizar una pauta de terapia para un sujeto que recibe terapia para un trastorno metabólico, dicho método comprende las etapas de obtener una primera muestra del sujeto antes del inicio de la pauta de tratamiento, determinar la presencia y/o número de células que tienen el trastorno metabólico en la primera muestra usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento para detectar la presencia de una célula que tiene un trastorno metabólico en una muestra, iniciar la pauta de terapia, obtener una segunda muestra del sujeto después de un periodo de tiempo, determinar la presencia y/o número de células que tienen el trastorno metabólico en la segunda muestra usando cualquiera de los

métodos descritos anteriormente en este documento para detectar la presencia de una célula que tiene un trastorno metabólico en una muestra, monitorizándose así la pauta de terapia para el sujeto.

En una realización, los métodos de monitorizar la pauta de terapia comprenden además la etapa de regular la pauta de terapia regulando una cantidad de dosificación, un programa de dosificación, o una combinación de los mismos, de la pauta de terapia. En una realización, la pauta de terapia comprende radioterapia. En otra realización, la pauta de terapia comprende quimioterapia. En otra realización, la pauta de terapia comprende inmunoterapia. En otra realización, la pauta de terapia comprende terapia viral. En otra realización, la pauta de terapia comprende cualquier combinación de radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y terapia viral. En otra realización, la pauta de terapia comprende tratamiento con un compuesto químico, un compuesto natural, un sintético compuesto, un monómero, polímero, una proteína, una glicoproteína, un lípido, un hidrato de carbono, un ácido graso, un ácido nucleico, un anticuerpo, un virus, un prión, una biblioteca combinatoria de compuestos sintéticos, una biblioteca genómica, un ácido nucleico, una biblioteca de ácidos nucleicos, una proteína, una biblioteca de proteínas, un extracto natural, un extracto de planta, un extracto animal, o una mezcla de los mismos.

En una realización, la etapa de detección de la tinción usada en los métodos descritos anteriormente en este documento comprende determinar la relación de la tinción con el primer colorante con respecto al segundo colorante en la primera fracción y en la segunda fracción. En otra realización, la etapa de detección de la tinción usada en los métodos descritos anteriormente en este documento comprende además determinar el número total de células en la muestra detectando la tinción de la muestra con el primer colorante, detectar la tinción de la muestra con el segundo colorante y sumar la tinción de la muestra con el primer colorante y el segundo colorante.

En otra realización, la etapa de detección de la tinción usada en cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento comprende detectar la absorción del primer colorante o el segundo colorante. En otra realización, la etapa de detección de la tinción comprende detectar la intensidad de color del primer colorante y el segundo colorante. En otra realización, la etapa de detección de la tinción comprende detectar el patrón de color del primer colorante y el segundo colorante. En otra realización, la etapa de detección de la tinción comprende detectar la distribución de color del primer colorante y el segundo colorante. En otra realización, la etapa de detección de la tinción comprende detectar la concentración de color del primer colorante y el segundo colorante. En otra realización, la etapa de detección de la tinción comprende cualquier combinación de los métodos de detección descritos anteriormente en este documento.

En una realización, los métodos de la presente invención comprenden además la etapa de fijar las células. En otra realización, los métodos comprenden además la etapa de fijar al aire las células.

En una realización, los métodos se repiten usando diferentes concentraciones del agente, el oncogén, el gen supresor de tumores y similares.

En una realización, los métodos de la presente invención están adaptado para y se realizan usando medios de alta producción. En otra realización, los medios comprenden un dispositivo de muestreo automatizado, un equipo de manipulación de líquidos, un teñidos automatizado, un dispensador, un robot, o cualquier combinación de los mismos.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un kit para detectar la presencia de una célula maligna en una muestra, comprendiendo el kit un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna produciendo tinción diferencial de la célula maligna y la célula no maligna, o por tener fluorescencia diferencial en la célula maligna y la célula no maligna como se ha descrito anteriormente en este documento, y un miembro para contener una muestra.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un kit para detectar la presencia de una célula metabólicamente alterada en una muestra, comprendiendo el kit un compuesto capaz de distinguir entre una célula metabólicamente alterada y una célula metabólicamente normal produciendo tinción diferencial de la célula metabólicamente alterada y la célula metabólicamente normal, o por tener fluorescencia diferencial en la célula metabólicamente alterada y la célula metabólicamente normal como se ha descrito anteriormente en este documento, y un miembro para contener una muestra.

En una realización, el miembro está seleccionado del grupo que consiste en portaobjetos, portaobjetos de microscopio, matrices de pocillos, bandejas de ensayo de placas de microtitulación, recipientes transparentes, cubreobjetos, filtros, membranas, tubos, o una combinación de los mismos.

En otra realización, el kit comprende además al menos un primer colorante y un segundo colorante. El colorante puede ser cualquiera de los colorantes descritos anteriormente en este documento, por ejemplo, un colorante ácido, un colorante básico, un derivado de triaminotriifenilmetano, un derivado de diazo, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el kit comprende además al menos un fijador. En otra realización, el kit comprende además un tampón, un agente quelante, un conservante, o cualquier combinación de los mismos.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método de identificar la concentración de trabajo óptima de una composición que comprende un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna produciendo tinción diferencial de la célula maligna y la célula no maligna como se ha descrito anteriormente en este documento, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una célula que tiene un fenotipo maligno, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, poner en contacto la segunda fracción con un agente que promueve la conversión del fenotipo maligno en un fenotipo no maligno, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con una o más concentraciones de la composición, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con al menos un primer colorante y un segundo colorante, detectar la tinción de la primera fracción y la segunda fracción con el primer colorante y el segundo colorante, medir la relación R_1 que indica tinción con el primer colorante con respecto al segundo colorante en la primera fracción a cada concentración de la composición; medir la relación R_2 que indica tinción con el primer colorante con respecto al segundo colorante en la segunda fracción a cada concentración de la composición, y calcular la relación R_1/R_2 para cada concentración de la composición, en el que la concentración de trabajo óptima de la composición es la concentración a la que R_1/R_2 está en un máximo. En una realización, la célula maligna se tiñe sustancialmente con el primer colorante y la célula no maligna se tiñe sustancialmente con el segundo colorante.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método de identificar la concentración de trabajo óptima de una composición que comprende un compuesto capaz de distinguir entre una célula maligna y una célula no maligna produciendo tinción diferencial de la célula maligna y la célula no maligna como se ha descrito anteriormente en este documento, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una célula que tiene un fenotipo no maligno, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, poner en contacto la segunda fracción con un agente que promueve la conversión del fenotipo no maligno en un fenotipo maligno, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con una o más concentraciones de la composición, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con al menos un primer colorante y un segundo colorante, detectar la tinción de la primera fracción y la segunda fracción con el primer colorante y el segundo colorante, medir la relación R_1 que indica tinción con el primer colorante con respecto al segundo colorante en la segunda fracción a cada concentración de la composición, medir la relación R_2 que indica tinción con el primer colorante con respecto al segundo colorante en la primera fracción a cada concentración de la composición; y calcular la relación R_1/R_2 para cada concentración de la composición; en el que la concentración de trabajo óptima de la composición es la concentración a la que R_1/R_2 está en un máximo. En una realización, la célula maligna se tiñe sustancialmente con el primer colorante y la célula no maligna se tiñe sustancialmente con el segundo colorante.

Trastornos malignos:

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se usa indistintamente con los términos tumor maligno, malignidad o neoplasia, y se refiere a una enfermedad de células caracterizada por un crecimiento anormal de células que tienden a proliferar de una forma incontrolada y, en algunos casos, a metastatizar.

Una "célula cancerosa" o una "célula maligna", como se usa en el presente documento, es una célula que ha sido liberada del control de la división de células normales, se caracteriza así por un crecimiento anormal y una tendencia a proliferar de una forma incontrolada y, en algunos casos, a metastatizar. En una realización, el término "célula maligna" se refiere a una célula que tiene un fenotipo maligno. La definición de una célula maligna incluye una célula neoplásica, una célula pre-maligna, una célula metastásica, una célula maligna, una célula tumoral, una célula oncogénica, una célula con un genotipo de cáncer, una célula de fenotipo maligno, una célula con un genotipo maligno, una célula transfectada con oncogén, una célula transformada con virus, una célula que expresa un marcador para un oncogén, una célula que expresa un marcador para cáncer, o una combinación de las mismas. En esta definición se incluyen líneas celulares derivadas de cualquiera de estas células. Ejemplos no limitantes de células malignas/líneas celulares adecuadas para su uso en la presente invención son: una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano (HT29); una línea celular de carcinoma de mama humano (MCF-7), una línea celular K562 de leucemia humana, una línea celular HL-60 leucémica humana, una línea celular Rat1 transformada con Ras V 12 (Rat1 Ras), una línea celular de linfoma histiocítico (U937), o una combinación de las mismas.

Una "célula no maligna", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula normal, una línea celular normal, una célula maligna que ha sido inducida para expresar un fenotipo de una célula no maligna, una línea celular inmortalizada, un cultivo celular primario, o cualquier combinación de las mismas. En esta definición se incluyen líneas celulares derivadas de cualquiera de estas células. En una realización, el término "célula no maligna" se refiere a una célula que tiene un fenotipo maligno. Ejemplos no limitantes de células no malignas/líneas celulares adecuadas para su uso en la presente invención son: colonocitos primarios humanos (CCD-33C0), fibroblastos rat1, una línea celular MCF-7 tratada con butirato de sodio, una línea celular HT29 tratada con butirato de sodio, una línea celular Rat1 Ras tratada con PD98058, una línea celular K562 tratada con butirato de sodio y/o Gleevec, una línea celular U937 tratada con ácido all-trans-retinoico (ATRA), o una combinación de las mismas.

Una "célula normal", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que no tiene un fenotipo maligno, y/o célula que no tiene un trastorno metabólico.

Según realizaciones de la presente invención, una célula maligna o una célula cancerosa es una célula de adenocarcinoma, una célula de tumor de la glándula suprarrenal, una célula de ameloblastoma, una célula anaplásica, una célula de carcinoma anaplásico de tiroides, una célula de angiofibroma, una célula de angioma, una célula de angiosarcoma, una célula de apudoma, una célula de argentafinoma, una célula de arrenoblastoma, una célula de tumor de ascitis, una célula de tumor ascítico, una célula de astroblastoma, una célula de astrocitoma, una célula de ataxia-telangiectasia, una célula de mixoma auricular, una célula de carcinoma de células basales, una célula de tumor benigno, una célula de cáncer de huesos, una célula de tumor de huesos, una célula de glioma del tronco encefálico, una célula de tumor cerebral, una célula de cáncer de mama, una célula de linfoma de Burkitt, una célula cancerosa, una célula carcinoide, una célula de carcinoma, una célula de astrocitoma cerebeloso, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de angioma en cereza, una célula de colangiocarcinoma, una célula de colangioma, una célula de condroblastoma, una célula de condroma, una célula de condrosarcoma, una célula de corioblastoma, una célula de coriocarcinoma, una célula de cáncer de colon, una célula de leucemia linfoblástica aguda común, una célula de craneofaringioma, una célula de cistocarcinoma, una célula de cistofibroma, una célula de cistoma, una célula de citoma, una célula de carcinoma ductal *in situ*, una célula de papiloma ductal, una célula de disgerminoma, una célula de encefaloma, una célula de carcinoma endometrial, una célula de endotelioma, una célula de ependimoma, una célula de epitelioma, una célula de eritroleucemia, una célula de sarcoma de Ewing, una célula de linfoma extranodal, una célula de sarcoma felino, una célula de fibroadenoma, una célula de fibrosarcoma, una célula de cáncer folicular de tiroides, una célula de ganglioglioma, una célula de gastrinoma, una célula de aglioblastoma multiforme, una célula de glioma, una célula de gonadoblastoma, una célula de hemangioblastoma, una célula de hemangioendotelioblastoma, una célula de hemangioendotelioma, una célula de hemangiopericitoma, una célula de hematolinfangioma, una célula de hemocitoblastoma, una célula de hemocitoma, una célula de leucemia de células pilosas, una célula de hamartoma, una célula de hepatocarcinoma, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de hepatoma, una célula de histoma, una célula de enfermedad de Hodgkin, una célula de hipernefoma, una célula de cáncer infiltrante, una célula de carcinoma de células ductal infiltrante, una célula de insulinooma, una célula de angiofibroma juvenil, una célula de sarcoma de Kaposi, una célula de tumor renal, una célula de linfoma de células grandes, una célula de leucemia, una célula de leucemia crónica, una célula de leucemia aguda, una célula de lipoma, una célula de cáncer de hígado, una célula de metástasis de hígado, una célula de carcinoma de Lucke, una célula de linfadenoma, una célula de linfangioma, una célula de leucemia linfocítica, una célula de linfoma linfocítico, una célula de linfocitoma, una célula de linfoedema, una célula de linfoma, una célula de cáncer de pulmón, una célula de mesotelioma maligno, una célula de teratoma maligno, una célula de mastocitoma, una célula de meduloblastoma, una célula de melanoma, una célula de meningioma, una célula de mesotelioma, una célula metastásica, una célula de metástasis, una célula de diseminación metastásica, una célula de neuroma de Morton, una célula de mieloma múltiple, una célula de mieloblastoma, una célula de leucemia mieloide, una célula de mielolipoma, una célula de mieloma, una célula de mioblastoma, una célula de mixoma, una célula de carcinoma nasofaríngeo, una célula neoplásica, una célula de nefroblastoma, una célula de neuroblastoma, una célula de neurofibroma, una célula de neurofibromatosis, una célula de neuroglioma, una célula de neuroma, una célula de linfoma no Hodgkin, una célula de oligodendroglioma, una célula de glioma óptico, una célula de osteocondroma, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de osteosarcoma, una célula de cáncer de ovario, una célula de enfermedad de Paget del pezón, una célula de tumor de Pancoast, una célula de cáncer pancreático, una célula de feocromocitoma, una célula de feocromocitoma, una célula de plasmacitoma, una célula de tumor cerebral primario, una célula de progonoma, una célula de prolactinoma, una célula de carcinoma de células renales, una célula de retinoblastoma, una célula de rhabdomyosarcoma, una célula de rhabdosarcoma, una célula de tumor sólido, una célula de sarcoma, una célula de tumor secundario, una célula de seminoma, una célula de cáncer de piel, una célula de carcinoma de células pequeñas, una célula de carcinoma de células escamosas, una célula de hemangioma en fresa, una célula de linfoma de linfocitos T, una célula de teratoma, una célula de cáncer testicular, una célula de timoma, una célula de tumor trofoblástico, una célula tumorigénica, una célula de iniciación de tumor, una célula de progresión de tumor, una célula de schwannoma vestibular, una célula de tumor de Wilms, o una combinación de las mismas.

Diferenciación de células neuronales o de citoblastos

Además, según otra realización de la presente divulgación, se proporciona un método de tinción citohistológica para identificar un agente que induce diferenciación de células neuronales o de citoblastos, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra que comprende más de una célula neuronal o citoblasto no diferenciado, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, poner en contacto la segunda fracción con el agente, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con un compuesto capaz de distinguir entre una célula neuronal o citoblasto no diferenciado y diferenciado produciendo tinción diferencial de la célula neuronal o citoblasto no diferenciado y diferenciado, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con al menos un primer colorante y un segundo colorante, detectar la tinción de la primera fracción con el primer colorante y el segundo colorante, detectar la tinción de la segunda fracción con el primer colorante y el segundo colorante; y comparar la tinción de la primera fracción y la segunda fracción, identificando así el agente que induce diferenciación de células neuronales o de citoblastos. En otra realización, el método está adaptado para identificar una combinación de agentes que inducen diferenciación de células neuronales o de citoblastos.

Además, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para identificar un agente que induce diferenciación de células neuronales o de citoblastos, comprendiendo el método las etapas de obtener una muestra

que comprende más de una célula neural o citoblasto no diferenciado, separar en alícuotas al menos una primera fracción y una segunda fracción de la muestra, poner en contacto la segunda fracción con el agente, poner en contacto la primera fracción y la segunda fracción con un compuesto capaz de distinguir entre una célula neuronal o citoblasto no diferenciado y diferenciado por tener fluorescencia diferencial en la célula neuronal o citoblasto no diferenciado y diferenciado, detectar la fluorescencia de la primera fracción y la segunda fracción; y comparar la fluorescencia de la primera fracción y la segunda fracción, identificando así el agente que induce diferenciación de células neuronales o de citoblastos. En otra realización, el método está adaptado para identificar una combinación de agentes que inducen diferenciación de células neuronales o de citoblastos.

Como se usa en el presente documento, los términos célula neuronal o citoblasto “no diferenciado” y “diferenciado” se refieren no solo a una célula neural o citoblasto completamente no diferenciado frente a una célula neuronal o citoblasto que está completamente diferenciado, es decir, ha completado el proceso de diferenciación. Más bien, estos términos también incluyen células neuronales o citoblastos en diferentes etapas en el desarrollo y diferenciación. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención puede producir tinción diferencial en dos células neuronales o citoblastos en diferentes etapas de diferenciación. En otra realización, el compuesto de la presente invención puede tener fluorescencia diferencial en dos células neuronales o citoblastos en diferentes etapas de diferenciación.

La posible conexión entre la inducción de diferenciación y la normalización del fenotipo de enfermedad se establece en la bibliografía (Lindsell P, 2001). Además, la base científica sobre la posibilidad de usar los agentes que provocan la diferenciación como histoprotectores podría demostrarse por neuroprotectores en el caso del daño de células neuronales o de citoblastos y está bien establecida (Cheung et al, 2000). Extracto de ganoderma (medicina tradicional china) indujo la diferenciación de células neuronales o de citoblastos de células PC12. Se documentó la presencia de compuestos neuroactivos que mediaban en la diferenciación de células neuronales o de citoblastos y la neuroprotección de las células PC 12 (Cheung et al, 2000). El factor de crecimiento nervioso (NGF), que se ha mostrado que actúa de factor de diferenciación morfológico y neuroquímico en células PC 12, también protege a las células PC 12 de la toxicidad de privación de suero e isquemia (Boniece et al, 1995). El efecto neuroprotector de NGF requiere algunas de las mismas etapas de transducción de señales usadas por NGF para promover la diferenciación y formación de axones (Boniece et al, 1995). Además, se encontró que la exposición de células PC 12 a ácido retinoico, que promueve la diferenciación e inhibe el crecimiento de células PC 12, también mejora la supervivencia celular durante la isquemia. Además, una combinación de NGF y ácido retinoico fue más eficaz que cualquier agente solo. Es probable que estos dos agentes confieran protección por vías independientes (Boniece et al, 1995), pero estas señales están conectadas con la diferenciación.

Como se contempla en el presente documento, la presente invención proporciona un sistema de cribado útil para detectar agentes inductores de la diferenciación. Basándose en los resultados descritos en el presente documento más adelante, que muestran la detección de NGF (no mostrada), ácido retinoico (Figuras 36A-B) y butirato de sodio (Figuras 22A-D y Figuras 23A-C), la presente invención proporciona además un método de neuroprotección contra el daño de células neuronales o de citoblastos, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto una célula neuronal o citoblasto con un agente que induce la diferenciación de células neuronales o de citoblastos, en el que el agente se identifica según cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento.

Trastornos metabólicos

Como se define en el presente documento, el término “célula metabólicamente alterada” se refiere a una célula que tiene una alteración metabólica aberrante, deficiente o anormal como resultado de una actividad metabólica anormal. Como se define en el presente documento, el término “célula metabólicamente normal” se refiere a una célula que tiene una función y/o actividad metabólica normal.

Como se contempla en el presente documento, una lista no limitante de trastornos metabólicos que están dentro del alcance de la presente invención incluye trastornos del metabolismo de los hidratos de carbono, trastornos del metabolismo de los esteroides, tejido conjuntivo, músculo, hueso, trastornos del metabolismo de los aminoácidos, trastornos del metabolismo de purina/pirimida, trastornos de la sangre, trastornos del metabolismo de los lípidos, trastornos del metabolismo de los metales, trastornos del transporte, trastornos de enzimas lisosómicas y trastornos del metabolismo de hemo/porfiria.

En una realización, el trastorno metabólico está seleccionado del grupo que consiste en un trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono, un trastorno del metabolismo de esteroides, un trastorno de tejido conjuntivo, un trastorno muscular del metabolismo de aminoácidos, un trastorno del metabolismo de purina/pirimidina, un trastorno de la sangre, un trastorno del metabolismo de los lípidos, un trastorno del metabolismo de metales, un trastorno del transporte, un trastorno de enzimas lisosómicas y un trastorno del metabolismo de hemo/porfiria.

En otra realización, el trastorno metabólico está seleccionado del grupo que consiste en diabetes, intolerancia a la fructosa, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, hiperplasia suprarrenal, distrofia muscular, síndromes de Ehlers-Danlos, hipofosfatasa, fenilcetonuria, albinismo, bocio, gota, síndrome de Lesch-Nyhan, xerodermia

pigmentosa, hemofilia, β -talasemia, anemia de células falciformes, hipercolesterolemia, enfermedad de Wilson (eliminación de cobre), fibrosis quística, raquitismo, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Tay-Sachs, porfiria y enfermedad de Niemann-Pick.

Objetivos, ventajas y características novedosas adicionales de la presente invención serán evidentes para un experto habitual en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han delineado anteriormente en este documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones más adelante, encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una forma no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de EE.UU. N° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como si se expusieran completamente en el presente documento. Otras referencias generales se proporcionan en todo este documento. Se cree que los procedimientos en el presente documento son muy conocidos en la técnica y se proporcionan por comodidad del lector. Toda la información contenida en el presente documento se incorpora en el presente documento por referencia.

EJEMPLO 1

Tinción diferencial de células malignas y no malignas de biopsias no cervicales

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

La siguiente sección de materiales y procedimientos experimentales se refiere a los Ejemplos 1 a Ejemplo 5 detallados en el presente documento más adelante.

Procedimientos de tinción

La Tabla 1b más adelante proporciona procedimientos etapa por etapa para la tinción general según la presente invención. Por favor, obsérvese que el secado al aire se efectúa preferentemente según las enseñanzas de la presente invención, mejorando el efecto diferencial de los protocolos. Podrían teñirse placas de múltiples pocillos tras el secado: mínimo 3 horas (h) con un óptimo de 24 horas tras la tinción.

TABLA 1b

<u>A - Protocolo para frotis de aire no cervical seca</u>	<u>B - Revisado protocolo para frotis cervicales no secadas al aire</u>
1. Diapositiva Aire seco o de impresión 2. 2: Fijación minutos en Fix-1 3. Limpie en la gestión de agua destilada 4. 1 minuto en Fix-2 5. Limpie en la gestión de agua destilada 6. 1 minuto en Tinte-1 7. Limpie en la gestión de agua destilada 8. Ext-2 durante 1 minuto (min) 9. Limpie vigorosamente 5-7 segundos en agua destilada 10. 15 segundos en Ext-1 11. Limpie vigorosamente 5-7 segundos en agua destilada 12. 20 segundos en Ext-3 13. Limpie vigorosamente 30 segundos en agua destilada 14. PBS durante 15 segundos 15. Limpie con agua destilada durante 10 segundos 16. Tinte-2 durante 6 segundos 17. Limpie con agua destilada durante 10 segundos 18. Tinte-8 durante 4 min. 19. Limpie con agua destilada durante 10 segundos (seg) 20. La deshidratación en 70% - 100% de etanol - 96% 21. Claro en Xileno 22. Monte en Eukitt	1. Diapositiva Aire seco o de impresión 2. Fijación: 12 min. en Fix-3 3. Limpie en la gestión del agua desionizada 4. 2 min. en Fix-4 5. Limpie en la gestión de agua destilada 6. 2 min. en Tinte-3 7. Limpie con agua del grifo 8. Ext-2 durante 2 minutos. 9. Lavar en agua desionizada durante 1 min. 10. 10 seg. en Tinte-5 11. Lavar en agua destilada 12. Incubar en tinte-23 durante 5 min. 13. Limpie en agua destila durante 10 s. 14. La deshidratación en 70% - 100% de etanol - 96% 15. Claro en Xileno 16. Monte en Eukitt
<u>I - Protocolo para histológico sección / embebidas en parafina, Tejido</u> 1. tejido incluido en parafina en un portaobjetos (4 micras) 2. desparafinación en dos baños de xileno, a 1 minuto cada uno 3. Limpie en dos baños de etanol consecutivos, 1 minuto cada uno 4. Fix-5 durante 3 min. 5. Lave en agua desionizada durante 1 minuto 6. Incubar en Tinte-3 durante 15 minutos. 7. Lavar en agua corriente durante 1 min. 8. Incubar en Ext-2 durante 3 min. 9. Lavar en agua desionizada durante 15 s. 10. Incubar en Tinte-22 durante 3,5 min. 11. Lavar en agua desionizada durante 15 s. 12. Incubar en Tinte-26 para 10 sec-enjuague en agua destilada 13. Incubar en Tinte-27 durante 1 minuto 15 sec-enjuague en agua destilada 14. Incubar en Tinte-25 durante 30 segundos. 15. Lavar en agua desionizada durante 15 s. 16. La deshidratación en 70% - 70% - etanol 70%. 17. Claro en 9 baños consecutivos de etanol absoluto, 5 segundos en cada una. 18. Claro en Xileno 19. Monte en Eukitt	

Reactivos:

Hoechst N 33342, Sigma; 10 mg/ml en PBS; Dahlia Michrome 105, índice de color (CI) 42535, Edward Gurr LTD; New Fuchsin, SIGMA, Lote 37H3463, CI 42520; acetato de pararosanilina, Allied Chemical, CI 42500; clorhidrato de rosanilina, BDH, Prod. 30024, CI 42510; violeta de metilo, Fluka, 69710, CI 42535L; Light Green, SF Yellowish, Lote 055H4405, CI 42095; Fast Green FCF, BDH, CI 42053; Eosin Yellow Shade, BDH Producto N° 34027, CI 45380; marrón de Bismark R, SIGMA, Lote 111H3470, CI 21010; azul de toluidina, Fluka, CI 52040; verde de metilo, MERCK, CI 42590; ácido pícrico, pironina Y, Fluka, CI 45005; tinción de May-Grunwald, Sigma Cat. no. M6901; hematoxilina de Harris, Pioneer Research Chemicals; Hematoxylin Solution Gill No. 3, Sigma GHS-3-32; New Fuchsin, C.I. 42520, Sigma N-0638; floxina, C.I. 778, Hartman Leddon Co.; Azure A, Allied Chemical Cat. N° 442; violeta de metilo; Basic Fuchsin; tabletas de PBS, SIGMA, P4417; ácido tricloroacético (TCA), metanol, ácido acético glacial (GAA); formaldehído; éter; resina de carboximetilcelulosa, CM52, Whatman.

Ensayo de cribado para fracciones que contienen compuesto histomodulador:

Se desarrolló el ensayo de cribado con el objetivo de cribar fracciones purificadas para actividad. El ensayo se diseña para evaluar si una fracción es capaz de simular la actividad de un extracto en bruto o extracto verificado (GS marcado). Una fracción se considera activa si es capaz de inhibir significativamente la primera tinción (verde o rojo) de células malignas, alternativamente la actividad histomoduladora se verificó en tinción histológica.

Extracto de planta:

Hojas óptimas para el proceso tienen entre 15 y 25 gramos y su longitud es preferentemente 18-30 centímetros como se mide desde la base de la hoja hasta el borde. Las hojas que estuvieron por debajo de estas especificaciones tienden a tener un pigmento rojo y tienden a ser hiperactivas desde el punto de vista de la inhibición, mientras que las hojas que están por encima de estos criterios se caracterizan por pigmento verde muy fuerte y tienden a mostrar muy poca actividad.

Se cortaron 600 gramos de hojas en trozos de 1-2 cm. Las hojas cortadas se mezclaron con 1,5 litros de 70% de etanol (EtOH) y se mantuvieron durante 10 días (temperatura ambiente) en un envase sellado. A partir de aquí, el líquido se separó de los sólidos y se mantuvo para uso adicional a temperatura ambiente. Para los rendimientos de purificación óptima, el líquido se dejó envejecer en el recipiente durante al menos 10 días y hasta un mes a temperatura ambiente.

Preparación alternativa de extracto de planta (*Ficus elastica*) para su uso en el procedimiento de tinción de la invención:**Material de entrada:**

Se seleccionó material de hoja como se ha descrito anteriormente en términos de longitud y peso de la hoja.

Preparación alternativa del extracto óptimo:

Se cortaron hojas en trozos de 1-2 cm. Las hojas cortadas se secaron en una estufa a 65 °C durante 24 horas (h). Al principio, el contenido de humedad fue del 80%, mientras que al final debería haber sido del 4%.

El material se combinó en un polvo (700-1000 micrómetros). El polvo se usó en extracción en un sistema de reflujo: 1 hora (h) por extracción, disolvente: 70% de etanol, 40 °C. Se realizaron tres extracciones secuenciales, cada vez se reextrajo el polvo. Cantidad de 70% de etanol en cada extracción: primera - 1:5; segunda - 1:4; tercera - 1:3. Se mezclaron los tres extractos resultantes, se filtraron en filtro de vacío, papel N° 40. El extracto filtrado mezclado se evaporó en un evaporador de rotor a vacío a 60 °C hasta que se obtuvo un peso estacionario.

El polvo resultante (la humedad final fue del 3%) se combinó adicionalmente en un molino. El extracto de polvo se reconstituyó para su uso como un reactivo de tinción. El polvo se recogió en 70% de etanol a TDS 1,3% en peso/volumen, pH 7,4. Estabilidad en almacén del extracto en polvo: humedad 1%, después de seis meses a temperatura ambiente en vidrio transparente – la actividad fue equivalente al nivel inicial.

Disoluciones de tinción y fijadores:

Fijador N° 1 (Fij-1): El fijador N° 1 contuvo 0,3% de ácido tricloroacético (TCA), 20% de etanol, 2,5% de metanol, 2,5% de ácido acético glacial (GAA), 2,5% de formaldehído, 43% de éter y 29,2% de agua destilada doble. Se añadió éter ex tempera.

Fijador N° 2 (Fij-2): El fijador N° 2 contuvo 1,2% de ácido tricloroacético (TCA), 20% de etanol, 1,2% de metanol, 2,5% de ácido acético glacial (GAA), 0,5% de formaldehído, 40% de éter y 34,6% de agua destilada doble. Se añadió éter ex tempera.

Fijador N° 2B (Fij-2B): El fijador N° 2B contuvo 6,6% de ácido tricloroacético (TCA), 6,6% de ácido acético

glacial (GAA), 3,3% de metanol, 3,3% de formalina, 80,2% de éter.

Fijador N° 3 (Fij-3): El fijador N° 3 contuvo 0,4% de ácido tricloroacético (TCA), 1,2% de metanol, 2,5% de GAA, 2,5% de formaldehído, 93,4% de agua destilada doble.

Fijador N° 4 (Fij-4): El fijador N° 4 contuvo 1,2% de ácido tricloroacético (TCA), 7% de metanol, 9% de GAA, 7% de formaldehído, 76,4% de agua destilada doble.

Fijador N° 102-B (Fij-102-B): El fijador N° 102-B contuvo 6,6% de ácido tricloroacético (TCA), 7,5% de ácido acético glacial (GAA), 5,8% de metanol, 5,8% de formalina, agua destilada.

Extractos de planta adicionales:

Extracto de *Aloe arborescens miller* (Ext-1): Se mezclaron 600 gramos de hojas cortadas con 1 litro de etanol al 96% y mantuvieron durante 10 días (temperatura ambiente) en un envase sellado. A partir de aquí, el líquido se separó de los sólidos y se mantuvo para uso adicional a temperatura ambiente.

Extracto de *Ficus elastica* (Ext-2): Descritos anteriormente, pero brevemente: se mezclaron 600 gramos de hojas cortadas con 1,5 litros de 70% de etanol y se mantuvieron durante 10 días (temperatura ambiente) en un envase sellado. A partir de aquí, el líquido se separó de los sólidos y se mantuvo para uso adicional a temperatura ambiente.

Extracto de *Lantana camara* (Ext-3): Se mezclaron 300 gramos de hojas cortadas con 1 litro de 70% de etanol y se mantuvieron durante 10 días (temperatura ambiente) en un envase sellado. A partir de aquí, el líquido se separó de los sólidos y se mantuvo para uso adicional a temperatura ambiente.

Colorantes:

Floxina (Colorante-A): El colorante de anilina floxina se usó para la tinción de tejido incorporado en parafina. El colorante se preparó mezclando 1,5 gramos de floxina con 200 ml de agua destilada doble y 50 ml de etanol.

BBr (Colorante-B): El colorante BBr se preparó disolviendo 2 gramos de marrón de Bismark R en 50 ml de etanol y 200 ml de agua destilada doble.

Eosina (Colorante-C): Se preparó Yellow disolviendo 0,26 gramos de tonalidad amarilla de eosina en 15 ml de 100% de etanol y 35 ml de agua destilada doble.

Colorante hematoxilina de Harris (Colorante-1): Colorante hematoxilina de Harris comercialmente disponible, listo para uso.

Light Green (Colorante-2): El colorante de anilina Light Green sirvió de tinción general en los procedimientos de tinción. El colorante de anilina se preparó mezclando 4 gramos de Light Green con 50 ml de 70% de etanol y 50 ml de agua destilada doble.

Hematoxilina de Gill (Colorante-3): Una disolución lista para uso de hematoxilina de Gill N° 3.

Conjugado de marrón de Bismark-floxina (Colorante-4): Se mezclaron Colorante-A y Colorante-B, se hirvieron durante 20 min y se enfriaron a temperatura ambiente. El colorante se filtró a través de un papel de filtro, y se añadieron 250 ml de etanol absoluto.

Light Green 50% (Colorante-5): El colorante de anilina Light Green 50% se usó como tinción general en algunos de los protocolos. El colorante de anilina se preparó mezclando 4 gramos de Light Green con 50 ml de etanol y 50 ml de agua destilada doble.

New Fuchsin (Colorante-6): Se preparó disolución al 0,4% en etanol al 33%.

Azure (Colorante-7): Se usó el colorante de anilina Azure A para la tinción de tejido incorporado en parafina. El colorante de anilina se preparó mezclando 0,25 gramos de Azure A con 50 ml de 100% de etanol y 50 ml de agua destilada doble.

Solución salina de tampón fosfato (PBS): Se preparó PBS, pH 7,4, usando tabletas de PBS comercialmente disponibles. Se usó una tableta por 200 ml de agua destilada doble para lograr una disolución de trabajo.

Colorante Dahlia (Colorante-8): El colorante Dahlia sirvió de tinción para frotis no cervical. El colorante Dahlia se preparó mezclando 0,5 gramos de Dahlia en 20 ml de 70% de etanol y 80 ml de agua destilada doble.

Dahlia 99a (Colorante-23): Dahlia 99A fue un colorante de anilina usado en el procedimiento revisado para frotis no cervical. Se preparó Dahlia 99A mezclando 1,5 gramos de Basic Fuchsin, 1 gramo de violeta de metilo, 0,5 gramos de New Fuchsin con 100 ml de etanol y 20 400 ml de agua destilada doble.

Light Green 20% (Colorante-24): Se usó el colorante de anilina Light Green 20% como tinción general en el protocolo para secciones congeladas. El colorante de anilina se preparó mezclando 4 gramos de Light Green con 20 ml de etanol y 80 ml de agua destilada doble.

Marrón de Bismark-eosina: Se preparó marrón de Bismark-eosina disolviendo 5 g de marrón de Bismark-R en 200 ml de agua destilada y 25 75 ml de etanol al 100%, y se apartó durante 5 minutos (min). A continuación, se disolvieron 2,5 g de amarillo de eosina en 150 ml de agua destilada y 50 ml de etanol al 100%, y se apartó durante 10 min. Ambos se mezclaron y se hirvieron durante 5 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se filtraron a través de filtro de papel. El filtro se dejó secar y se lavó en 300 ml de etanol absoluto.

Tinción de May-Grunwald: 0,25% de colorante May-Grunwald en metanol, diluido en tampón de Sorenson, pH 6,8.

Tinción de Giemsa: 10% de tinción de Giemsa diluida en tampón de Sorenson, pH 6,8.

Protocolo de tinción de hematoxilinaeosina:

Se desparafinaron tejidos de 4 micrómetros de espesor incorporados en parafina sobre portaobjetos en dos baños de xileno, 3 min cada uno, y se lavaron en dos baños de etanol consecutivos, 3 min cada uno, seguido de dos baños de 95% de etanol consecutivos, 3 min cada uno, y un baño de agua destilada, durante 3 min. Tras la desparafinación, los portaobjetos se sumergieron en tinción de hematoxilina (Colorante-1) durante 1 min y se lavaron en agua de grifo (corriente en el recipiente) hasta que el agua fue clara. Entonces, los portaobjetos se sumergieron en tinción de eosina (Colorante-C) durante 1-2 min, y se lavaron en agua de grifo como se ha descrito anteriormente. A continuación, los portaobjetos se deshidrataron en disoluciones de alcohol ascendentes (50%, 70%, 80%, 95% x 2, 100% x 2) y se limpiaron con xileno (3-4 veces). Los portaobjetos deshidratados se montaron con Permout u otro medio de montaje orgánico adecuado.

Protocolo de tinción de May-Grunwald-Giemsa:

Se fijaron portaobjetos en metanol durante 15 min, y a continuación se tiñeron en tinción de May-Grunwald durante 5 min. Los portaobjetos se aclararon con agua y se tiñeron en tinción de Giemsa durante 10 min. Después de la tinción, los portaobjetos se aclararon en tampón de Sorenson a pH 6,8 y se aclararon de nuevo en 50/50 v/v de tampón/acetona. Tras el aclarado, los portaobjetos se deshidrataron en dos lavados con acetona y se limpiaron en xileno. Finalmente, los portaobjetos se montaron con Permout u otro medio de montaje orgánico adecuado.

Protocolo de tinción de Papanicolaou:

Se secaron frotis y se realizaron las siguientes etapas de tinción y de lavado: Se lavaron portaobjetos con 70% de etanol durante 2 minutos y a continuación dos veces con agua de grifo durante 1 minuto cada uno. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina de Gill durante 4 minutos y se aclararon con agua de Scott durante 2 minutos, se lavaron con 70% de etanol durante 1 minuto, y a continuación con 95% de etanol durante 1 minuto. A continuación, los portaobjetos se tiñeron usando Orange G durante 2 minutos y se lavaron dos veces con 95% de etanol durante 1 minuto cada uno. A continuación, los portaobjetos se tiñeron durante 10 minutos con eosina A (eosina Azure), que es una contratinción, que comprende tres colorantes eosina Y, Light Green SF yellowish y marrón de Bismarck Y. A continuación, los portaobjetos se lavaron dos veces con 95% de etanol durante un minuto cada uno y se trataron dos veces con xileno durante 5 minutos cada uno. Los portaobjetos se montaron y una vez secos, los portaobjetos se cribaron bajo el microscopio.

Líneas de células:

Cultivos de líneas celulares: Las líneas celulares usadas en el presente documento se enumeran en la Tabla 4 más adelante. Las líneas celulares se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (4,5 g de glucosa/litro, DMEM) complementado con 1% de glutamina, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/g) y 10% de suero de ternero fetal inactivado por calor (57 °C, 30 min), FCS (Bio-Lab, Jerusalén, Israel). Las células se sometieron a pases sucesivos (semanalmente) y se cultivaron en placas de cultivo de tejido Miniplast de 10 cm de diámetro (Miniplast, Israel). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una estufa de incubación húmeda con una mezcla de aire que contuvo 5% de CO₂.

Frotis de líneas celulares: Se centrifugaron suspensiones de células de todos los tipos, el sedimento se resuspendió en un pequeño volumen de medio DMEM-FCS fresco. Se dispusieron pequeñas gotas de la suspensión sobre portaobjetos de vidrio, se untaron, se secaron al aire y se usaron en experimentos de tinción como se detalla adicionalmente en el presente documento más adelante.

Suspensiones de células primarias: Se obtuvieron células de médula ósea por lavado de fémures y tibia de ratones, se dispusieron sobre portaobjetos de vidrio, se untaron, se secaron al aire y se usaron en experimentos de tinción como se detalla adicionalmente en el presente documento más adelante.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Los procedimientos de tinción presentados en el presente documento se desarrollaron usando frotis citológicos clínicos positivos para cáncer y negativos para cáncer, que se recibieron rutinariamente de y se clasificaron por un laboratorio citológico. La presencia de células malignas se validó por examen citológico estándar y en la mayoría de los casos por diagnóstico histopatológico.

Se usaron aproximadamente 3.000 aspirados peritoneales, pleurales, pericárdicos para los esfuerzos de desarrollo del procedimiento de tinción. El procedimiento de tinción fue aplicable a frotis citológico secado al aire del tipo aplicable para tinción de May-Grunwald-Giemsa rutinaria.

La primera etapa fue el procedimiento de fijación especialmente diseñado que implica el uso de reactivos fijadores complejos (Fij-1 y Fij-2) optimizados para los mejores resultados de tinción posteriores. Estos reactivos de fijación complejos fueron, en la mayoría de los casos, esenciales para la eficacia del procedimiento de tinción. Además de permitir la tinción eficaz, el procedimiento de fijación descrito en el presente documento también proporcionó

preservación morfológica superior, en particular de las características y detalles nucleares en comparación con procedimientos de fijación convencionales. La segunda etapa incluyó la contratinción con hematoxilina de Harns, que se introdujo para el mejor contraste de detalles nucleares. La tercera etapa incluyó el tratamiento con extractos de planta (extractos de las plantas *Aloe arborescens miller*, *Ficus elastica* y *Lantana camara*), que se creyó que cambiaba las capacidades de unión de las células para los colorantes aplicados en etapas posteriores. La cuarta etapa comprende una tinción secuencial usando colorantes biológicos, primero una corta exposición a un colorante ácido, por ejemplo, Light Green, y luego una exposición más larga a un colorante básico, por ejemplo, New Fuchsin o Dahlia.

En frotis sometidos al procedimiento de tinción anteriormente descrito, el citoplasma de células normales, concretamente células mesoteliales y epiteliales, macrófagos, granulocitos y diversos linfocitos, viró a tono verde o siguió sin teñir. Al contrario, el citoplasma de células cancerosas se volvió de color rojo (Figuras 1A-B y Figuras 2A-B). Los núcleos de las células se volvieron azul-violetas como resultado de la hematoxilina de Harris obligada por la tinción de Dahlia (Figura 3). En parte de las células tumorales, el virado a rojo del citoplasma se produjo junto con el distinto virado a rojo de los núcleos (Figuras 1A-B y Figura 2B). Los granulocitos pueden producirse ocasionalmente con núcleos teñidos de rojo, que sin embargo, son claramente distinguibles del citoplasma rojo de células cancerosas (Figuras 1A-B).

El protocolo de tinción descrito en la presente invención es aplicable a frotis citológico secado al aire del tipo aplicable para tinción de May-Grunwald-Giemsa rutinaria.

En una prueba de doble ciego para el procedimiento de tinción, se probaron 128 muestras por tres patólogos bien cualificados empleados en un laboratorio de citología de un hospital en Israel. Se prepararon dos portaobjetos a partir de cada espécimen. Uno se tiñó convencionalmente con May-Grunwald-Giemsa (MGG), mientras que el otro se tiñó usando el procedimiento de tinción según la presente invención y como se ha descrito anteriormente en este documento. Cada uno de los portaobjetos teñidos con MGG se evaluó por uno de los patólogos y los portaobjetos teñidos según el método de la presente invención por el tercero.

Los resultados, que se resumen en la Tabla 2 en el presente documento más adelante, son sorprendentes. De las 40 muestras de líquido pleural probadas, tres dieron positivo y de una se sospechó que incluyó células malignas por ambos métodos de tinción empleados. De las 10 muestras de líquido peritoneal, tres dieron positivo y de dos se sospechó que incluyeron células malignas por el método de tinción de MGG, mientras que se encontró que las cinco incluyeron tales células usando el procedimiento de tinción según la presente invención. De las 75 muestras de lavado de broncoalveolar y de raspado, cuatro dieron positivo y de tres que se sospechó que incluyeron células malignas por el método de tinción de MGG, mientras que se encontró que las siete incluyeron tales células usando el procedimiento de tinción según la presente invención. De las tres muestras de líquido pericárdico, de una se sospechó que incluyó células malignas por el método de tinción de MGG, mientras que se encontró que la misma muestra incluía tales células usando el procedimiento de tinción según la presente invención.

TABLA 2

		Resultado Citológicos			
		<i>Positivo para maligno</i>		<i>Sospecho de maligno</i>	
Especimen	Nº de casos	MGG	Presente invención	MGG	Presente invención
Fluido pleural	40	3	3	1	1
Fluido Peritoneal	10	3	5	2	-
Lavado y Cepillado Broncoalveolar	75	4	7	3	-
Fluido Pericardial	3	-	1	1	-

Estos resultados mostraron claramente que el procedimiento de tinción según la presente invención dio mejores resultados que el procedimiento de tinción de MGG, especialmente en el diagnóstico de tumores malignos en casos difíciles. Sin embargo, esfuerzos adicionales tuvieron como objetivo mejorar los rendimientos en términos de potenciar la diferenciación de color, contraste y especificidad del procedimiento de tinción según la presente invención.

Así, en otro intento, el procedimiento de tinción de la presente invención se revalidó en un estudio piloto clínico. Los resultados se resumen en la Tabla 3 en el presente documento más adelante. Este estudio se diseñó como estudio de doble ciego de muestras fraccionadas en el que los únicos datos puestos a disposición para el operario del procedimiento fueron una referencia codificada y el tipo de muestra clínica (por ejemplo, efusión pleural, efusión peritoneal, etc.). Usando el procedimiento de tinción de la presente invención se produjo la identificación de 3 casos positivos de cáncer, 45 casos negativos de cáncer y 1 caso sospechoso. Estos resultados fueron idénticos a los

resultados obtenidos por evaluación citológica convencional. Debe enfatizarse que el procedimiento de tinción según la presente invención dio una fuerte tinción, incluso cuando solo algunas células cancerosas dispersas estuvieron presentes sobre el portaobjetos (Figura 4).

TABLA 3

<i>Validación Histológica</i>	<i>Diagnostico presente invención</i>	<i>Diagnostico Clínico patologico</i>	<i>Nº</i>	<i>Tipo Especimen</i>
Adenocarcinoma de pecho	Positivo	Positivo	1	Pleural
Carcinoma de ovario	Positivo	Positivo	1	Pleural
Carcinoma	Positivo	Positivo	1	Pleural
Malignidad Sp. Hematológico	Sp. Positivo	Sp. Positivo	1	Pleural
	Negativo	Negativo	25	Pleural
	Negativo	Negativo	1	Efusión estomago
	Negativo	Negativo	2	Lavado Retroperitoneo
	Negativo	Negativo	3	Lavado Peritoneal
	Negativo	Negativo	5	Ascites
	Negativo	Negativo	9	Fludios Peritoneal
			49	Total

A partir de aquí se usaron diversas líneas de células malignas de origen diferente, líneas benignas, cultivos primarios de tejidos normales y suspensiones preparadas a partir de tejidos adultos y embrionarios para validar adicionalmente la eficacia de diferenciación del procedimiento de tinción de la presente invención (Tabla 4). Este enfoque permitió la investigación de componentes celulares separados normalmente presentes en frotis clínicos. Los resultados se resumen en la Tabla 4 en el presente documento más adelante y se presentan en las Figuras 5A-G.

TABLA 4

<i>Células</i>	<i>Origen</i>	<i>Presente invención</i>	<i>Figura</i>
<u>Líneas malignos y transformados</u>			
3LL Lewis carcinoma de pulmon	Humano	Positivo	Figura 5a(1)
CaCo2 Colon Adenocarcinoma	Humano	Positivo	
Fao Hepatoma	Rata	Positivo	
Pc-12 Feocromocitoma	Ratón	Positivo	Figura 5b(1)
Amigo Eritroleucemia	Ratón	Positivo	Figura 5d(1)
Neuroblastoma SK-N-SH	Humano	Positivo	
Melanoma	Humano	Positivo	Figura 5c(1)
Carcinoma de pecho MDA435	Humano	Positivo	
NIH3T3*	Ratón	Positivo	Figura 5e(1)
Rat1	Rata	Negativo	Figura 33A
Rat1-Ras V12	Rata	Positivo	Figura 33A
HF-1	Humano	Positivo	Figura 39

<u>Otras líneas y cultivos primarios</u>			
Fibroblastos médula ósea y estroma	Ratón	Negativo	
Fibroblastos de quiste mamario benigno	Humano	Negativo	
<u>Suspensiones de células</u>			
Celulas inflamatorias Peritoneales	Rata	Negativo	Figura 5f(1)
Normal hepatocitos	Rata	Negativo	
* Este clon N1H3T3 fue espontaneamente transformado			

- 15 Todas las líneas de células malignas probadas se tiñeron rojo, mientras que todas las líneas de células no malignas y cultivos primarios probados se tiñeron de verde.

Con el fin de mejorar el entendimiento del procedimiento de la presente invención, se realizaron un conjunto de experimentos en el que se omitieron ciertos componentes del proceso (véase Tabla 5). Este procedimiento se probó empleando tanto líneas celulares como especímenes clínicos para los que se obtuvo validación citopatológica de los resultados antes de la tinción (Tabla 6 y Figuras 5A-G).

TABLA 5

Nº Procedimiento	Extracto	Verde claro	Dalia
1	+	+	+
2	+	-	+
3	-	+	+
4	-	-	+
5	+	+	-
6	-	+	-
(+) presente; (-) ausente			

TABLA 6

<i>Líneas de célula malignas y transformadas:</i>						
	1	2	3	4	5	6
3LL Lewis carcinoma de pulmón	Rojo	Rojo	Rojo Rojo Efecto Fondo	Rojo Fuerte	Verde	Verde Fuerte
CaCo2 Colon Adenocarcinoma	Rojo	Rojo Fuerte	RojoRojo Fondo borroso	Rojo Fuerte	Verde	Verde Fuerte
Fao Hepatoma	Rojo Fuerte	Rojo Fuerte	Rojo Fuerte, Rojo Efecto	Rojo Fuerte	Tinte no marcado	Tinte no marcado
PC-12 Feocromocitoma	Rojo	Rojo	Rojo Efecto Fondo	Rojo Fuerte	Verde	Verde
C6 Astrocitoma	Rojo	Rojo	Rojo/Rojo Fuerte Efecto Fondo	Rojo Fuerte	Verde	Verde Fuerte

Lineas de célula malignas y transformadas:						
	1	2	3	4	5	6
Eritroleucemia amigo	Red	Rojo fuerte	Red, Verde Sombras en parte de células	Rojo fuerte	Verde	Verde fuerte
Neuroblastoma SK- N-SH	Medio Rojo	Rojo	Medio Rojo	Rojo fuerte	Verdoso	Verde
Melanoma A375	Rojo	Rojo fuerte	Rojo, suave cambio a violeta	Rojo fuerte (mas de 2)	Verde	Verde fuerte
Carcinoma de pecho MDA435	Rojo	Rojo fuerte	Rojo, Verde sombras en parte de células	Rojo fuerte	Verde	Verde
N1H3T3	Rojo	Rojo fuerte	Rojo, Verde sombras en parte de células	Rojo fuerte	Verde	Verde
Situación tintado (Ver Tabla 5)						
Lineas de células no malignas y cultivos primaries:						
Fibroblastos estromales de médula ósea	Verde	No tintado	Verde	Rojo sucio	Verdoso	Verde
Fibroblastos de quiste mamario benigno	Verde	Rojizo	Violeta	Rojo	Verde	Verde fuerte
Situación tintado (Ver Tabla 5)						
Suspensiones de células:						
Suspensión de células embrionicas	Sin tinte	Sin tinte	Ligeramente sucia Violeta	Rojo sucio	Verdoso	Verde
Células Peritoneales inflamatorias	Sólo las células cebadas tiñeron Rojo	Sólo las células cebadas tiñeron Rojo	Sólo las células cebadas tiñeron Rojo	Sólo las células cebadas tiñeron Rojo	Verdoso	Verde
Hepatocitos de hígado	Sin tinte	Sin tinte	Sin tinte	Rojo	Sin tinte	Sin tinte
Situación tintado (Ver Tabla 5)						

Líquido peritoneal del paciente con carcinoma de ovario::						
células malignas (predominante mente)	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo fuerte	Verdoso	Verde
Limfocitos	mayoría de las células sin teñir, algunas con un ligero tono verde	sin teñir	La mayoría de las células sin teñir, algunas con un ligero tono verde	Rojizo citoplásmic a de color en la mayoría de las células	Parte de las células sin teñir, una parte con el tono ligero Verde	Más células con tono verdoso, el tono es más profundo
Monocitos y Macrofagos	Tinción citoplasmática en gran parte sin teñir	sin teñir	Algunas de las células ligero rojizo	Varios grados de color rojizo	Sin teñir, algo verdoso	Más células verdes tintadas
Células Mesoteliale s	sin teñir	sin teñir	Sin mancha, ligero tono rosa en algunas células	De rojizo a color rojo	sin teñir	Tono verdoso de células
Eritrocitps	Muy débil tono amarillento	Muy débil tono amarillent o	Sin teñir a verdoso o tono rosa	sin teñir a sucio rojizo	sin teñir a muy debil amarillent o	Verdoso débil a verdoso
Escombros y el fondo difuso	sin teñir	sin teñir	Verdoso y rojizo	Rojo	Verde suave	Verde prominente
Situación tintado (Ver Tabla 5)						

Los resultados de estos experimentos fueron indicativos de la función de los diversos componentes del procedimiento de tinción. Mientras que el procedimiento completo produjo la tinción de rojo de células malignas y la tinción de verde, o no tinción, de células normales, la omisión de la etapa de Dahlia demostró que podría haber diferencias significativas en la afinidad de diversos tumores por Light Green, demostrando el hepatoma baja afinidad (no mostrado), mientras que el astrocitoma (Figura 5B5-6), carcinoma 3LL (Figura 5A5-6) y carcinoma CaCo2 (no mostrado) demostraron alta afinidad. Por otra parte, todos los tumores estudiados presentaron una fuerte afinidad por Dahlia, como se enfatiza omitiendo la etapa de tinción con Light Green (Figuras 5A-G, procedimientos 2 y 4 descritos en la Tabla 5 anterior en este documento).

Mientras que muchas células normales se tiñen de verde, algunas células normales dejaron de teñirse significativamente de verde. Este es el caso, por ejemplo, de hepatocitos que mostraron tinción verde muy débil en todos los casos, incluso cuando se omitieron tanto el extracto como el colorante Dahlia (no mostrado). Algunos leucocitos se tiñeron de verde, además de macrófagos y células del estroma.

Los gránulos de mastocitos presentes en peritoneo de rata se tiñeron de rojo, con la técnica de la presente invención (Figura 5F). En ausencia de Dahlia (es decir, procedimientos número 5 y 6 descritos en la Tabla 5 anterior en este documento) no hay evidencia de tinción verde de estos gránulos (Figura 5F).

La omisión de los extractos del procedimiento de la presente invención cambió el resultado global. Cuando se tiñe solo con Light Green se obtuvo un fondo bastante borroso y sucio comprendido principalmente de unión no específica de la tinción a eritrocitos y residuos (procedimiento número 6 descrito en la Tabla 5 anterior en este documento y Figuras 5A6-G6). Cuando se tiñe con Light Green después del tratamiento con el extracto, esta tinción del fondo se suprime (procedimiento número 5 descrito en 5 anterior en este documento y Figuras 5A5-G5). Así, el extracto tiene un efecto de limpieza.

A pesar de este efecto de limpieza, no se previno la tinción verde de otros elementos normales o la tinción verde de algunas poblaciones tumores (es decir, en los procedimientos número 5 descritos en la Tabla 5 anterior en este

documento), en los que se omitió la tinción con Dahlia.

Cuando se tiñe solo con Dahlia (procedimientos número 4 descritos en la Tabla 5 anterior en este documento y Figuras 5A4-G4) se observó un fondo borroso y sucio y fuerte tinción roja de algunas células normales (por ejemplo, hepatocitos). El pretratamiento con extractos de planta suprime esta tinción tanto del fondo como de células no malignas (procedimientos número 2 descrito en la Tabla 5 anterior en este documento y Figuras 5A2-G2).

El procedimiento de tinción completo dio resultados que podrían no haber sido obtenidos usando cualquiera de los protocolos parciales. Los resultados del procedimiento completo incluyeron capacidad muy alta de diferenciar entre células normales y malignas (Figuras 5A1-G1). Debe observarse que la intensidad de la tinción roja en el procedimiento completo tiene algunas variaciones entre diferentes tumores, pero siempre proporcionó los mejores resultados dentro del mismo grupo. La tinción roja más fuerte se obtuvo para hepatoma y la más suave para neuroblastoma (no mostrada).

Con el fin de analizar la eficacia del procedimiento de tinción según la presente invención en especímenes clínicos, se eligieron ocho casos representativos como se indica en la Tabla 7.

TABLA 7

Pacient	Sexo y Edad	Fuente de células	Diagnosis
Bar	M-70	Derrame pericárdico	Carcinoma Metastático
Man	F-90	derrame pleural	Carcinoma de células de transición de la vejiga
Slu	M-65	derrame pleural	Carcinoma de pecho
Vin	F-71	ascitis	Carcinoma
Eiz	F-50	derrame pleural	Carcinoma
Pel	F-40	derrame pleural	Carcinoma de ovario, etapa de diferenciación 4
Zip	F-54	Impresión de un tumor	Sarcoma de Ovario
Zwe	F-7	derrame pleural	Carcinoma

En todos los casos de tumor probados, el procedimiento de tinción según la presente invención proporcionó marcado rojo de todas las células tumorales morfológicamente aparentes, individuales y agrupadas, sobre los portaobjetos. Debe enfatizarse que en el caso de Zwe cantidades grandes de mesotelio reactivo estuvieron presentes sobre los portaobjetos, pero éstas fueron fácilmente distinguidas de células tumorales. Las células de Zip se presentan en la Figura 8.

Los resultados anteriormente descritos sirven para soportar algunas conclusiones importantes referentes a los resultados obtenidos cuando se implementa el procedimiento de tinción según la presente invención en diversos tipos de células. Estas conclusiones se resumen en la Tabla 8, en el presente documento más adelante.

TABLA 8

	Núcleo	Citoplasma
Células malignas		
Células malignas	Rojo/Rosa/Azul	Rojo/Morado
Células no malignas		
Linfocitos	Azul	Azul/Verde
Monocitos	Azul	Verde
Granulocitos	Azul/Verde	Verde/Gris
Eritrocitos	-----	De Incoloro a Verdoso
Macrófagos	Azul/violeta	Verde/Incoloro
Células estromales	Azul	Verde
Mesotelio reactiva	Violeta/Verde	Verde/Incoloro
Células cebadas	Rojo Granulocitos	
Eritrocitos	-----	De Incoloro a Verdoso
Degenerando células		
Degenerando células		Rosa/Azul/violeta

Como se muestra en las Figuras 6A-D, Figuras 9B-D y Figura 10, el procedimiento de tinción de la presente invención no se limita a frotis citológico preparado a partir de líquido, sino que también puede aplicarse a preparaciones de contacto (Figura 10) y a otros tipos de preparaciones de células o de tejido tales como tejido incorporado en parafina (Figuras 6A-D y Figuras 9B-D).

El efecto de la tinción del procedimiento de tinción de la presente invención es sensible al pH durante todas las etapas, que incluyen los reactivos fijadores, tinciones, extractos y agua de aclarado.

El procedimiento de fijación se realiza preferentemente bajo entorno de pH bajo. El pH del fijador 1 y del fijador 2, como se mide antes de la adición del éter, es 1,7 y 1,4, respectivamente. Se encontró que el pH de los extractos de planta era ligeramente ácido, oscilando de 5,5-6,0. En el procedimiento de tinción de la presente invención, el pH óptimo para la tinción con Light Green está dentro del intervalo 3,5-5,0 y para la tinción con Dahlia en el intervalo 3-4. Se observó que el aclarar el portaobjetos después de la etapa de Light Green con PBS (pH 7,4) mejoró los resultados finales. El pH del agua destilada usada para el aclarado estuvo en el intervalo 6,0-6,5.

El procedimiento de tinción de la presente invención no se limita al uso de Dahlia, ya que también pueden considerarse muchas otras tinciones básicas con contraste satisfactorio con el verde. La mayoría de los cambios de la tinción básica requerirán optimización de los tiempos de exposición y concentraciones. Por ejemplo, mezclas de Basic Fuchsin y violeta de metilo proporcionaron resultados satisfactorios. Una disolución de 0,6% de Basic Fuchsin y 0,3% de violeta de metilo en etanol al 20% proporcionó resultados bastantes comparables, sin cambios adicionales en el procedimiento de tinción.

Según Gurr [Gurr, "Encyclopedia of Microscopic Stains" London: Leonard Hill (Books) Limited (1960)], la adición de grupos metilo (o etilo) adicionales convierte Basic Fuchsin y sus componentes en colorantes violetas, que incluyen Dahlia, violeta de genciano, violeta de metilo 6b, cristal violeta, etc. Por consiguiente, el procedimiento de tinción podría realizarse con todos estos derivados de fuchsinas básicas, con ligeros cambios en el rendimiento.

Similarmente, se estudió el efecto de Fast Green como una alternativa a la tinción ácida Light Green y los resultados fueron similares, sin embargo, Light Green es superior. También podría considerarse otra tinción ácida.

Se encontró que el orden de las etapas de tinción del procedimiento de tinción de la presente invención proporcionado anteriormente en este documento (Tabla 1b) daba resultados óptimos. Si en el transcurso de la tinción, usando el procedimiento de tinción para frotis citológico no cervical, se invirtió el orden de la tinción con las tinciones básicas y ácidas (por ejemplo, Dahlia antes de Light Green), el efecto heterocromático por debajo fue menos pronunciado.

El proceso de fijación de dos etapas descrito anteriormente podría sustituirse por un procedimiento basado en agua

de una etapa. El fijador basado en agua comprendió una disolución de 1,2 gramos de ácido tricloroacético (TCA), 4 ml de ácido acético glacial (GAA), 3 ml de formalina, 2 ml de metanol, rellena con agua destilada doble hasta 100 ml. Aunque el procedimiento de dos etapas sugerido anteriormente fue superior a este fijador en términos de resultados de tinción, fue problemático para la práctica clínica rutinaria debido a que se basó en éter.

El tiempo fue lo principal en este procedimiento, y exposiciones por defecto y por exceso podrían producir resultados adversos. Los tiempos sugeridos anteriormente en este documento (Tabla 1b) se seleccionaron como óptimos para la máxima tinción diferencial. La etapa más sensible al tiempo fue la exposición a Light Green, ya que en muchos casos Light Green predominaría con respecto a la tinción básica, incluso en células tumorales, si la exposición a Light Green fue demasiado larga.

EJEMPLO 2

Tinción diferencial de células malignas y no malignas en frotis cervical y frotis de cáncer de mama

Los procedimientos para frotis cervical se desarrollaron en respuesta a resultados de tinción inferiores a los óptimos de frotis fijados en alcohol por el protocolo para frotis no cervicales. Estos frotis incluyeron tanto frotis de Papanicolaou cervicales ginecológicos como frotis de cáncer de mama fijados en alcohol no cervicales.

Estos procedimientos de tinción aprovecharon las propiedades de tinción de los conjugados de marrón de Bismark con ácido pícrico y marrón de Bismark con eosina, aplicando los efectos de los extractos de planta descritos en el protocolo para frotis no cervicales y el mismo proceso de fijación. Los protocolos para frotis cervicales produjeron tinción diferencial de células normales en tonos verdes y células cancerosas en tonos rojos (rojo llama). Además, ambos de estos procedimientos de tinción parecieron ser capaces de detectar la mayoría de los cambios celulares, benignos, malignos y pre-malignos, prevalentes en frotis cervicales. Estos cambios incluyeron: células escamosas atípicas de significancia indeterminada (ASCUS), lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LGSIL) y lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HGSIL), además de neoplasia como se defendió por el sistema de Bethesda (Figuras 12A-G).

Con el fin de evaluar las ventajas del protocolo para frotis cervicales según la presente invención, se prepararon frotis de Papanicolaou de una mujer diagnosticada con lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HGSIL) y se tiñeron con tanto la tinción de Papanicolaou convencional (Figuras 11A-D) como con el procedimiento de tinción según la presente invención (Figuras 11E-H). Las células mostradas en las Figuras 11B y 11D, especialmente 11D, son células no atípicas teñidas de rojo por la tinción de Papanicolaou convencional, precisamente como las células atípicas mostradas en las Figuras 11 A y 11C, haciendo la identificación de células atípicas, especialmente en casos en los que están en bajo número y “que se esconden” entre células normales teñidas de rojo, muy difícil. Al contrario, como es claramente evidente de las Figuras 11 E-H, solo células atípicas se tiñeron de rojo usando el procedimiento de tinción según la presente invención.

En un ensayo clínico que engloba 183 especímenes de frotis de Papanicolaou se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 9):

TABLA 9

	Nº de casos	Diagnóstico convencional incluido
Total	183	
Normal tanto por el procedimiento de la presente invención y por el diagnóstico convencional	150	Normales, inflamatorias, sangrientas de desprestigio, tricomonas y cocobacilos
Los cambios celulares detectados por tanto el procedimiento de la presente invención y por el diagnóstico convencional	25	La metaplasia escamosa, células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), de bajo grado lesión intraepitelial escamosa (LGSIL), de alto grado de lesión intraepitelial escamosa (HGSIL)
Cambios en las células encuentran sólo por el procedimiento de la presente	8	inflamación o normal

Se revisaron los ocho casos de discrepancia; en todos los casos, los portaobjetos convencionalmente teñidos contuvieron atipia que había sido pasada por alto.

Algunos de los casos en los que el procedimiento según la presente invención tiñó positivo, mientras que el diagnóstico convencional mediante interpretación citopatológica de portaobjetos teñidos con tinción de Papanicolaou

dio resultados negativos, se representan en las Figuras 13A-G.

Debe enfatizarse que el procedimiento de tinción según la presente invención no corrige el grado de atipia presente sobre los portaobjetos. Más bien, el procedimiento de tinción se usa para resaltar la presencia de atipia sobre los

Con el fin de demostrar las diferencias entre el protocolo de tinción para frotis no cervical, el protocolo de tinción para frotis cervical y los procedimientos de tinción de May-Grunwald-Giemsa, se tiñeron frotis de Cytospin secados al aire preparados a partir de líquido pleural de un paciente masculino de 65 años de edad diagnosticado con cáncer de mama (Figuras 14A-C) según estos procedimientos. Aunque la tinción global producida usando los protocolos para frotis cervical y no cervical fue bastante similar, aparte de diferencias de color evidentes, el protocolo para frotis cervical pareció poseer propiedades superiores en células individuales.

La Tabla 10 más adelante describe los resultados de tinción usando el protocolo para frotis cervical y frotis no cervical.

TABLA 10

	Núcleo	Citoplasma
<u>Maligno</u>		
células malignas	Azul	Rojo Ardiente
<u>Células No-Maligno</u>		
Limfocitos	Azul	Verde/Gris
Monocitos	Azul	Verde/Gris
Granulocitos	Azul	Verde/Gris
Eritrocitos	Azul	Verde/Gris
Macrófago	Azul	Verde/Gris
células estromales	Azul	Verde/Gris
Reactivo de Mesotelio	Azul	Verde/Gris
Células cebadas	Azul	Verde/Gris
Eritrocitos	Azul	Desde incoloro a Verde
<u>Degenerando células</u>		
degenerando células		Gris/Verde

EJEMPLO 3

Tinción diferencial de células malignas y no malignas en secciones de histología incorporadas en parafina y secciones congeladas

Los resultados obtenidos con secciones histológicas están de acuerdo con aquellos obtenidos con frotis citológicos. Sin embargo, debe enfatizarse que mientras que los frotis citológicos normalmente contienen una variedad muy pequeña de células y tipos de tejidos, una sección de histología representa el alcance completo de tipos de tejidos y células y el distinguir estructuras malignas de normales presenta una tarea más difícil. Las Figuras 9A-D muestran algunos resultados comparativos.

Similarmente, en las Figuras 6A-D, las células de cáncer de colon adyacentes a tejido normal se diferenciaron satisfactoriamente por un color citoplásmico rojo claro y distintivo, a diferencia de un color citoplásmico verde claro y distintivo que indica células normales.

El protocolo de tinción para secciones histológicas dio tinción roja de células neoplásicas malignas, además de alguna neoplasia, hiperplasia, además de displasia teñidas de forma diferente de células normales (véanse las Figuras 7A-C). Las Figuras 6A-D y Figura 7A demostraron que glándulas colónicas con morfología normal se tiñeron de verde, mientras que glándulas colónicas en el campo microscópico de visualización se tiñeron de rojo y rosa (Figuras 6A-D). Similarmente, en las Figuras 15A-C y Figuras 16A-D, las células de cáncer de colon adyacentes a tejido normal se diferenciaron satisfactoriamente por un color citoplásmico rojo claro y distintivo, a diferencia de un color citoplásmico verde claro y distintivo que indica células normales.

Los eritrocitos presentes sobre secciones histológicas se tiñeron de rojo debido al componente de eosina en Azure A. Otros elementos de las secciones, tales como fibroblastos, células endoteliales, componentes de músculo y de la matriz extracelular, se tiñeron de verde, como el tejido escamoso epitelial normal, que rodea la neoplasia.

En otro ejemplo, se tiñó una sección de tejido tomada de un paciente con melanoma usando tinción de hematoxilina-eosina convencional en comparación con el protocolo de tinción de la presente invención. Las Figuras 17A-B demuestran claramente que, aunque ambos métodos permiten la visualización de las células, los componentes celulares y la morfología celular, solo el novedoso protocolo de tinción fue capaz de diferenciar entre células malignas y normales, tiñendo las células normales de verde azulado y las células malignas en rojo distintivo.

Actualmente es evidente que puede obtenerse suficiente diferenciación entre células normales y malignas por el protocolo revisado para frotis no cervical y el protocolo para secciones histológicas en las que solo se usa un extracto de planta (*Ficus elastica*).

EJEMPLO 4

Detección de límites de tejidos malignos

La exigente tarea de la detección de límites de un tejido maligno después de la escisión quirúrgica es de importancia primordial para verificar la completa eliminación del tumor. Es preferible realizar tal diagnóstico durante el procedimiento quirúrgico, particularmente en casos de tumores sólidos que incluyen cánceres de próstata y de colon, melanomas y similares. Normalmente realizada por visualización microscópica de una sección congelada, hay una gran necesidad de mejorar la eficiencia del proceso de detección de límites. El protocolo de tinción de la presente invención puede simplificarse y acelerar la detección de límites, ya que los resultados obtenidos pueden analizarse sin la necesidad de un patólogo especialista. Las Figuras 18A-C demuestran la facilidad de detección de un tumor de glioblastoma en un cerebro de rata usando los métodos de la presente invención (Figura 18C), en comparación con su visualización bien con tinción de Gimsa (Figura 18A) o bien con métodos convencionales de hematoxilina-eosina (Figura 18B).

EJEMPLO 5

Discriminación entre etapas de diferenciación

Se seleccionaron células embrionarias como un ejemplo de tejido con rápida capacidad de proliferación asociada a la progresión del desarrollo normal de la etapa fenotípica no diferenciada con respecto a la terminalmente diferenciada. Las Figuras 19A-D muestran secciones de retina de embrión de pollito en diferentes etapas de diferenciación y demuestra que la tinción usando el novedoso protocolo está asociada al estado metabólico general de las células. El estado metabólico es mucho mayor en las células no diferenciadas y se tiñen distintivamente de rojo, mientras que las células terminalmente diferenciadas se tiñen distintivamente de verde. Se muestra claramente que las células que no se diferencian presentan un patrón de tinción rojo y a medida que las células progresan a través de la diferenciación y se vuelven menos proliferativas, se tiñen de verde.

EJEMPLO 6

Uso de las enseñanzas de la presente invención para distinguir entre células en sistemas de células in vitro

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

La siguiente sección de materiales y procedimientos experimentales se refiere al Ejemplo 6 al Ejemplo 12 detallados en el presente documento más adelante.

Procedimientos de tinción:

La Tabla 11 más adelante proporciona procedimientos para tinción general según la presente invención:

TABLA 11

5	<u>I - Protocolo para corte histológico / tejido embebido en parafina</u>	<u>II - Protocolo para la tinción de colonocitos normales y HT29 en la cámara de diapositivas</u>
10	Tejido incluido en parafina en un portaobjetos (4 micras) desparafinación en dos baños de xileno, 1 minuto cada una.	Revestimiento de conseguir cultivo confluyente Incubar con extracto de 30 segundos. Lave en agua desionizada 30 seg. Tinte-6- 1 min.
15	Limpia en dos baños de etanol consecutivos, a 1 minuto cada uno. Incubar en Fix-2B durante 10 min. Incubar en Fix-102B durante 5 min.	Lavar en agua corriente
20	Lave en agua desionizada durante 1 min. Incubar en Tinte-1 durante 1,5 minutos.	50% EtOH - 3 salsas (corto) Lavar en agua corriente
25	Lavar en agua corriente durante 1 min. Incubar en Ext-2 durante 3 min.	Tinte -7 1 min. 40 seg.
30	Lave en agua desionizada durante 15 segundos Incubar en Tinte-2 durante 2 minutos.	
35	Lave en agua desionizada durante 30 segundos Incubar en etanol al 70% durante 15 s. Incubar en Tinte-3 durante 5 minutos.	
40	Lave en agua desionizada durante 15 s.	
45	Incubar tres veces en 70% y tres veces etanol al 100% de ida y vuelta para un total de 40 seg. Enjuagar en agua destilada	
50	Incubar en Tinte-4 durante 10 min.	
55	Lave en agua desionizada durante 15 s.	
60	Incubar tres veces en 70% y tres veces etanol al 100% de ida y vuelta para un total de 30 seg. Enjuague con agua destilada.	
65	Incubar en Tinte-5 durante 5 segundos.	
	Lave en agua desionizada durante 15 s.	
	La deshidratación en tres veces 70% de etanol, 10 segundos cada Clear en 9 cuartos de baño consecutivos de etanol absoluto, 5 segundos en cada	
	Borrar tres veces en xileno, 1 minuto cada uno	
	Monte en Eukitt	
50	<u>III - Protocolo básico para la tinción HT29 en múltiples pocillos</u>	<u>IV - Protocolo para la tinción Rat2-Ras</u>
55	placas y HTS robot	- Incubar con extracto (40%, baño optimizado tal como se describe a continuación) 30 sec. - Lavar con agua corriente 3 veces durante 5 segundos.
60	-Extracto (50%, baño optimizado tal como se describe a continuación) 30 sec.	- Tinte-9-7 min.
65	- Lavar con agua desionizada	- Lavar con agua corriente 3 veces
	- Tinte-8 - 7 min.	- Dip en el 50% de EtOH - Lavar en agua corriente para repetir el ciclo 3-5 veces
	- Lavar con agua desionizada	
	Diferenciación en el 50% EtOH + 1 mM HCl - remojo 1 min.	
	- Lavar con agua desionizada	
	- Tinte-7 - 9 min	
	- Lavar con agua desionizada dos veces	
	<u>V - Protocolo básico para la tinción de células K562</u>	<u>VI - Protocolo básico de esfuerzo-60 HL celular</u>
	- Las células se prepararon y se sembraron según el protocolo	- Citospines se prepararon a densidad de 100 000 células / anillo

5	- Extracto - 1 min. - Lave en agua, 4 tiempos - La tinción con tinte-9-4 min. - Diferenciación, etanol una vez en 50% - Lave en agua, 4 tiempos - Tinte-7 - 6 min. - Lave en agua, 3 veces	- Incubar con extracto (50%; baño optimizado tal como se describe a continuación) 30 sec. - Lavar con desionizada 10 seg. - Tinte-9-6 min. - Lavar con agua corriente 10 seg. - 50% de EtOH - 20 inmersiones - Lavar con agua 10 seg, - Tinte-7 - 6 min - Lavado brevemente en agua corriente
10		
15	<u>VII - Protocolo básico para la tinción de células U937</u> - Las células se sembraron a una densidad de 250 000 células / cámara de - Incubar con extracto (40%; optimizado-lote tal como se describe a continuación) 30 sec. - Lavar con agua corriente 30 seg. - Tinte-9-4 min. - Lavar con agua corriente 10 seg. - 50% de EtOH - 4 inmersiones - Lavar con agua corriente 10 seg. - Tinte-7 - 3 min. - Lavado brevemente en agua corriente	<u>VIII - LG rápida Ensayo (para la purificación)</u> - Disponer células en placas de múltiples pocillos para obtener cultivo confluyente - Incubar con extracto o fracciones (100-0% en el 70% EthOH) 4 min. - Lavar con agua corriente 4 veces - Tinte-7 - 1 min. - Lavar con agua corriente - La interpretación se realizó de acuerdo con el procedimiento, descrito en el texto
20		
25		
30	<u>IX - Protocolo básico para la visualización de fluorescencia extracto en células fijadas</u> - Células de la placa sobre el cubreobjetos en medio sin indicador, al final del período de lavado de incubación con medio sin suero y el indicador y secar al aire - 2 minutos. incubación en 70% EtOH - 1 minuto. incubación en 70% EtOH - Seque el EtOH extra con un papel absorbente - 1 minuto. la incubación con 100% de extracto crudo o fracción purificada - Lavar el portaobjetos con agua corriente dos veces - Busque en el microscopio utilizando filtro FITC o TRITC.	<u>X - Protocolo 2 de la sección histológica / tejido embebido en parafina</u> - Tejido incluido en parafina en un portaobjetos (4 micras) - Desparafinación en tres baños Xileno, 5 minutos cada uno - Limpiar en tres baños de etanol consecutivos, 5 minutos cada uno - Incubar en Tinte-1 durante 3 min. - Lavar con agua corriente durante 5 min. - Incubar en Ext-2 durante 5 min. - Lavar con agua desionizada durante 30 segundos. - Incubar en Tinte-2 durante 2 min. - Lavar con agua desionizada durante 1 min. - Incubar en etanol al 70% durante 2 min. - Lavar con agua desionizada durante 15 s. - Incubar en Tinte-3 durante 3 min. - Lavar con agua desionizada durante 15 s. - Incubar tres veces en 70% y tres veces 100% etanol de ida y vuelta para un total de 1 min. - Enjuagar en agua destilada - Incubar en Tinte-10 durante 2,5 minutos. - Lavar con agua desionizada durante 15 s. - La deshidratación en tres veces 70% de etanol, 5 segundos cada uno - Claro en 9 baños consecutivos de etanol absoluto, 5 segundos en cada - Borrar tres veces en xileno, a 1 minuto cada uno. - Montar en Eukitt
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

Protocolo de agar blando:

Se calentó 20% de medio de suero en un baño a 48 °C. Se fundió 5% de agar en un microondas durante 2 min, se dejó que se enfriara a TA durante 10 min y se dispuso en baño de H₂O a 48 °C. Se preparó dilución 1:5 de agar en medios precalentados para una concentración final de 1% de agar. Se vertieron 1,5 ml de agar en placas de 35 x 10 mm (Greiner, cat nº 627102) y se dejó que las placas solidificaran a TA durante 10 min. Las placas se dispusieron en una estufa de incubación (37 °C, 5% de CO₂) para ajustar al pH apropiado. Se prepararon diluciones de agar en medios precalentados para una concentración final del 0,3%. Las células tratadas se tripsinaron y se resuspendieron a una concentración de 10.000 células/50 - 100 µl/placa. La viabilidad celular se verificó con azul de tripano. Se añadieron rápidamente suspensiones de células al agar, se invirtieron suavemente 2-3 veces (con el fin de suspender las células uniformemente) y a continuación se vertieron (1,5 ml de agar + suspensión de células) encima de cada placa previamente vertida con 1% de agar. Las placas se enfriaron a TA durante aproximadamente 10 min, se dispusieron en una estufa de incubación (37 °C, 5% de CO₂), se añadieron 200 µl de 20% de medio de suero a las células cada 3 días.

Protocolo experimental de ratones sin pelo:

Se incubaron células H29 durante tres días con genisteína 100 microM, 5 FU 10 microM, butirato 5 nM, N-metilformamida (NMF) 30 microM, ácido fólico 30 microM o medio solo. En el cuarto día, las células se recogieron y se diluyeron a una concentración final de 5×10^6 células en 0,2 ml de PBS. Inmediatamente tras la dilución, células HT29 de cada grupo de prueba se inyectaron subcutáneamente en el lado dorsal de 10 ratones sin pelo (0,2 ml de 5×10^6 células por ratón). Durante el periodo de ensayo se registraron el tamaño del tumor y el peso corporal de los ratones dos veces a la semana. El volumen del tumor (mm³) se estimó según la fórmula: Longitud (mm) x [Anchura (mm)]² x 0,5.

Procedimiento de cribado HTS:

Día 1 – Las células se sembraron en placa: Se prepararon los medios, se tripsinaron las células, se contaron y se diluyeron en medios. La concentración de siembra de las células fue 5000 células por pocillo.
Día 2 - Adición de biblioteca. El compuesto se diluyó a una concentración de trabajo final: a partir de disolución madre de DMSO hasta concentración de tratamiento 30 microMolar en el medio de crecimiento, “medio del día 2”.
Día 3 – Cambio del medio de células. El medio se sustituyó por el “medio del día 2”.
Día 4 – Cambio del medio de células. El medio se sustituyó por el “medio del día 2”.
Día 5 – Las células se lavaron con medio y se secaron al aire

Transfección estable de líneas celulares Rat1/Rat2:

Se sembraron células Rat1 o células Rat2 (diferentes clones de la misma línea) a 250.000 células/pocillo (placa de 6 pocillos) el día antes de la transfección. El día de la transfección, la densidad del cultivo fue del 80 - 90% de confluencia. Se realizó transfección con polietilenimina (PEI). Se preparó disolución madre de PEI en agua: 10 mM (4,5 mg/10 ml) a pH 7,4. **Disolución I** – Se mezclaron microL de PEI en 50 microL de NaCl 150 mM y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 5 min. **Disolución II** – Se prepararon 2 microg de ADN en 50 microL de NaCl 150 mM, se mezclaron y se incubaron durante 5 min a TA. Las disoluciones I y II se mezclaron y se incubaron durante 20 min a TA (mezcla de transfección). El volumen de mezcla se ajustó a 1 ml con medio de transfección (antibiótico y medio sin suero). Se lavaron células de rata con medio de transfección, se añadió mezcla de transfección a las células durante 4 horas. Al final del periodo de incubación, el medio se sustituyó con el medio de crecimiento completo.

Preparación del sistema de K562:

Se sembraron células K562 en un matraz de 75 ml con 20 ml de medio RPMI 1640 completo a una concentración de 50000 células/ml durante 4 días en una estufa de incubación. El medio de célula se sustituyó después de 48 h. Después de 96 h de incubación, las células K562 se centrifugaron y se resuspendieron en medio libre de suero a una concentración de 10^6 células/ml. Se sembraron 100 microlitros de células en placas de 96 pocillos, se recubrieron preliminarmente con 0,01% de poli-L-lisina y se incubaron durante 2 h hasta que las células se unieron al fondo de los pocillos. Se aspiró el medio de cultivo y las placas se secaron al aire abiertas durante al menos 12 h. Se llevó a cabo ensayo de hemoglobina con 10^5 células lavadas en PBS, se lisaron en agua por congelación y se descongelaron 3 veces. Se enviaron 100 microL de lisado celular al ensayo de bencidina.

Prueba de nitroazul de tetrazolio (NBT):

Se incubaron 1×10^6 células en 1 ml de medio de crecimiento celular a 37 °C durante 30 min en presencia de 0,1% de cloruro de nitroazul de tetrazolio (Merck) y 100 ng de miristato-acetato de forbol (PMA, Sigma). Después de la incubación, las células se centrifugaron en Cytospin y los portaobjetos se tiñeron con tinción de May-Grunwald-

Giemsa (Sigma). Las células se puntuaron para la presencia de gránulos de formazano azules-negros.

Reactivos:

- 5 Genisteína, Sigma Cat. no. G-6649, ácido fítico, Sigma Cat. no. P-3168, SFU, Sigma Cat. no. F-6627, ácido
butírico, Sigma Cat. no. B-5887, NMF, Aldrich Cat. no. 473936, PD 98059, Calbiochem Cat. no. 513000
ChemBridge Corporation -- <http://www.chembridge.com>
Construcciones de ADN – Clontech Cat. no. K 6013-1 (conjunto de vector negativo dominante en Ras)
Polietilenimina (PEI) Aldrich Cat. no. 40872-7,
10 Base libre de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma Cat. no. T2885
Mesilato de imatinib Gleevec™, Novartis
Ácido all-trans-retinoico (ATRA), Sigma Cat. no. R2625
IFN-gamma humana recombinante, Bender MedSystems. Se preparó disolución madre de 100 microg/ml en
agua destilada. La actividad específica de IFN-gamma es 2×10^7 NIH Gg 23-901-530 unidades/mg.
15 Disolución de hematoxilina de Gill Nº 3, Surgipath Cat. no. 01540
Azure A, SIGMA Cat. no. A-6270
Marrón de Bismark R, Sigma Cat. no. B-7758
Eosin Yellow certificada Sigma Cat. no. E43 87
Floxina, floxina-B Sigma P403 0
20 Light Green, SF Yellowish, Merck I, 15941
New Fuchsin (CI 42520; Basic Violet 2), Sigma N-0638
Sistema de portaobjetos con cámaras Lab-Tek - Lab-Tek, Nalge Nunc International, 177402

Líneas celulares:

- 25 Todas las líneas celulares se compraron de ATCC y se trataron según las instrucciones de la ATCC.

CCD-33CO, colonocitos primarios normales, medio Eagle MEM:

- 30 450 ml de medio Eagle MEM, Biological Industries (BI cat. no. 01-040-1A), 5 ml de PSA/PS, 5 ml
de L-glutamina, 5 ml de piruvato de Na, 50 ml de FCS.
HT-29, adenocarcinoma colorrectal humano, medio de Mmloy, glutamina 1,5 mM, 450 ml de medio
Mmloy's 5an, 5 ml de PSA/PS, 50 ml de FCS.
35 **Rat2**, medio DMEM: 450 ml de medio DMEM HG (BI cat. no. 01-055-LA), 5 ml de 20 PSA/PS, 5 ml
de L-glutamina, 50 ml de FCS.
K562, leucemia mielógena crónica (LMC), medio RPMI 1640: 450 ml de medio RPMI 1640 (BI cat. no. 01-
104-1A), 5 ml de PSA/PS, 5 ml de L-glutamina, 50 ml de FCS.
40 **HL-60**, se mantuvieron células de leucemia promielocítica aguda en medio Dulbecco modificado con Iscove
(400 ml de medio Dulbecco modificado con Iscove (BI cat. no. 01-058-1A), 5 ml de PSA/PS, glutamina 4
mM, 100 ml de FCS (20%). **U937**, se mantuvieron linfoma histiocítico en RPMI 1640 complementado con
HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM, 4,5 g/l de glucosa y 10% de suero bovino fetal.
45 **MCF-7**, adenocarcinoma; glándula mamaria. La línea celular se mantuvo en medio DMEM.

Disoluciones de tinción y fijadores:

- 50 **FIX 2B** - 8% de ácido tricloroacético (TCA), 8% de ácido acético glacial (GAA), 4% de formaldehído, 4% de
metanol, 30% de etanol y 46% de éter.
FIX 102B - 8% de ácido tricloroacético (TCA), 7% de metanol, 9% de GAA, 7% de formaldehído y 69% de agua
destilada doble.

Colorantes:

- 55 **Hematoxilina de Gill (Colorante-1)** - Una disolución lista para uso de hematoxilina de Gill Nº 3.
Azure (Colorante-2) - Se preparó el colorante de anilina Azure-A mezclando 0,25 gramos de Azure con 50 ml
de etanol y 50 ml de agua destilada doble.
Conjugado de marrón de Bismark-eosina (Colorante-3) - Se preparó mezclando Colorante-B y Colorante-C.
60 La mezcla se hirvió durante 3 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un
papel de filtro. El filtro se dejó secar y se lavó con 250 ml de etanol absoluto. Se retiró el filtro y se usó la
preparación.
Conjugado de marrón de Bismark-floxina (Colorante-4) - Se preparó mezclando Colorante-A y Colorante-B.
La mezcla se hirvió durante 20 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un
papel de filtro. El filtro se dejó secar y se lavó con 250 ml de etanol absoluto. Se retiró el filtro y se usó la
65 preparación.

Light Green 4% de (Colorante-5) - Se usó el colorante de anilina Light Green 4% como tinción general en el protocolo para secciones histológicas. El colorante de anilina se preparó mezclando 4 gramos de Light Green con 70 ml de etanol y 30 ml de agua destilada doble.

Floxina (Colorante-A) - El colorante de anilina floxina se usó para la tinción de tejido incorporado en parafina. El colorante de anilina se preparó mezclando 1,5 gramos de floxina con 200 ml de agua destilada doble y 50 ml de etanol.

BBr (Colorante-B) - El colorante BBr se preparó disolviendo 2 gramos de marrón de Bismark R en 50 ml de etanol y 200 ml de agua destilada doble.

Eosine Yellow (Colorante-C) - Se mezclaron 0,26 gramos de tono de Eosine Yellow con 15 ml de 100% de etanol y 35 ml de agua destilada doble.

New Fuchsin (Colorante-6) - Se preparó 0,4% de disolución en 33% de EtOH

Light Green 4% (Colorante-7) - Se preparó 4% de disolución en 20% de EtOH

New Fuchsin (Colorante-8) - Se preparó 0,4% de disolución en 33% de EtOH

New Fuchsin (Colorante-9) - Se preparó 0,5% de disolución en 20% de EtOH. El pH se ajustó a 5,7.

Light Green 4% (Colorante-10) - Se usó el colorante de anilina Light Green 4% como tinción general en el protocolo para secciones histológicas. El colorante de anilina se preparó mezclando 4 gramos de Light Green con 100 ml de agua destilada doble.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Este enfoque se ha modificado para soportar experimentos *in vitro* en los que participaron células fijadas individuales, en vez de muestras de tejido. Se construyó un sistema de modelo que representa tejido normal frente a maligno usando colonocitos normales primarios (CCD-33CO) y adenocarcinoma colorrectal humano (HT-29). Con el fin de obtener la tinción diferencial en este sistema modelo se requirieron ciertas modificaciones del protocolo de tinción usadas para muestras histológicas (Protocolo II). La tinción resultante (Figuras 20A-C) discriminó claramente entre fenotipos celulares normales (verde, Figura 20A) y malignos (rojo, Figura 20C). Se han realizado varias pruebas relacionadas con el fenotipo para verificar los fenotipos normales y normales de estas células. La densidad de saturación de células normales fue mucho más baja que la de las células malignas, probablemente debido a la inhibición del contacto (Figuras 20A-B y no mostrado), la diseminación de células normales fue más importante en comparación con el homólogo maligno (Figuras 20A-B) y, además de esto, HT-29 poseyeron profundas capacidades de formación de focos en agar blando (Figura 21).

EJEMPLO 7

Uso de los métodos y compuestos descritos por la presente invención para el descubrimiento de fármacos

Habiendo desarrollado un protocolo de tinción capaz de teñir diferencialmente fenotipos normales y transformados, los presentes inventores demostraron en el presente documento la capacidad de usar este método de tinción para detectar cambios fenotípicos de células malignas. Se informó en la bibliografía que varios compuestos químicos produjeron la normalización del fenotipo celular y se eligieron diferentes actividades/mecanismos celulares representativos. Ejemplos de estos compuestos químicos son butirato de sodio [Newmark et al, Cancer Lett (1994) 78: 1-5] y genisteína [Barnes, J Nutr (1995) 125 (3 Suppl):77S-783S Is].

El butirato de sodio induce la diferenciación y normalización del fenotipo celular inhibiendo la actividad de la histona desacetilasa [Parker et al., J Biol Chem (1986) 261: 2786-2790], mientras que la genisteína es un potente inhibidor de tirosina cinasas [Barnes, J Nutr (1995) 125 (3 Suppl):77S-783S Is]. Como se demuestra en el presente documento, células HT-29 nativas se tiñeron de rojo, mientras que células eficazmente tratadas con estos compuestos se tiñeron de verde/azul, pero siguieron siendo viables durante todo el experimento (usando el Protocolo II).

Con el fin de facilitar la cuantificación del grado de cambio de color, y como es evidente que las células contienen una mezcla de colorante rojo y verde, se desarrolló una medición que representaba la relación de densidad óptica medida en el espectro del colorante rojo (DO_{Rojo}) y la densidad óptica medida en el espectro del colorante verde (DO_{Verde}). Esta relación, indicada R, demostró ser una herramienta útil y simple: Células malignas presentan valores de R superiores o iguales a 1, mientras que células normales presentan valores de R inferiores a 1.

Las Figuras 22A-D y Figuras 23A-C muestran el resultado del cribado de fármacos para fenotipo en HT29 (células de carcinoma de colon humano) tratadas con concentraciones crecientes de butirato de sodio para inducir la diferenciación de células malignas. El tratamiento con butirato produjo la reducción en el número de células y cambios morfológicos asociados a la diferenciación y cambio de fenotipo. Los cambios fenotípicos se detectaron por medio de cambios en el color graduales, dependientes de la concentración y del tiempo, de rojo (malignas) a azul/verde (normales). Se obtuvo un cambio de color similar después del tratamiento con genisteína (Figuras 24A). Estuvieron presentes tres tipos de resultados en las Figuras 24A-C: tipo tinción (Figura 24A), cuantificación de los resultados de tinción (Figura 24B) y el efecto del tratamiento sobre el número de células (Figura 24C). Como se demuestra en las Figuras 24A-C, como resultado del tratamiento con genisteína, hubo un evidente desplazamiento dependiente de la dosis en el tipo de tinción celular: de tinción roja a tinción verde/azul, que no pudo explicarse por

la reducción del número de células (Figura 24C).

EJEMPLO 8

5 Validación usando ensayos funcionales

Las validaciones bioquímicas del fenotipo celular son herramientas altamente valiosas, sin embargo, frecuentemente padecen una falta de amplitud a través de diferentes sistemas celulares y a través de diferentes vías de diferenciación. Mientras que la fosfatasa alcalina es un marcador razonable para la diferenciación de borde en cepillo de células de colon [Matsumoto et al., Gastroenterology (1990) 98(5 Pt 1):1199-207], tiene poco valor en otros sistemas de células, además de en otras vías de diferenciación. Similarmente, la producción de hemoglobina, que es una clara característica de células hematopoyéticas normales [Clarke et al., Blood (1982) 60:346-351; Constantinou y Huberman, Proc Soc Exp Biol Med (1995) 208 (1):109-15] se inhibe altamente en células hematopoyéticas malignamente transformadas. Tan valioso como este marcador es en sistemas hematopoyéticos, no tiene valor como marcador en la mayoría de otros sistemas de células. Así, aunque hay una ausencia de marcadores químicos de amplio alcance, hay varios enfoques clásicos que permiten la evaluación funcional del fenotipo transformado. Entre los enfoques clásicos más comúnmente usados se incluyen agar blando, que valida el crecimiento independiente del anclaje de células malignas, y modelos animales, que ensayan la posible formación de tumor de células malignas en ratones inmunosuprimidos [Alberts et al, Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York y London, c (1994)]. Los presentes inventores usaron estos enfoques clásicos para validar los resultados informados anteriormente. El comportamiento en agar blando (Figura 21) y ratones sin pelo (Figura 25) se estableció estudiando la función de células pre-tratadas con diferentes compuestos. Los compuestos se clasificaron según su capacidad para generar diferentes respuestas en el ensayo de tinción presentado anteriormente. Un grupo poseyó la capacidad de afectar un cambio de color de rojo a verde, mientras que el otro grupo no poseyó esta capacidad para cambiar el tipo de tinción de rojo a verde. Se especuló que algunos compuestos pueden afectar un cambio transitorio en vez de estable de fenotipo y esto influiría en los resultados obtenidos en agar blando y en experimentos en ratones sin pelo. Los presentes inventores probaron la capacidad de estos compuestos para afectar un cambio sostenible estable de fenotipo tratando las células y observando las células después de la retracción del tratamiento con butirato de sodio (Figuras 26A-E). En el caso de genisteína, el tipo de tinción normal estuvo presente durante un largo tiempo después de la retracción del compuesto de las células y este comportamiento contribuyó aparentemente al fenotipo normal observado en agar blando (Figura 21) y tumorigenicidad mínima en los ratones sin pelo e incluso hasta 30 días no se detectaron tumores en estos animales (Figura 25). En cambio, el butirato de sodio causó una retracción transitoria en el cambio de color que causó un regreso de la tinción de color rojo en el plazo de cuatro días (Figuras 26A-E). Como era de esperar, las células tratadas con butirato de sodio se comportaron de un modo de acuerdo con el fenotipo transformado tanto en agar blando como en el modelo animal (Figuras 21 y 25, respectivamente). La correlación entre estos resultados se resume en la Tabla 12 a continuación.

TABLA 12

Tratamiento	Ensayo de tinte	Agar suave (colonias)	Tumorigenicidad
Control	Negativo (Rojo)	+	Tumores
PA Ácido Fítico	Negativo (Rojo)	+	No determinado
5FU	Positivo (Verde)	-	Inhibición parcial
Genisteína	Positivo (Verde, larga duración)	-	No inhibición
Butirato de sodio	Positivo (Verde, corta duración/transitorio)	+	No inhibición
NMV N-metilformamida	Negativo (Rojo)	+	No inhibición

En resumen, como se demuestra en el presente documento, mientras que los resultados de la tinción indican que el fenotipo se ha afectado, este cambio puede ser tanto transitorio como terminal. Si el cambio es transitorio, la funcionalidad de las células en agar blando o en ratones sin pelo puede estar algo impedida, pero con el tiempo el comportamiento simulará al del fenotipo transformado.

EJEMPLO 9

Uso de los métodos y compuestos descritos por la presente invención en cribado de alto rendimiento

Basándose en los informes previos, los presentes inventores generaron la posibilidad conceptual de usar este enfoque como arquitectura para el descubrimiento de fármacos; la prueba industrial de grandes cantidades de compuestos para actividad biológica deseada. El método de tinción sugerido anteriormente permite la detección de compuestos no citotóxicos, también comúnmente conocidos como agentes reguladores del cáncer. Estos tipos de compuestos conducen a la mejora del fenotipo celular maligno/transformado.

La implementación práctica de este concepto se completó usando placas de 384 pocillos y un sistema de manipulación de líquidos en el cribado de grandes conjuntos químicos. Con el fin de tratar la posibilidad de que algunos de estos compuestos pudieran ser citotóxicos y así hacer la medición de la relación (R) poco fiable, los presentes inventores desarrollaron una medición del grado de citotoxicidad del compuesto.

El uso de dos colorantes dentro del protocolo de tinción dio un perfil de absorbancia distinto que lo hizo factible para leer a dos longitudes de onda diferentes y usar ambos resultados de salida para la evaluación. La absorbancia del colorante rojo New Fuchsin (NF) se leyó a 560 nm y la absorbancia del colorante verde Light Green (LG) se leyó a 630 nm. Ambos se leyeron simultáneamente en un lector de placas de espectrofotómetro. La salida de datos sin procesar se transformó y analizó automáticamente.

Como tanto los colores verde como rojo contribuyeron a la diferenciación de color fenotípica, se creó un índice de tumor maligno usando la relación de NF/LG. El cociente de 1 se usó como el corte para distinguir entre el fenotipo maligno y el fenotipo normal. Las células malignas se tiñeron de rojo y, por tanto, tuvieron un índice de tumor maligno superior a 1. Las células normales o células diferenciadas se tiñeron de verde y, por tanto, tuvieron un índice de tumor maligno inferior a 1 (véase la Figura 23C).

El número de células en cada pocillo también tuvo significancia en la evaluación de los resultados. Con el fin de eliminar la falsa interpretación, cuando números de células muy bajos dan valores de lectura del fondo, que pueden ser malinterpretados cuando se calculan como el índice de tumor maligno, fue necesaria una estimación del número de células. Por tanto, se usó la suma de NF + LG (es decir, DORojo + DOVerde) como estimación para el número de células en un pocillo y se normalizó a ésta, usando control no tratado. Éste se basó en el hecho de que estas células se tiñeron tanto de rojo como de verde y la suma de ambos reflejó la presencia global de células en el pocillo. Experimentos en los que células en diferentes densidades se sembraron mostraron linealidad de la suma de los colorantes en el intervalo relevante (datos no mostrados).

Brevemente, se cribó una biblioteca química de moléculas pequeñas (ChemBridge Corporation) a concentración inicial 30 micromolar de los compuestos. Las células HT-29 se sembraron, se trataron durante 4 días con diferentes compuestos y al final del proceso se tiñeron usando el protocolo (II).

Una herramienta de análisis basada en Excell formateada automática analiza los resultados. Se pronunció un acierto de cambio de fenotipo cuando un compuesto dio una relación de NF/LG inferior a 1, pero tuvo un valor de la suma de NF + LG superior a 0,2. Se pronunció un acierto citotóxico cuando la suma de NF + LG fue inferior a 0,2. Los aciertos podrían visualizarse incluso a simple vista (Figura 27A).

El cribado de la biblioteca ChemBridge, de 55.120 moléculas tipo fármaco pequeño, produjo 248 (0,45%) aciertos en el cribado primario, de los que 32 aciertos (0,06%) fueron activos en las concentraciones nanomolares sobre la línea celular HT-29 (Figura 28). 6 de aquellos compuestos fueron elegidos para ser adicionalmente validados. Aunque esta biblioteca se ha cribado numerosas veces antes, estos compuestos nunca fueron detectados como cabezas de serie contra el cáncer en otros ensayos. Se validó la actividad de aciertos por un ensayo repetido. Todos los aciertos fueron positivos por segunda vez. Se probó el intervalo de actividad usando una curva de respuesta a dosis usando el mismo ensayo colorimétrico (Fig 27B).

Los resultados de este cribado se representan en la Figura 28. Como muestran los resultados, el cribado dio lugar a tres prototipos distintos de respuestas para un nivel dado de concentración de compuesto: efecto tóxico/estático, cambio de fenotipo (basado en el cambio de color de rojo a verde) y sin cambio obvio de fenotipo (tinción roja). La subpoblación de compuestos capaz de afectar un cambio de color de células, sin inducir una respuesta altamente tóxica como se mide por el número de células en el pocillo, es de gran interés como posibles candidatos a fármaco, ya que se ha mostrado que la tinción verde se correlacionó con la tumorigenicidad de células. Los compuestos que muestran gran efecto estático/tóxico deben volver a comprobarse a menor concentración con el fin de determinar si hay una menor concentración a la que el fenotipo cambia a menores niveles de citotoxicidad.

EJEMPLO 10

Uso de los métodos y compuestos de la presente invención para la validación de dianas

Los resultados anteriores demuestran la capacidad de este método de tinción para determinar cambios de fenotipo que se han producido en células malignas. Además, los resultados también han mostrado que este método tiene utilidad en determinar cambios fenotípicos en células normales; una característica altamente deseable en el campo de validación de dianas. Este sistema se construyó basándose en células Rat1 o Rat2. Se derivaron clones, que expresan establemente vector de expresión vacío (Vec), no mutante de Ras (Ras-vec) y forma oncogénica de Ras (Ras-V12) (Figura 29) y se caracterizaron por transferencia Western (no mostrada), organización citoesquelética (no mostrada) y el comportamiento en agar blando (según la Tabla 13 y las Figuras 30A-B). Se usaron células SVT2 como control positivo para el crecimiento independiente del anclaje [Simcha et al., J Cell Biol (1996) 133(1):199-209]. Así, se confirmó la capacidad previamente informada de Ras-V12 para transformar células e inducir la formación de colonias en agar blando [Egozi et al., Int. J. Cancer (1999) 80:911-918].

TABLA 13

Línea de célula basada en Rat2	Vec		Ras Vec		Ras V12		SVT2	
Número de células en plato	250	1000	250	1000	250	1000	250	1000
Número de colonias	1	1	17	32	25	72	219	~800
Tamaño de colonias	Pequeño (S)		Pequeño(S)		Largo (L)			

La capacidad del extracto en bruto para tefir células Rat1 Ras se resumió en la Tabla 14, en la que la capacidad de tinción se correlaciona directamente con la concentración del extracto.

TABLA 14

70 % EtOH		100 % Ext		50 % Ext		25 % Ext		12 % Ext		6 % Ext	
0.876	0.914	0.117	0.126	0.141	0.135	0.285	0.248	0.395	0.402	0.637	
0.861	1.017	0.114	0.133	0.180	0.185	0.365	0.286	0.517	0.479	0.671	
0.867	1.090	0.135	0.181	0.193	0.158	0.309	0.340	0.555	0.535	0.742	
0.848	1.081	0.126	0.140	0.155	0.159	0.282	0.272	0.514	0.589	0.681	
0.852	1.075	0.148	0.136	0.185	0.167	0.319	0.298	0.505	0.526	0.764	
0.870	1.075	0.141	0.177	0.182	0.188	0.296	0.333	0.556	0.478	0.754	
0.879	0.975	0.142	0.140	0.177	0.164	0.310	0.350	0.467	0.510	0.722	
0.840	0.852	0.130	0.142	0.141	0.125	0.247	0.291	0.372	0.412	0.510	
0.862	1.010	0.132	0.147	0.169	0.160	0.302	0.302	0.485	0.491	0.685	Resultado

EJEMPLO 11

Uso de los métodos y compuestos descritos por la presente invención en el desarrollo de sistemas de descubrimiento de fármacos de vía completa

Los presentes inventores usaron el conjunto de clones creados para validar la tinción usando el protocolo (IV). Como era de esperar, células fenotípicamente normales parecen ser verdes (Figuras 31A-B, Rat2) y células fenotípicamente malignas/ transformadas parecen ser rojas (Figuras 31C-D, Rat2 Ras-V12).

Una de las vías de transducción de señales mejor elucidadas es la iniciada por Ras, en la que MAPKK desempeña una función focal. Se ha informado [Duesbery et al., PNAS (2001) 98(7):4089-4094] de la posible parada de la transformación inducida por Ras previniendo la actividad de MAPKK. PD98059 es un potente inhibidor químico que posee esta actividad. Se esperó, basándose en informes previos [Duesbery et al., PNAS (2001) 98(7):4089-4094], que la incubación de células Ras-V12 con PD98059 cambiaría el fenotipo maligno a un fenotipo de célula normal. Como se muestra en las Figuras 32A-D, la tinción roja de células malignas/transformadas (Figuras 32A-B) se sustituyó por la tinción verde en células normalizadas (Figuras 32C-D).

Otras vías de señalización pueden implicar Ras, por tanto, la sensibilidad de la vía de transducción de señales del cribado de fármacos para fenotipo se evaluó en el sistema Rat1-Ras. Intervenciones químicas en la vía de señalización por inhibidor de farnesilación (HR12, Figura 33B) o por inhibidor de MAPK (PD98059, Figuras 33A y 33C) produjeron cambios graduales dependientes de la dosis del fenotipo de maligno a normal. Una característica única de la presente invención es que no se requiere conocimiento previo sobre la señalización diana oncogénica para el cribado de fármacos, opuesto a la práctica estándar. La incapacidad de la genisteína (inhibidor de la fosforilación de tirosina, Figura 33D) o LY294002 (inhibidor de cinasas PI3, Figura 33E) para cambiar el tipo de tinción soporta claramente esto.

Usando este sistema modelo, los presentes inventores han mostrado que una línea celular manipulada, creada por la transformación maligna de células normales por transfección con un oncogén, puede usarse como plataforma para el descubrimiento de fármacos, ya que la transformación es reversible por un compuesto químico.

EJEMPLO 12

Uso de los métodos y compuestos descritos por la presente invención en el desarrollo de sistemas

adicionales

Con el fin de evaluar la utilidad del enfoque de descubrimiento de fármacos informado anteriormente, se probaron fármacos y compuestos existentes con capacidades conocidas para afectar las respuestas reguladoras del cáncer. Para fines de validación, se usaron sistemas de células para los que estuvieron disponibles marcadores bioquímicos o diferenciación.

Los presentes inventores establecieron un sistema modelo para leucemia mielógena crónica (LMC) basado en células eritroleucémicas K562. La ventaja de este sistema es que la diferenciación de células eritroides puede confirmarse relativamente fácilmente midiendo los niveles de síntesis de hemoglobina (método de tinción de bencidina). Como se describió previamente [Sutherland et al., J Biological Response Modifiers (1986) 5, 250-262], la diferenciación eritroide de células K562 se indujo por butirato de sodio (no mostrado), DMSO (no mostrado) y Gleevec™ (Figuras 34A-C y Figuras 35A-B). Todos estos inductores de la diferenciación causaron un cambio evidente del fenotipo de tinción, de rojo a azul/verde como se mostró por Gleevec™ (Figuras 34A-B y Figura 35B).

STI571 (Gleevec™, mesilato de imatinib) es un ejemplo de un fármaco satisfactorio indicado para el tratamiento de LMC. En el caso de LMC, la progresión de la enfermedad se produce por acumulación de anomalías moleculares, que conducen a una pérdida progresiva de la capacidad de diferenciación terminal del clon leucémico. Gleevec™ dirige la actividad de cinasa de Ber-Abl y así desencadena la diferenciación terminal en LMC e induce una fuerte respuesta hematológica y citogenética en la clínica [Drucker, Trends in Molecular Medicine (2002) Vol. 8, No. 4 (Suppl.), S 14-S18],

Se realizaron estudios correlativos del efecto de Gleevec™ sobre el número de células y la producción de hemoglobina (Figuras 34C y 35A). Se encontró que el nivel de detección de la tinción de células K562 era muy sensible y era capaz de detectar la actividad de Gleevec deseada a concentración 30 nM (Figura 35B). A esta concentración todavía no se ha afectado ni el número de células ni la producción de hemoglobina (Figura 35A).

Se establecieron dos sistemas de leucemia adicionales: HL-60 (línea celular de leucemia mieloide aguda humana) y U937 (línea celular de leucemia monocítica/linfoma histiocítico). Células HL-60 expresaron un fuerte cambio de color de rojo a verde (Figuras 36A-B) como resultado de la diferenciación inducida por ATRA, ácido all-trans-retinoico [Alison et al., The Cancer Handbook. Nature publishing group (2002) Capítulo 89, "Differentiation Therapy"]. Se trataron células U937 con butirato de sodio (Figuras 38C-D) o IFN-gamma para inducir la diferenciación (Figuras 37B-C y Figuras 38E-H). Se usó la prueba de reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) como marcador bioquímico indicativo del estado de diferenciación de estas células (Figuras 37A-C). El tratamiento con concentraciones crecientes de IFN-gamma produjo un aumento del número de células bioquímicamente positivas que está altamente correlacionado con un desplazamiento en el color de células de rojas malignas a verdes normales (Figuras 38A-B y Figuras 38E-H). Se obtuvieron resultados similares con butirato de sodio (Figuras 38A-D).

Se estableció otro sistema en el que queratinocitos humanos inmortalizados HPV16 se trataron por diferentes inhibidores (originados a partir de los trabajos del Dr. A Levitzki, Universidad hebrea, Jerusalén, Israel). La Figura 39 muestra el potencial de optimización de compuestos cabeza de serie del enfoque de cribado de fármacos para fenotipo. Este experimento ha mostrado el efecto de diferentes cambios de andamiajes químicos en el fenotipo celular que se visualizó por el procedimiento de tinción de la presente invención. Obsérvese que AG555 no funciona; sin embargo la modificación química del motivo AG555 produjo actividad parcial en AG494.

Los presentes inventores han sentado los cimientos para una forma altamente fiable y eficaz de medir el fenotipo de células. Este método se ha reducido a la práctica de aplicaciones tales como el descubrimiento de fármacos, validación de dianas y diagnósticos. Se han desarrollado diversos sistemas que cubren tanto carcinomas como otros tumores, y los resultados se han validado usando diversos métodos y marcadores aceptados. La plataforma de descubrimiento de fármacos tiene propiedades genéricas, ya que funciona no solo con compuestos químicos, sino también con ligandos de proteína. Los presentes inventores han mostrado que el sistema se usa fácilmente para la validación de dianas de oncogenes y también ha sido capaz de usarse para el cribado de construcciones sentido y antisentido (no mostradas). La prueba de genes supresores de tumores ha sido trivial, empezando simplemente el sistema con células malignas y transfectándolas con un gen supresor de tumores (no mostrado). El método sugerido requiere un rápido ajuste a diferentes sistemas de células, teniendo en cuenta rasgos particulares del sistema con el fin de obtener resultados óptimos. La naturaleza genérica del método está parcialmente conectada con el hecho de que la tinción se realiza después del tratamiento, por lo que la eficacia, no la naturaleza, del tratamiento administrado a las células es de importancia.

EJEMPLO 13

Purificación de un nuevo compuesto de tinción (CST 2001) de extracto en bruto de planta capaz de distinguir entre células malignas y no malignas

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Todos los procedimientos, protocolos, líneas celulares, ensayos, reactivos, disoluciones de tinción y fijadores para los Ejemplos 13 a Ejemplo 17 son como se han descrito en la sección de materiales y procedimientos experimentales para los Ejemplos 6 a Ejemplo 12 anteriores en este documento.

5 **Purificación de CST-2001**

1. Se preparó extracto de etanol en bruto (50 ml) fuertemente básico (pH 12,0) con NaOH 1 N, se mezcló y se mantuvo durante 1 h a 4 °C.
2. Se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min.
3. Se lavó una vez con 10 ml de 70% de etanol, pH 12.
4. Se centrifugó el sedimento a 4000 rpm durante 15 min.
5. El sedimento se suspendió en 20 ml de agua destilada.
6. Se centrifugó el sedimento a 4000 rpm durante 15 min.
7. El sedimento se suspendió en 10 ml de agua destilada.
8. Se añadió HCl 1 N hasta que el pH alcanzó 2,0 y la suspensión se mantuvo durante 1 h a 4 °C.
9. El sedimento se recogió por centrifugación a 4000 rpm durante 15 min.
10. El sedimento se disolvió en 10 ml de 70% de etanol.
11. El pH se ajustó a 6,2 con NaOH 1 N.
12. Se almacenó extracto altamente enriquecido a temperatura ambiente en una botella oscura.
13. Se añadieron 10 ml de extracto altamente enriquecido a 5 ml de Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) y se mezclaron.
14. Se sedimentó el gel Chelating Sepharose por centrifugación a 500 x g durante 10 min.
15. El sobrenadante se decantó cuidadosamente (contuvo el material activo).
16. Se repitieron las Etapas 1-3 dos veces más.
17. El sobrenadante (llamado CST 2001) se usó para análisis, por ejemplo, espectros de fluorescencia, RMN y EM.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

30 **Extracto de planta:**

Los métodos de tinción presentados anteriormente implican el uso de un extracto de planta, que se ha mostrado empíricamente que es importante para la discriminación de color específica del fenotipo de células malignas frente a no malignas. Los presentes inventores han identificado satisfactoriamente una composición que permite la misma actividad que el extracto en bruto.

El punto de partida en este proceso es la preparación de extracto en bruto.

40 **1. Extracto en bruto:**

Hojas (*Ficus elastica*) que fueron óptimas para el proceso debían tener un peso de 15 a 25 gramos y su longitud debe haber sido 18 a 30 centímetros, como se mide desde la base de la hoja hasta el borde. Se cortaron 600 gramos de hojas en trozos de 1-2 cm. Las hojas cortadas se mezclaron con 1,5 litros de 70% de EtOH y se mantuvieron durante 10 días (a temperatura ambiente) en un envase sellado. A partir de aquí, el líquido se separó de los sólidos y se mantuvo para uso adicional a temperatura ambiente. Cada lote requirió la optimización de lotes para determinar la concentración de trabajo óptima. El procedimiento de optimización de lotes usó pares de células (células normales frente a malignas, células no tratadas frente a tratadas, células normales frente a transfectadas con oncogén, células malignas frente a transfectadas con gen supresor de tumores, etc.). El objetivo del procedimiento era maximizar la relación de $R_{\text{malignas}}/R_{\text{normales}}$ usando una curva de dilución que cambiaba la concentración de la disolución de trabajo añadiendo 70% de EtOH al extracto en bruto.

Alternativamente, se han preparado extractos en bruto por el siguiente protocolo: Se extrajeron hojas (100 g) durante 6 días a temperatura ambiente con 200 ml de 90% de (v/v) de acetonitrilo acuoso. Entonces se eliminó el acetonitrilo mediante evaporación rotatoria. Después del filtrado (S&S de 0,4 mm), la fracción acuosa se redujo en volumen en un evaporador rotatorio a 35 °C a presión reducida. La fracción acuosa restante - 10 ml, se fraccionó con cromatografía de exclusión por tamaño usando Sephadex LH-20 (Pharmacia, Suecia).

II Purificación y propiedades de la fracción activa CST-2001:

Se diseñó un protocolo de purificación de múltiples etapas para conseguir una fracción activa que presentaba actividad similar a la del extracto en bruto. Con el fin de hacer el proceso de ensayo más fácil, se desarrolló un ensayo rápido de un colorante (ensayo rápido LG, protocolo VIII como se detalla en la sección de materiales y procedimientos experimentales). El ensayo rápido prueba la capacidad del extracto para reducir la tinción por LG (Figura 40) y muchos otros colorantes (no mostrados). El grado de actividad inhibidora se midió usando la DO a 630 nm de LG (Figura 40).

CST-2001 se purificó del extracto en bruto según el esquema de purificación como se detalla en la sección de materiales y procedimientos experimentales. Se encontró que la presencia de 2,5 micromoles de Mg^{2+} y/o Ca^{2+} era crítica para la actividad funcional de CST-2001 en el ensayo rápido de un colorante (protocolo VIII).

- 5 CST-2001 se sometió a amplias validaciones químicas y funcionales, que incluyen huellas de fluorescencia, se recogió información del análisis elemental y estructura química en el proceso de elucidación de estructuras.

Cromatografía en Sephadex LH-20:

- 10 Se aplicó extracto en bruto (2 ml en agua) a una columna de 1,5 x 8 cm de Sephadex LH-20 previamente equilibrada con agua. Entonces se realizó la elución consecutiva con 2 x 4 ml de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% y 80% (v/v) de metanol:agua y luego con 2 x 4 ml de 20%, 40%, 60% y 80% (v/v) de acetona:agua. Las fracciones resultantes se comprobaron para su capacidad para inhibir LG y para el contenido de proantocianidinas (Figura 41). Para estos fines, se evaporaron 200 ml de cada fracción y se redisolieron en 100 ml de 70% de etanol.

Ensayo de butanol ácido para proantocianidinas:

- 20 Se mezclaron 50 μ l de la muestra (fracción cromatográfica en 70% de etanol), 300 μ l de butanol ácido (butanol:HCl conc. 95:5, v/v) y 10 μ l de reactivo de hierro ($FeNH_4(SO_4)_2$ 0,04 M en HCl 2 N) y se incubaron a 95 °C durante 50 min, después de enfriarse la absorbancia se determinó a 540 nm (Figura 41).

Proantocianidinas oligoméricas y poliméricas:

- 25 Se reunieron proantocianidinas oligoméricas y poliméricas (Figura 41), se evaporaron los disolventes en un evaporador rotatorio y la disolución acuosa se liofilizó. El rendimiento de las proantocianidinas fue 130 mg de "Oligómero" y 83 mg de "Polímero" por 100 g de hojas de ficus.

Espectro de fluorescencia de CST 2001:

- 30 Se realizó investigación del espectro de fluorescencia de CST 2001 en un fluorímetro LS50b de Perkin-Elmer. Los espectros mostraron un pico, tras la excitación a 375 nm y emisión a 430 nm en ácido acético (Figura 42). Tras la prueba, esta huella fluorescente estuvo presente en las diferentes etapas de purificación de CST 2001.

HPLC de proantocianidinas oligoméricas:

- 35 Se separaron proantocianidinas oligoméricas por el método de HPLC. Se registraron el espectro de absorbancia para todos los picos. Se usó la columna Lichrosorb Si-60 250-4 (Merck).

Sistema de disolventes:

- 40 A - diclorometano + 4% de 50% de ácido acético acuoso,
B - metanol + 4% de 50% de ácido acético acuoso,
Todos los disolventes fueron de calidad para HPLC.

Gradiente:

0 min	Flujo: 0,8 ml/min	% de A: 100	% de B: 0,
10 min	Flujo: 0,8 ml/min	% de A: 70	% de B: 30,
20 min	Flujo: 0,8 ml/min	% de A: 50	% de B: 50,
25 min	Flujo: 0,8 ml/min	% de A: 14	% de B: 86,
30 min	Flujo: 0,8 ml/min	% de A: 70	% de B: 0,
34,8 min	Flujo: 0,8 ml/min	% de A: 70	% de B: 0,
34,9 min	Flujo: 0,1 ml/min	% de A: 70	% de B: 0.

Detección:

- 50 Matriz de diodos 220-600 nm; 800 m; 6 nm.

RMN y elucidación de la estructura de CST-2001:

- 55 Se obtuvo información adicional, que describe las propiedades químicas y la huella de CST 2001, por RMN (Figura 43) y por RMN 1H (Figura 44). Las proantocianidinas purificadas se caracterizaron por espectros de UV (1 max = 280 nm) y espectros de RMN ^{13}C . Los espectros de RMN ^{13}C confirmaron que los compuestos oligoméricos y poliméricos comprendieron proantocianidinas (taninos condensados). Se presentan dos formas oligoméricas (Figura 45 y Figura 46). Según los espectros de análisis de RMN, CST 2001 fue un derivado del ácido esteárico, MW = 384. Los resultados de los espectros del análisis de RMN mostraron: CH_3 - 0,91 ppm; alfa- CH_2 - 2,39 ppm; beta- CH_2 -

1,65 ppm; (CH₂)₁₄ - 1,32 ppm; CH₂ - dq, 3,75 ppm; CH - m, 4,06 ppm; y CH₂, CH=CH - 4,2 ppm La fórmula química propuesta de CST 2001 fue C₂₃H₄₄O₄.

EJEMPLO 14

Interacción diferencial del extracto de planta en bruto con células malignas y normalizadas

La presencia de una señal de fluorescencia en CST-2001, además de en el extracto en bruto, permitió la detección de esta señal en células que habían sido tratadas con el extracto o con CST-2001 para rasgos de distribución intracelular diferencial. Observando la fluorescencia post-incubacional, los presentes inventores encontraron que el extracto de planta en bruto tendía a interaccionar de manera diferente con células fenotípicamente normales o malignas. Para garantizar que la señal detectada se originó de hecho en el extracto y no surgió de cualquier otro componente implicado del experimento, se probaron niveles de fluorescencia de fondo de células no tratadas sin tratamiento previo. Un ejemplo de señal fluorescente que se originó a partir del extracto en bruto se muestra en las Figuras 47A-C (según el Protocolo IX). En este experimento, células de adenocarcinoma colorrectal humano (HT-29, Figura 47A) se trataron con butirato de sodio con el fin de inducir la normalización de la diferenciación y fenotipo (Figura 47B). Adicionalmente, se probaron colonocitos primarios (CCD-33C0) como control normal (Figura 47C). Se observó una sorprendente diferencia en la intensidad de tinción nuclear (puntas de flecha).

EJEMPLO 15

Interacciones diferenciales de CST-2001 enriquecidas con células malignas y normalizadas

Mientras que la distribución específica del fenotipo de fluorescencia en el compartimento nuclear era la misma para CST-2001 enriquecidas con Mg⁺² o Ca⁺² (CST-2001 enriquecidas) y para el extracto en bruto, el contraste y la intensidad de la señal, además de la relación de señal con respecto a fondo, mejoraron espectacularmente usando CST-2001 enriquecidas en vez del extracto en bruto. Usando el protocolo (IX) previamente descrito, los presentes inventores observaron de nuevo que los núcleos de las células transformadas o malignas fueron considerablemente menos fluorescentes que sus homólogos normales o tratados respectivos.

Con el fin de tratar la amplitud del fenómeno, se establecieron un gran número de modelos celulares usando conjuntos de células malignas, células normales y células que se habían normalizado usando butirato de sodio o ATRA (ácido all-trans-retinoico). Estos modelos incluyeron: carcinoma de mama humano MCF-7 (Figuras 48A-F), carcinoma de colon humano HT-29 (Figuras 49A-B), colonocitos humanos normales (Figura 47C y Figura 49C), leucemia humana K562 (Figuras 50A-B), línea celular HL-60 leucémica humana (Figuras 51A-B), línea celular U937 leucémica humana (no mostrada) y el sistema experimental conducido por diana de oncogén basado en fibroblastos Rat1 y células Rat1 transformadas con Ha-Ras V12 (Rat1-Ras) (Figuras 52A-B). En el sistema posterior, los presentes inventores también probaron el efecto de tratar las células Rat1-Ras con PD98059, un inhibidor específico de MAPKK, bloqueando la transformación maligna iniciada por Ras V12 (Figura 52C). En todos los casos, las células fijadas al aire se incubaron con tanto CST-2001 enriquecidas como 70% de etanol como control de disolvente (Protocolo IX).

Tras el tratamiento con CST-2001 enriquecidas, la fluorescencia originada por CST-2001 se ha repartido de diferentes formas dentro del citoplasma y el núcleo de la célula. La localización de la señal fluorescente en células malignas se diferenció esencialmente de la de las células normales o tratadas con agente de inversión. En todas las células fenotípicamente malignas estudiadas, la fluorescencia fue muy débil en el núcleo (-), en comparación con células fenotípicamente normales en las que se observó fuerte fluorescencia del núcleo (+). Los resultados se resumen en la Tabla 15 más adelante.

TABLA 15

Tejido	Línea de célula	Tratamiento	Fenotipo	CST-2001 en el núcleo
Pecho	MCF	No tratamiento	Maligno	-
Pecho	MCF	Butirato	Normal	+
Colon	Primario CCD33Co	No tratamiento	Normal	+
Colon	HT 29	No tratamiento	Maligno	
Colon	HT 29	Butirato	Normal	+
Fibroblasto	Rat 1	No tratamiento	Normal	+
Fibroblasto	Rat1 Ras	No tratamiento	Maligno	
Fibroblasto	Rat1 Ras	PD98058	Normal	+
Sangre	K562	No tratamiento	Maligno	
Sangre	K562	Butirato	Normal	+
Sangre	HL60	No tratamiento	Maligno	
Sangre	HL60	Butirato	Normal	+
Sangre	U937	No tratamiento	Maligno	-
Sangre	U937	Butirato	Normal	+
Sangre	U937	ATRA	Normal	+

EJEMPLO 16***Interacción diferencial de CST-2001 con células vivas***

Para demostrar una capacidad de CST 2001 para discriminar entre dos fenotipos, se incubaron células de leucemia U937 con 1,5 μ M de ATRA durante 72 h para inducir la normalización de fenotipo. Al final del tratamiento, se añadió CST 2001 al medio y se incubó con células U937 tratadas con ATRA y tratadas con disolvente durante 2 horas. Se detectó la fluorescencia originada por CST 2001 y el nivel de intensidad se diferenció entre los dos fenotipos (por dos veces, Figuras 53A-B).

La autofluorescencia de CST 2001 nativa fue muy débil, por tanto, se hicieron varios intentos por aumentarla por diferentes modulaciones como se describe en el diagrama de flujo en la Figura 54: biotilación [como se describe por Wilchek et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1986) 138:872-879] y formación de complejos [como se describe por Karabourniotis et al., American Journal of Botany (1998) 85(7):1007]. La biotilación produjo aumentos de 10 veces en la señal específica detectada por estreptavidina-Cy3. Las Figuras 55A-B ilustran la diferencia en la intensidad de señal entre CST 2001 nativas y biotiniladas.

La formación de complejos con ácido difenilbórico-etanolamina, reactivo Naturstoff basado en el trabajo de Karabourniotis [Karabourniotis et al., Amer J de Bot (1998) 85(7):1007-1012], produjo un fuerte aumento de la fluorescencia (26 veces) como se midió por FACS (Figuras 56A-C).

CST 2001 fue capaz de formar complejos con proteínas. Tal complejación indujo la precipitación de proteínas, que se detectó por ensayo de difusión radial. Brevemente, gel de agarosa que contenía BSA se cargó con concentraciones decrecientes de extracto. Fueron visibles anillos precipitados con BSA (Figura 57), que indica el proceso de precipitación dependiente de la dosis. Esta capacidad de CST 2001 se explotó satisfactoriamente para la visualización de células U937 con BSA biotinilado (Figuras 58A-C).

Estuvieron presentes tres ejemplos no limitantes de tinción basada en CST 2001 de células vivas: MCF-7 sin tratar y células tratadas (Figuras 59A-B), células normales Rat2 frente a células malignas Rat2 Ras V12 (Figuras 60A-B) y células originadas de placenta (coriocarcinoma, Figuras 61A-C).

EJEMPLO 17***Interacciones diferenciales de CST-2001 con riñones de jerbos diabéticos frente a normales***

Se ha establecido el modelo de diabetes en la Unidad de Investigación de la Diabetes del Hospital Universitario de Hadassah, Jerusalén, Israel (Kalman *et al*).

Las Figuras 62A-D muestran la tinción de secciones de histología de un modelo animal inducido por diabetes tipo II. Se muestran secciones de riñones de jerbos normales (Figuras 62A y 62C) y diabéticos (Figuras 62B y 62D) tras la tinción con CAMA. Imágenes de gran aumento (paneles inferiores) enfocan estructuras del glomérulo, y acentúan la tinción verde asociada al tejido diabético, visualizado por este protocolo. El experimento muestra la tinción diferencial de tejido normal y diabético con CST-2001.

Se apreciará por un experto en la materia que la presente invención no está limitada por lo que se ha mostrado y descrito particularmente anteriormente en este documento. Más bien, el alcance de la invención se define por la sección de reivindicaciones que sigue.

Aunque la invención se ha descrito conjuntamente con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Por consiguiente, pretende englobar todas aquellas alternativas, modificaciones y variaciones que entran dentro del espíritu y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también puedan proporcionarse en combinación en una única realización. En cambio, diversas características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Aunque la invención se ha descrito conjuntamente con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Por consiguiente, pretende englobar todas aquellas alternativas, modificaciones y variaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

1. Un método de tinción o pre-tinción de al menos una célula, comprendiendo el método poner en contacto la al menos una célula con un agente de tinción que comprende un extracto de etanol de una planta *Ficus elastica*,
5 tiñéndose o pre-tiñéndose así la al menos una célula, en el que las células no son células embrionarias humanas.
2. Un método de tinción de al menos una célula, comprendiendo el método:
 - (a) poner en contacto la al menos una célula con un agente de tinción que comprende un extracto de etanol de
10 una planta *Ficus elastica*, de manera que se obtenga una célula pre-teñida o células; y
 - (b) poner en contacto dicha célula pre-teñida o células con al menos un colorante;
en el que las células no son células embrionarias humanas.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha al menos una célula comprende una población
15 heterogéneamente diferenciada de células.
4. El método de la reivindicación 2, en el que cuando
 - (i) dicho al menos un colorante es un colorante ácido, una intensidad de tinción por encima de un umbral
20 predeterminado es indicativa de una célula diferenciada;
 - (ii) dicho al menos un colorante es un colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula no diferenciada;
 - (iii) dicho al menos un colorante comprende dicho colorante ácido y dicho colorante básico una intensidad de
25 tinción por encima de un umbral predeterminado con dicho colorante ácido es indicativa de una célula diferenciada y una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con dicho colorante básico es indicativa de una célula no diferenciada.
5. El método de la reivindicación 3, en el que dicha población de células heterogéneamente diferenciada comprende
30 células malignas o pre-malignas.
6. El método de la reivindicación 3, en el que dicha población de células diferenciadamente diferenciada comprende células fetales.
7. El método de la reivindicación 3, en el que dicha población de células diferenciadamente diferenciada comprende
35 células metabólicamente alteradas.
8. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho extracto de etanol de la planta *Ficus elastica* comprende un extracto de hojas.
9. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho extracto de etanol de la planta *Ficus elastica* comprende
40 espectros de RMN como se detalla en las Figuras 43-44.
10. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho extracto de etanol de *Ficus elastica* planta se complementa
45 con iones positivamente cargados.
11. El método de la reivindicación 2, en el que dicho al menos un colorante comprende dos colorantes.
12. El método de la reivindicación 2, en el que dicho al menos un colorante está seleccionado del grupo que consiste
50 en un colorante básico, un colorante ácido, un derivado de triaminotrifetilmetano, un derivado de diazo y una combinación de los mismos.
13. El método de la reivindicación 11, en el que dichos dos colorantes comprenden colorantes seleccionados del
55 grupo que consiste en un colorante básico, un colorante ácido, un derivado de triaminotrifetilmetano, un derivado de diazo y una combinación de los mismos.
14. Un método de identificación de una célula de un estado de diferenciación de interés, comprendiendo el método:
 - (a) teñir la célula según la reivindicación 2; y
 - (b) analizar dicha tinción, en el que cuando:
60
 - (i) dicho al menos un colorante es un colorante ácido, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula diferenciada;
 - (ii) dicho al menos un colorante es un colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral
65 predeterminado es indicativa de una célula no diferenciada;
 - (iii) dicho al menos un colorante comprende dicho colorante ácido y dicho colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con dicho colorante ácido es indicativa de una célula

diferenciada y una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con dicho colorante básico es indicativa de una célula no diferenciada, en el que las células no son células embrionarias humanas.

5 15. Un método de diagnosticar un cáncer en un sujeto, comprendiendo el método:

(a) teñir la célula según el método de la reivindicación 2, de manera que se obtenga una población teñida de células; y

(b) analizar una tinción, de dicha población teñida de células, en el que cuando:

(i) dicho al menos un colorante es un colorante ácido, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula diferenciada;

(ii) dicho al menos un colorante es un colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado es indicativa de una célula no diferenciada;

(iii) dicho al menos un colorante comprende dicho colorante ácido y dicho colorante básico, una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con dicho colorante ácido es indicativa de una célula diferenciada y una intensidad de tinción por encima de un umbral predeterminado con dicho colorante básico es indicativa de una célula no diferenciada,

por el cual una presencia o nivel de dichas células no diferenciadas es indicativa de células malignas o pre-malignas, diagnosticándose así el cáncer en el sujeto.

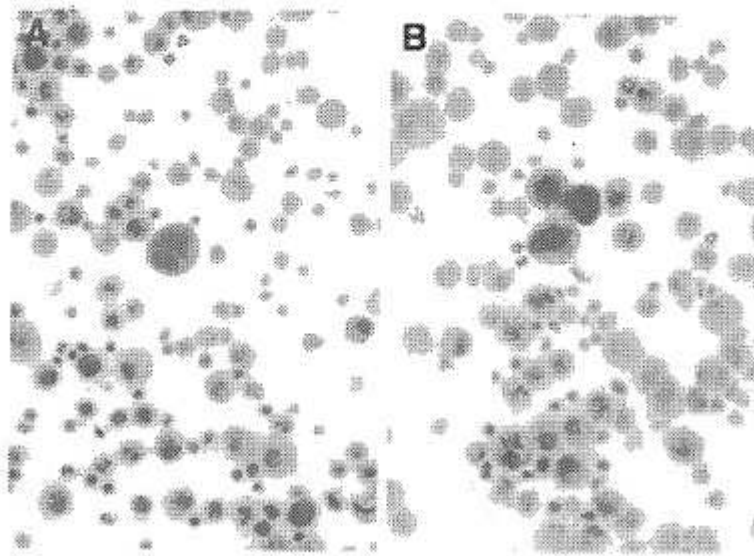


Fig. 1a

Fig. 1b

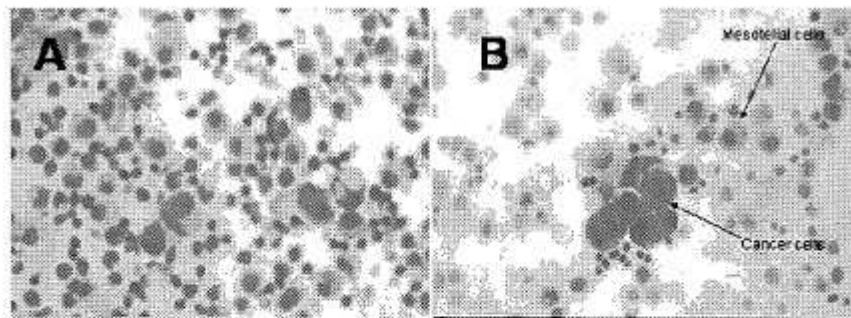


Fig. 2a

Fig. 2b

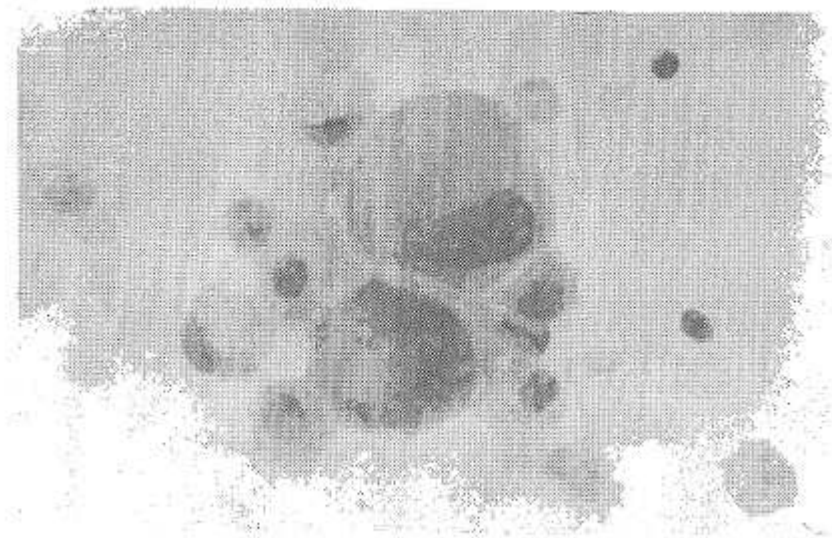


Fig. 3

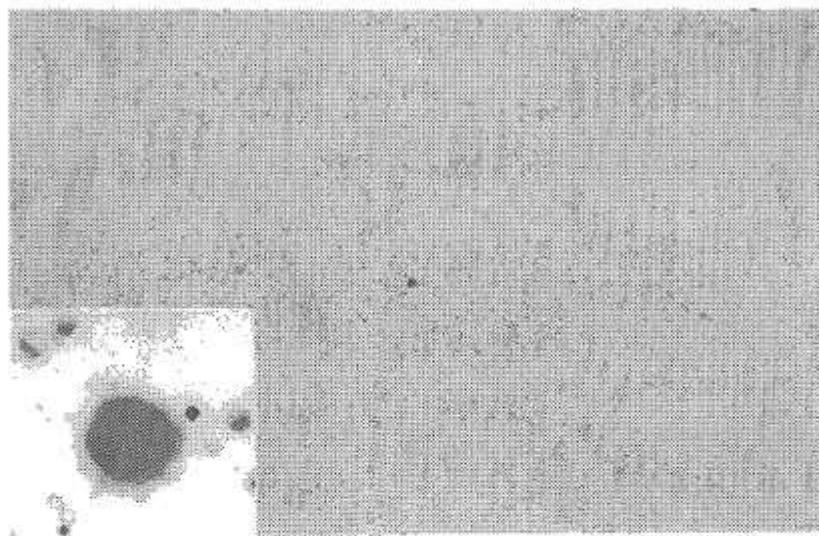
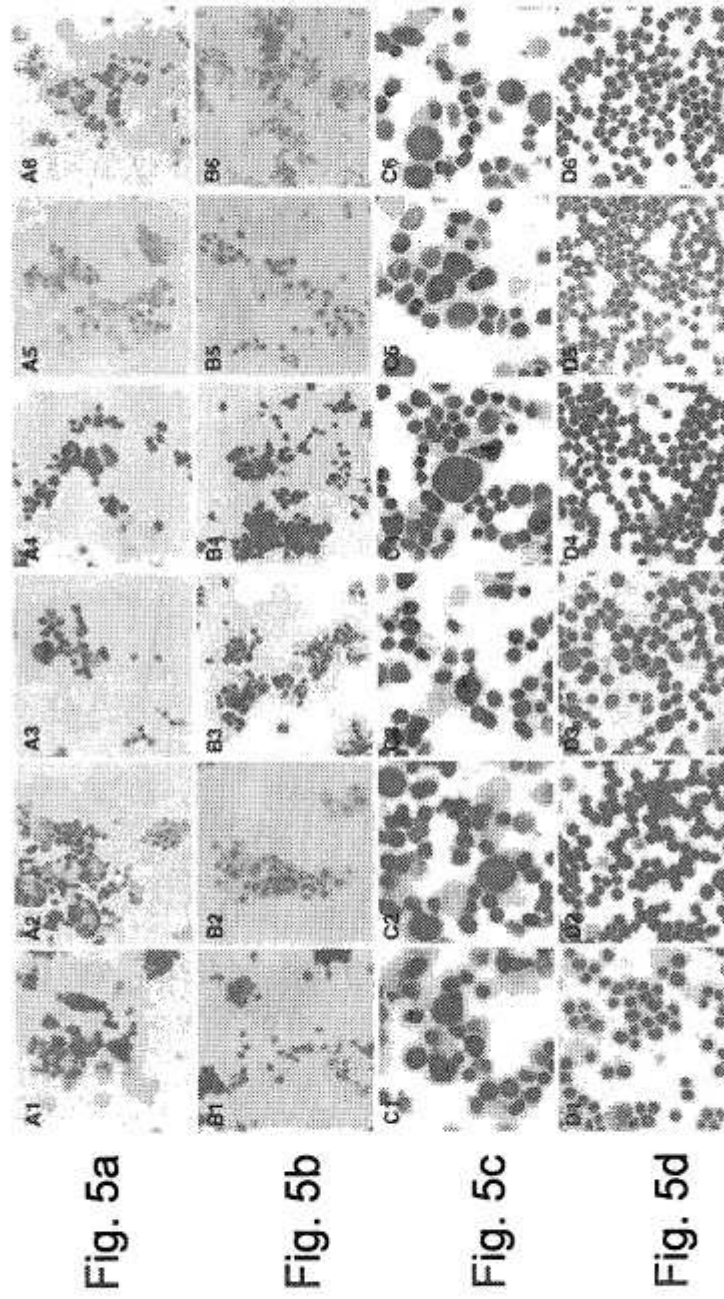


Fig. 4



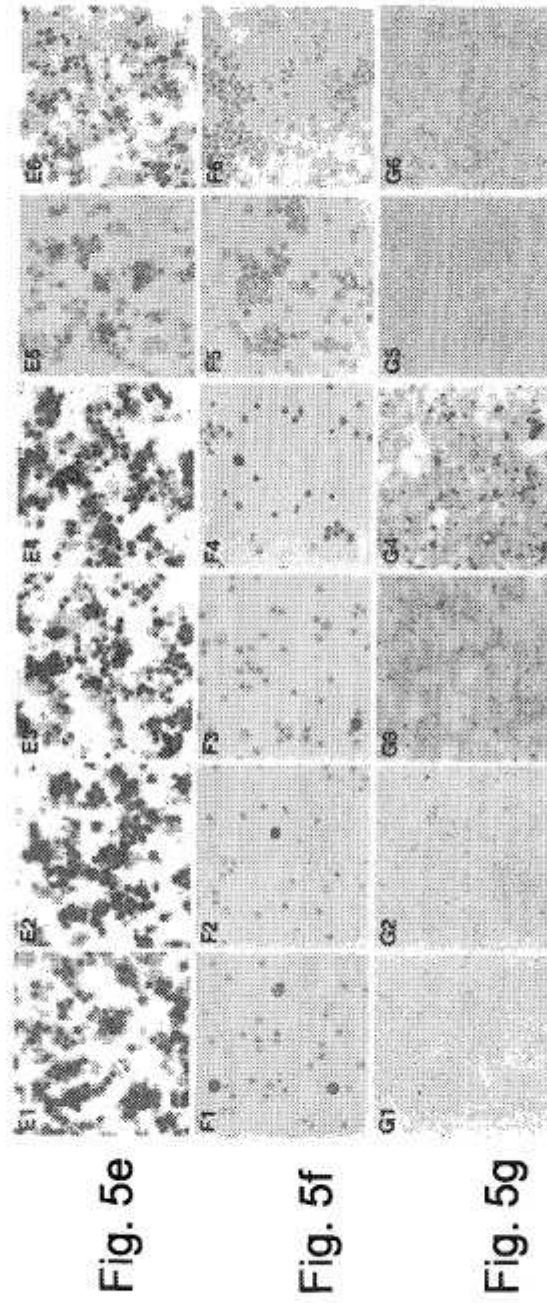
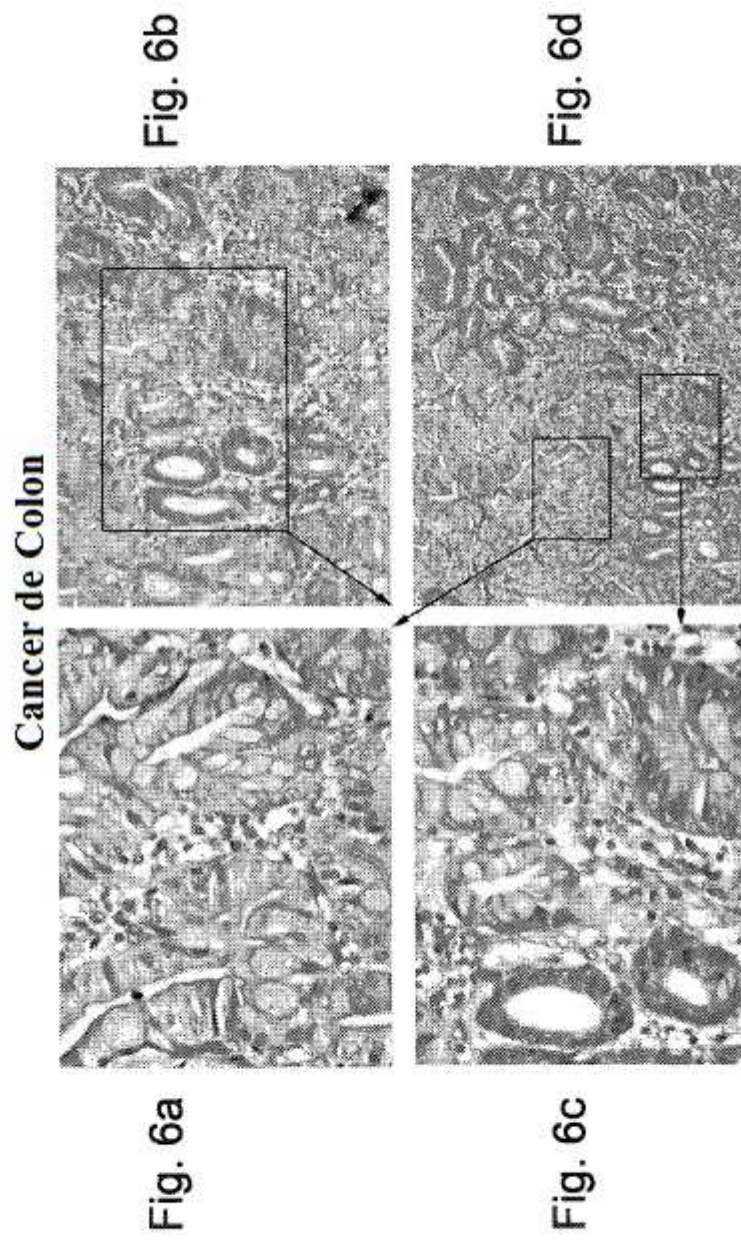
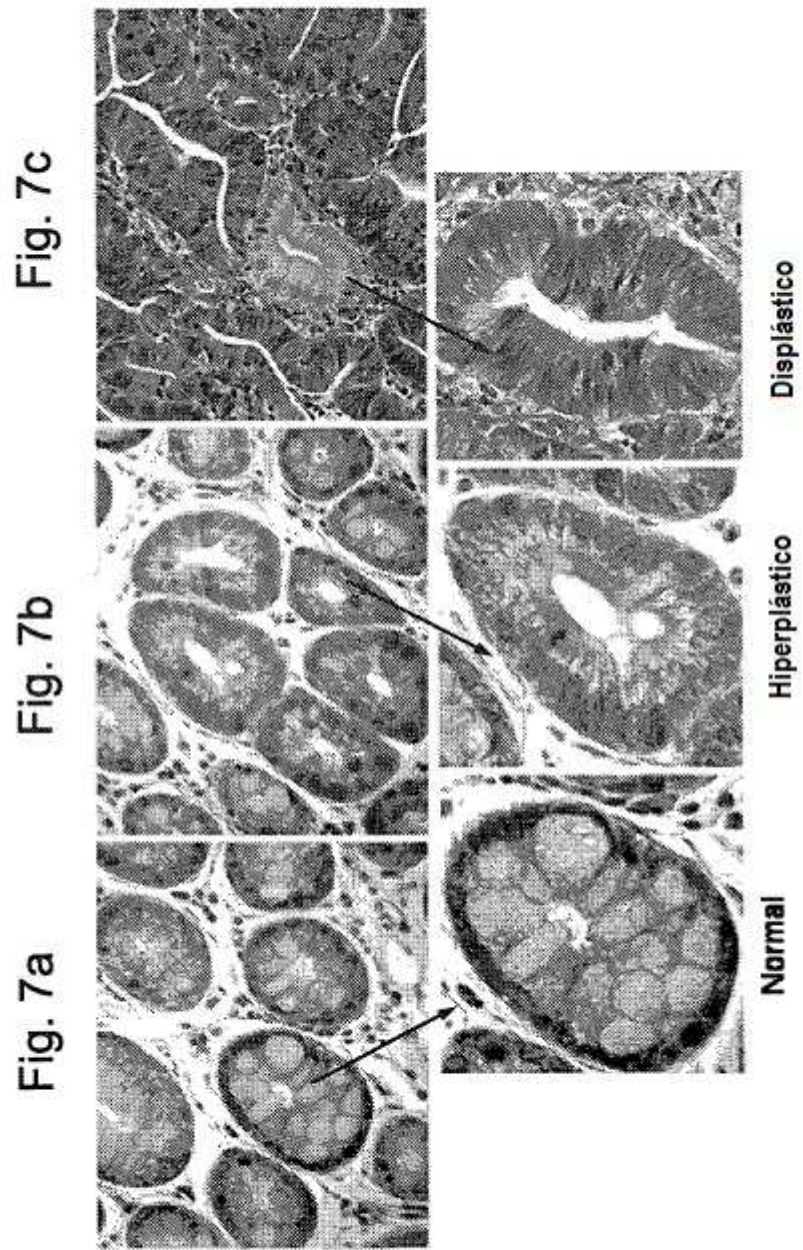


Fig. 5e

Fig. 5f

Fig. 5g





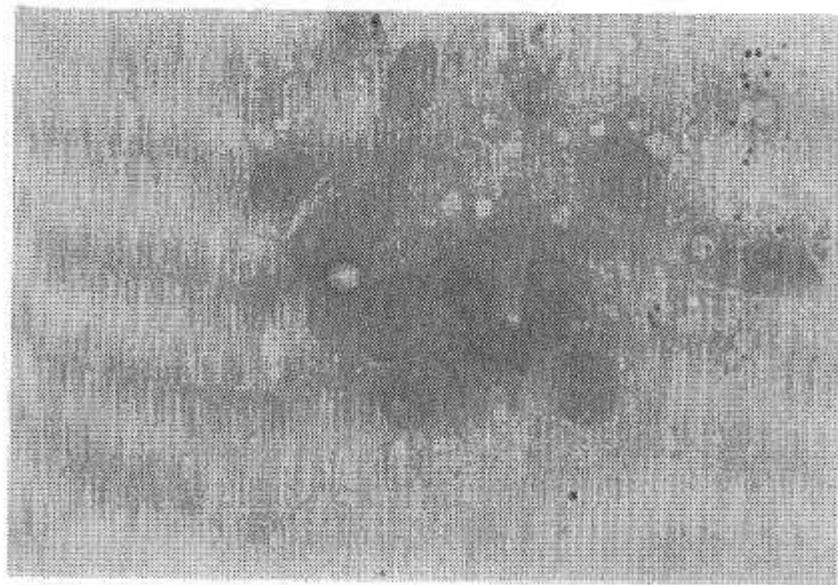


Fig. 8

Fig. 9a

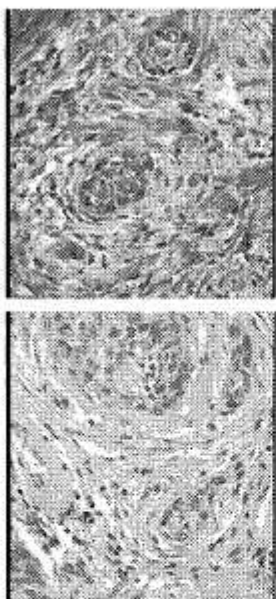


Fig. 9b

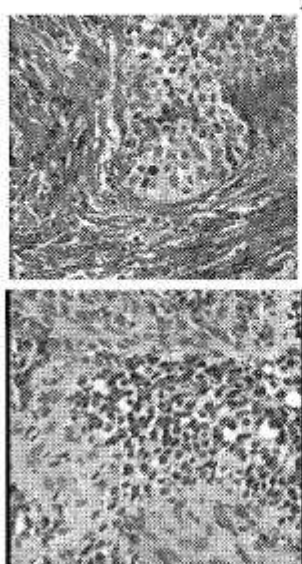


Fig. 9c

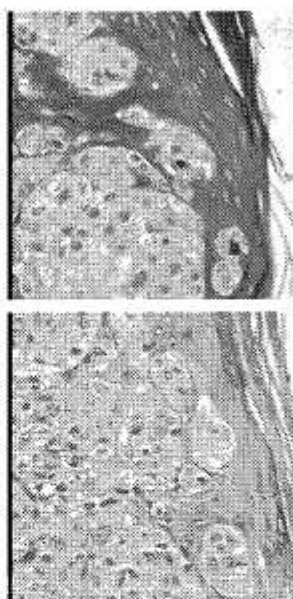
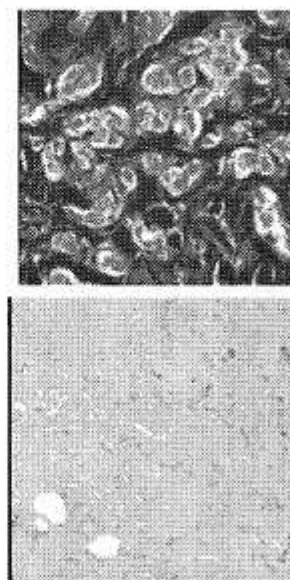


Fig. 9d



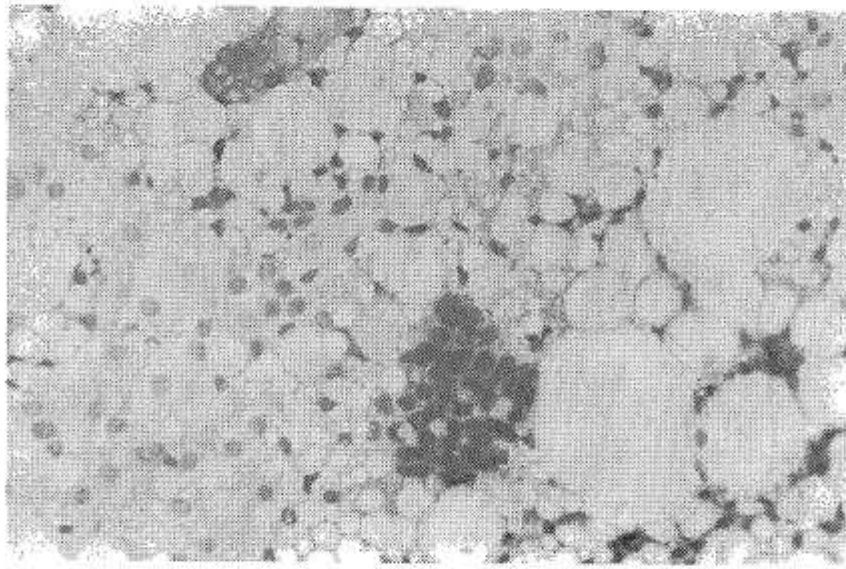
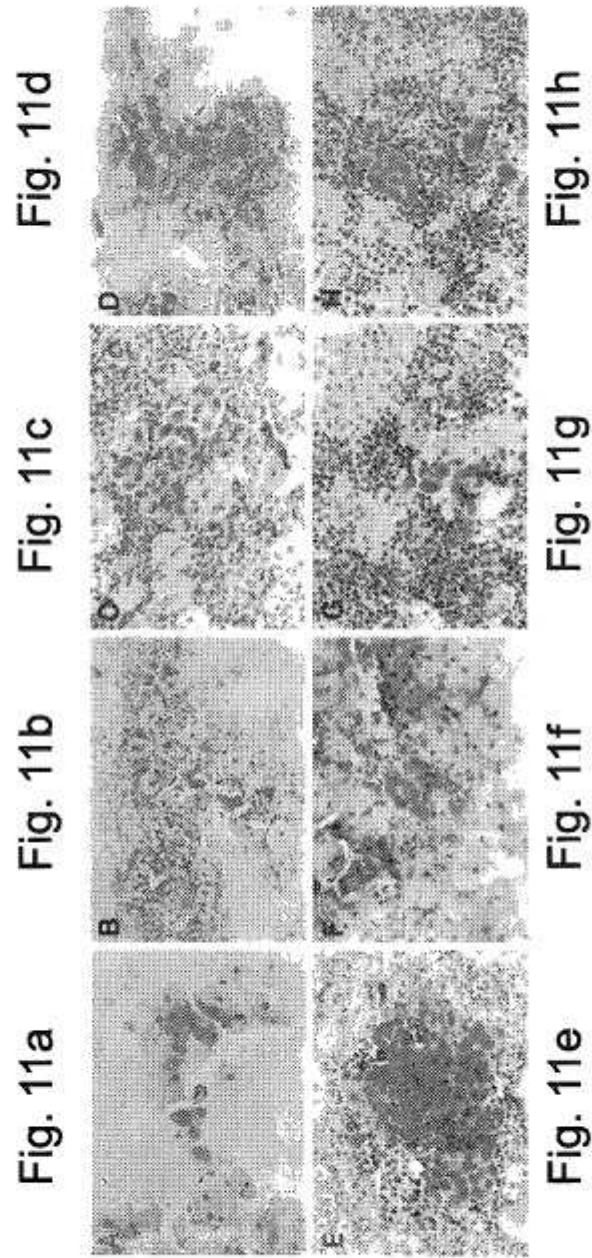
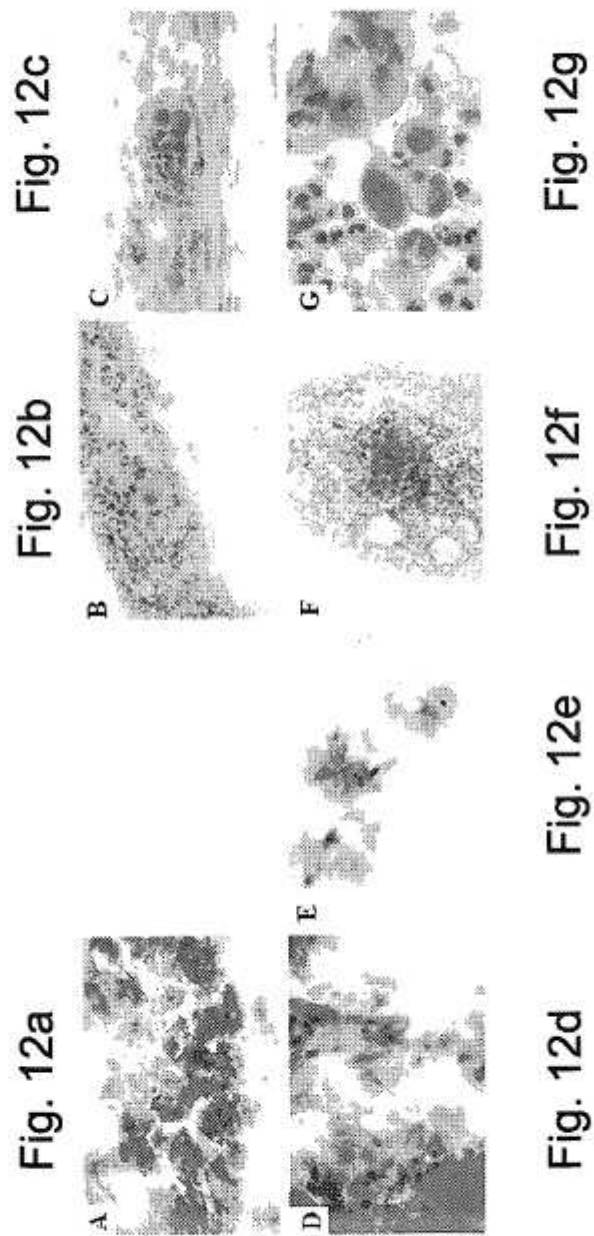
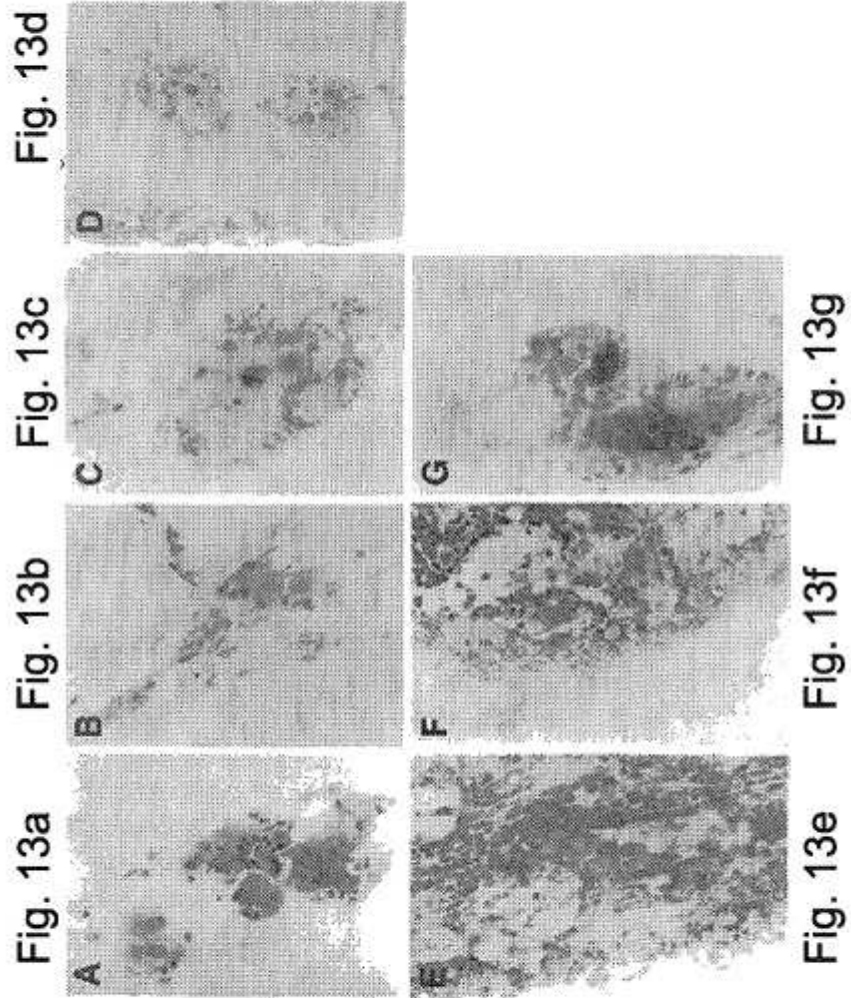


Fig. 10







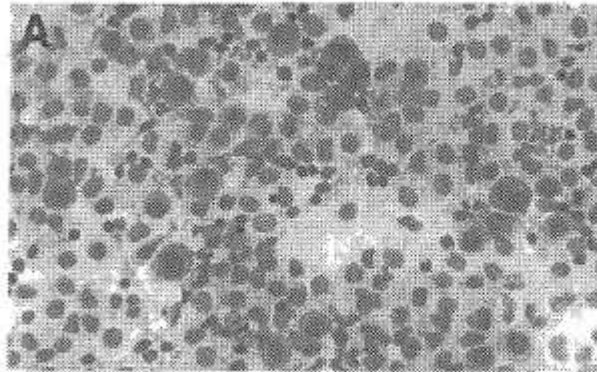


Fig. 14a

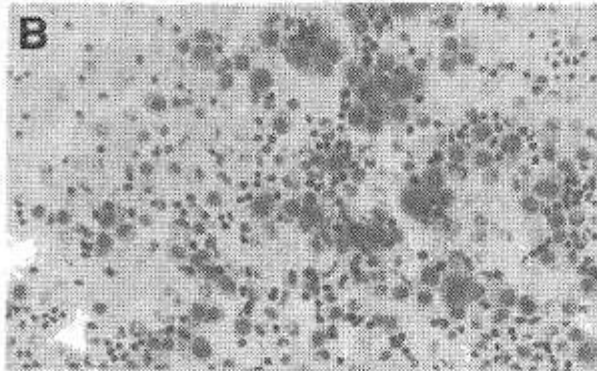


Fig. 14b

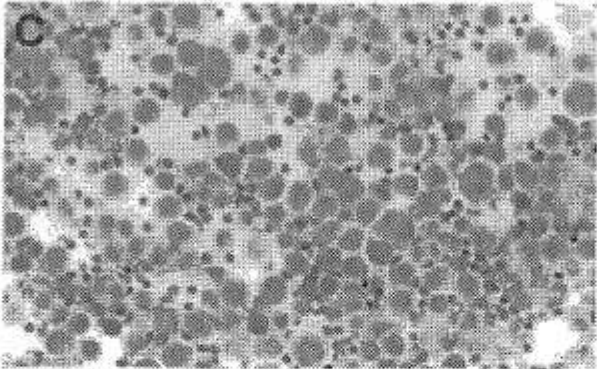


Fig. 14c

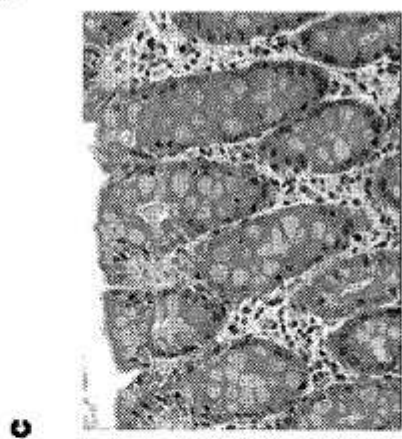
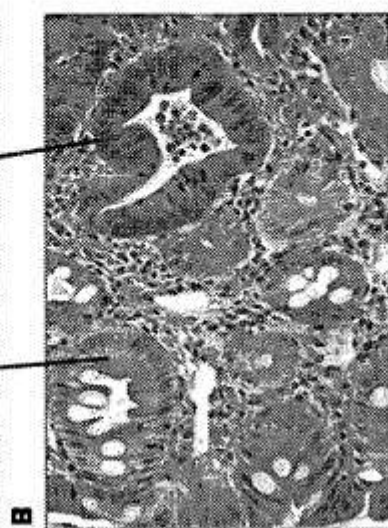
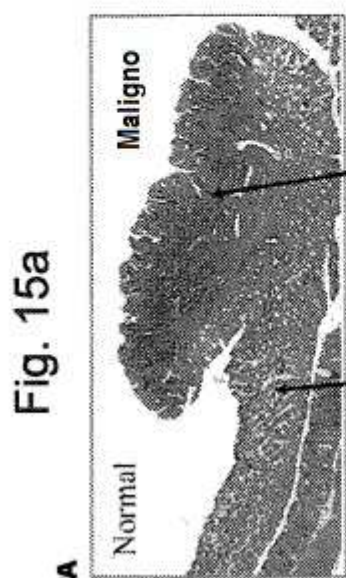


Fig. 15b

Fig. 15c

Inducción-Dimetilhidracina de carcinogenesis de colon en ratas

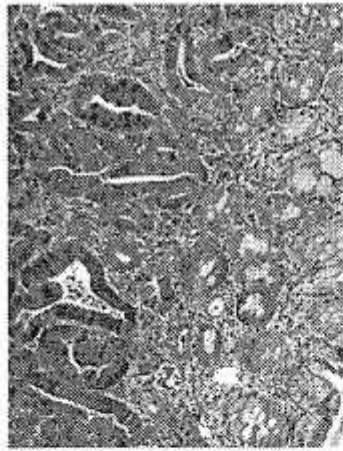


Fig. 16a

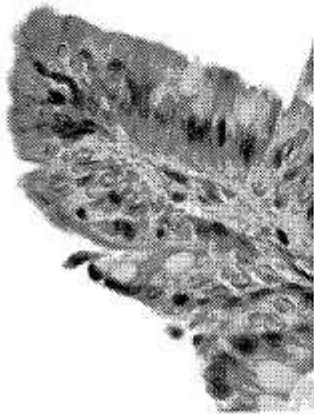


Fig. 16b

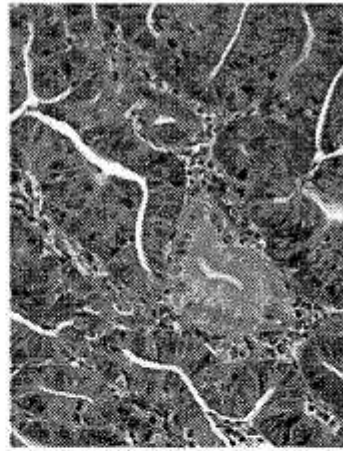


Fig. 16c

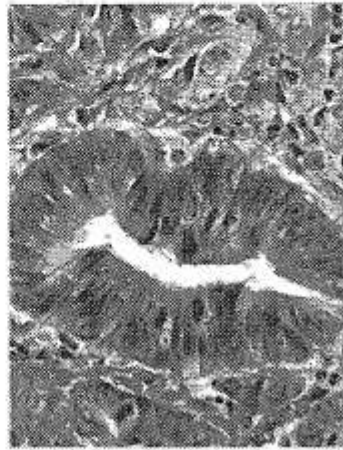


Fig. 16d

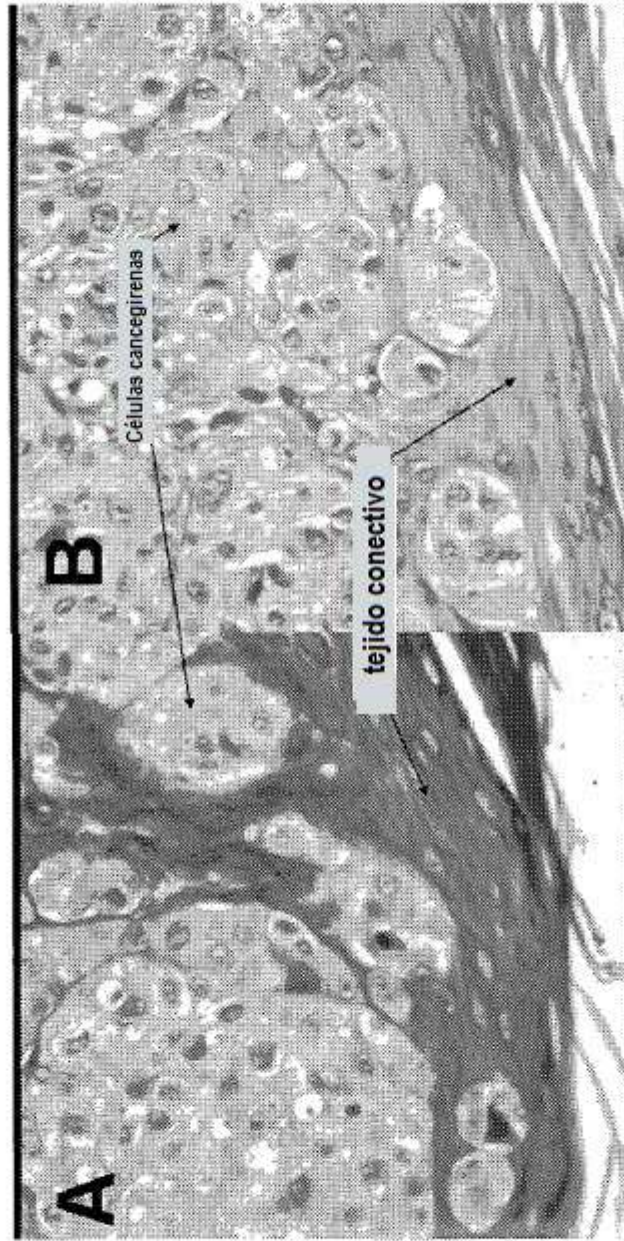


Fig. 17a

Fig. 17b

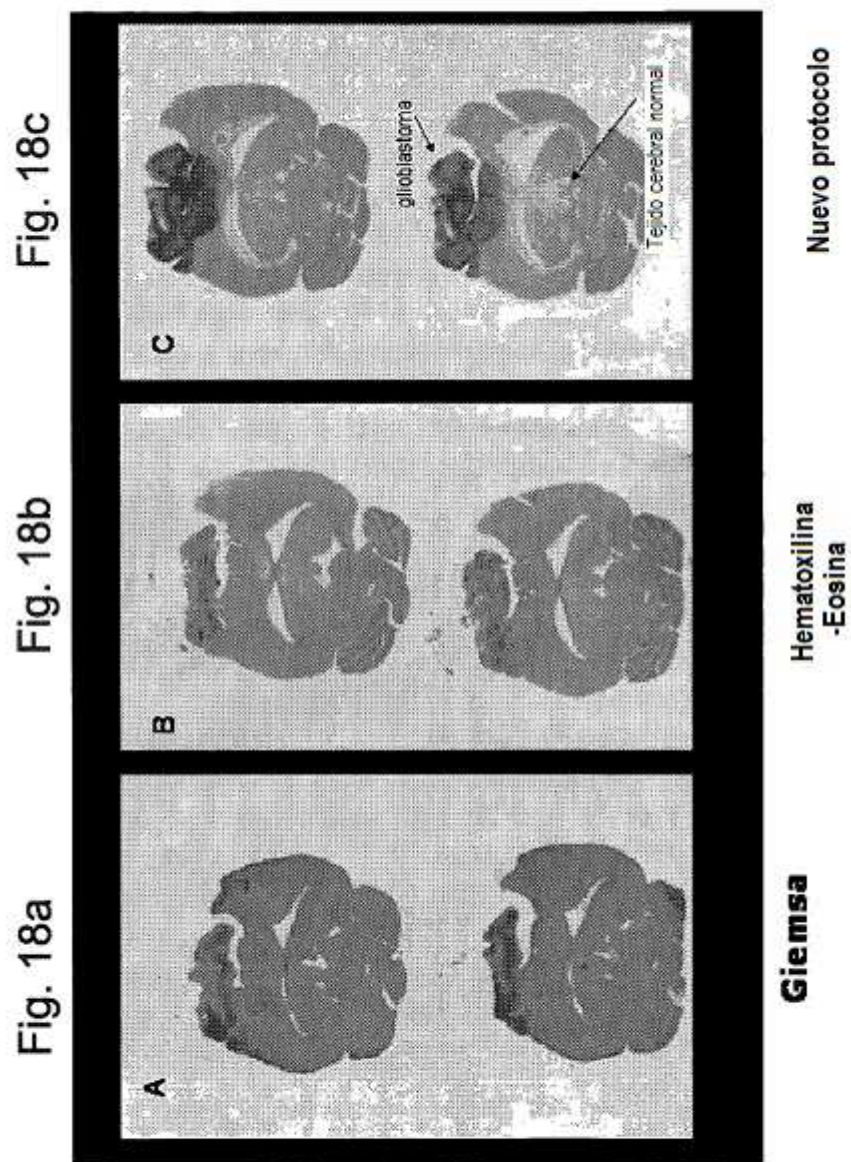


Fig. 19a

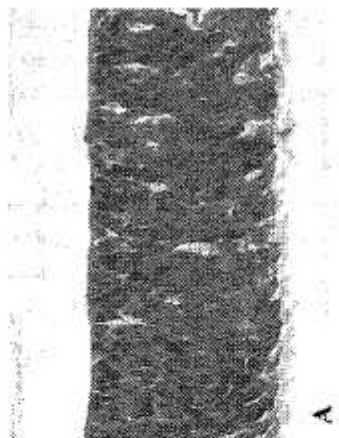


Fig. 19b

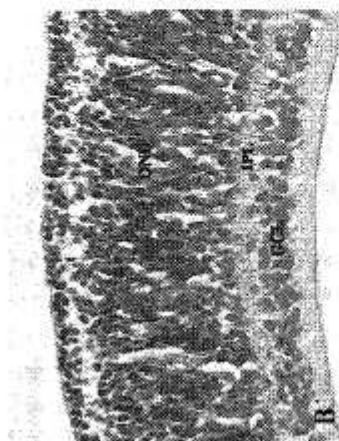


Fig. 19c

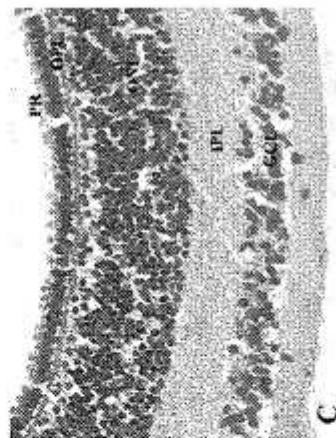
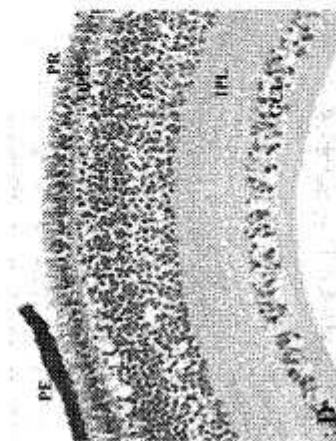


Fig. 19d



Celulas humanas de colon culturizadas

**Colonocitos normales
CCD-33C0**

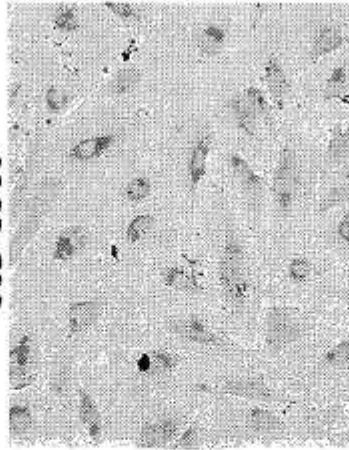


Fig. 20a

Formato HTS



Fig. 20b

**Células cancer de colon
HT-29**

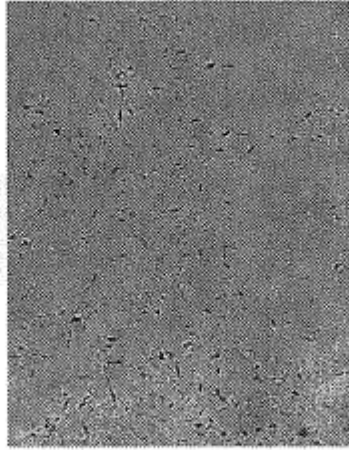


Fig. 20c

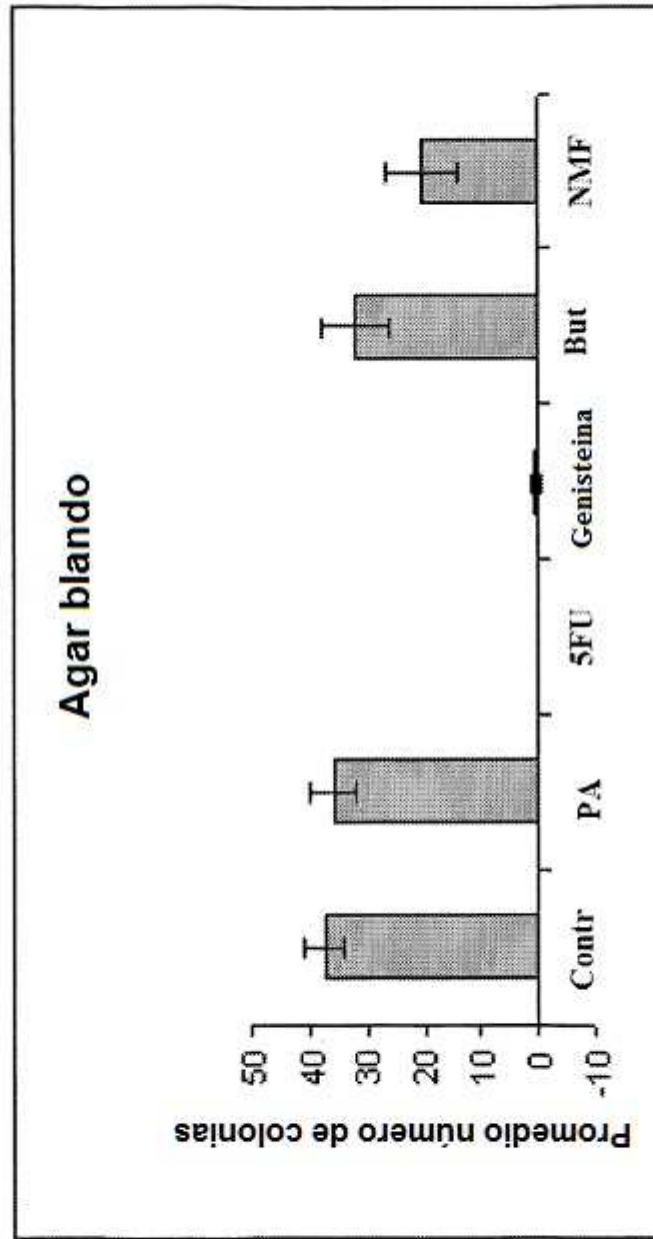


Fig. 21

**Celulas humanas carcinoma de colon cultivadas
en un plato multi-titulo**

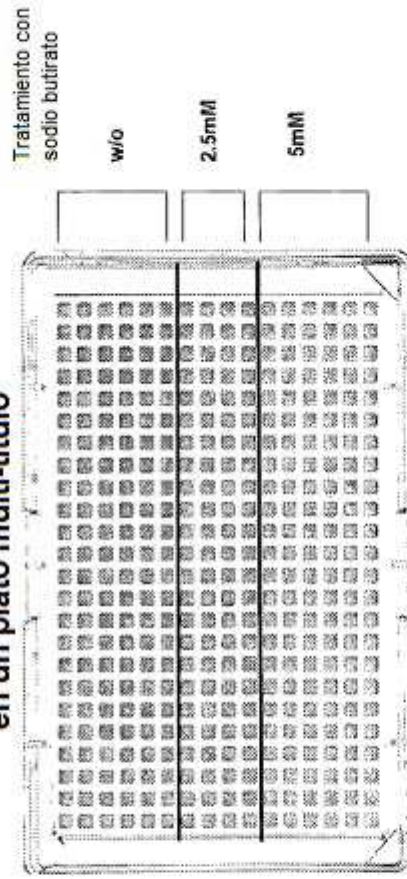


Fig. 22a



Reversión del fenotipo

Fig. 22b

Fig. 22c

Fig. 22d

Fig. 23a

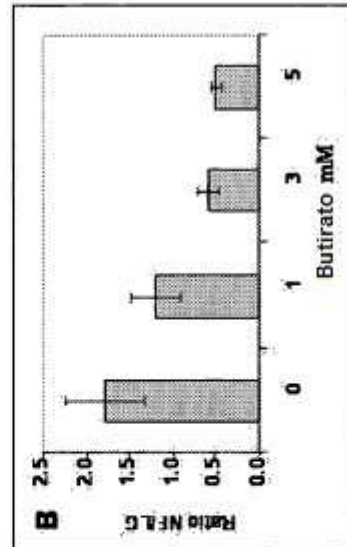
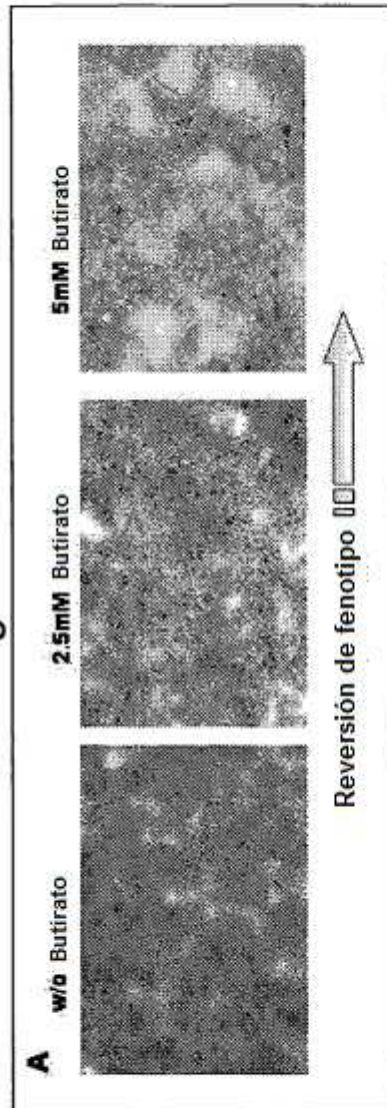


Fig. 23b

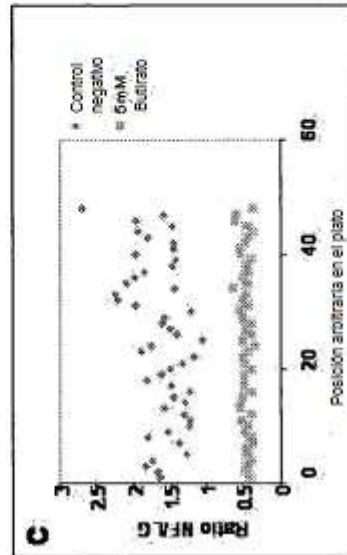


Fig. 23c

Efectos Genisteina en celulas HT-29

Fig. 24a

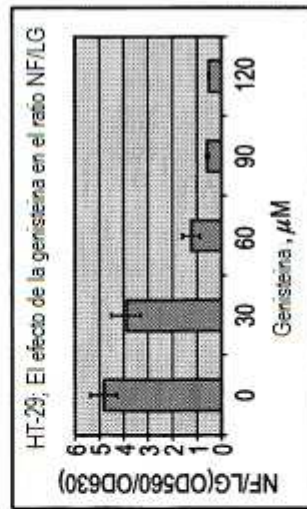
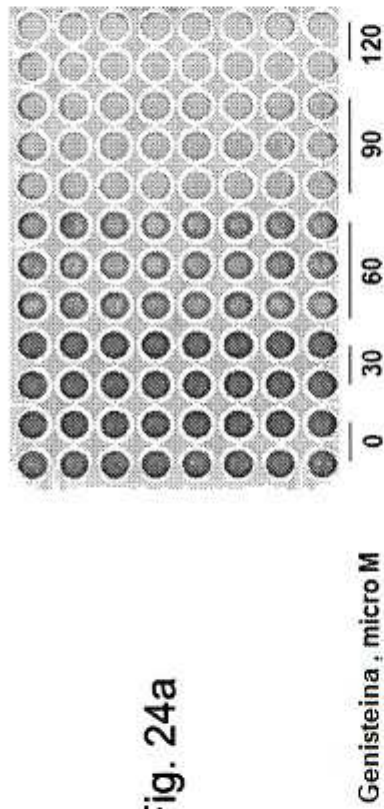


Fig. 24b

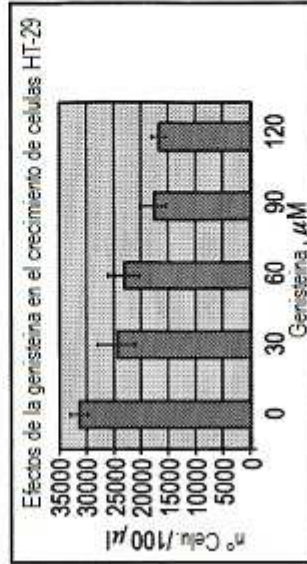


Fig. 24c

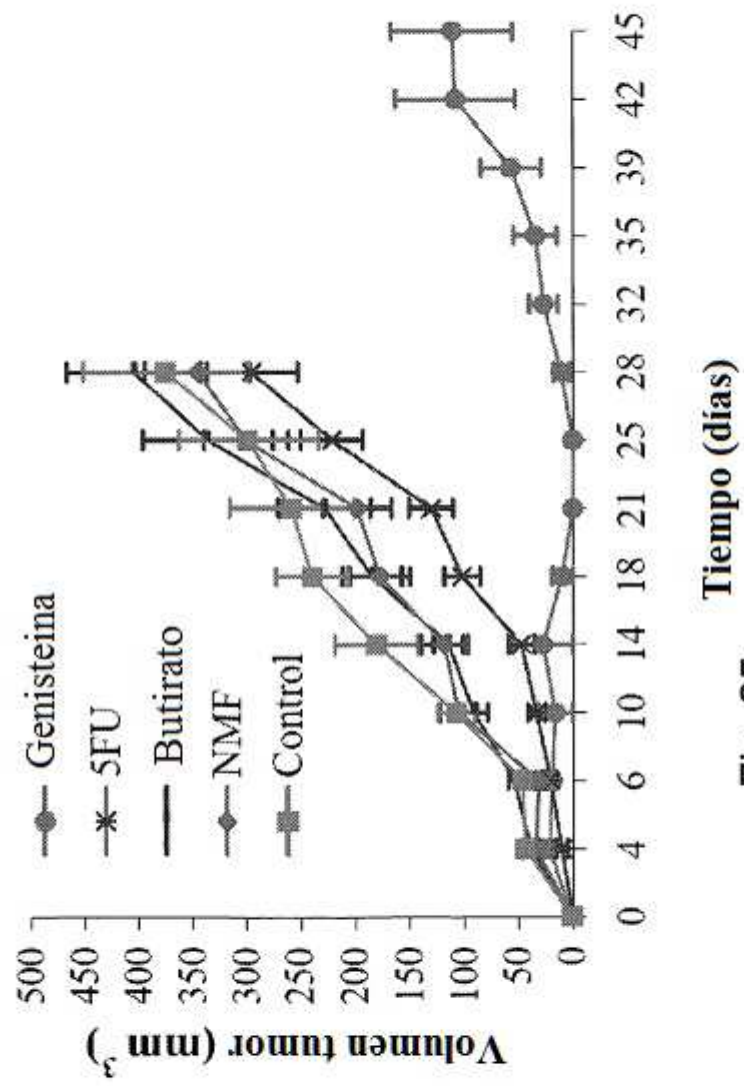
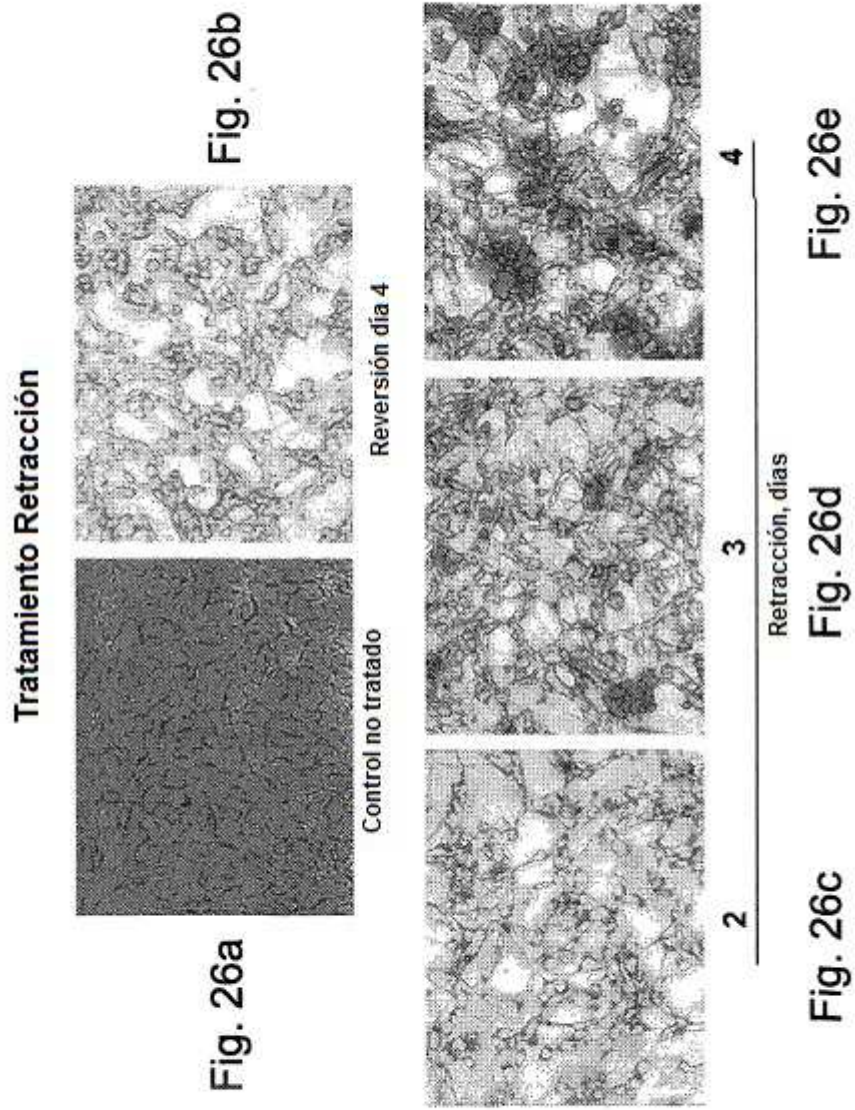


Fig. 25



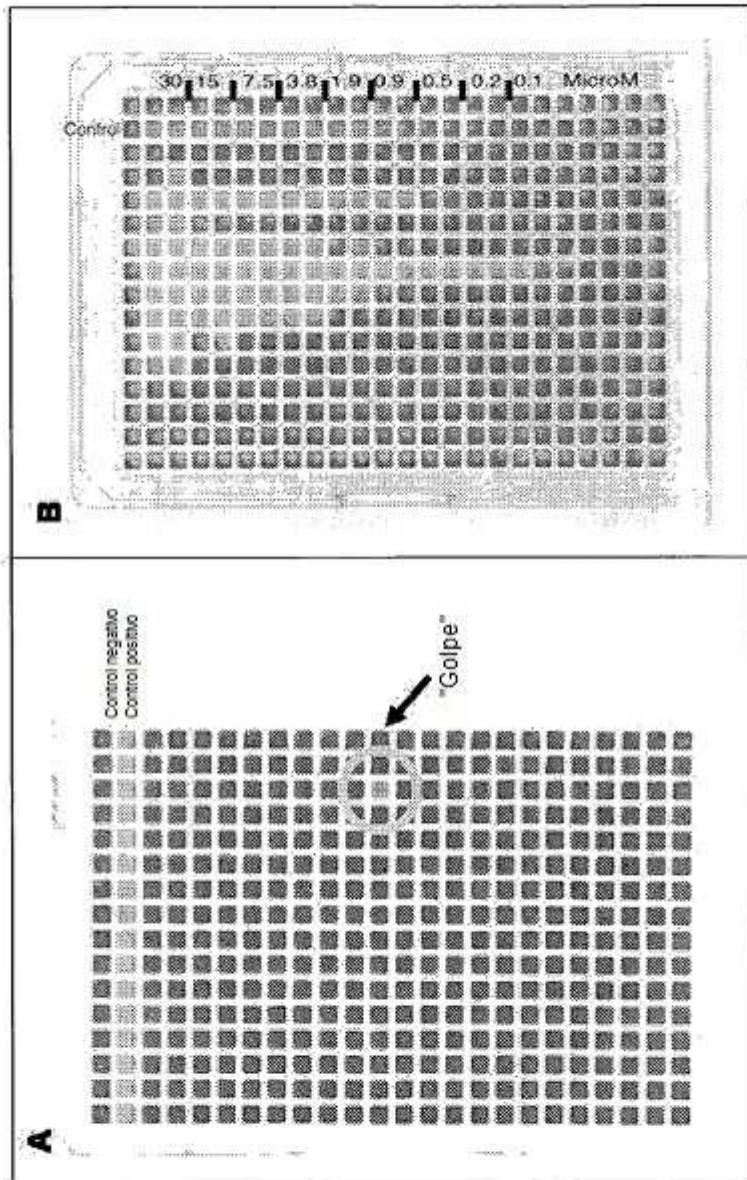


Fig. 27b

Fig. 27a

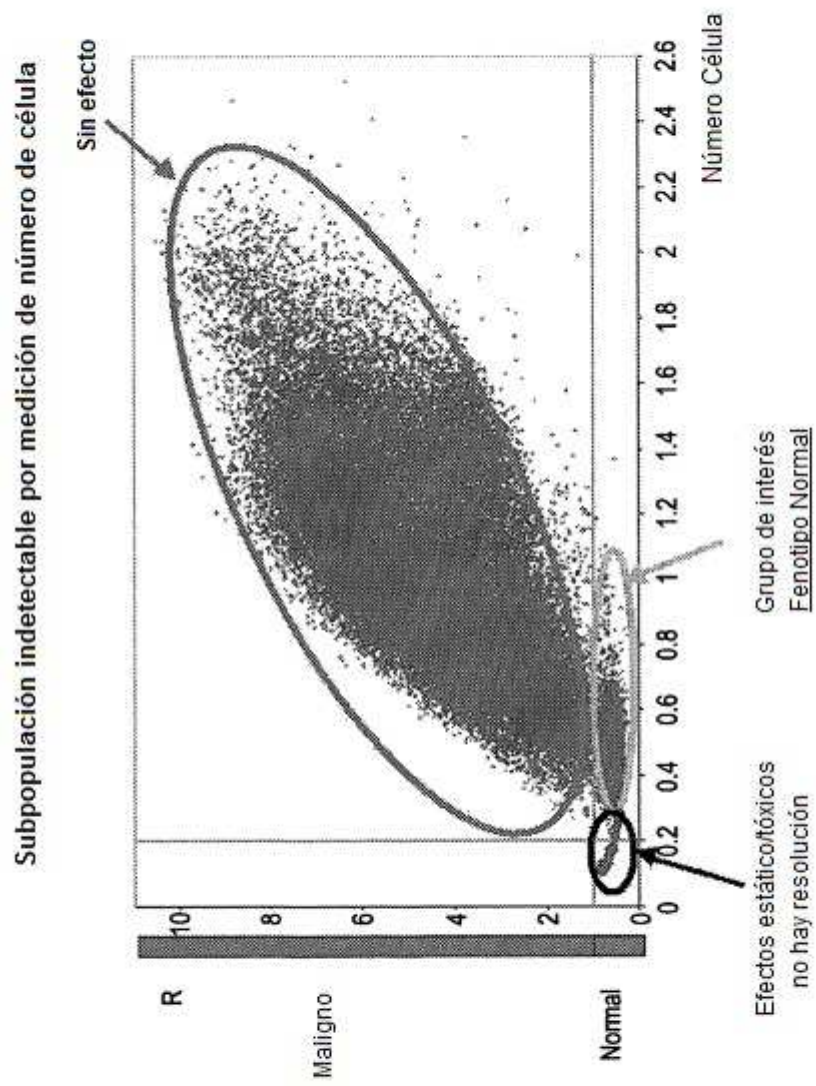
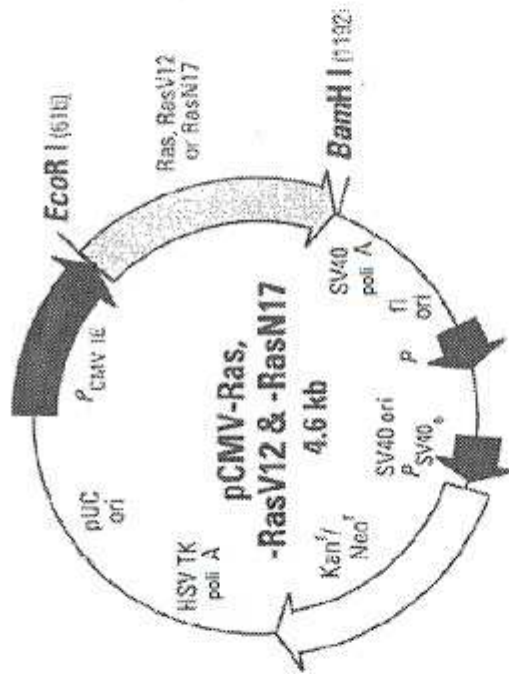


Fig. 28



PCMV-Ras Vector – Tipo salvaje (wt) Proteína Ha-Ras

PCMV-Ras V12 Vector – Forma activa de la Ras

(conteniendo una mutación de glicina a valina en residuo 12)

Fig. 29

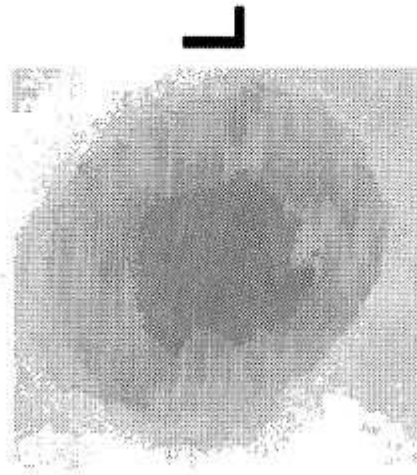


Fig. 30b

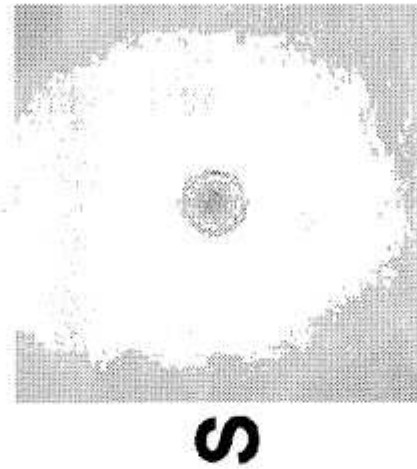
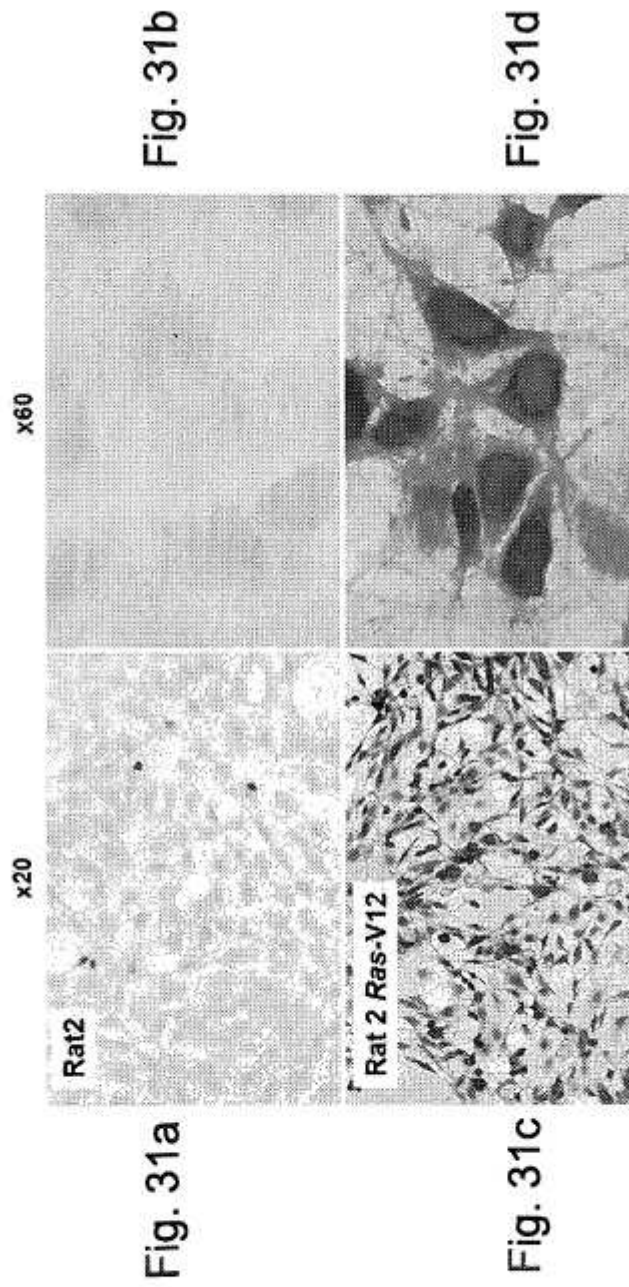
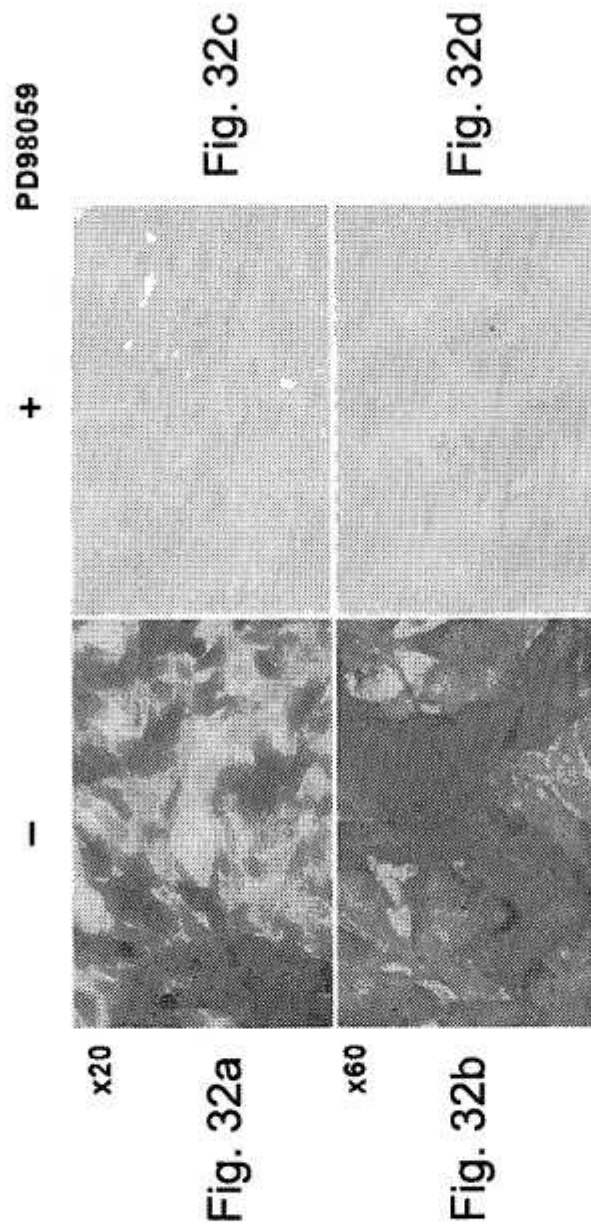


Fig. 30a





Células Ras-transformadas tratadas con inhibidor MEK1/2 (PD98059) muestra cambios en la morfología de ceulas y en tinción CamaRx

Ras/MAPK – detección vía

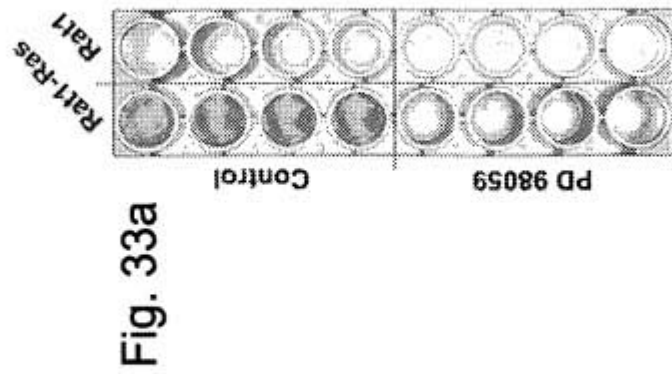


Fig. 33b

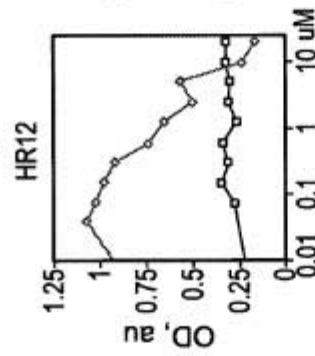


Fig. 33c

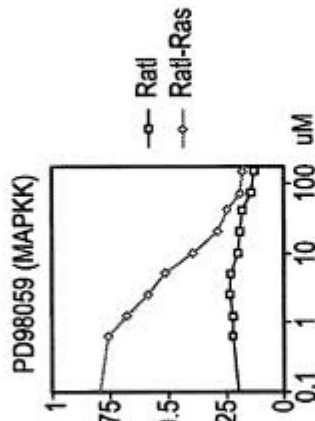


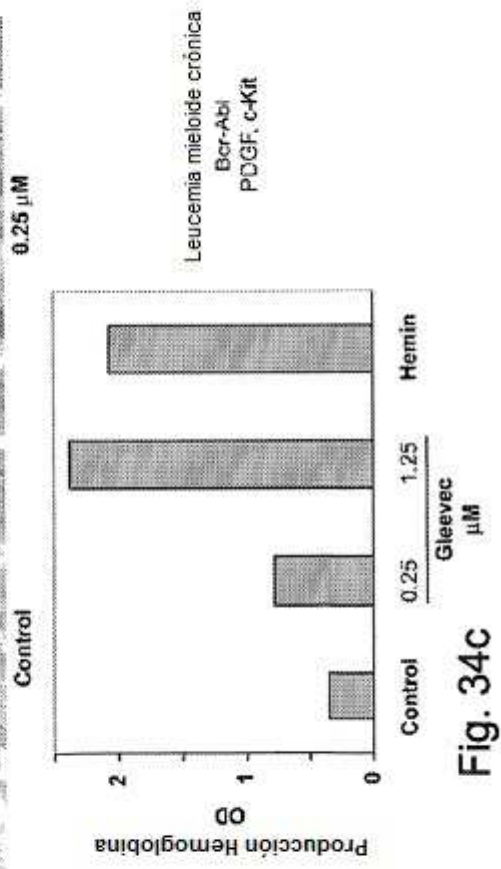
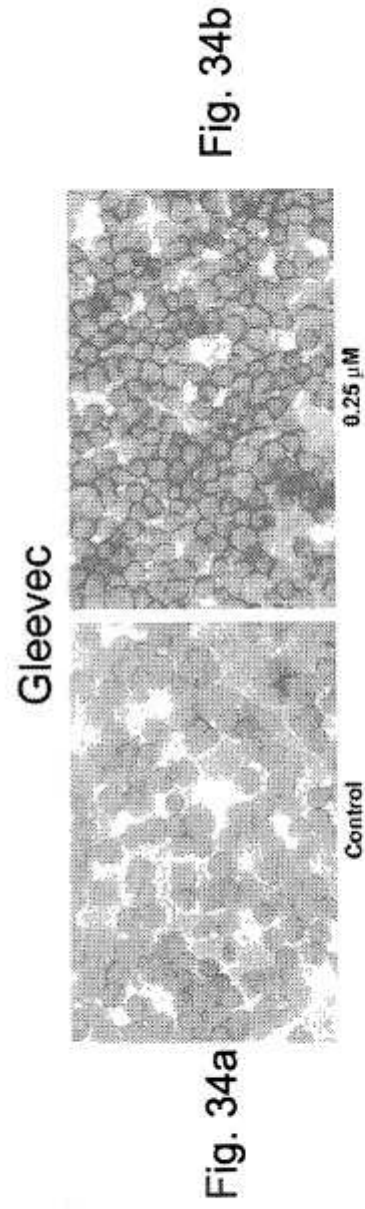
Fig. 33d

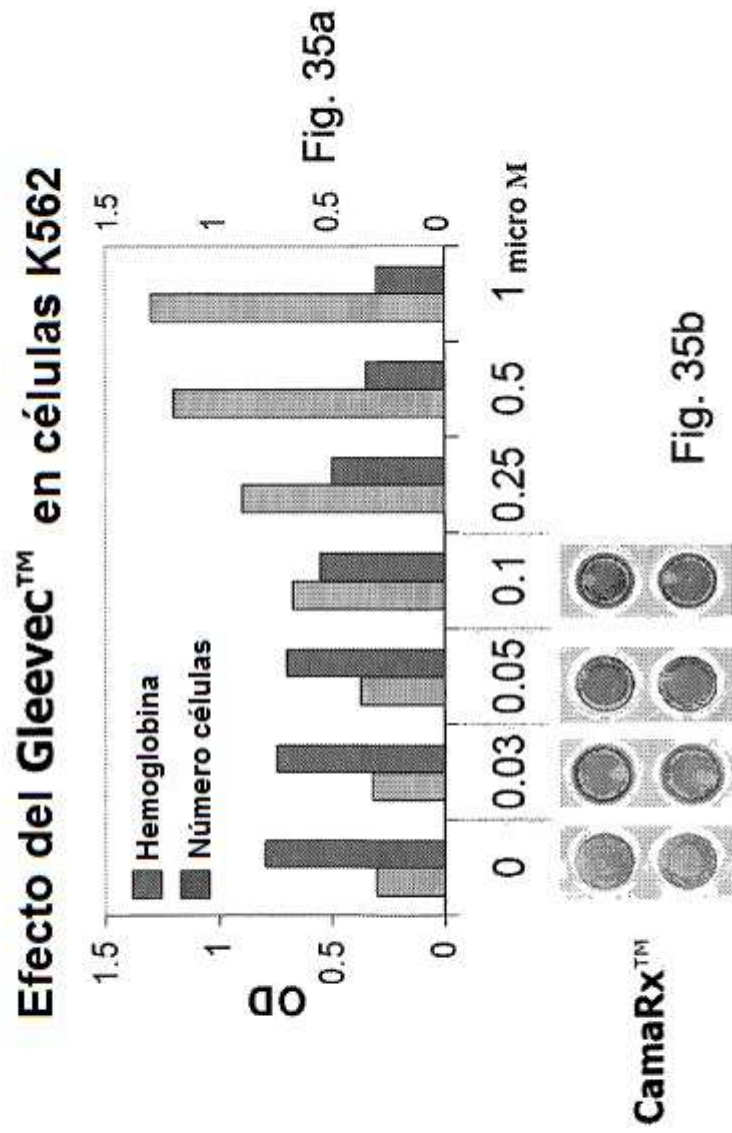
Concentración

Fig. 33e

Estudio dependencia de dosis

Fenotipo





HL-60

control

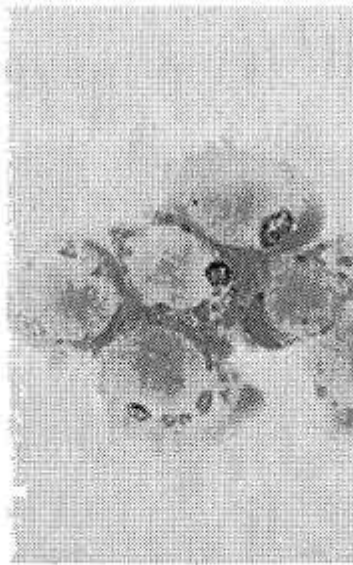


Fig. 36a

1 micro M ATRA



Fig. 36b

**Test de Reducción Nitroblue Tetrazolio (NBT) en células U-937
tratados con Interferon gamma**

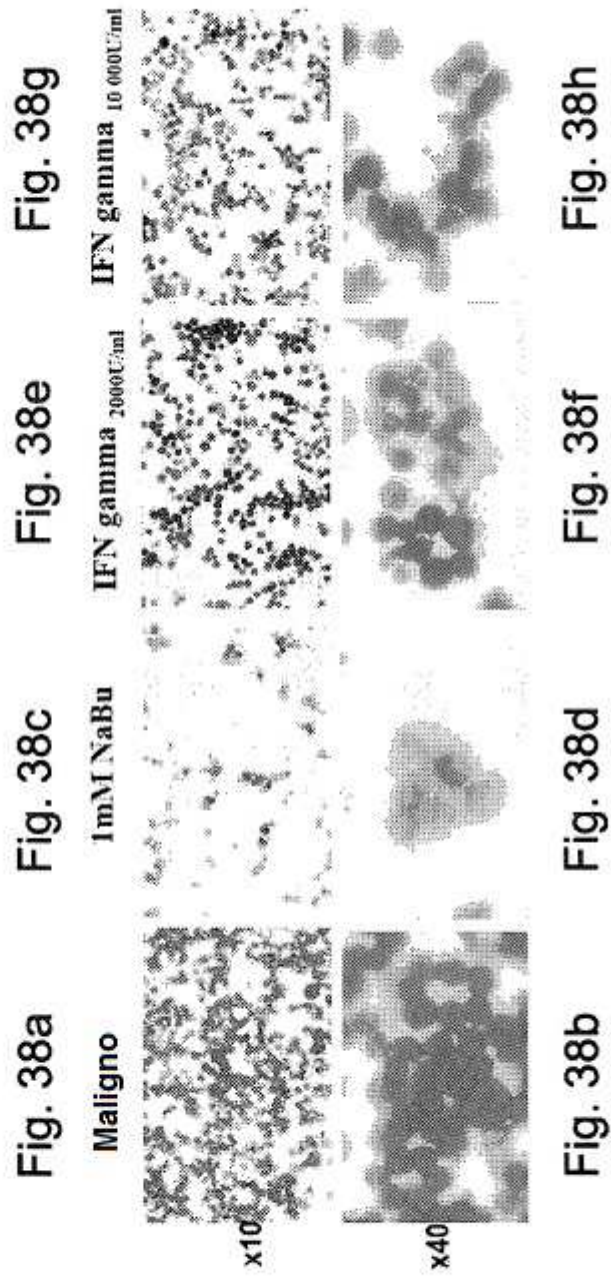


Fig. 37a

Fig. 37b

Fig. 37c

**CamaRx tintado de células U-937 tratadas con Interferon
gamma**



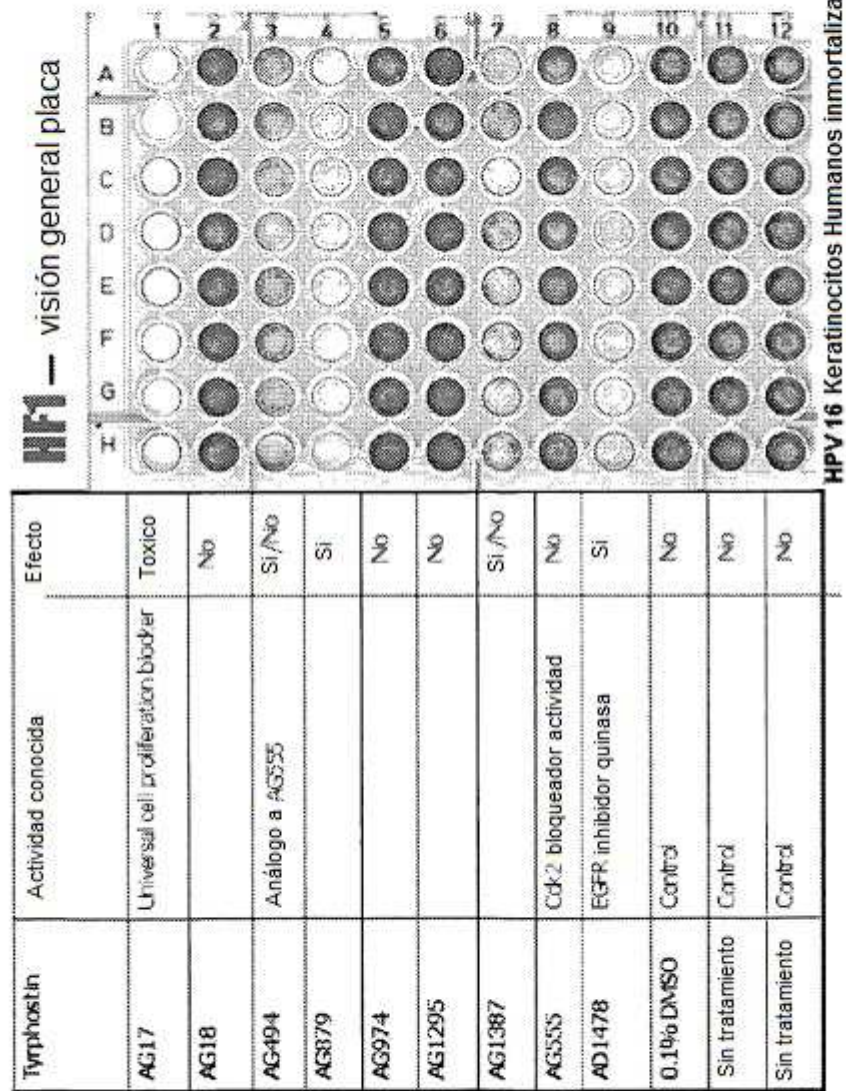


Fig. 39

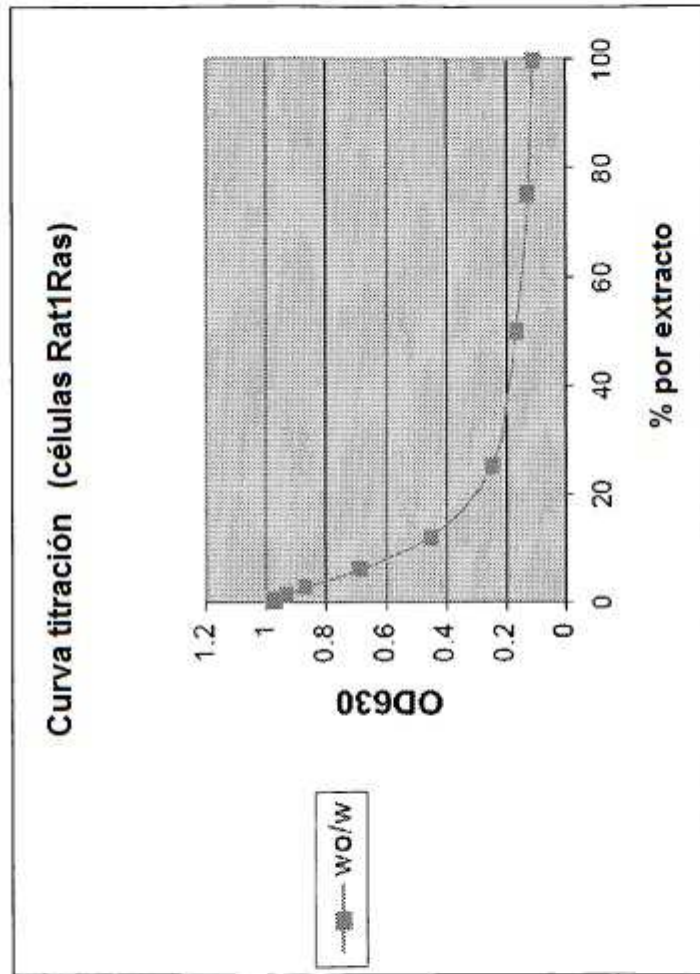


Fig. 40

Sephadex LH-20:
LG inhibición de tintado y cantidad de proantocianidinos
Preparación de cromatografía

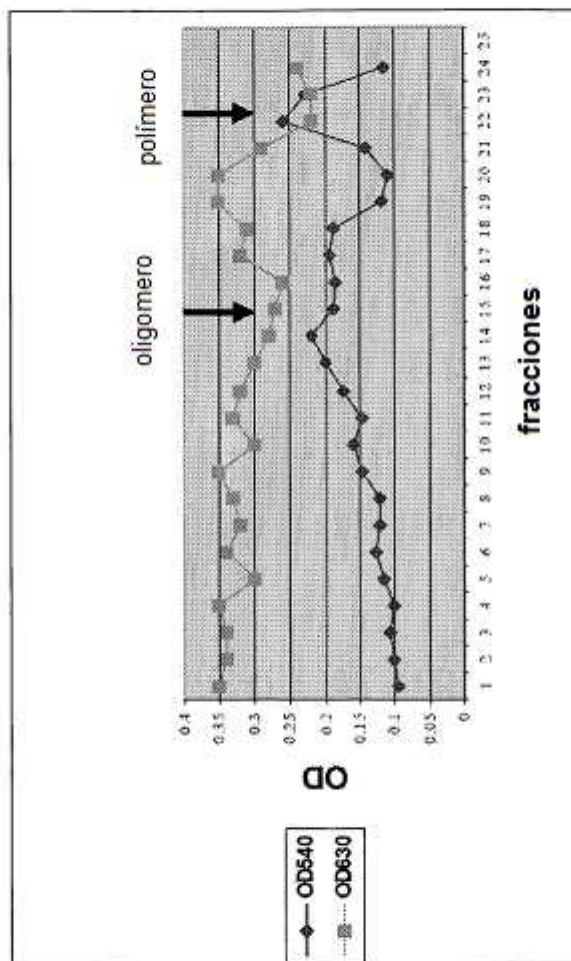


Fig. 41

Huella dactilar de Fluorescencia de CST-2001

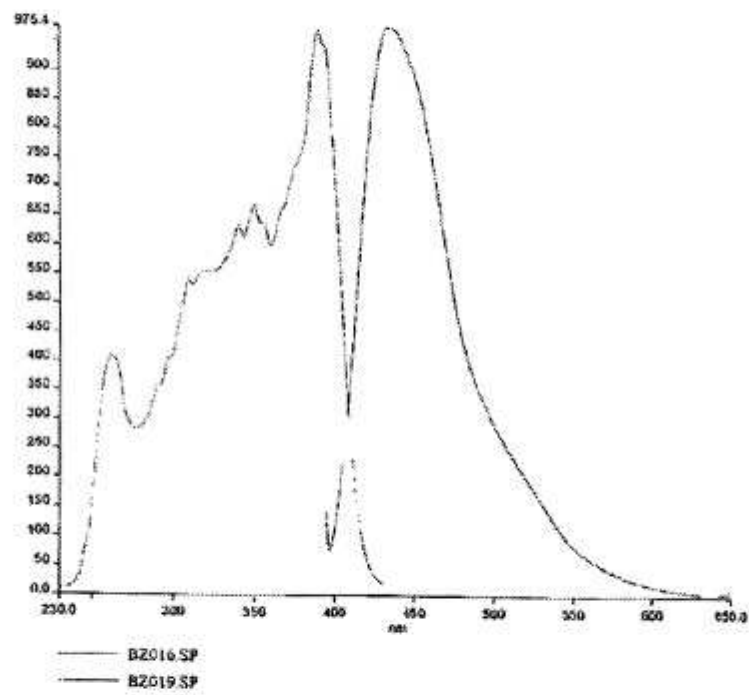


Fig. 42

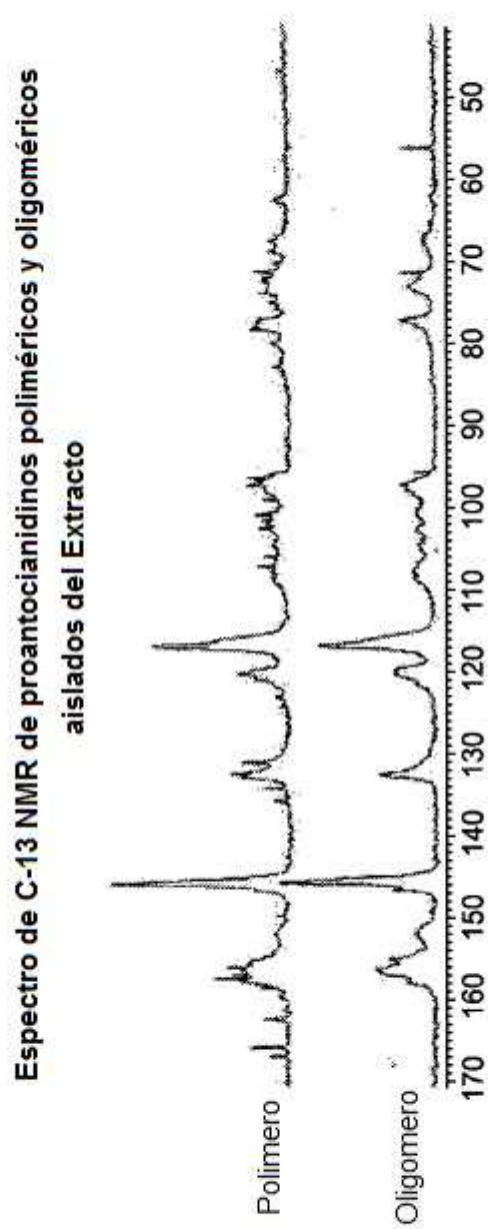


Fig. 43

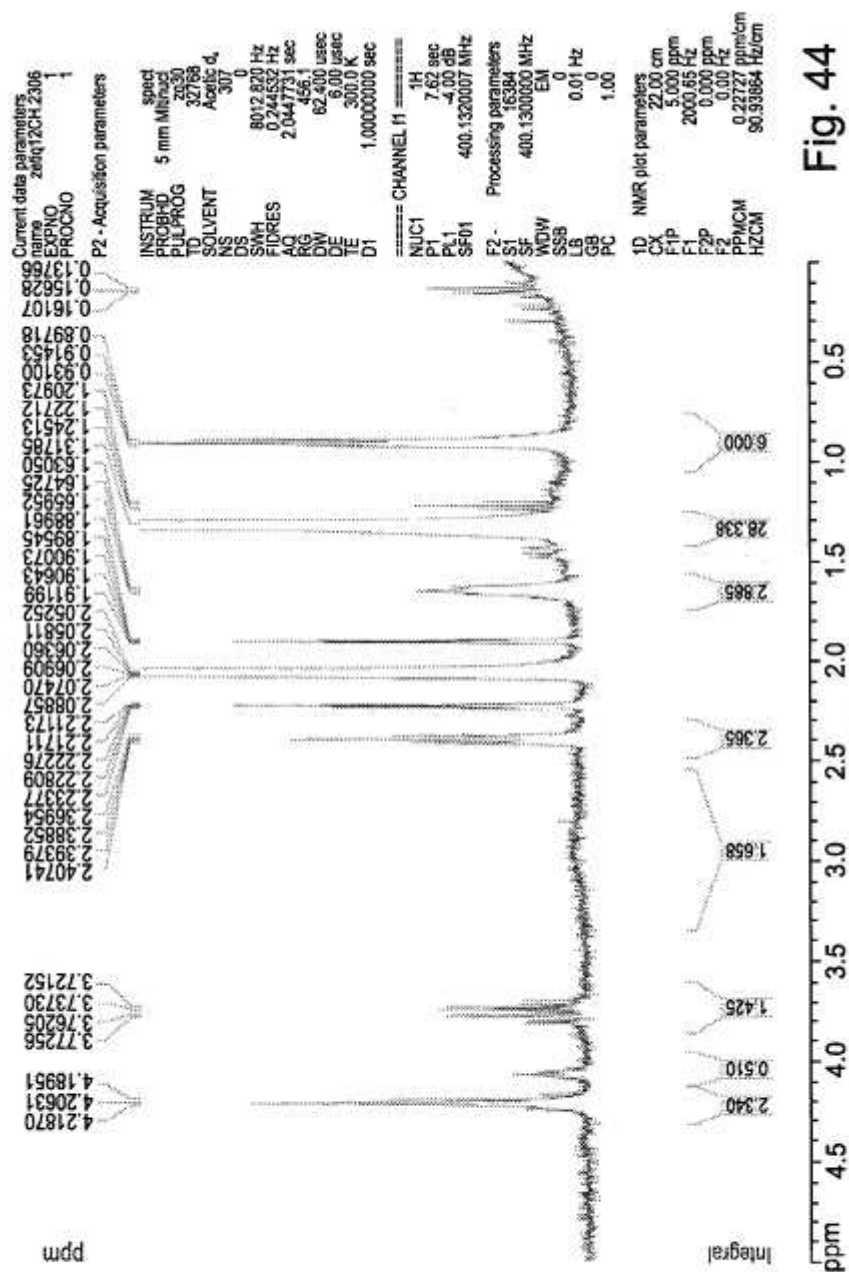
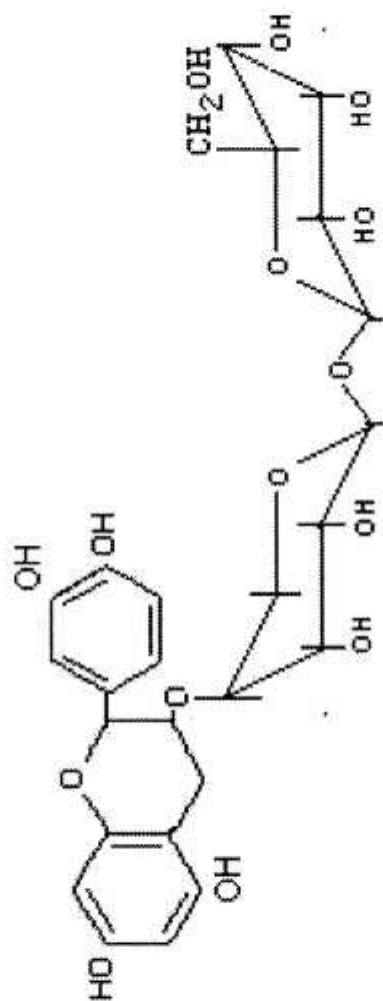


Fig. 44

OLIGOMER-1 CST-2001

(MW 584.58)

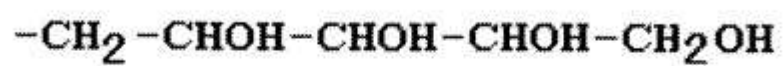
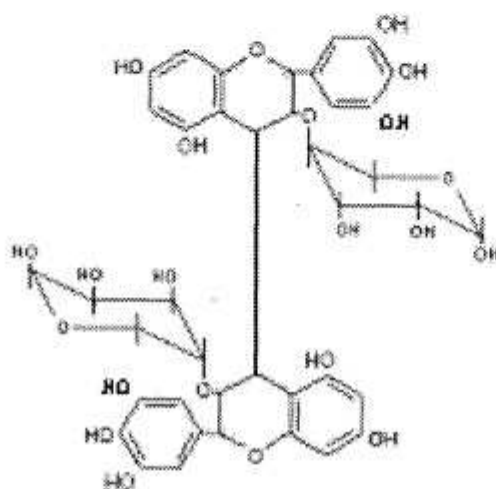


MS: 294 y 587 $C_{26}H_{32}O_{15}$

Fig. 45

OLIGOMER-2 CST-2001

(MW 874.82)



MS: 438 y 877

Fig. 46

Interacción Diferencial del extracto de planta crudo con células malignas y normales

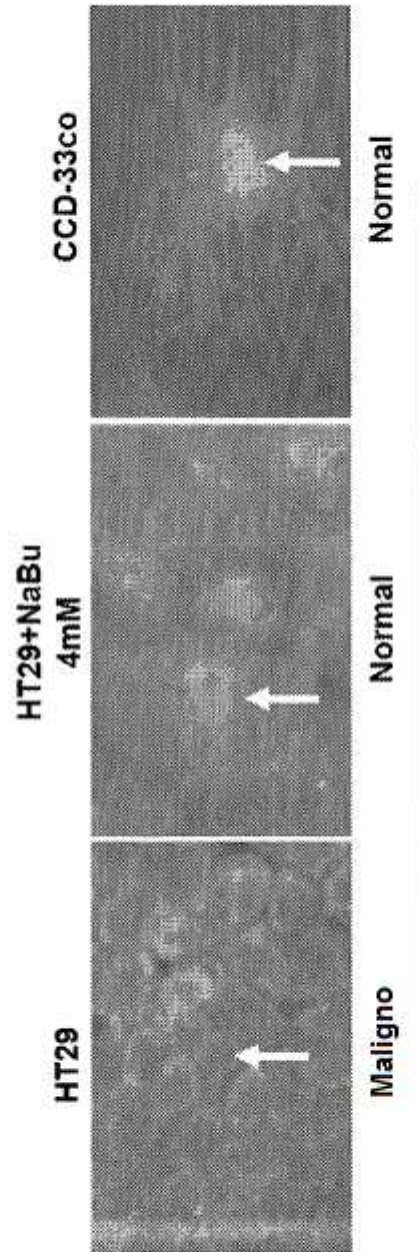
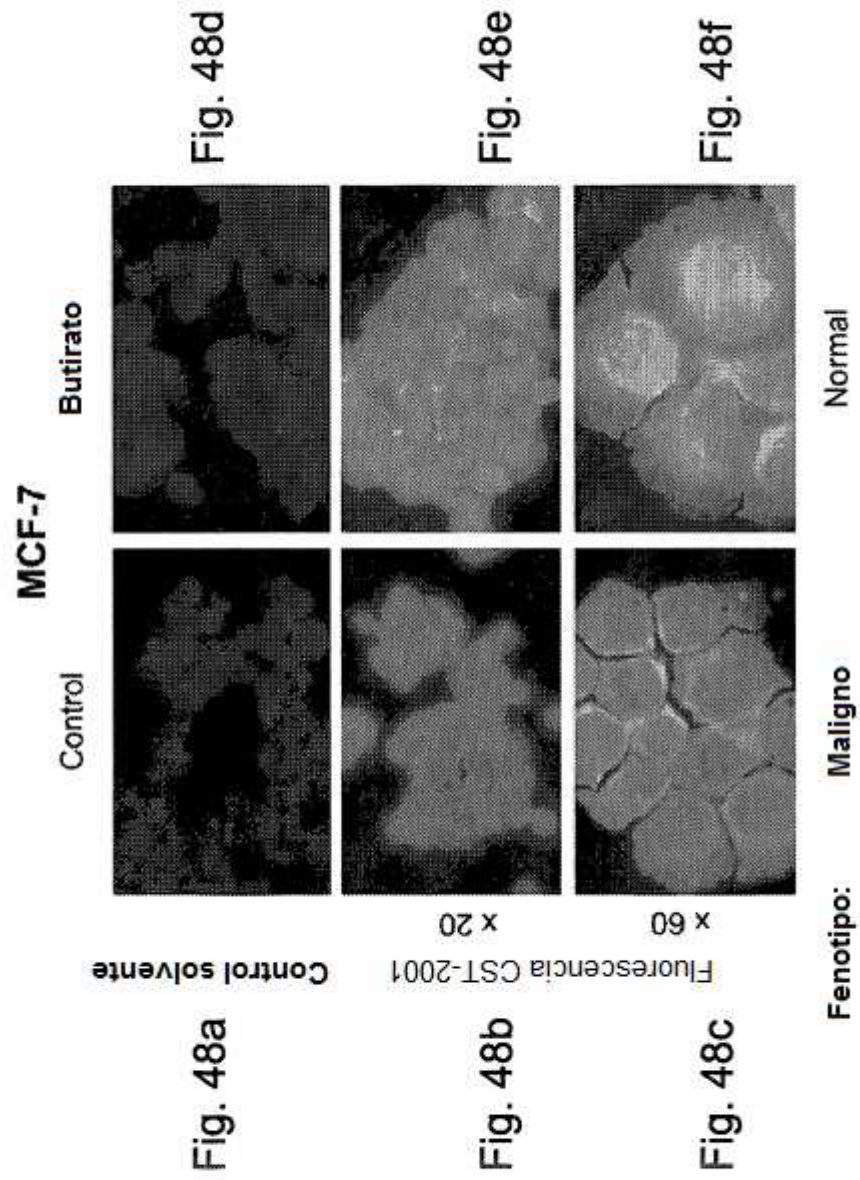


Fig. 47a

Fig. 47b

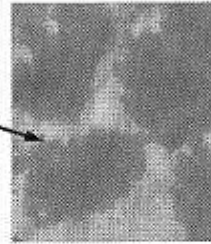
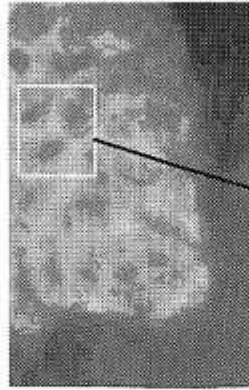
Fig. 47c



Colon

Fig. 49a

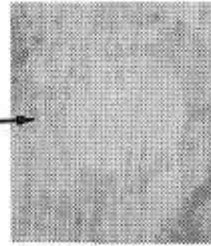
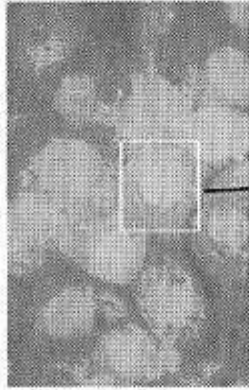
Control



Fenotipo: Maligno
(HT-29)

Fig. 49b

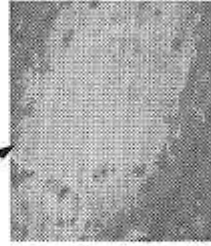
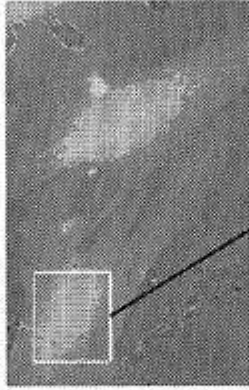
Butirato



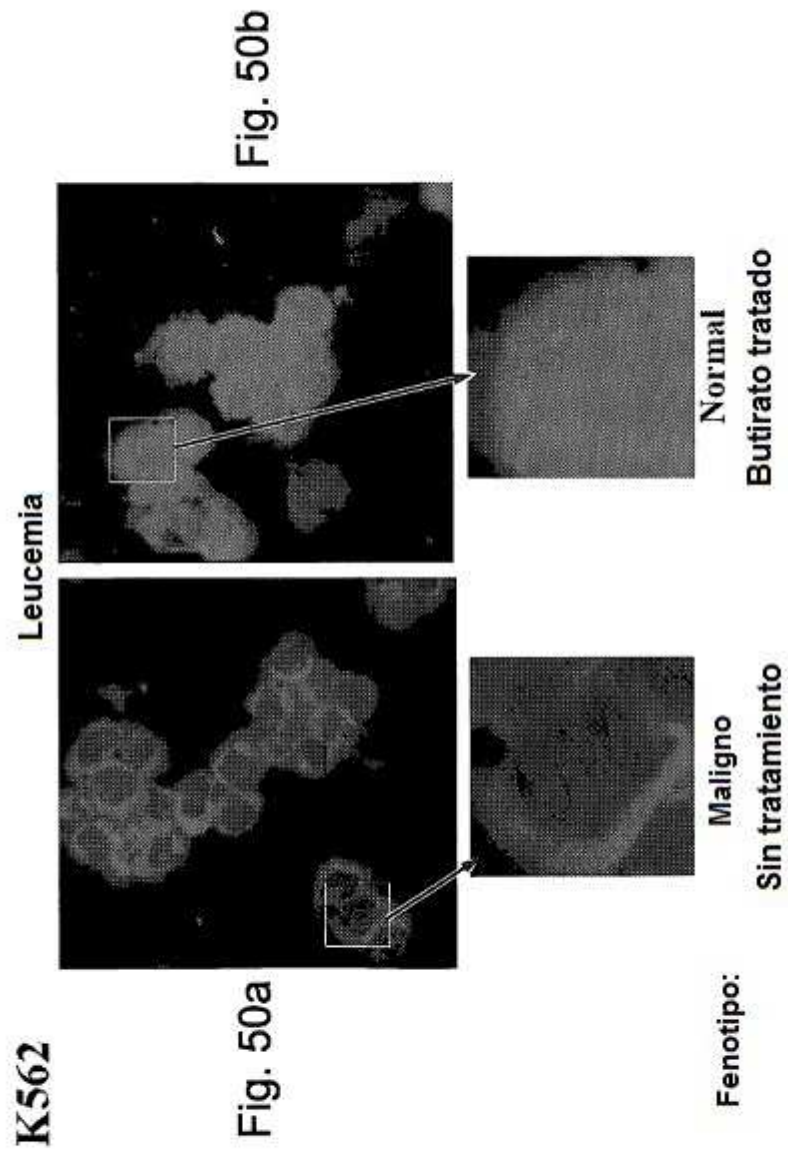
Normal
(HT-29 tratado)

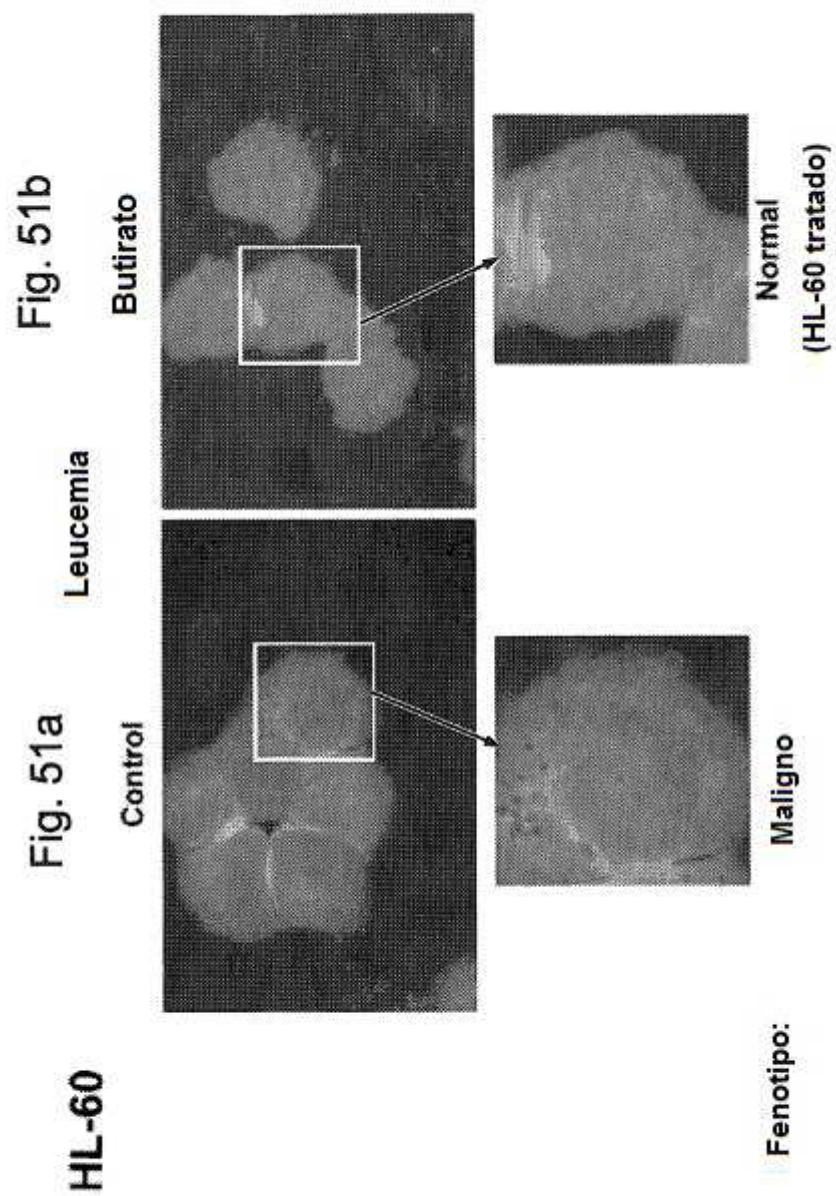
Fig. 49c

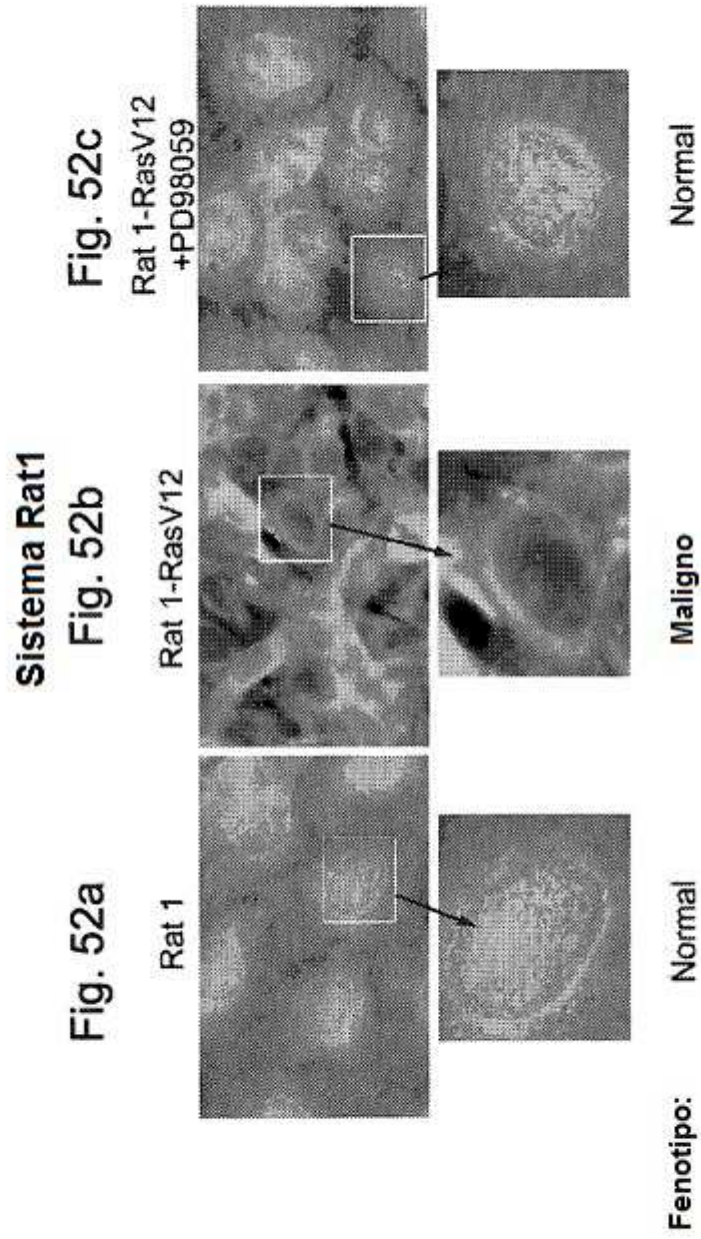
Células normales primarias

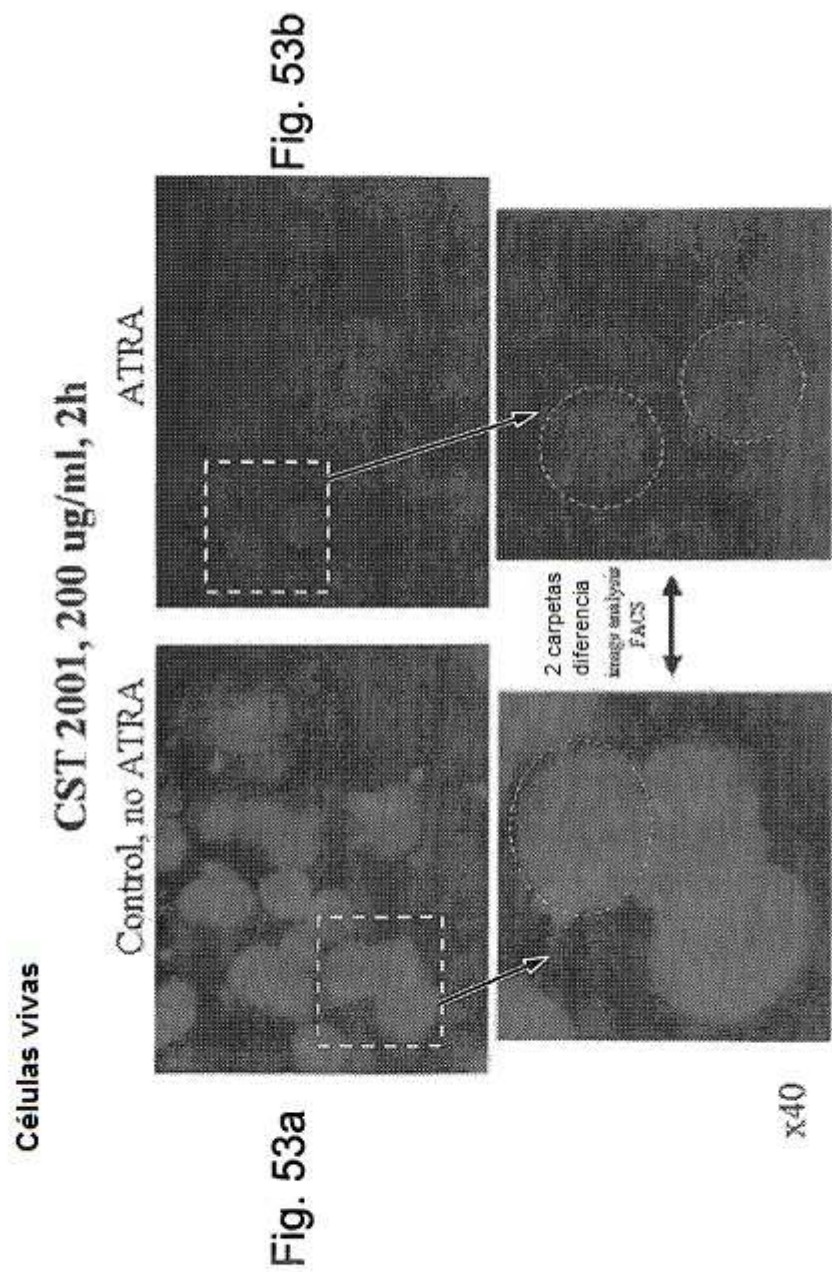


Normal
(colonocitos primarios)









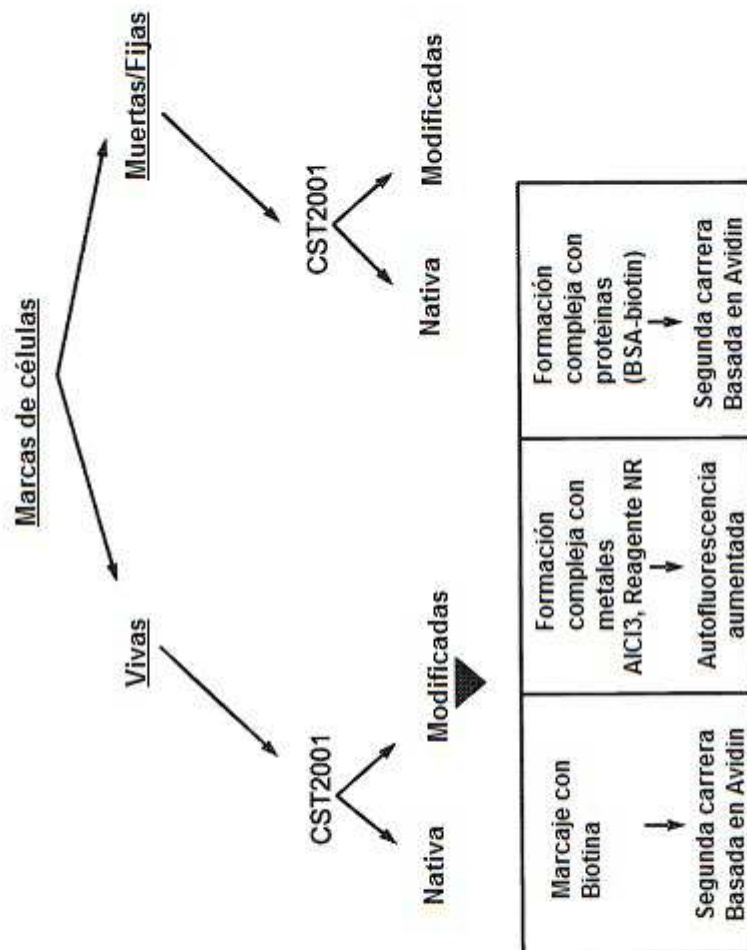
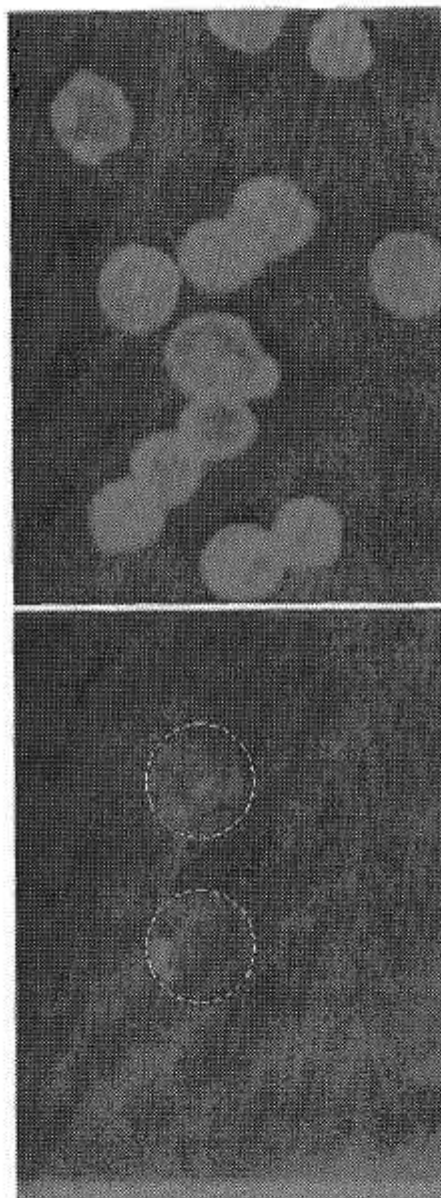


Fig. 54

Biotinilación CST 2001

Células de leucemia U937



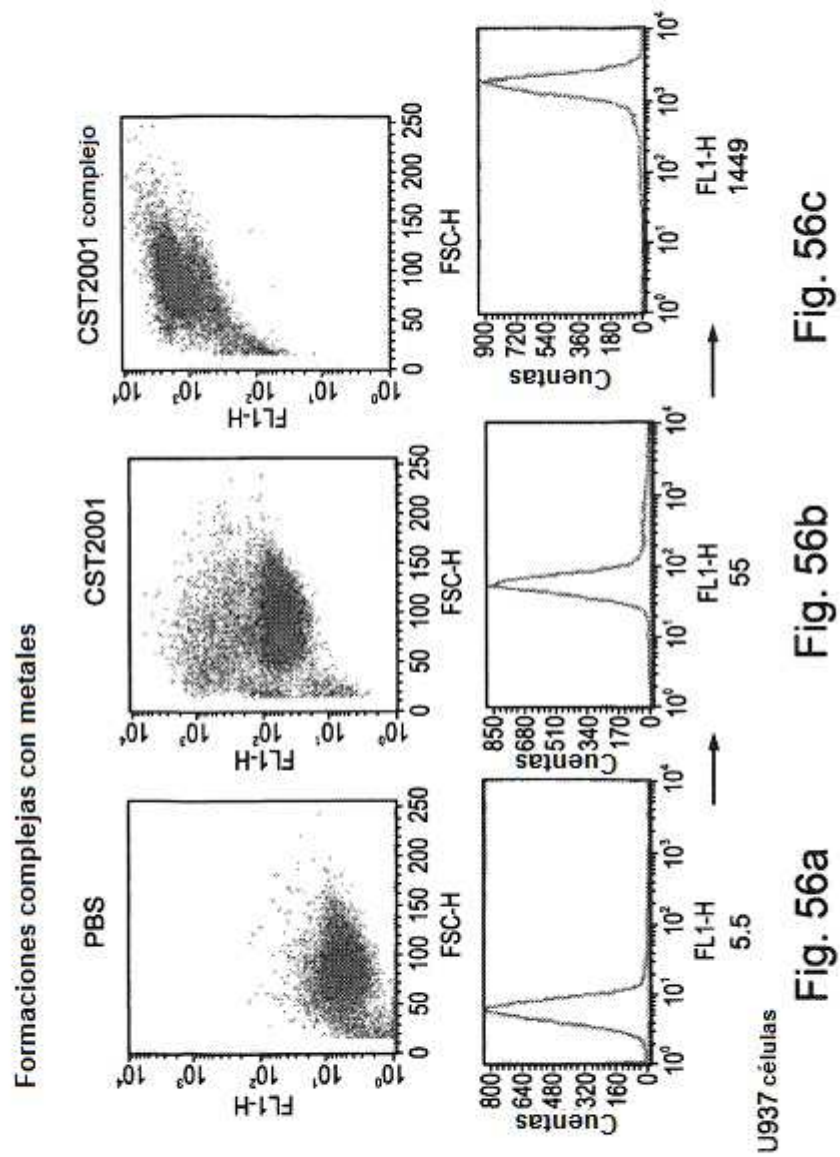
Nativo CST 2001

CST 2001 Biotinilado
visualizado con Streptavidin Cy3

10 carpetas
diferencia
FACS

Fig. 55a

Fig. 55b



CST 2001 precipita una variedad de proteínas

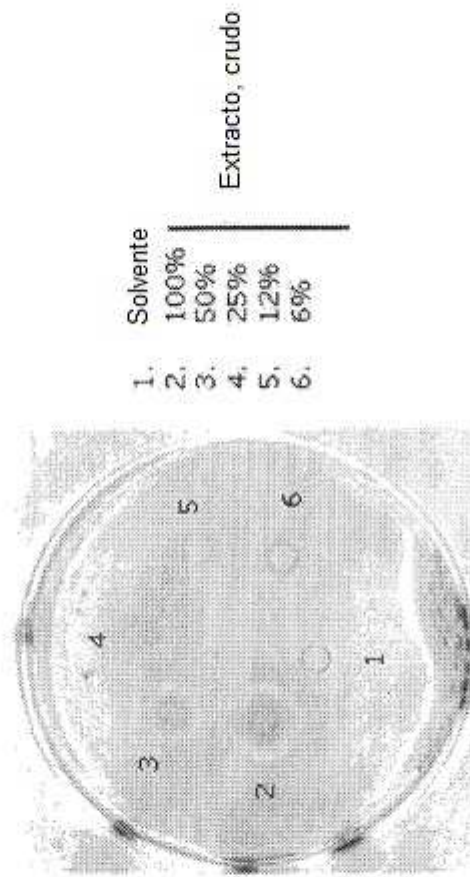
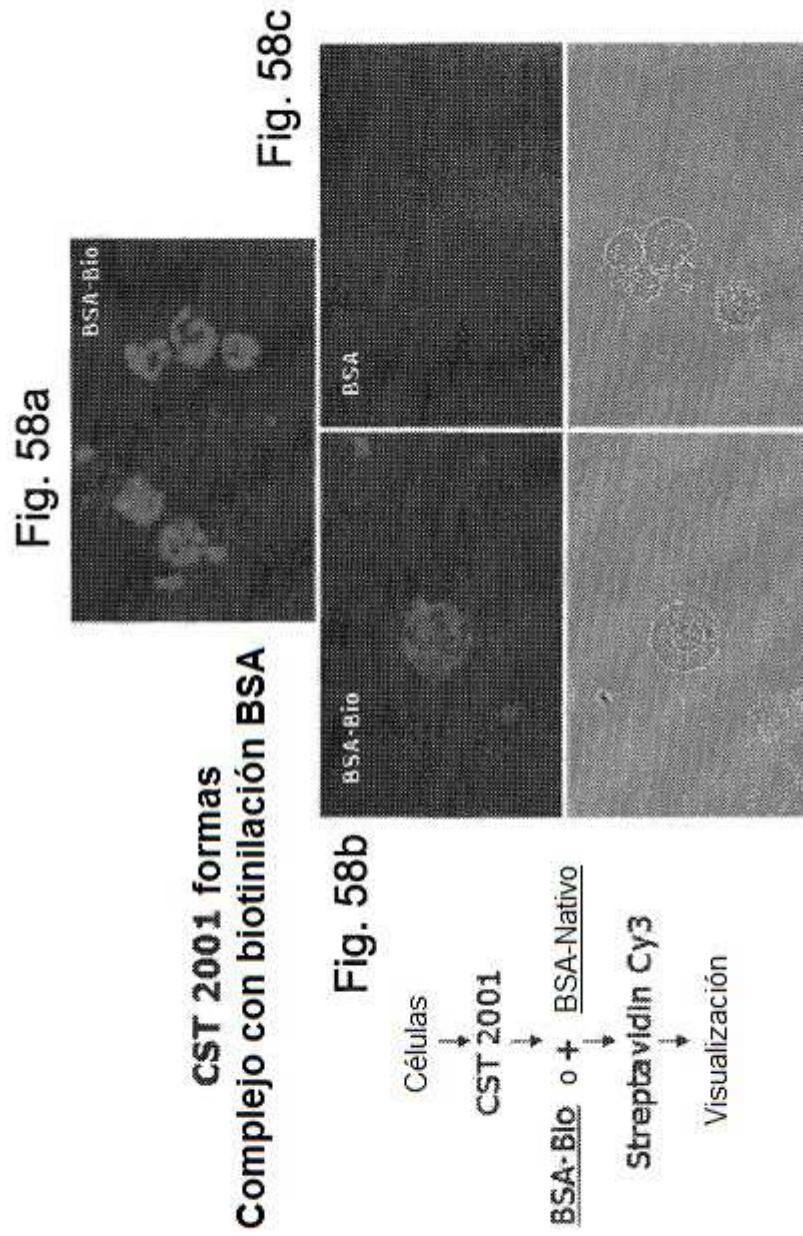


Fig. 57



Células vivas

CST 2001+NR

Control

Butirato

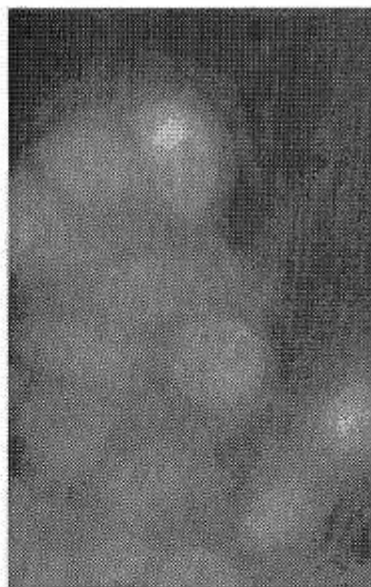


Fig. 59a

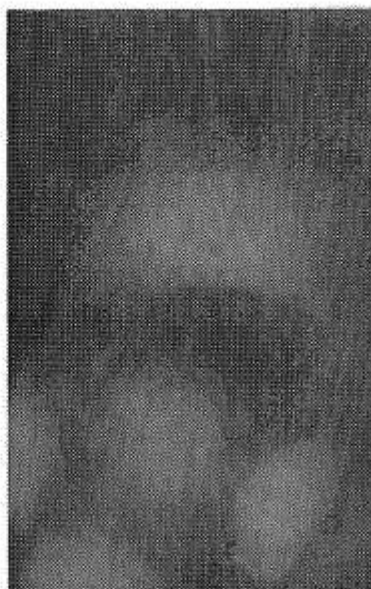


Fig. 59b

CST 2001+NR

Rat2 Células

Rat2-RasV12 Células

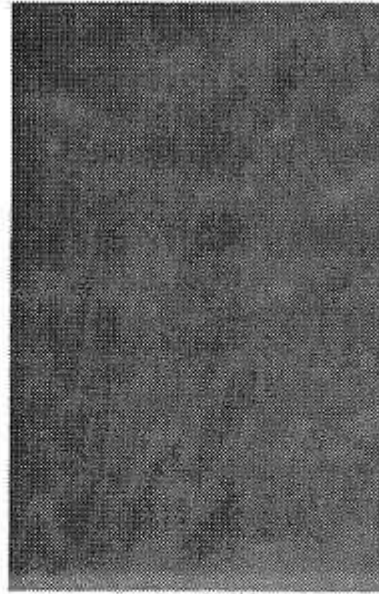


Fig. 60a

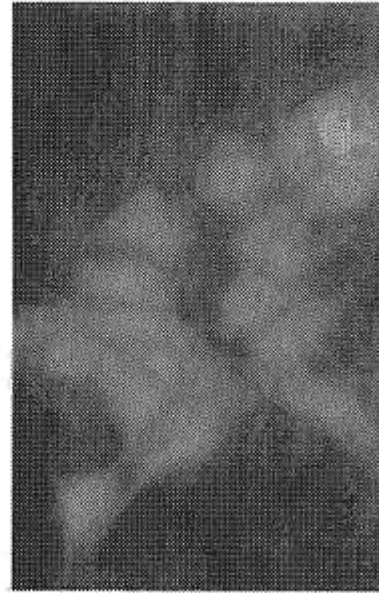
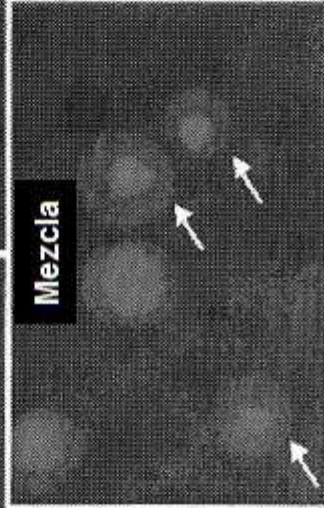
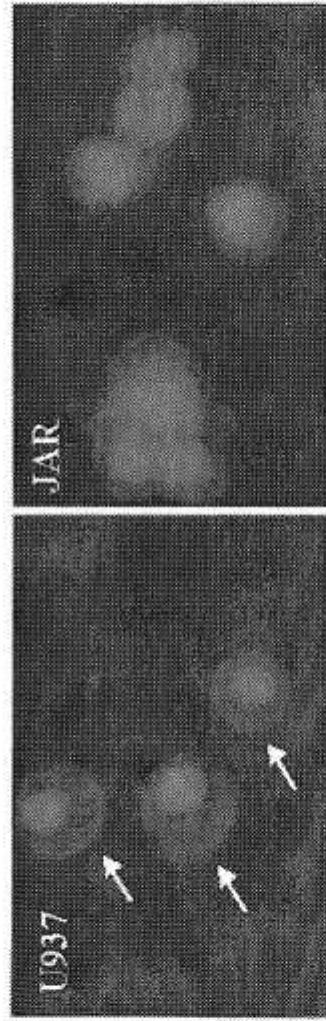


Fig. 60b

Fig. 61a Línea de célula originada por Placenta (coriocarcinoma) **Fig. 61b**



CST 2001 complejo
con reagente Naturstoff

Fig. 61c

