

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 029**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/30** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2011 PCT/IL2011/050016**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12070041**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2011 E 11842792 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2643481**

54 Título: **Métodos y kits para tinción diferencial de las células anormales del sistema urinario**

30 Prioridad:

**22.11.2010 US 415893 P**

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

**05.12.2016**

73 Titular/es:

**ZETIQ TECHNOLOGIES LTD. (100.0%)  
Building 3, 5th floor, Kiryat Atidim  
Tel Aviv 61581, IL**

72 Inventor/es:

**IDELEVICH PAVEL;  
ELKELES, ADI;  
TERKIELTAUB, DOV y  
EYAL, AMI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 593 029 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 y kits para tinción diferencial de las células anormales del sistema urinario****Descripción**5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a métodos para la identificación de células anormales/atípicos sistema urinario incluyendo, por ejemplo, células de cáncer de vejiga.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 [0002] El sistema urinario (también llamado sistema excretor o urinario) es el sistema que produce, almacena y elimina la orina. En los seres humanos que incluye dos riñones, dos uréteres, la vejiga y la uretra. La vejiga urinaria es un órgano muscular hueco y distensible que recoge la orina excretada por los riñones antes de su eliminación por la orina. tejido de la vejiga urinaria y, en particular, el revestimiento epitelial del tracto urinario inferior (uréteres, la vejiga urinaria y la uretra), que se conoce colectivamente como el urotelio, es susceptible de numerosos tipos de patologías caracterizadas por células anormales/atípicas incluyendo lesiones, tumores y cánceres.

20 [0003] Puesto que las células uroteliales anormales pueden ser un indicio de cáncer urotelial, la identificación precoz de dichas células y el seguimiento de individuos diagnosticados puede ser utilizado para prevenir o tratar patologías que amenazan la vida de manera efectiva.

25 [0004] El cáncer de vejiga se refiere a cualquiera de varios tipos de tumores malignos de la vejiga urinaria. Es una enfermedad en la que las células anormales se multiplican sin control en la vejiga. El tipo más común de cáncer de vejiga, carcinoma de células transicionales (TCC), se inicia en el urotelio.

30 [0005] El carcinoma de la vejiga urinaria se produce con una incidencia de 15 casos por cada 100.000 personas en la población general. Es el cuarto tipo de cáncer más común en los varones y su frecuencia es 3 veces mayor en los hombres que en las mujeres. Más del 90% de los cánceres de vejiga recién diagnosticados son carcinomas de células transicionales. La tasa de supervivencia a 5 años es de ~ 95% cuando el tumor está confinado a la vejiga, y disminuye a un 46% y un 6% al difundirse localmente o en sitios distantes, respectivamente, haciendo hincapié en la necesidad de una herramienta de detección temprana eficaz.

35 [0006] El actual "estándar de oro" para la detección de cáncer de vejiga incluye la citología de orina y cistoscopia. Cistoscopia es una prueba invasiva y se asocia con costos relativamente altos, y la citología de orina tiene una baja sensibilidad, particularmente en TCC superficiales de bajo grado. Muchos estudios clínicos están en marcha con el objetivo de la introducción de nuevos marcadores moleculares en muestras de orina para la detección de TCC. Estas pruebas son potencialmente costosas y por lo tanto representan un desafío para la aplicabilidad como herramienta de cribado general.

40 [0007] Por lo tanto, hay una necesidad de un método preciso de detección de cáncer de vejiga, especialmente en las primeras etapas de los mismos.

45 [0008] Idevlevich Pavel et al. ("Tinción histoquímica novedosa para la detección de cáncer de tinción y células neoplásicas", Journal of Histotechnology del 1 de septiembre de 2009, Downers Grove, IL, EE.UU.; Vol. 32, nº 3, p. 97-105) describe tres kits desarrollados por ZetiQ Technologies Ltd. denominados colectivamente CellDetect®. También se describe el uso de estos kits para la tinción de las células y el material clínico, incluyendo un tejido de la vejiga urinaria. Los kits CellDetect® contienen tres ingredientes: 1) una mancha roja acidófilo, 2) una mancha verde basófilo, y 3) un extracto de planta.

50 **RESUMEN DE LA INVENCION**

55 [0009] Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificación de células anormales en una muestra de células de la orina, el método que comprende (a) la fijación de la muestra de orina que comprende células del sistema urinario en ácido tricloroacético; (b) la puesta en contacto de la muestra de orina con un extracto de la planta Ficus o uno o más componentes del mismo, por lo tanto la obtención de células del sistema urinario anormales acondicionadas; (c) la tinción de dichas células del sistema urinario acondicionadas con un colorante básico y un tinte ácido, de manera que un citoplasma de las células anormales de las manchas de células del sistema urinario con un color predominantemente rosa o rojo.

60 [0010] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, la planta Ficus es del subgénero Urostigma, y es preferiblemente Ficus elástica.

65 [0011] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el extracto de la planta Ficus es un extracto de etanol de tejido de la hoja.

[0012] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el colorante básico es Nueva Fucsina y el colorante ácido es Verde claro o Verde Rápida.

5 [0013] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, la tinción de las células del sistema urinario con aire acondicionado y Nueva Fucsina se sigue por la tinción de las células con Verde claro o Verde Rápida.

[0014] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, las células del sistema urinario son células de urotelio; o las células del sistema urinario son células de la vejiga.

10 [0015] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el uno o más componentes del extracto incluyen uno o más flavonoides; o el uno o más componentes del extracto incluyen uno o más flavonoides y el uno o más flavonoides incluyen proantocianidinas.

15 [0016] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, las células del sistema urinario son células uroteliales, las células condicionadas se tiñen secuencialmente con el colorante básico y el colorante ácido, y la identificación de al menos una célula urotelial que tiene un citoplasma que tiene un color de base de tinte por encima de un umbral predeterminado es indicativo de células anormales en la muestra.

20 [0017] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, las células del sistema urinario son células de la vejiga, y la identificación de al menos una célula de la vejiga que tiene un citoplasma rojo encima de un umbral predeterminado es la identificación de anomalías celulares indicativas de la patología de la vejiga.

25 [0018] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el método comprende además el análisis de una morfología de la célula al menos una vejiga que tiene un citoplasma de color predominantemente rosa a rojo, en el que las células acondicionadas se tiñen secuencialmente con el colorante básico y el colorante ácido, en donde el Ficus es Ficus elastica.

30 [0019] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el método comprende además la puesta en contacto de las células de la vejiga con una inmunotinción; o la puesta en contacto de las células de la vejiga con una inmunotinción anti-Ki67.

[0020] De acuerdo con realizaciones de la presente invención, la patología de la vejiga es el cáncer de vejiga; o la patología de la vejiga es el carcinoma de células de transición.

35 [0021] La presente invención aborda con éxito las deficiencias de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando un enfoque preciso y simple para detectar células anormales en un sistema urinario de un sujeto.

40 [0022] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de formas de realización de la invención, se describen a continuación los métodos y/o materiales a modo de ejemplo. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de patente, incluyendo las definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos necesariamente.

45

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

50 [0023] Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se insiste en que los particulares mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden ponerse en práctica formas de realización de la invención.

55 Las FIGs. 1a-d ilustran el epitelio normal de la vejiga manchado con hematoxilina y eosina (H&E), magnificado 40X (Figuras 1a y 1c), o con el actual enfoque de tinción (Figuras 1b y 1d). Como se muestra en estas figuras, el epitelio normal de la vejiga se tiñeron con el presente enfoque exhibe un color citoplásmica verde uniforme.

60 Las Figs. 2a-d ilustran el carcinoma de células transicionales de bajo grado del tejido (TCC) manchadas con H&E (figuras 2a y 2c) o el enfoque actual (Figuras 2b y 2d); magnificado 40X. El citoplasma de las células TCC exhibe un color rojizo/violeta única cuando se tiñen con el presente enfoque.

65 Las Figs. 3a-d ilustran alto grado TCC tejidos manchados con H&E (Figuras 3a y 3c) o el enfoque actual (Figuras 3b y 3d); magnificado 40X. El citoplasma de las células TCC exhibe un color rojizo único cuando se tiñen con el presente enfoque.

Las Figs. 4a-d ilustran displasia epitelial de la vejiga manchada con H&E (Figuras 4a y 4c) o el enfoque actual

(Figuras 3b y 3d); magnificado 40X. El citoplasma de las células displásicas exhibe un color rosa cuando se tiñen con el presente enfoque.

5 Las FIGs. 5a-d ilustran grado bajo de TCC de tejido manchado con el enfoque actual (Figuras 5a y 5c) o inmunotinción Ki67 (Figuras 5b y 5d), magnificado 40X. Áreas de células manchadas en rojo (Figura 5a) tienen un alto índice de Ki67 (Figura 5b), mientras que las áreas de células manchadas en verde (Figura 5c) tienen índice de Ki67 relativamente bajo (Figura 5d).

10 Las FIGs. 6a-b ilustran el grado bajo de TCC de tejido manchado con el enfoque actual (Figura 6a) o Ki67 (Figura 6b), magnificado 10X. El citoplasma de la célula se tiñe con una mezcla de rojo y verde (Figura 6a) y muestra un relativamente bajo índice de Ki67 (Figura 6b).

15 Las Figs. 7a-d ilustran el epitelio normal de la vejiga (figuras 7a-b) y TCC de bajo grado (Figuras 7c-d) manchado con H&E (figuras 7a y 7c) o manchado doble con Ki67 y el enfoque actual (Figuras 7b y 7d); magnificado 40X. El tejido normal exhibe un color azul/verde mancha citoplásmica (Figura 7a) y está desprovisto de células positivas Ki67 (Figura 7b). El tejido TCC de bajo grado presenta una mancha uniforme de color rosa citoplasmática (Figura 7c) e incluye numerosas células positivas Ki67 (Figura 7d).

20 Las Figs. 8a-b ilustran la citología urinaria de células TCC normales y de alto grado y aisladas a partir de muestras de orina, y manchadas con el método actual; magnificado 40X. Citoplasmas de las células epiteliales normales (y células inflamatorias) se tiñen de azul/verde (Figura 8), mientras que los citoplasmas de las células CTP de alto grado se tiñen de color rojo/rosa (Figura 8b).

25 **DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ESPECÍFICAS DE LA INVENCION**

[0024] La presente invención se refiere a métodos para la detección de células del sistema urinario anormales y de uso de los mismos en la diagnosis de una patología como el cáncer de vejiga.

30 [0025] Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, se entiende que la invención no está necesariamente 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 llevarse a cabo de varias maneras.

35 [0026] El cáncer de vejiga (por ejemplo, TCC, carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma) es el quinto cáncer más común en los Estados Unidos. TCC es la forma más común de cáncer de vejiga, la cual representa más del 90% de los casos de cáncer de vejiga en el cáncer de EE.UU. La vejiga actualmente se diagnostica mediante cistoscopia y citología en pacientes con síntomas sospechosos.

40 [0027] Se conocen una serie de marcadores tumorales con base de orina para identificar células malignas en la orina. Sin embargo, el diagnóstico de cáncer de vejiga el uso de tales marcadores requiere la visualización adicional de un tumor a través de cistoscopia y confirmación por resección transuretral o biopsia. Además, estos marcadores son altamente insensibles a los tumores de vejiga de bajo grado.

45 [0028] La publicación PCT nº WO2007/102146 de los presentes inventores da a conocer un método de tinción de células o pre-tinción usando un extracto de una planta de Ficus elastica, o los ingredientes activos de los mismos, para la detección de anomalías de las células derivadas de cáncer o enfermedades metabólicas.

50 [0029] Mientras que la reducción de la presente invención a la práctica, el enfoque de tinción se describe en WO2007/102146 fue modificado y adaptado para su uso en la distinción entre las células uroteliales normales y anormales (por ejemplo, células TCC). Como se muestra claramente en el Ejemplo 1 de la sección de ejemplos que sigue, el enfoque de la tinción de la presente invención (también denominado en este documento "el presente enfoque") puede identificar con precisión y rápidamente las células TCC incluso bajo grado, y es por lo tanto muy adecuado para su uso en la detección temprana de patologías del aparato urinario, como el cáncer de vejiga.

55 [0030] Por otra parte, los métodos de tinción de la invención proporcionan una plataforma de diagnóstico altamente ventajoso de alta precisión y especificidad para la identificación de cáncer de vejiga en muestras de orina. Este enfoque aborda la necesidad de un diagnóstico no invasivo de anomalías de la vejiga.

[0031] Así, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificación de células anormales en una muestra de células de orina.

60 [0032] Tal como se usa en este documento la frase "las células del sistema urinario" se refiere a células (por ejemplo, células epiteliales) de un riñón, uréter, uretra o la vejiga.

[0033] Las células se pueden proporcionar para el análisis como una suspensión celular o un frotis.

65 [0034] Una mancha puede ser una muestra cruda de células del sistema urinario se unta en un portaobjetos de microscopio sin ninguna purificación.

Otros métodos para la preparación de células de orina para la citología, incluyen, pero no se limitan a, citospina o métodos de citología líquida como ThinPrep™ (Hologic, EE.UU.).

5 **[0035]** Las células del sistema urinario también pueden cultivarse antes del acondicionamiento y la tinción. Tal cultivo se puede efectuar utilizando métodos conocidos en la técnica, véase por ejemplo, Hertz et al. "Short-term culture of exfoliated cells from the urine of patients with bladder tumors", Urological Research, Volumen 21, Número 1, 23-26, 1993; y Belik et al. "Improvements in Culturing Exfoliated Urothelial Cells In Vitro from Human Urine" Journal of Toxicology and Environmental Health, Parte A, Volumen 71, Número 13 y 14 de enero de 2008, páginas 923 - 929.

10 **[0036]** Con el fin de aumentar la exactitud de la detección, la muestra de células se puede pretratar para eliminar las células del sistema no urinarias, tales como células del sistema circulatorio (por ejemplo, leucocitos y eritrocitos) y similares utilizando el método, bien conocido en la técnica de separación de células (por ejemplo, exclusión de tamaño, la lisis celular selectiva, etc.).

15 **[0037]** El método se efectúa poniendo en contacto las células del sistema urinario con un extracto de la planta Ficus o uno o más componentes del mismo, condicionando las células anormales para su identificación.

20 **[0038]** Tal como se utiliza aquí, el término "acondicionado" cuando se utiliza en referencia a células o tejidos se refiere a la etapa de células de reproducción (como en células anormales particulares) más susceptibles de detección posterior a través de la tinción histológica o mediante enfoques bioquímicos o moleculares. La etapa de acondicionamiento de la presente invención se efectúa preferiblemente usando un extracto de etanol de tejido de la hoja Ficus Elastica.

25 **[0039]** La puesta en contacto con la muestra de células del sistema urinario con el extracto o componentes de la planta Ficus del mismo puede ser realizado por aplicación de ella en la muestra de células del sistema urinario, o por inmersión, remojo y/o la incubación de la muestra de células del sistema urinario en un recipiente que contiene las mismas.

30 **[0040]** Tal contacto se realiza durante un período de tiempo que permite el acondicionamiento de células anormales, que van a ser detectables a través de uno de los enfoques de detección descritos en el presente documento. El contacto puede realizarse durante aproximadamente 1 a 20 minutos o más en condiciones ambientales o de calor y presión elevadas.

35 **[0041]** Tal como se usa aquí, la frase "extracto de planta Ficus" se refiere a un extracto de etanol/metanol de tejido de planta entero o cortado/molido (por ejemplo hojas) de una planta de Ficus preferiblemente de al subgénero Urostigma, más preferiblemente de la especie Ficus elastica. El extracto de etanol de tejido de la planta puede incluir aproximadamente 10% (v/v de etanol en agua), aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50% de etanol, aproximadamente 60% de etanol, aproximadamente 70% de etanol, aproximadamente 80 % de etanol aproximadamente 90% de etanol o aproximadamente 100% de etanol. Se deben tomar medidas, sin embargo, para no diluir más el extracto, ya que esto puede afectar a la tinción posterior. Protocolos de extracción de ejemplares se describen a continuación.

45 **[0042]** El extracto se produce como sigue. Hojas de color verde oscuro, de entre 15 y 25 cm de longitud (medida desde la base de la hoja de la punta) se obtienen a partir de Ficus elastica. Una muestra de 1,000 gr de hojas se corta en piezas 1-3 cm<sup>2</sup> y se lavó con agua desionizada (DIW). Los trozos de hoja se mezclan con 3 litros de etanol al 70% y se mantuvieron durante 14 días (temperatura ambiente) en un recipiente sellado, en la oscuridad. A partir de entonces, el líquido se separa de los sólidos y se mantiene para el uso adicional a temperatura ambiente.

50 **[0043]** Alternativamente, los trozos de hojas se secan en un horno hasta un contenido de agua de aproximadamente el 4% (65°C durante 24 horas) y el material de la hoja seca se mezcla en un polvo (700 a 1000 micras). El polvo se utiliza en la extracción en un sistema de reflujo: 1 hora por extracción, disolvente: 70% de etanol, 40°C. Tres extracciones secuenciales se realizan, cada vez que se volvió a extraer el polvo. Cantidad de etanol 70% en cada extracción: primero - 1: 5; En segundo lugar - 1: 4; tercero - 1: 3. Los tres extractos resultantes se mezclan, se filtra en filtro de vacío (filtro de papel nº 40). El extracto filtrado, mezclado se evaporó en un evaporador de rotor bajo vacío a 60°C hasta que se obtiene un peso constante. El polvo resultante (contenido de agua final - 3%) se mezcla adicionalmente en un molino. El extracto en polvo se reconstituye para su uso como un reactivo de acondicionamiento. El polvo se suspendió en 70% de etanol con 1,3% TDS w/v y un pH final de 7,4.

60 **[0044]** Los componentes del extracto de la planta son preferiblemente los ingredientes activos de la planta [por ejemplo, flavonoides en una forma oligomérica (que puede comprender 2-10 mers, por ejemplo, C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>) o una forma polimérica, C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub> o proantocianidinas], que proporcionan las capacidades de acondicionamiento características descritas en este documento. Tales componentes se pueden aislar a partir del extracto de planta o sintetizar.

65 **[0045]** Como se ha mencionado anteriormente, la etapa de acondicionamiento de la presente invención puede ser seguida por una etapa de detección que se efectúa utilizando enfoques bioquímicos, moleculares o de tinción de

células/tejidos.

5 **[0046]** Para la detección, la muestra de células/tejidos se pueden preparar en un portaobjetos o usados en la suspensión. Los métodos de fijación de células a portaobjetos de microscopio son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, las células de capas (mediante frotis o citología de base líquida, por ejemplo ThinPrep™) de los portaobjetos de microscopio, centrifugación de las células en el portaobjetos (por ejemplo, utilizando una citospina), montaje de secciones de tejido en los portaobjetos (por ejemplo, el uso de secciones incluidas en parafina), o se untan células sobre un portaobjetos de microscopio.

10 **[0047]** Los portaobjetos microscópicos que incluyen la muestra de células se pueden usar per se o se pueden recubrir previamente con agentes que aumentan la adherencia de las células al portaobjetos (por ejemplo, poli-L-lisina o silano). Los portaobjetos se pueden calentar, congelar o someter a la energía de una cierta longitud de onda (por ejemplo, U.V.) con el fin de aumentar la adhesividad de las células a la diapositiva.

15 **[0048]** Hay que señalar que la muestra de células del sistema urinario está fijada con un fijador antes de la detección. Los métodos de células de fijación son bien conocidos en la técnica, e incluyen el uso de ácido tricloroacético.

20 **[0049]** Las suspensiones celulares se pueden analizar en recipientes tales como platos, frascos, tubos y similares. Las células se pueden suspender en DIW o solución de salina tamponada con TRIS (TBS).

25 **[0050]** Análisis de diapositivos o suspensiones se pueden efectuar utilizando métodos subjetivos (por ejemplo, patólogo se describe en la sección de ejemplos que sigue), o mediante el uso de métodos objetivos (por ejemplo, detección automática) utilizando, por ejemplo, software (de imagen) de análisis óptico. Dado que el enfoque de tinción preferida de la presente invención se basa en las diferencias de color (entre las células normales y anormales), así como las diferencias en la morfología, el análisis automatizado puede emplear algoritmos informáticos diseñados para la detección automática de tales diferencias de color, así como la densidad del color/textura, tamaño de la región de color y similares. Un ejemplo de un algoritmo que puede detectar las células basadas en la tinción diferencial/color es THREECOND. Un algoritmo de detección óptico se puede combinar con los algoritmos de detección morfométricos con el fin de mejorar la fiabilidad de los resultados.

30

35 **[0051]** El presente método también puede incluir una etapa de detección inmunocitológica. En los últimos años, varias pruebas no invasivas para marcadores tumorales han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA). Pruebas comercialmente disponibles para el diagnóstico de cáncer de vejiga incluyen InmunoCyt/uCyt+, BTA TRAK®, BTA stat®, NMP22®, NMP22 Bladder- Chek® y UroVysion™. Tales pruebas se pueden utilizar para validar los resultados obtenidos por el presente enfoque si es necesario.

40 **[0052]** La tinción de la muestra de células se realiza usando agentes de tinción (por ejemplo, colorantes) y condiciones que permiten la tinción única o diferencial de las células anormales. Se prefieren los tintes y combinaciones básicas y ácidos de los mismos.

45 **[0053]** Como se usa aquí la frase "tinción diferencial" se refiere a la tinción de una célula anormal o un compartimiento celular del mismo (por ejemplo, el citoplasma) con un color o tono diferente que una célula normal del mismo tipo.

50 **[0054]** Los ejemplos de colorantes que pueden ser utilizados para teñir la muestra de células acondicionadas incluyen, pero no se limitan a los siguientes colorantes (Los números de catálogo indicados son de StainsFile (<http://stainsfile.info/StainsFile/jindex.html>): amarillo acetil 13015, amarillo Nitro Fast, ácido negro 1 20470, AzoAmido negro 10B, azul ácido 22 42755, triarilmetano, azul I del agua, azul ácido 93 42780, triarilmetano, azul de metilo, ácido de fucsina 42685, ácido triarilmetano fucsina ácida verde 42095, triarilmetano, verde claro SF amarillenta, verde ácido 1 10020, NitrosoNaphthol verde B, verde ácido 5 42095, triarilmetano verde claro SF amarillento magenta ácido 42685, triarilmetano, fucsina ácida, naranja ácido 10 16230, Azo naranja G, ácido rojo 4 14710, AzoAzo-eosina, ácido rojo 26 16150, AzoXylidineponceau, ácido rojo 29 16570, AzoChromotropo 2R, ácido rojo 44 16250, AzoPonceau 6R, ácido rojo 51 45430, FluoronaEritrosina B, ácido rojo 66 26905, AzoBiebrich escarlata, ácido rojo 73 27290, escarlata AzoWoodstain, ácido rojo 87 45380, ws fluorona eosina Y, ácido rojo 91 45400, fluorona eosina B, ácido rojo 92 45410, FluoronaFloxina B, ácido rojo 94 45440, fluorona, Rosa de bengala, ácido rojo 101 50085, quinona-imina, AzoCarmín G, ácido rojo 103 50090, quinona-imina Azocarmín B, ácido roseina 42685, triarilmetano ácido fucsina ácido rubin 42685, ácido triarilmetano fucsina ácida violeta 19 42685, ácido triarilmetano fucsina ácida amarilla 1 10316, Nitro naftol S amarillo, ácido amarillo 9 13015, Nitro Fast amarillo, ácido amarillo 23 19140, AzoTartrazina, ácido amarillo 24 10315, nitro Martius amarillo, ácido amarillo 36 13065, AzoMetanil amarillo, ácido amarillo 73 45350, fluorona fluoruro ácido resceina S amarillo 10316, Nitro naftol S amarillo, ácido T 19140 amarillo, naranja AzoTartrazineAcridine 46005, 46000 AcridinaAcridina naranja acriflavina, AcridinaAcriflavina azul Alcian 74240, ftalocianina Alcian azul 8GX, Alcian amarillo 12840, azo Alcian amarillo, soluble en alcohol 45386, fluorona etílica eosina eosina alizarina 58000, antraquinona alizarina, alizarina azul 67410, antraquinona alizarina azul alizarina azul 2RC 58605, antraquinona antraceno cables de acero azul, alizarina Carmín 58005, antraquinona, rojo de alizarina S, alizarina cianina BBS 58610, antraquinona alizarina cianina BBS,

65

alazarolcianina R 43820, triarilmetanoCromoxanocianina R rojo de alizarina S 58005, antraquinona rojo de alizarina S de alizarina purpurina 58205, AntraquinonaPurpurinaAluminona 43810, triarilmetano cromo violeta CG negro amido 10B 20470, AzoAmido negro 10B amidonaftol rojo 18050, AzoAzofloxinaAmidoschwarz 20470, AzoAmido negro 10B azul de anilina WS - triarilmetano azul de anilina púrpura anilina WS - AzinMauveina antraceno SWR azul 58605, Antraquinona antraceno antraceno SWR azul azul SWX 58610, antraquinona alizarina cianina BBS auramina O 41000, DiarilmetanoAuramina O Azo-eosina 14710, AzoAzo-eosina AzoCarmín B 50090, quinona-imina AzoCarmín B azo Carmín G 50085, quinona-imina AzoCarmín B Azo eosina G 14710, AzoAzo-eosina azoica diazo 5 37125, sal de diazonio rápido rojo azoico B diazo 48 37235, sal de diazonio azul rápido B azofloxina 18050, AzoAzofloxinaAzovano azul 23860, Azo Evans Blue Azure A 52005, tiazinaa Azure A Azure B 52010, tiazinaa Azure B Azure C 52002, tiazinaa Azure C azul básico 8 42563, triarilmetano azul victoria 4R azul básico 9 52015, tiazina azul de metileno azul básico 12 51180, oxazina azul de nilo azul básico 15 44085, triarilmetano Noche azul azul básico 17 52040, tiazina azul de toluidina O azul básico 20 42585, triarilmetano verde de metilo azul básico 26 44045, triarilmetano azul victoria B básico marrón 1 21000, Azo Bismarck marrón y fucsina básica - triarilmetano básico fucsina básica verde 4 42000, triarilmetano malaquita verde básico verde 5 52020 tiazina metileno amarillo anaranjado básico 14 46005, AcridinaAcridina naranja rojo básico 2 50240, SafraninaSafranina O rojo básico 5 50040, Eurhodina rojo neutro rojo básico 9 42500, TriarilometanoPararosanolina violeta básico 2 42520, triarilmetano nueva fucsina violeta básico 3 42555, triarilmetano violeta cristal violeta básico 4 42600, triarilmetano violeta etil violeta básico 10 45170, RodaminaRodamina B violeta básico 14 42510, TriarilometanoRosanolina básica amarilla 1 49005, TiazolTioflavinz T básico amarillo 2 41000, DiarilometanoAuramina O Biebrich escarlata 26905, AzoBiebrich escarlata de Biebrich escarlata R 26105, Azo Sudán IV Bismarck brown y 21000, Azo Bismarck marrón y Brasileina 75280, Natural Brasileina brasileina 75280, Natural brasileina croceína brillante 27290, AzoWoodstain escarlata cristal brillante 16250, AzoPonceau 6R escarlata 6R El calcio rojo 60760, antraquinona nuclear rápido rojo Carmín 75470, Carmín Natural El ácido carmínico 75470, Natural Carmín carmoisina 6R 16570, AzoCromotropo 2R Celestino azul B 51050, Celestino oxazina azul B de china azul - azul de anilina Clorantín rápido 28160, Azo Sirius 4B roja 5B rojo cochinilla 75470, Natural Carmín Coelestina azul 51050, Celestino oxazina azul B Chicago azul 4B - cielo azul azoPontamina 5B Cromo violeta CG 43810, triarilmetano Cromo violeta CG Cromotropo 2R 2R 16570 AzoCromotropo Cromoxanecianina R 43820 TriarilometanoCromoxanecianina R Congo Corinth 22145, Azo Congo corinto rojo Congo 22120, Azo Congo algodón azul rojo 42780, triarilmetano metil algodón azul rojo 22120, Azo Congo croceína rojo escarlata 26905, AzoBiebrich escarlata croceína escarlata 3B 27290, AzoWoodstain Scarlet croceína escarlata MOO 27290, AzoWoodstain escarlata croceína 75100, azafrán natural del cristal de Ponceau 6R 16250 , AzoPonceau 6R cristal escarlata 16250, AzoPonceau 6R cristal violeta 42555, triarilmetano cristal violeta Dahlia 42530, diamante violeta de triarilmetano Hoffman verde B 42000, triarilmetano malaquita verde azul directo 14 23850, AzoTrypan azul azul directo 58 23860, Azo Evans Blue rojo directo 22120, Azo rojo Congo rojo directo 10 22145 Azo Congo corinto rojo directo 28 22120, Azo rojo Congo rojo directo 80 35780, Azo rojo Sirio F3B rojo 81 28160, Azo Sirius 4B roja directa amarilla 7 49010, TiazolTioflavina S Durazol 4R azul directo - AzoDurazol 4R azul Durazol azul 8G - FtalocianinaDurazol azul 8G eosina B 45400, fluorona eosina B eosina azulada 45400, fluorona eosina B eosina 45380, fluorona eosina Y ws eosina Y 45380, ws fluorona eosina eosina amarillenta 45380, fluorona eosina Y wsEosinol - granate FluoronaEosinol Erie B 22145, Azo Congo corinthEriocromecianina R 43820, TriarilometanoCromoxanecianina R eritrosina B 45430, FluoronaEritrosina B etílico eosina 45386, fluorona etílico etileosina verde 42590, triarilmetano etílico verde etil violeta 42600, triarilmetano etil violeta Evans Blue 23860, Azo Evans Blue azul rápido B 37235, sal de diazonio azul rápido B verde rápido FCF 42053, triarilmetano verde rápido FCF rápida B rojo 37125, sal de diazonio rápido rojo B Fast amarilla 13015 Nitro Fast amarilla rápido amarilla adicional 13015, Nitro Fast amarilla rápido amarilla G 13015, Nitro Fast amarilla grasa negro HB 26150 , Azo negro Sudán B fluoresceína 45350, fluorona fluoresceína alimentos verdes 3 42053, triarilmetano verde rápido FCF Gallein 45445, 51045 FluoroneGalleinGallamine azul, azul OxazinaGallamine Gallocyanin 51030, OxazinaGallocyanin violeta de genciana - triarilmetano violeta de metilo 2B haematein 75290, 75290 HemateinHaematine Natural, Natural hemateina Haematoxilin 75290, hematoxilina Natural Helio rápida de BBL Rubin 60760, antraquinona nuclear rápido Helvetia rojo azul 42780, triarilmetano azul de metilo hemateína 75290, Natural HemateinHematine 75290, Natural hemateina hematoxilina 75290, violeta de Natural hematoxilina Hoffman 42530, violeta de hidrazina de triarilmetano Hoffman amarilla 19140, AzoTartazine Imperial rojo 45400 fluorona eosina B ingrain azul 1 74240, ftalocianina azul Alcian 8GX ingrain amarillo 1 12840, Azo Alcian amarilla INT - Tetrazoliumlo- donitrotetrazolium sal Kermes Kermes 75460 Natural ácido quermésico 75460, Natural Kermes Kernechtrot 60760, An- thraquinone Nuclear Fast red Lac 75450 lacaico Natural ácido lacaico ácido 75450, violeta de lacaico Natural ácido Lauth 52000, 42095 ThiazinThionin luz verde, triarilmetano Luz Verde Lisamina SF amarillento rápida 18965, AzoLissamine rápida yellowLissamine verde amarillo SF 42095, triarilmetano luz verde SF amarillento Luxol rápido azul - Phthalocyanin- eLuxol MBS Azul rápido Magenta O 42500, 42510 TriarylmethanePararosanolin Magenta I, triarilmetano Rosanolin Ma- genta II - II de triarilmetano Magenta Magenta III 42520, triarilmetano Nueva fucsina malaquita verde 42000, triaril- metano malaquita verde marrón Manchester 21000, Azo Bismarck brown y amarillo Martius 10315, Nitro Martius amarilla malva-AzinMauveineMauveine - AzinMauveineMerbromin - fluorona mercurocromo 220, mercurocromo - Fluor- uno mercurocromo 220, 13065 metanilo amarillo, amarillo AzoMetanil metileno azul, un azul 52005 tiazina Azure un metileno B 52010, tiazina azul de metileno azul B C 52002, tiazina Azure C azul de metileno 52015, tiazina metileno El azul de metileno verde 52020, tiazinaa azul de metileno verde de metilo 42780, triarilmetano metil azul de metilo verde 42585, triarilmetano violeta de metilo verde de metilo 42535 triarilmetano violeta de metilo 2B violeta de metilo 2B 42535, tri- arylmethane violeta de metilo 2B violeta de metilo 10B 42555, triarilmetano cristal violeta Fresado amarilla 3G - azo fresado amarilla 3G mordiente azul 3 43820 TriarylmethaneChromoxanecyanin R mordiente azul 10 51030, OxazinaGallocyanin mordiente azul 14 51050,

oxazina Celestino azul B mordiente azul 23 58610, AnthraquinoneAlizarin cianina BBS mordiente azul 32 58605, antraquinona antraceno SWR azul mordiente azul 45 51045, OxazinaGallamine azul mordiente rojo 3 58005, antraquinona rojo de alizarina S mordiente rojo 11 58000, antraquinona alizarina violeta mordiente 25 45445, Fluoron- eGallein mordiente violeta 39 43810, triarilmetano Chrome violeta azul CG naftaleno - AzoNaphalene azul blackNaphthol negro azul negro 20470 AzoAmido negro 10B naftol verde B 10020, NitrosoNaphthol verde de naftol B S amarillo 10316, Nitro naftol S amarillo negro natural 1 75290, Natural hemateína rojo natural 58205, Anthraquinon- ePurpurin Natural rojo 3 75460, Natural Kermes rojo natural 4 75470, natural carmín rojo natural 8 58205, antraquinona purpurina roja natural de 16 58205, AnthraquinonePurpurin Natural red 24 75280, Natural brazilin red Natural 25 75450, lacaico Natural ácido rojo natural de 28, - Natural Natural Orcein amarilla 6 75100, azafrán natural NBT - tetrazolio nitro azul de tetrazolio sal neutra de color rojo 50040, Eurhodin rojo neutro Nueva fucsina 42520, triarilmetano Nueva fucsina Cataratas azul 3B 23850, AzoTrypan azul Noche azul 44085, triarilmetano Noche azul azul Nilo 51180, oxazina azul de Nilo azul de Nilo 51180, oxazina azul de Nilo Nilo azul sulfato de 51180, oxazina azul de Nilo Nilo rojo - Oxazone rojo Nilo Nitro BT - - tetrazolio nitro azul de tetrazolio sal nitro azul - tetrazolio nitro azul de tetrazolio sal de tetrazolio nuclear rojo rápido 60760, antraquinona nuclear rápido Oil red O rojo 26125, Azo aceite rojo O Naranja G 16230, Azo Naranja G Orcein - Natural violeta OrceinPararosaniiln 42500 TriarylmethanePararosaniiln de Perkin - AzinMauveinePhloxine B 45410, fluor nePhloxine B pícrico ácido pícrico 10305 Nitro ácido 2R Ponceau 16150, 16250 AzoXylidineponceauPonceau 6R, AzoPon- Ceau 6R Ponceau B 26905, AzoBiebrich escarlata Ponceau xilidina de 16150, 27195 AzoXylidineponceauPonceau S, S AzoPonceau pontamina cielo - cielo azoPontamine azul 5B azul 5B Primula 42530, violeta Pumuline de triarilmetano Hoffman 49000, ThiazolePrimulinePurpurin 58205, AnthraquinonePurpurinPyronin B 45010, PyroninPyronin B pironina G 45005, PyroninPyronin Y pironina Y 45005 PyroninPyronin Y Rodamina B 45170 RhodamineRhodamine B Rosanilin 42510, TriarylmethaneRosanilin Rosa de bengala 45440, fluorona Rosa de bengala azafrán 75100, Natural azafrán safranina O 50240, SafraninSafranin O Scarlet R 26105, Azo Sudán IV rojo escarlata 26105, Azo Sudán IV Scharlach- R 26105, Azo Sudán IV Shellac 75450, lacaico Natural ácido Sirius F3B rojo 35780, Azo Sirius F3B rojo rojo Sirius 4B 28160, Azo rojo Sirius Sirius 4B supra - AzoDurazol 4R azul azul F3R Solochrome cyaninR 43820, TriarylmethaneChromoxanecyanin R solubles azul - azul de anilina solvente negro 3 26150, Azo negro Sudán B solvent blue 38 - PhthalocyanineLuxol rápidas MBS azules Solvent red 23 26100, Azo Sudán III Solvent red 24 26105, Azo Sudán IV Solvent red 27 26125, Azo aceite rojo O Solvent red 45 45386, fluorona etílico eosina Solvent Yellow 94 45350, fluorona fluoresceína Espiritu solubles 45386, fluorona etílico eosina eosina Sudán III 26100, Azo Sudán III Sudán IV 26105, Azo Sudán IV negro Sudán B 26150, Azo negro Sudán B rojo Sudán BK 26100 Azo Sudán III azufre S amarillo 10316, Nitro amarillo naftol S suizo azul 52015 tiazina metileno tartrazina azul 19140, AzoTartrazineThioflavine S 49010, ThiazoleThioflavine S tioflavina T 49005 tia- zoleThioflavine T tionina 52000, 52040 ThiazinThionin azul de toluidina, tiazina azul de toluidina O Toluyline rojo 50040, Eurhodin rojo neutro tropeolina G 13065, AzoMetanil amarilla Trypaflavine 46000, 23850 AcridineAcriflavineTrypan azul, azul AzoTrypan Uranin 45350, fluorona fluoresceína azul Victoria 4R 42563, triarilmetano azul Victoria 4R azul Victoria B 44045, triarilmetano azul Victoria B azul Victoria R 44040, triarilmetano azul Victoria R Victoria verde B 42000, triarilmetano malaquita verde azul agua I 42755, eosina soluble en triarilmetano agua azul I agua 45380, fluorona eosina Y wsWoodstain escarlata 27290, AzoWoodstain escarlata Xylidineponceau 16150, 45380 AzoXylidineponceau eosina amarillenta, ws fluorona eosina Y.

40 **[0055]** Los colorantes preferidos incluyen el colorante básico Nueva fucsina, el tinte catiónico azul Alcian, y los colorantes ácidos verde claro o verde rápido.

45 **[0056]** Nueva fucsina mancha células del sistema urinario anormal - pre-acondicionada como se describe en este documento - con un color rojo intenso, dejando células normales manchadas con un tono menos intenso más ligero de color rojo (rojo o rosa ligero). Tal tinción se concentra en el núcleo y el citoplasma y es indicativo de un fenotipo anormal.

50 **[0057]** Nueva fucsina está disponible como polvo de varios fabricantes como Sigma (Cat. nº N0638), Fluka (Cat. nº 72200) o Merck (Cat. nº 1052260100).

**[0058]** La concentración preferida de Nueva fucsina (por tejido fijado y montado) puede ser aproximadamente desde 0,05 hasta 0,5% (w/v) en una solución de 2-20% [volumen por volumen (v/v)] etanol en agua.

55 **[0059]** Nueva fucsina se puede utilizar en una concentración de aproximadamente 0,02% [en peso por volumen (w/v)], aproximadamente el 0,1% (w/v), aproximadamente 0,2% (w/v), aproximadamente 0,3% (w/v), aproximadamente 0,4% (w/v), aproximadamente 0,5% (w/v), aproximadamente 0,6% (w/v) o aproximadamente 0,7% (w/v).

60 **[0060]** La solución de Nueva Fucsina puede basarse en agua y/o etanol y puede incluir aproximadamente 2% de etanol, aproximadamente 5% de etanol, aproximadamente 10% de etanol, aproximadamente 15% de etanol, aproximadamente 20% de etanol, aproximadamente 25% de etanol, sobre 30% de etanol, aproximadamente 35% de etanol, aproximadamente 40% de etanol o de 50% de etanol.

65 **[0061]** La tinción de la muestra de células del sistema urinario acondicionado con Nueva fucsina se puede realizar mediante la aplicación de la Nueva fucsina en la muestra de células del sistema urinario, añadiéndolo a la misma, o

por inmersión, remojo y/o la incubación de la muestra de células del sistema urinario en un recipiente que contiene las mismas. La tinción de la muestra de células del sistema urinario con Nueva fucsina se puede efectuar durante un período de tiempo que permite la tinción diferencial de células anormales por Nueva fucsina, por ejemplo, al menos 5 segundos, al menos aproximadamente 10 segundos, al menos aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 1-10 minutos.

**[0062]** Azul Alciano puede ser utilizado por la presente invención con el fin de reducir el nivel de la tinción de fondo no específica de células urinarias normales o para teñir las mucinas en caso de Mucinuria. Por otra parte, Azul Alciano puede servir como mordiente de verde claro, conocido en su rápido desvanecimiento, lo que permite retraso de decoloración.

**[0063]** Azul Alciano está disponible en forma de polvo de varios fabricantes, tales como Sigma (nº Cat. 5500) o Merck (Cat. nº 1052340010).

**[0064]** La concentración preferida de Azul Alciano (para tejido fijado y montado) puede ser aproximadamente desde 0,05 hasta 0,5% (w/v) en agua.

**[0065]** Azul Alciano se puede utilizar en una concentración de aproximadamente 0,05% [en peso por volumen (w/v)], aproximadamente el 0,1% (w/v), aproximadamente 0,2% (w/v), aproximadamente 0,3% (w/v), aproximadamente 0,4% (w/v), aproximadamente 0,5% (w/v).

**[0066]** La tinción de la muestra de células del sistema urinario con Azul Alciano se puede realizar aplicando el Azul Alciano para la muestra de células o por inmersión, remojo y/o la incubación de la muestra de células en un recipiente que contiene este colorante. Tinción de la muestra de células del sistema urinario con Azul Alciano puede llevarse a cabo durante un período de tiempo que permita la reducción del fondo no específica, la tinción de mucinas y la protección de verde claro de la decoloración (por ejemplo, al menos 30 segundos).

**[0067]** Preferiblemente, la tinción con Azul Alciano se efectúa después de la tinción con Nueva fucsina.

**[0068]** La muestra de células del sistema urinario puede ser, alternativamente, o preferiblemente, además, se tiñó con verde claro o verde rápido.

**[0069]** Verde claro y verde rápido son colorantes ácidos que tiñen el citoplasma de las células normales con el verde (dejando el citoplasma de las células anormales rojo/rosa/púrpura después de la tinción de Nueva fucsina). Verde claro está disponible en un polvo de varios fabricantes como Merck (C.I. 42095) o Sigma (Cat. nº 62110). Verde rápido está disponible de Sigma-Aldrich (F7258) en una forma de un polvo.

**[0070]** la luz verde se puede utilizar en una concentración de aproximadamente 0,02% [en peso por volumen (w/v)], aproximadamente el 0,1% (w/v), aproximadamente 0,2% (w/v), aproximadamente 0,3% (w/v), aproximadamente 0,4% (w/v), aproximadamente 0,5% (w/v), aproximadamente 0,6% (w/v), aproximadamente 0,7% (w/v) a aproximadamente 0,8% (w/v), aproximadamente 1% (w/v), aproximadamente 2% (w/v), aproximadamente 3% (w/v), aproximadamente el 4% (w/v), aproximadamente 5% (w/v), aproximadamente 6% (w/v) , alrededor de 7% (w/v), aproximadamente el 8% (w/v), aproximadamente 9% (w/v) o aproximadamente 10% (w/v).

**[0071]** La solución verde claro puede ser agua y/o a base de etanol, y puede incluir 1% de etanol, aproximadamente 5% de etanol, aproximadamente 10% de etanol, aproximadamente 15% de etanol, aproximadamente 20% de etanol, aproximadamente 25% de etanol, sobre 30% de etanol, aproximadamente 35% de etanol, aproximadamente 40% de etanol, aproximadamente 50% de etanol, aproximadamente 70% de etanol.

**[0072]** Preferiblemente, la mancha de verde claro utilizado por el presente método es de aproximadamente 4% (w/v) en 20% de etanol (cuando se utiliza con muestras de tejidos fijos y montados). La concentración de verde claro puede ser de 10 pliegues menos para muestras citológicas (es decir, un 0,4% en el 2% de etanol).

**[0073]** Verde rápido se puede utilizar en una concentración de aproximadamente 0,02% [en peso por volumen (w/v)], aproximadamente el 0,1% (w/v), aproximadamente 0,2% (w/v), aproximadamente 0,3% (w/v), aproximadamente 0,4% (w/v), aproximadamente 0,5% (w/v), aproximadamente 0,6% (w/v), aproximadamente 0,7% (w/v) a aproximadamente 0,8% (w/v), aproximadamente 1% (w/v), aproximadamente 2% (w/v), aproximadamente 3% (w/v), aproximadamente el 4% (w/v), aproximadamente 5% (w/v), aproximadamente 6% (w/v) , alrededor de 7% (w/v), aproximadamente el 8% (w/v), aproximadamente 9% (w/v) o aproximadamente 10% (w/v).

**[0074]** La solución de verde rápido puede ser un agua y/o a base de etanol y puede incluir aproximadamente 0,01% de etanol, aproximadamente 5% de etanol, aproximadamente 10% de etanol, aproximadamente 15% de etanol, aproximadamente 20% de etanol, aproximadamente 25% de etanol, sobre 30% de etanol, aproximadamente 35% de etanol, aproximadamente 40% de etanol, aproximadamente 50% de etanol, aproximadamente 70% de etanol.

**[0075]** Preferiblemente, la mancha de verde rápido utilizada por el presente método es de aproximadamente 1% en

20% de etanol.

**[0076]** La tinción de la muestra de célula del sistema de orina con verde claro/rápido puede llevarse a cabo mediante la aplicación de verde claro/rápido en la muestra de células del sistema urinario, añadiéndolo a la misma, o por inmersión, remojo y/o la incubación de la muestra de células del sistema urinario en un recipiente que contiene las mismas.

**[0077]** La tinción de la muestra de célula de sistema orinario con verde claro/rápido se efectúa durante un período de tiempo que permite la tinción diferencial de las células normales en verde, por ejemplo, durante al menos 10 segundos, al menos aproximadamente 30 segundos, al menos aproximadamente 1 minuto o aproximadamente 30 segundos a 10 minutos.

**[0078]** Preferiblemente, la tinción con verde claro/rápido se efectúa después de la tinción con Nueva fucsina y, opcionalmente, Azul Alciano.

**[0079]** La tinción con Nueva fucsina y, opcionalmente, Azul Alciano y con verde claro/rápido se efectúa de la siguiente manera. Las células se tiñeron primero con Nueva fucsina y después se lavan (por ejemplo con etanol) para eliminar el exceso de colorante. Las células se tiñeron con Azul Alciano y se lavan. Por último, las células se tiñeron con verde claro/rápido y se lavaron (véase el Ejemplo 1 para una descripción más detallada). El uso de Nueva fucsina junto con verde claro/rápido proporciona el contraste de colores (rojo vs. verde) debido a la diferente afinidad de las manchas a telómeros componentes. Nueva fucsina tiene más afinidad por las células cancerosas y precancerosas (acondicionadas como se describe en el presente documento), mientras que verde claro/rápido tiene más afinidad por las células normales (acondicionadas como se describe en el presente documento). El uso de Azul Alciano reduce el fondo no específico, manchas de mucinas y evita el rápido desvanecimiento de la mancha.

**[0080]** Por lo tanto, el presente enfoque permite la identificación de células anormales, así como la diferenciación entre las células normales y anormales basándose en las diferencias de color de tinción.

**[0081]** Cuando se utiliza una sola mancha, como Nueva fucsina, una célula manchada predominantemente oscura o roja intensa se identifica en el presente documento como una célula anormal, es decir, un resultado positivo (por una patología), mientras que una célula manchada de color rojo predominantemente clara a rosa se identifica en el presente documento como una célula normal, es decir, un resultado negativo.

**[0082]** Cuando se utiliza el enfoque de doble tinción, una célula manchada predominantemente roja (cualquier tono de rojo, por ejemplo, de color rosa/rojo claro a violeta o rojo oscuro se identifica en el presente documento como una célula anormal, es decir, un resultado positivo (por una patología) mientras que una célula manchada predominantemente verde/azul (cualquier tono de color verde o azul o combinaciones de los mismos) se identifica en el presente documento como una célula normal, es decir, un resultado negativo.

**[0083]** Las muestras de tejido de vejigas sometidas al acondicionamiento y los pasos de doble tinción descritos en este documento se analizaron y los resultados se presentan en el Ejemplo 1 de la sección de ejemplos que sigue.

**[0084]** En resumen, los presentes resultados de acondicionado y aproximación de tinción en un color rosa/de color rojo frente al citoplasma de las células casi uniformes de TCC en muestras histológicas y citológicas tanto de grado bajo como de grado alto. Urotelio normal uniformemente manchado de color verde. Un número relativamente pequeño de áreas de TCC de mancha verde o mezcla (rojo/verde) muestra bajo índice Ki67 en contraste con las zonas rojas de TCC muestra un alto índice de Ki67.

**[0085]** Las células del sistema urinario manchadas de Nueva fucsina y/o verde claro/rápido se pueden teñir con hematoxilina más toxilina (por ejemplo, solución de Hematoxilina Gill) por un período de tinción de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 9 minutos para la contratinción de núcleos de las células. Esto se efectúa preferiblemente después de la fijación, antes de la aplicación del extracto Ficus. Esta mancha destaca las características estructurales ultra nucleares adicionales.

**[0086]** Manchas adicionales y colorantes para la identificación de componentes bioquímicos (por ejemplo inmunotinciones tales como anti-Ki67) o componentes moleculares (por ejemplo, sondas específicas de polinucleótidos) se pueden utilizar para establecer aún más el tipo de célula, estado de célula y origen celular (especialmente cuando se obtienen de una muestra de orina). El análisis microscópico también se puede utilizar para escribir el origen celular. Las células epiteliales tubulares renales son normalmente más grandes que los granulocitos, contienen un gran núcleo redondo o ovalado y normalmente se desprenden en la orina en pequeñas cantidades. Las células epiteliales de transición de la pelvis renal, uréteres o la vejiga tienen más bordes regulares celulares, núcleos más grandes, y el tamaño general más pequeño que el epitelio escamoso. Las células epiteliales tubulares renales son más pequeñas y más redondas que el epitelio de transición, y su núcleo ocupa más del volumen total de células.

**[0087]** Así, la presente invención proporciona un método de identificación de las células del sistema urinario anormal en una muestra de células de orina. La presente invención proporciona un enfoque de tinción única, que es

altamente eficaz en las células del sistema urinario precondicionadas anormales de tinción única.

5 **[0088]** Aunque el concepto básico de acondicionado y doble tinción de las células se ha descrito previamente por los presentes inventores, el uso de este enfoque para la tinción de las células uroteliales de calibración requerida tanto en los pasos de acondicionamiento como de tinción.

10 **[0089]** Mientras se reduce la presente invención a la práctica, los presentes inventores descubrieron que el método de tinción descrito en WO2007/102146 no era efectivo en la producción de la tinción diferencial deseada de células uroteliales. La calibración de este enfoque de doble tinción descrito anteriormente para la detección de células uroteliales anormales como dio un resultado de tinción sensiblemente más largo que con Nueva fucsina y Verde clara. Efectiva tinción de Nueva fucsina requiere tiempos de incubación que son al menos el doble del tiempo que los descritos en WO2007/102146, mientras que la tinción de Verde claro requiere tiempos de incubación que son al menos cinco veces más largos que los tiempos de incubación que se describen en WO2007/102146.

15 **[0090]** El presente enfoque se puede utilizar para cualquier patología del sistema urinario asociada con la presencia de células anormales.

20 **[0091]** Una patología que puede ser identificada utilizando el enfoque actual es el cáncer de vejiga. Como se describe en la sección de ejemplos que sigue, el presente enfoque demostró ser muy eficaz en la detección de TCC de etapa temprana en el tejido de la vejiga (Ejemplo 1). Al aumentarse dramáticamente las posibilidades de sobrevivir al cáncer de vejiga con la detección temprana, el presente enfoque proporciona a los médicos una herramienta de diagnóstico importante en la lucha contra el cáncer de vejiga.

25 **[0092]** Por lo tanto, según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificación de un sujeto (por ejemplo humano) una patología de la vejiga que se caracteriza por la presencia de anomalías de las células. Preferiblemente, una tal patología de la vejiga es el cáncer de vejiga y se sospecha que el sujeto tenga, o está predispuesto a tener tal patología.

30 **[0093]** El método se efectúa poniendo en contacto las células del sistema urinario (muestra de orina) con un extracto de la planta Ficus, condicionando las células anormales para la identificación. Después de la fijación y acondicionamiento de las células se tiñen con un tinte básico y ácido (preferiblemente con Nueva fucsina y Verde claro/rápido como se ha descrito anteriormente). Después de la tinción, la muestra de células se analizó subjetiva u objetivamente tal como se describe en el presente documento para identificar una célula o células de la vejiga con un citoplasma que se tiñe de color rosa a rojo/violeta. Dicha célula se considera anormal e indicativa de una patología de la vejiga tales como cáncer de vejiga.

35 **[0094]** La muestra de células puede después ser analizada morfológicamente o comprobada para la presencia de marcadores específicos de cáncer.

40 **[0095]** La muestra de orina se puede obtener a partir de muestras de orina o recogerse durante la cistoscopia. La muestra puede ser fija (por ejemplo, con 50% de etanol), y después procesarse utilizando citospina, un método de recogida de membrana, o un método de preparación de citología de base líquida.

45 **[0096]** La muestra de células se analizó tanto para color y morfología. El análisis de color se realiza como se describe en el presente documento, el color verde citoplasmático implica negativo para malignidad, y el color rosado a rojo citoplasmático implica positivo para malignidad.

50 **[0097]** Criterios morfológicos TCC se determinan como se conoce en la técnica. En pocas palabras, los carcinomas uroteliales papilares de bajo grado se caracterizan por una apariencia ordenada tanto en su arquitectura como en la citología. Las células son uniformemente espaciadas y cohesivas. Hay evidencia mínima pero definida de atipia nuclear que consta de núcleos hiper cromáticos dispersos, figuras mitóticas infrecuentes predominantemente hacia la base, y la variación leve en tamaño y forma nuclear. Cánceres uroteliales papilares de alto grado contienen células que pueden ser discohesivas con grandes núcleos hiper cromáticos. Algunas de las células tumorales muestran anaplasia, características de la mitosis, incluyendo las atípicas, son frecuentes. Displasias fueron identificadas según los criterios siguientes: Cambio de la polarización urotelial, la variación en el tamaño nuclear, hacinamiento nuclear.

55 **[0098]** Los agentes de la presente invención descrita en el presente documento pueden ser incluidas en un kit de diagnóstico/artículo de fabricación preferiblemente junto con instrucciones apropiadas para el uso y etiquetas que indican la aprobación reglamentaria para uso en el diagnóstico y estadificación del cáncer de vejiga, el seguimiento de recurrencia de la enfermedad, examinando de pacientes en riesgo.

60 **[0099]** Tal kit puede incluir los agentes de acondicionado y de tinción anteriormente descritos e instrucciones para su uso en la tinción de tipos específicos de preparación de células (diapositivas, suspensiones, frotis), así como instrucciones para interpretar los resultados. Una dirección de sitio web que proporciona más información, resolución de problemas, las bases de datos de imagen y los servicios de diagnóstico (para las imágenes cargadas) también puede ser proporcionada.

65

[0100] Tal como se usa en este documento el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm 10\%$ .

[0101] Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de formas de realización separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención, que son, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuada en cualquier otra forma de realización descrita de la invención. Ciertas características que se describen en el contexto de diversas realizaciones no han de considerarse las características esenciales de estas formas de realización, a menos que la forma de realización no funciona sin esos elementos.

[0102] Varias realizaciones y aspectos de la presente invención como se delinearon aquí anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

[0103] Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas formas de realización de la invención de una manera no limitante.

### EJEMPLO 1

#### *La detección de cáncer de vejiga utilizando el enfoque actual*

[0104] Un estudio fue diseñado para comprobar la capacidad de la presente enfoque para detectar células anormales en las biopsias de la vejiga con una patología conocida. El objetivo del presente estudio es calibrar y optimizar la etapa de acondicionamiento celular, así como los pasos de tinción del enfoque actual de tinción con el fin de permitir la detección precisa de células anormales de la vejiga, y, en particular, permitir un diagnóstico precoz del cáncer de vejiga.

#### *Materiales y métodos*

##### Colección de muestra

[0105] Biopsias de vejiga (bloques de parafina archivados) de vejiga normal, cáncer de vejiga superficial - Ta, T1, Tis (de bajo grado) y el cáncer invasivo muscular (alto grado) y se procesaron tal como se describe a continuación. Se recibieron un total de 73 muestras, 15 muestras no fueron incluidas en el estudio. Todas las muestras fueron recibidas con un diagnóstico de patología conocida realizada en el Centro Médico Rabin.

[0106] Cada bloque se procesa por un laboratorio patológico para preparar diapositivas para la tinción. Diapositivas de cada bloque se tiñeron como se describe a continuación y los resultados de la tinción se compararon con los resultados de patología de las muestras. Para cada caso, una diapositiva se tiñó por el método H&E para fines comparativos.

##### Tinción H & E

[0107] Muestras de tejido incluidas en parafina se seccionaron a 4 micras, y se montaron en portaobjetos de microscopio estándar. Desparafinización se llevó a cabo de la siguiente manera: inmersiones en xileno 100%, dos veces (3 minutos cada uno); etanol 100%, dos veces (3 minutos cada uno); inmersión en etanol al 95%, dos veces (3 minutos cada uno); DIW (3 minutos). Las secciones fueron manchadas con hematoxilina, Tinte-1, (1 minuto), se lavó con agua corriente del grifo hasta que el agua se puso clara, y después se lavó durante 10 segundos en el funcionamiento de DIW. Las secciones fueron manchadas de eosina, Tinte-C, (1-2 minutos) y se lavó con agua corriente y DIW, como el anterior. Para la cubierta deslizante, las secciones se deshidrataron en una serie ascendente de las concentraciones de etanol (50%, 70%, 80%, 95%, 100% dos veces), despejado en xileno 100% (3 - 4 veces), y después montadas en Permount, o un producto comercial equivalente.

##### Tinción de biopsias de vejiga

[0108] Procedimientos de tinción se realizaron en un recipiente de diapositivas. El volumen de las soluciones utilizadas se ajustó al tamaño del contenedor. Para la desparafinación, los portaobjetos se calentaron a 70°C durante 15 minutos y después se sumergieron en xileno al 100%, dos veces (3 minutos cada uno); etanol 100%, dos veces (3 minutos cada uno); etanol 95%, dos veces (3 minutos cada uno); DIW (3 minutos). Las secciones fueron manchadas con hematoxilina (1 minuto), se lavaron en agua corriente del grifo hasta que el agua era clara, y después se lavaron durante 10 segundos en el funcionamiento de DIW. Las secciones fueron incubadas en una solución de extracto de la planta (4 minutos), se lavaron durante 10 segundos en el funcionamiento de DIW, en 0,5% Nueva fucsina en etanol 20% (2 minutos), se lavaron del modo anterior, en 4% de verde claro en etanol 20% (4 minutos) y se lavaron de nuevo. Para la cubierta deslizante, las secciones se secaron al aire durante 30 minutos, se

sumergieron 3 veces en xileno 100% y se montaron con Entelano.

Análisis de las muestras

5 **[0109]** Cada muestra manchada se analizó de la siguiente forma:

(i) Color de la célula - la presencia de células de color verde/azul (células normales), células de color rojo (potencialmente las células cancerosas) o ambos. Una descripción de los colores se preparó (sobre todo verde, pequeña cantidad de células rojas, etc).

10 (ii) También se realizó un análisis morfológico de las células en la muestra. Como se indicó anteriormente, una ventaja importante del presente enfoque de tinción es la que permite el análisis morfológico.

15 **[0110]** Un alineamiento de color y morfología celular fue realizado y registrado para establecer la correlación entre la morfología celular y el color de la célula. Se registraron medidas adicionales, incluyendo la intensidad del color, sombreado de color, la propagación de las células de colores, etc. Se analizaron estas medidas contra las otras medidas de estudio (es decir, la morfología celular).

Calibración de tinción

20 **[0111]** El protocolo de tinción fue calibrado para los parámetros óptimos de incubación, utilizando soluciones de tinción de concentraciones variables, diferentes secuencias de tinción y diferentes tiempos de incubación. Después de establecer los parámetros óptimos, un enfoque optimizado de tinción se generó y se ensayó con el fin de verificar la reproducibilidad. Tras varias rondas de calibración y de prueba, el enfoque de la tinción de la presente invención proporcionó resultados altamente repetitivas. A continuación, se utilizó el protocolo de tinción calibrado para la tinción de muestras adicionales.

**Resultados**

30 **[0112]** Un análisis detallado de la tinción resultante para cada caso se preparó y se comparó con el diagnóstico histórico, así como hasta la muestra H&E paralela manchada.

35 **[0113]** Cada caso (tanto muestra "H&E manchada" y la muestra manchada usando el enfoque actual) se analizó por primera vez por un patólogo profesional. Tras la finalización del análisis, los portaobjetos se transfieren a una revisión y un análisis independiente realizado por un patólogo experto.

**[0114]** Los datos de los informes de patología se utilizaron para compilar los resultados del presente estudio.

40 **[0115]** La Tabla 1 clasifica los casos en los grupos de enfermedades tal como se representaron en el protocolo clínico.

**Tabla 1: casos clasificado de acuerdo con los grupos de diagnóstico clínico**

Diagnosis histórica	Número de casos
Normal	22
Bajo grado TCC	17
Alto grado TCC	19

45 **[0116]** La Tabla 2 recoge los datos de la comparación de resultados del presente método de tinción a la de la tinción con HE, de acuerdo con el diagnóstico histórico original:

**Tabla 2: Tasas de coincidencia de diagnóstico para el presente enfoque y H&E en biopsias de vejiga**

Patólogo	Normal (22 casos)		Bajo Grado TCC (17 casos)		Alto Grado TCC (19 casos)	
	el enfoque presente	H&E	el enfoque presente	H&E	el enfoque presente	H&E
1	19/22 a, b (86,4%)	19/22 a, b (86,4%)	16/17 a, d (94,1%)	16/17 a, d (94,1%)	18/19 a, e (94,7%)	18/19 a, e (94,7%)
2	20/22 a, c (90,9%)	20/22 a, c (90,9%)	17/17 (100%)	17/17 (100%)	16/20 a, f (80%)	16/20 a, f (80%)

a - Número de nuevos diagnósticos en concordancia con el diagnóstico original, por número total examinado.  
 b- Tres casos (histórica vejiga urinaria normal) fueron diagnosticados de displasia por un patólogo después de un examen de las dos diapositivas H&E y el portaobjetos manchado utilizando el presente método.  
 c- Dos casos fueron diagnosticados, respectivamente, como la displasia de bajo grado y por un patólogo después de un examen de las dos diapositivas H&E y el portaobjetos manchado utilizando el presente método.

d- Uno de los casos (histórica TCC de bajo grado) fue diagnosticado como normal por un patólogo después de un examen de las dos diapositivas H&E y el portaobjetos manchado utilizando el presente método.  
 e- Dos casos (histórica TCC de alto grado) respectivamente, fueron diagnosticados como hiperplasia y TCC de bajo grado por un patólogo después de un examen de las dos diapositivas H&E y el portaobjetos manchado utilizando el presente método.  
 f- Un caso y tres casos (todos los diagnósticos históricos del TCC de alto grado), respectivamente, fueron diagnosticados como hiperplasia (TCC de grado bajo sospechoso) y TCC de bajo grado por un patólogo después de un examen de las dos diapositivas H&E y el portaobjetos manchado utilizando el presente método.

[0117] El análisis de los resultados mostró que para cada patólogo, el diagnóstico utilizando los portaobjetos manchados con el presente enfoque coincide con la de las diapositivas H&E. Claramente, tinción H&E no es específica y destaca principalmente la morfología celular y tisular. Por lo tanto, el diagnóstico de una enfermedad específica por análisis de tinción con H&E requiere una investigación a fondo de la morfología y debe ser realizada por un experto especializado en la patología, en concreto, la patología de dicha enfermedad. Ventajosamente, el diagnóstico basado en el enfoque de la presente invención es altamente específico y no requiere de habilidades y conocimientos únicos. Por otra parte, el diagnóstico basado en el enfoque de la presente invención es sencillo y rápido y de este modo ahorra tiempo y es rentable. Además, el enfoque de la tinción de la presente invención mantiene el tejido y la morfología celular y de ese modo permite la comparación de los portaobjetos manchados con tobogán adyacente analizado por otros medios histológicos.

[0118] Además del análisis de los casos, también se realizó un análisis de las regiones de tejido. Esto es posible ya que en la mayoría de los casos hay más de una región distinta para el análisis. Este análisis se realizó por un patólogo marcando cuidadosamente y analizando cada región y comparando el diagnóstico morfológico de la región para el diagnóstico de color.

[0119] Se analizaron un total de 250 regiones de 58 diapositivas. Regiones normales (n = 70, citoplasma verde = correlación positiva) incluídas 78,6% de las regiones con citoplasma verde, el 14,3% de las regiones con citoplasma de color rojo y el 7,1% de las regiones con citoplasma de color mezclado. Regiones neoplásicas (displásicas + Bajo Grado TCC + alto grado TCC) (n = 180, el citoplasma rojo = correlación positiva) incluyen el 15,6% de las regiones con citoplasma verde, el 78,9% de las regiones con citoplasma de color rojo y el 5,6% de las regiones con citoplasma de color mezclado. Los resultados se presentan en las figuras 1-3, 5 y 6.

[0120] El presente método de tinción permitió la identificación de características morfológicas claras, lo que permite la correlación entre el color y la morfología. El análisis de la región descrita anteriormente proporciona una buena correspondencia entre la morfología de cada región, y el color que aparece después del enfoque actual de tinción. Una observación importante es que, en un número significativo de regiones, hubo un color mezclado de las células rojas y verdes, o incluso en el citoplasma de células. Esto proporciona otro nivel de diferencia de color.

[0121] Por lo tanto, el presente estudio tuvo éxito en la calibración y la optimización de un enfoque de tinción descrito anteriormente para la detección de células anormales de la vejiga. El enfoque de la tinción de calibrado de la presente invención maximiza las propiedades de tinción diferencial y activa excelentes capacidades de visualización morfológicas. Este rasgo de doble análisis fue capaz de conferir la no inferioridad de los métodos existentes probados en este estudio. Se encontró una alta correlación entre el color y la morfología.

[0122] Estas observaciones muestran de forma concluyente que el actual enfoque de tinción que se facilita por el acercamiento de acondicionamiento celular de la presente invención se puede usar para diagnosticar con precisión el cáncer de vejiga, incluso en las primeras etapas.

## **EJEMPLO 2**

### ***Inmunotinción anti-Ki67***

[0123] La inmunotinción Anti-Ki67 se utilizó con el fin de entender mejor el análisis de la morfología de color y el aspecto de un número significativo de una población mezclada del color.

[0124] La expresión de la proteína Ki67 humana está estrictamente relacionada con la proliferación celular. Durante la interfase, el antígeno se puede detectar exclusivamente dentro del núcleo, mientras que en la mitosis la mayoría de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas. El hecho de que la proteína Ki67 está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G (1), S, G (2), y mitosis), pero está ausente de las células en reposo (G (0)), hace que sea un excelente marcador para la determinación de la denominada fracción de crecimiento de una población celular dada. La fracción de células tumorales Ki67 positivas (el índice de etiquetado Ki67) a menudo se correlaciona con el curso clínico de la enfermedad. (J Cell Physiol. 2000 Mar; 182 (3):. 311-22).

### ***Materiales y métodos***

#### Recogida de muestras e inmunotinción Ki67

[0125] Secciones de parafina de las biopsias de vejiga descritas en el Ejemplo 1 se utilizaron para la tinción de Ki67. La tinción se llevó a cabo como se conoce en la técnica, utilizando un anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki67 (Thermo Fisher Scientific) con una máquina de Ventana (punto de referencia/XT ISH#712482). La mancha resultante se comparó con una diapositiva de duplicado manchada utilizando el presente enfoque.

Además, las diapositivas también se tiñeron con doble inmunotinción Ki67 y el enfoque actual. La doble tinción se consiguió por tinción inicial con anti-Ki67, como se describió anteriormente, y después el tratamiento de la corredera como se describe a continuación. La calibración y la optimización de la mancha se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

Una doble tinción de Ki67 y el enfoque actual

[0126] Portaobjetos manchados-Ki67 desparafinados, se incubaron en una solución de extracto de la planta (2 minutos) y se lavaron durante 10 segundos en el funcionamiento de DIW. Los portaobjetos se sumergieron entonces 5 veces en 0,05% Nueva fucsina en etanol al 2%, se lavó del modo anterior, se sumergieron 5 veces en 0,4% de verde claro en etanol al 2% y se lavaron de nuevo. Para la cubierta deslizante, las secciones se secaron al aire durante 30 minutos, se sumergieron 3 veces en xileno 100% y se montaron con Entelano.

**Resultados**

[0127] Un total de 7 biopsias de vejiga con diagnóstico histórico de grado bajo TCC se tiñeron para Ki67. Los resultados se compararon con los obtenidos utilizando el presente método. Se consideraron tres parámetros: la morfología celular, color de la célula y el índice Ki67.

Numerosas muestras incluyen múltiples regiones; el número total de regiones analizadas era de 67. El resultado del análisis de tinción se proporciona en la Tabla 3 a continuación.

**Tabla 3: doble tinción con el enfoque actual y anti-Ki67**

Diagnosic de región	Color de región	nº regiones	índice Ki67
Grado bajo	rojo	41	Alta
Grado bajo	mezcla	4	Bajo
Grado bajo	verde	2	Bajo
Displasia	rojo	4	Alto
Metaplasia	rojo	2	Alto
Metaplasia	mezcla	3	Bajo
Normal	verde	7	Bajo
Normal	verde	3	Alto
Normal	rojo	1	Bajo

[0128] El análisis reveló una correlación muy alta entre el color de la presente tinción y el índice de Ki67.

[0129] Se observó una combinación perfecta para las regiones de bajo grado, todas las regiones manchadas de rojo mostraron un alto índice Ki67, mientras que las regiones manchadas de verde exhibieron un bajo índice Ki67. Las regiones de color mixto (independientemente del fenotipo) exhibieron un bajo índice Ki67, mientras que las regiones displásicas, las cuales son anormales, se tiñeron de rojo y exhibieron un alto índice Ki67. Los resultados se presentan en las Figuras 5-6.

[0130] Además de al análisis por separado de los portaobjetos con tinción con Ki67 o el presente enfoque, se analizaron también las diapositivas manchadas doble con anti-Ki67 y el enfoque actual. Las Figuras 7b y 7d ilustran los resultados de estas diapositivas de doble manchado en las biopsias de TCC. Una combinación de manchas de color (según lo dispuesto por el presente enfoque) y un índice de Ki67 proporciona una herramienta robusta y única que puede ser especialmente útil en los casos que son difíciles de diagnosticar, los casos límite. Además, la preservación de la morfología, una característica importante del método de la presente invención, proporciona una herramienta de detección adicional.

**EJEMPLO 3**

**Deserción de las células cancerosas en la orina usando el presente enfoque**

[0131] La orina contiene células epiteliales que se desprenden de las vías urinarias. La citología urinaria evalúa el sedimento urinario para la presencia de células cancerosas en el tracto urinario de una manera conveniente, no invasiva. La sensibilidad de la citología de orina es baja (revisado en Mod Pathol 2009 Jun; 22 Suppl 2: S53-9), y hay una necesidad real de desarrollar nuevas pruebas que se pueden utilizar en el cribado del cáncer de vejiga. El objetivo del presente estudio es calibrar y optimizar la etapa de acondicionamiento celular, así como los pasos de

tinción del enfoque actual de tinción con el fin de permitir la detección precisa de las células de las vías urinarias anormales en una muestra de orina.

**Materiales y métodos**

5

Colección de muestra

[0132] Se recogieron las muestras de orina de los sujetos con un diagnóstico conocido y procesado por un laboratorio patológico para preparar diapositivas para la tinción utilizando el método de citospina. Las diapositivas de cada muestra se tiñeron como se describe a continuación. La calibración y la optimización de la mancha se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

10

Tinción de células de orina

[0133] Diapositivas de citospina fueron fijadas en TCA 10% (1 hora) y se lavaron durante 10 segundos en el funcionamiento de DIW. Las células se tiñeron con hematoxilina (1 minuto), se lavaron en agua corriente del grifo hasta que el agua era clara, y después se lavaron durante 10 segundos en el funcionamiento de DIW. Las células fueron incubadas en una solución de extracto de la planta (4 minutos), se lavó durante 10 segundos en el funcionamiento de DIW, en 0,5% Nueva fucsina en etanol 20% (30 segundos), se lavaron del modo anterior, en 0,4% de verde claro en etanol 2% (1 minuto y 40 segundos) y se lavaron de nuevo. Para la cubierta deslizante, las secciones se secaron al aire durante 30 minutos, se sumergieron 3 veces en xileno 100% y se montaron con Entelano.

20

Análisis de las muestras

25

[0134] Las diapositivas manchadas fueron examinadas bajo el microscopio y se analizaron como se describe en el Ejemplo 1. Brevemente, las células malignas y normales se clasificaron de acuerdo a las características morfológicas y se documentó su color. Un alineamiento de color y morfología celular se llevó a cabo y se registró para establecer la correlación entre la morfología celular y el color de la célula.

30

**Resultados**

[0135] Diapositivas de citospina que contienen las células urinarias se tiñeron con el enfoque actual y se examinaron cuidadosamente bajo el microscopio. Las células que comprenden el epitelio vesical de células transicionales normal tuvieron citoplasma azul verdoso (Figura 8a). En contraste, las células neoplásicas morfológicamente reconocibles exhibieron citoplasma rojo/magenta manchada (Figura 8b). Por lo tanto, es posible reconocer neoplasia, incluso a bajo aumento, basándose exclusivamente en estado tintóreo del epitelio.

35

[0136] Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención, las cuales se describen, por motivos de brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5       **1.**       Un método de identificación de las células del sistema urinario anormal en una muestra de orina, comprendiendo el método:
- la fijación de la muestra de orina que comprende células del sistema urinario en ácido tricloroacético;  
la puesta en contacto de la muestra de orina con un extracto de la planta Ficus o uno o más componentes del mismo  
10       obteniendo de este modo las células del sistema urinario anormales acondicionadas; y  
la tinción de las células del sistema urinario acondicionado con un colorante básico y un tinte ácido, de manera que  
10       un citoplasma de las células anormales de las células del sistema urinario manchadas con un color predominantemente rosa a rojo.
- 15       **2.**       El método de la reivindicación 1, en el que el extracto de la planta Ficus es un extracto de etanol de tejido de la hoja.
- 3.**       El método de la reivindicación 1,  
en donde la planta Ficus es del subgénero Urostigma; o  
20       en el que la planta de Ficus es Ficus elastica.
- 4.**       El método de la reivindicación 1, en el que el colorante básico es Nueva fucsina y el colorante ácido es verde claro o verde rápido.
- 25       **5.**       El método de la reivindicación 1, en el que la tinción de células acondicionadas del sistema urinario de Nueva fucsina se sigue de la tinción de células con verde claro o verde rápido.
- 6.**       El método de la reivindicación 1,  
en el que las células del sistema urinario son células urotelio; o en el que las células del sistema urinario son células de la vejiga.  
30
- 7.**       El método de la reivindicación 1,  
en el que uno o más componentes del extracto incluyen uno o más flavonoides; o  
en el que uno o más componentes del extracto incluyen uno o más flavonoides y el uno o más flavonoides incluyen proantocianidinas.  
35
- 8.**       El método de una cualquiera o más de las reivindicaciones 1-5, en el que las células del sistema urinario son células uroteliales, en el que las células acondicionadas se tiñen secuencialmente con el colorante básico y el colorante ácido, y en el que la identificación de al menos una célula urotelial que tiene un citoplasma que tiene un color de base de tinte por encima de un umbral predeterminado es indicativo de células anormales en la muestra.  
40
- 9.**       El método de la reivindicación 1, en el que las células del sistema urinario son células de la vejiga, y en el que la identificación de al menos una célula de la vejiga que tiene un citoplasma rojo encima de un umbral predeterminado es la identificación de anomalías celulares indicativas de la patología de la vejiga.
- 45       **10.**      El método de la reivindicación 9, que comprende además el análisis de una morfología de la al menos una célula de la vejiga que tiene un citoplasma de color predominantemente rosa a rojo, en el que las células acondicionadas se tiñen secuencialmente con el colorante básico y el colorante ácido, en el que el Ficus es Ficus elastica.
- 50       **11.**      El método de la reivindicación 10,  
que comprende además la puesta en contacto de las células de la vejiga con una inmunotinción; o que comprende además la puesta en contacto de las células de la vejiga con una inmunotinción anti-Ki67.
- 55       **12.**      El método de la reivindicación 10,  
en el que la patología de la vejiga es el cáncer de vejiga; o en el que la patología de la vejiga es el carcinoma de células de transición.  
60
- 65

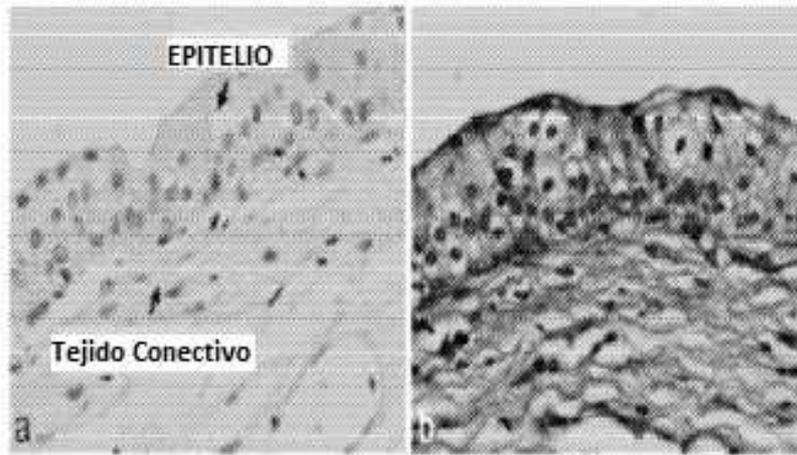


Figura 1a

Figura 1b

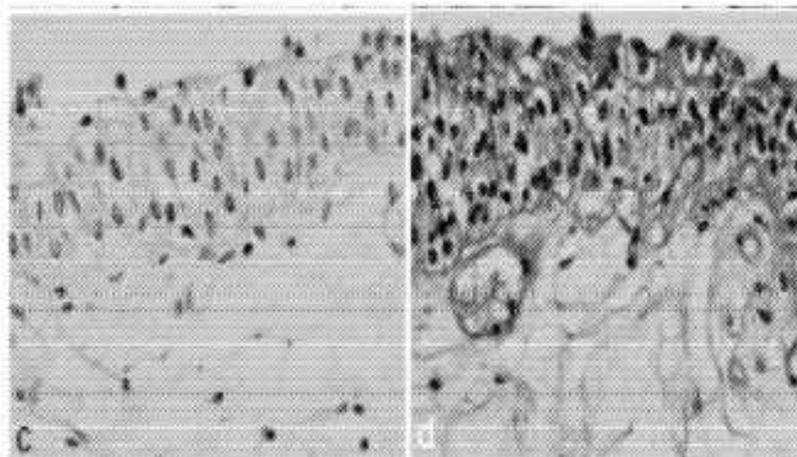


Figura 1c

Figura 1d

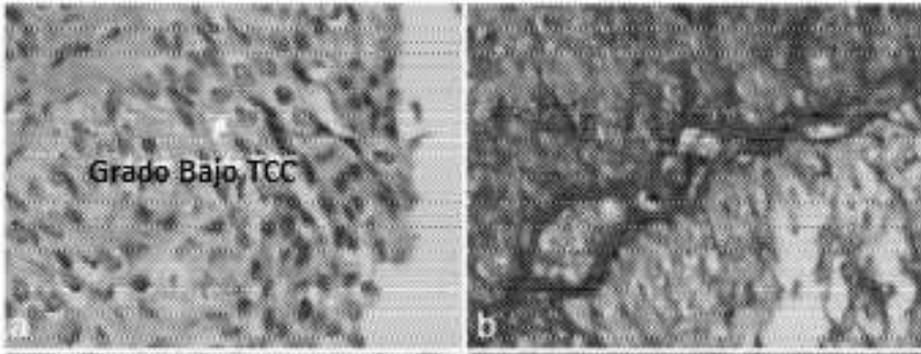


Figura 2a

Figura 2b

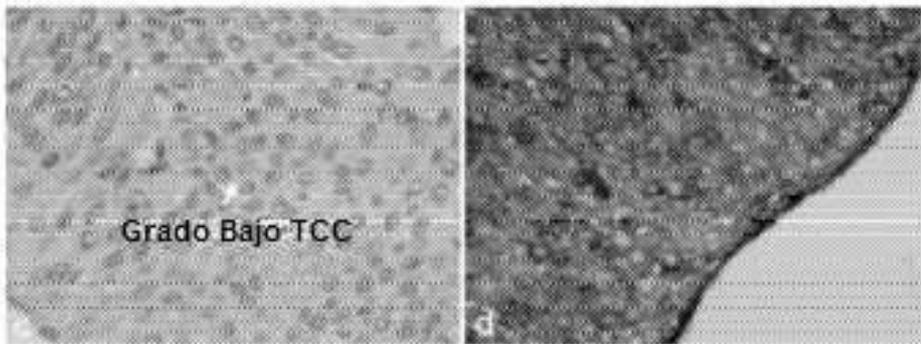


Figura 2c

Figura 2d



Figura 3a

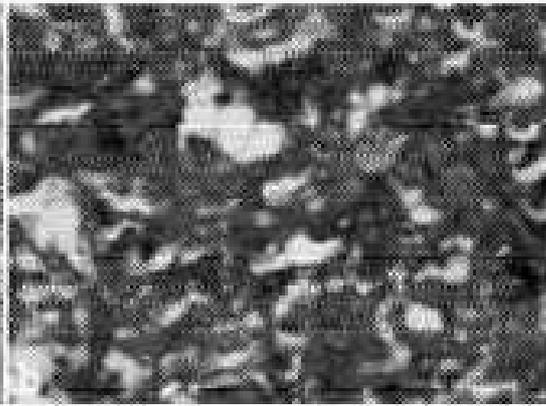


Figura 3b



Figura 3c

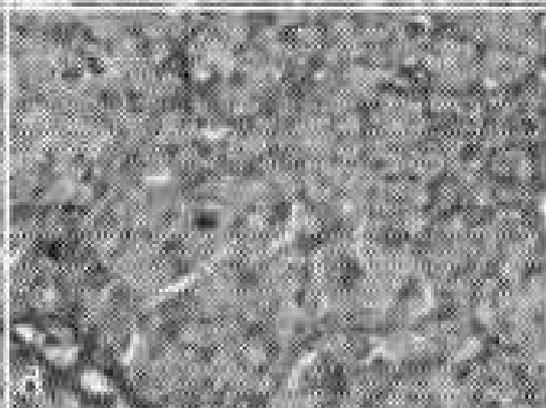


Figura 3d

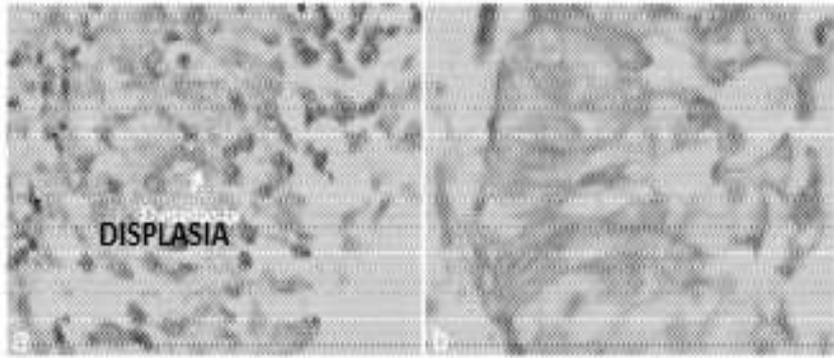


Figura 4a

Figura 4b

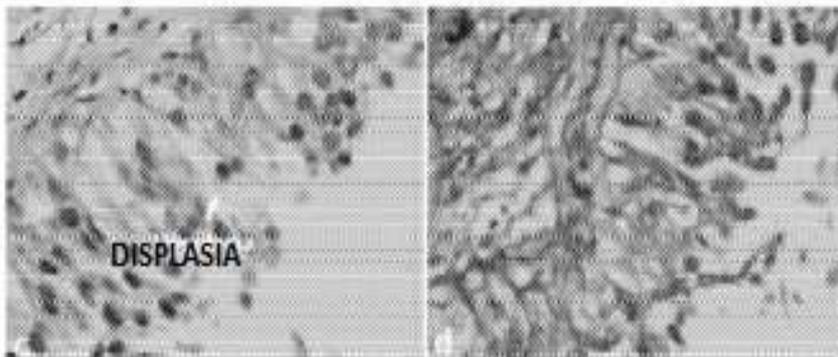
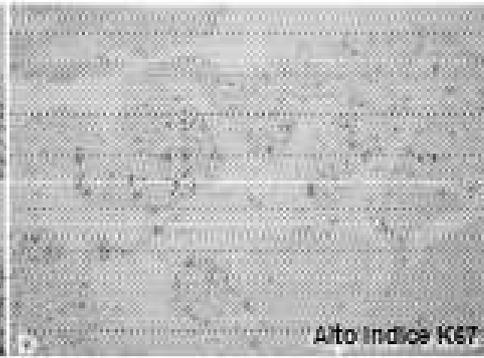


Figura 4c

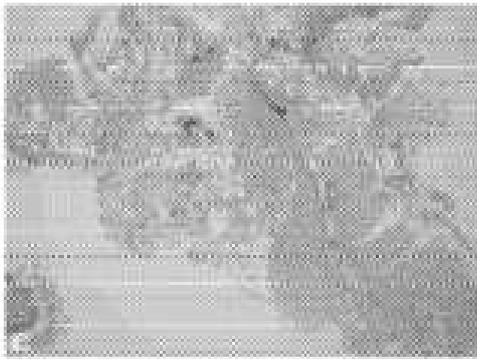
Figura 4d



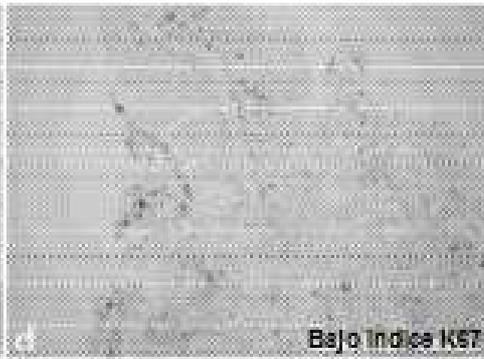
**Figura 5a**



**Figura 5b**



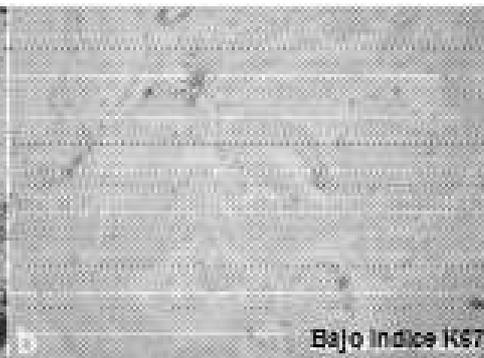
**Figura 5c**



**Figura 5d**



**Figura 6a**



**Figura 6b**

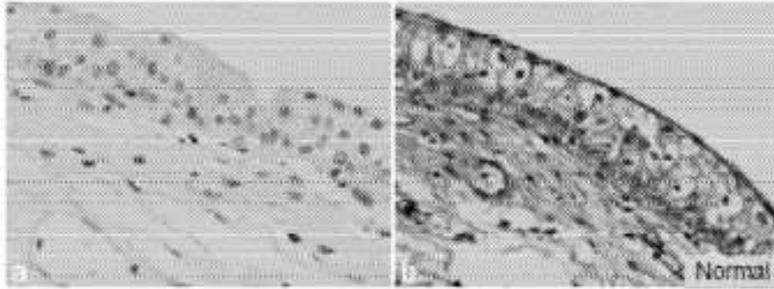


Figura 7a

Figura 7b

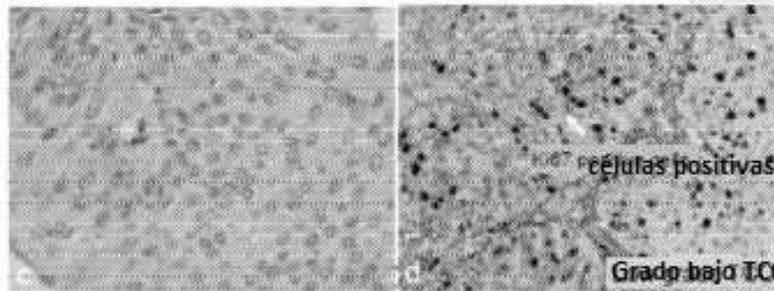


Figura 7c

Figura 7d

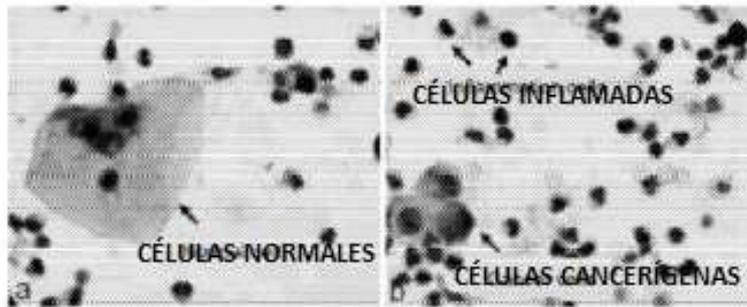


Figura 8a

Figura 8b