



326044

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formulada el 27 de Abril de 1966, con el núm. 326.044

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de INTERNATIONAL BUSINESS MACHINES CORPORATION,
entidad norteamericana, establecida en Armonk, Nueva York,
Estados Unidos de América, por:

"UN METODO PARA DETECTAR CANTIDADES ANORMALES DE ACIDO NU
CLEICO EN CELULAS BIOLOGICAS".-

La presente invención se refiere en general a un
aparato y un método para efectuar mediciones de gran ve--
locidad en células biológicas, y más especialmente a un -
aparato y un método para detectar y presentar la cantidad
5 de ácido nucléico por unidad de volumen para cada célula
individual en una muestra de un fluido corporal que pueda
contener células anormales.

Los estudios recientemente realizados han indica

326044



do que es posible detectar la presencia del cáncer por medición de cambios químicos en células específicas halladas en el cuerpo, que pueden obtenerse del donante o paciente por biopsia, por irrigación de órganos corporales tales como el útero, o por exploración con esponja de niflas en órganos tales como, por ejemplo, el cuello uterino. Los citados estudios han puesto de relieve que un aumento en el ácido nucléico (DNA o RNA) de una muestra respecto a las cantidades normales de algunas células indica la presencia de cáncer en el órgano del donante examinado. Un gran aumento en la cantidad de ácidos nucléicos de ciertas células de una muestra se ha propuesto como indicativo del cáncer, por lo que recientemente se han venido desarrollando técnicas de medición del aumento de ácido nucléico respecto a la cantidad normalmente esperada en células individuales. En tales mediciones se aprovecha el hecho de que los ácidos nucléicos tienen un máximo de absorción cerca de la longitud de onda de 2537 Å. Por lo general, la muestra celular del donante se coloca en un portaobjetos y se tiñe de manera ya conocida, de modo que, mediante el uso de un método de exploración es posible someter a radiaciones y medir la absorción en cada célula individual, que está sobre el portaobjetos, para determinar si los ácidos nucléicos están o no presentes en cantidades normales o anormales. En una solicitud de patente americana número 355.030 presentada el 26 de Mayo de 1964 aún titulada "Método y aparato de clasificación de células", a nombre de I. Kamensky y cedida al mismo cesionario de la presente, se describe dicho método de medida de absorción. En otro procedimiento, expuesto en otra solici

tud de patente americana número 301.265 presentada el 12 de agosto de 1963 afín titulada "Reconocimiento de células cancerosas", también a nombre de I. Kamentsky y cedida al mismo cesionario de la presente se utiliza un método de reconocimiento de una pauta para diferenciar entre células normales y anormales, utilizando como criterio - las variaciones de forma de una característica de absorción cuando se comparan células normales y anormales. Es tos métodos han venido teniendo un relativo éxito, pero sólo pueden aplicarse cuando el número de muestras a tra tar ha de ser forzosamente limitado. En cambio, cuando - se desee aplicar métodos de clasificación en masa o en - grandes cantidades, hasta llegar a tratar 100.000 célu-- las o más por muestra, las mediciones efectuadas del mo-- do últimamente indicado serían demasiado laboriosas y -- costosas. El tiempo y los factores económicos que mili-- tan en contra del empleo de los métodos citados, en que es necesaria la clasificación en masa, provienen del hecho de que, si bien éstos son apreciablemente más rápi-- dos que los métodos de clasificación manuales, la dismi-- nución del tiempo de tratamiento no es lo bastante gran-- de para que resulte factible su empleo en el campo de la clasificación en masa. Otro factor que milita en contra de los métodos arriba citados está en el hecho de que, - aun en una muestra anormal, las células cancerosas apare cen con poca frecuencia, haciendo necesario verificar o comprobar atentamente cada célula individual. A causa de esto, el ensayo automático, de gran velocidad y preci-- sión, de cada célula aparece como único camino para supe rar los factores económicos, de tiempo y de personal, --

326044



que limitan del uso de la clasificación en masa.

Una de las principales razones por las cuales -
ha venido disminuyendo en los últimos años la mortalidad
debida al cáncer es la insistencia puesta por la profe--
5 sión médica en una detección precoz. El reciente informe
de la Comisión de la Presidencia sobre enfermedades del
corazón, cáncer y apoplejía, en su comunicación a la Pre
sidencia de los EE.UU. de Norteamérica, vol. 1, pág. 15,
diciembre 1964, indica que, respecto al cáncer del cue--
10 llo uterino, existe casi un 100% de supervivencia y cura
para aquellas personas que reciben un diagnóstico y tra-
tamiento precoces. La precocidad en el descubrimiento y
la cura del cáncer del cuello uterino se ha hecho posible
mediante el uso del conocido ensayo de frotis de Papani-
15 colaou. Este ensayo tiene la ventaja de que las muestras
para efectuarlo pueden ser obtenidas fácilmente por un -
médico o por el propio paciente y, a consecuencia de ---
ello, el reconocimiento de comprobación anual del cáncer
de cuello uterino se ha convertido en un hecho logrado -
20 en muchas áreas locales. En muchas esferas se cree que -
este tipo de cáncer dejará de ser causa de mortalidad en
los EE.UU. y, en realidad, en todo el mundo, en cuanto -
puedan examinarse anualmente muestras procedentes de la
población total femenina. Como se ha dicho, los actuales
25 métodos de examen y clasificación de células, tanto ma--
nuales como automáticos, son relativamente laboriosos y
costosos, Además, los métodos disponibles adolecen de --
cierta inexactitud porque, en el caso de la medición de
máximos de absorción de ácidos nucleicos, en que se ex--
30 ploran los portaobjetos por medio de un haz luminoso, la

326044



presencia de células de gran tamaño o arracimadas puede dar lugar a una indicación de cantidades anormales de ácido nucléico cuando en realidad la densidad o presencia de ácido nucléico sea normal.

5 De lo que antecede, por consiguiente, puede verse que existe la necesidad de un método para descubrir o detectar el cáncer, método que sea adecuado para el examen en masa de muestras, que sea rápido y preciso y que tenga en cuenta factores tales como el tamaño y el contenido de ácido nucléico de las células que se estén midiendo.

10 Por todo ello, es objeto de esta invención un aparato y un método para detectar el cáncer, adaptables para el examen en masa.

15 Otro objeto es un aparato y un método que son superiores a los ya conocidos, tanto en velocidad como en precisión o exactitud.

Otro objeto reside en un aparato y un método - menos costosos y de manipulación menos laboriosa que los ya conocidos.

20 Otro objeto reside en un aparato y un método - en los que se tiene en cuenta el tamaño de las células, y se eliminan los efectos debidos al tamaño de las células.

25 Otro objeto consiste en un aparato y un método con los que se opera a base del principio de detectar la presencia de cantidades anormales de ácidos nucléicos por unidad de volumen, en una célula sospechosa.

30 Otro objeto consiste en un aparato y un método que indican la presencia de células anormales mediante

326044



detección de ácidos nucleicos en una célula, en cantidades mayores de lo normal.

Otro objeto más reside en unos medios para presentar las mediciones hechas en una muestra, medios que
5 indican claramente la presencia o ausencia de células -- anormales.

Otro objeto más consiste en un método y un aparato que, debido a que la capacidad de absorción de ácidos nucleicos viene reforzada por el uso de soluciones
10 isotónicas de acetato sódico y ácido acético a un pH de 2,1 permiten la detección de células cancerosas en muestras sospechosas.

Es característico de esta invención un método para detectar cantidades anormales de ácidos nucleicos
15 en células biológicas, que comprende las etapas de preparar una muestra celular reforzando la diferencia de absorción de energía radiante entre células de grande y pequeña cantidad de ácido nucleico, y someter dicha muestra a las radiaciones de una fuente de energía radiante.
20 También se incluye la etapa de medir la pérdida de energía radiante incidente de cada célula de la muestra en por lo menos dos longitudes, de onda, hasta obtener una salida eléctrica discontinua relativa a cada longitud de onda.

Otra característica del invento es la utilización de un método que incluye además la etapa de proporcionar una salida, basada en la suma vectorial de las salidas eléctricas discontinuas, para determinar las resultantes de las pérdidas medidas.

Otra característica está en la utilización de un

326044



método que incluye además la etapa de proporcionar una salida, basada en la suma vectorial de las salidas eléctricas discontinuas, para determinar las resultantes de las pérdidas medidas.

5 Otra característica está en la utilización de un método en el que la etapa de proporcionar una salida incluye además la de generar una presentación visual de las resultantes de las pérdidas medidas.

10 Otra característica más reside en el empleo de un método en el que la etapa de generar una presentación visual incluye además la de presentar, en una superficie de presentación, por lo menos parte de una traza generada por la acción mutua ortogonal de las señales con un medio de escritura o inscripción; la posición de la traza en la superficie indica diferentes cantidades de ácido nucleico por unidad de volumen.

15 Otra característica más reside en la utilización de un método en el que la etapa de preparar una muestra celular reforzando la diferencia de absorción de energía radiante entre células incluye la etapa de poner en suspensión la muestra celular en una solución que tenga un pH próximo a 2.

20 Otra característica de este invento reside en el empleo de un sistema para detectar la cantidad de ácidos nucleicos por unidad de volumen de cuerpos celulares, sistema que consta de una fuente de energía radiante destinada a proyectar radiación de una amplia gama de longitudes de onda en un trayecto dado, y medios para interponer una pluralidad de cuerpos celulares uno tras otro en dicho trayecto de la energía radiante. También se inclu-

30

326044



yen medios para detectar simultáneamente las variaciones de intensidad de la energía radiante debidas a la absorción y diseminación de la luz producidas por dichos cuerpos celulares en un número de longitudes de onda.

5 Otra característica más reside en el empleo de unos medios de presentación adecuados para dar un registro visual de la absorción de la energía radiante por -- unidad de volumen de los cuerpos celulares.

10 Otra característica más de este invento reside en el empleo de un miembro o elemento transparente dotado de un canal que posee un taladro o agujero de tamaño suficiente para dejar pasar las células solamente de una en una, a fin de interponer los cuerpos celulares uno -- tras otro, en el trayecto de la energía radiante.

15 Los precedentes y otros objetos, características y ventajas de la invención se irán desprendiendo de la siguiente descripción pormenorizada de una forma preferida de realización de la misma, tal como se ilustra en -- los dibujos adjuntos, en los cuales:

20 - la figura 1 es un esquema en parte pictórico y en parte funcional o por bloques del aparato utilizado para efectuar mediciones de gran velocidad en las células biológicas;

25 - la figura 2 es una vista ampliada de la disposición de canal y miembro transparente, que permite efectuar mediciones de absorción y diseminación de la luz en células individuales de una muestra biológica; y

30 - la figura 3 representa gráficamente la absorción de radiaciones ultravioleta de una frecuencia dada, por unidad de volumen de unos cuantos tipos de cuerpos -

326044



celulares. La representación gráfica muestra en silueta -
la distribución de cuerpos celulares esperada o que cabe
esperar, con arreglo a su tipo o condición. La gráfica -
realmente obtenida en una presentación osciloscópica con-
5 sistiría en una pluralidad de puntos que caerían dentro
de una de las regiones indicadas en silueta, de acuerdo
con el contenido de ácido nucléico por unidad de volumen
de cada célula.

Conforme al presente invento, se han desarrolla
10 do un método y un aparato para examinar rápidamente pobla
ciones del orden de 100.000 células, en dos o tres minu
tos. La población de células se obtiene en una mezcla a
4:1 de solución salina isotónica y etanol. Pueden usarse
otras soluciones fijativas, así como soluciones salinas
15 no fijativas; pero la citada mezcla a 4:1 de solución sa
lina y etanol dió los mejores resultados. Las muestras -
pueden ser obtenidas por un médico o por los propios pa
cientes, utilizándose, por ejemplo, en el caso de mues--
tras cervicales, el ajuar fácilmente obtenible de los --
20 hospitales o de empresas farmacéuticas. Al preparar las
muestras para ensayo, con el fin de evitar que se pier--
dan por lixiviación los constituyentes de las células, y
de normalizar el grado de desnaturalización proteínica,
sin destruir las características de absorción de radia--
25 ciones ultravioleta por los ácidos nucléicos, se volvie
ron a poner en suspensión las muestras, a las dos sema--
nas de tomadas, en una solución de etanol al 50% y ácido
acético al 2%. Según se ha visto, utilizando este fijati
vo, las muestras pueden guardarse durante hasta tres me
30 ses sin que haya apenas o ninguna desviación entre los -

326044

17 JUN 1946



resultados obtenidos al comienzo de este período y los -
obtenidos al final del mismo. En la preparación de las -
muestras para ensayo se ha visto también que la diferen-
cia de absorción entre células de grande y pequeña canti-
5 dad de ácido nucleico se hace resaltar si se vuelven a --
poner en suspensión las células en una solución acuosa de
acetato sódico y ácido acético que tenga un pH próximo a
2 (concretamente, de 2,1) y una molaridad en sodio de al-
rededor de 0,15. Con índices de pH y molaridades aparta-
10 dos de estos valores, no hay homogeneidad ni consecuen-
cia en los resultados obtenidos. Esta inconsecuencia pue-
de explicarse de una parte por el aumento de la absorción
producida por los ácidos nucleicos a consecuencia de su
desnaturalización para reducidos valores del pH. Según -
15 se ha visto, para un pH distinto de 2,1, una muestra que
contenga células cancerosas puede aparecer como normal.
En uno de los experimentos realizados, una muestra que -
contenía células cancerosas en una solución de acetato -
sódico y ácido acético de un pH igual a 3,8 no pudo dife-
20 renciarse de una muestra que contenía células normales -
en una solución de un pH igual a 2,1. Otros ensayos rea-
lizados con diferentes células cancerosas y con solucio-
nes de diferente pH mostraron una tendencia semejante. -
La absorción de radiaciones por el DNA y el RNA aumenta-
25 ba en un factor de casi 2 utilizando soluciones de un pH
próximo a 2. Según se cree, las soluciones que tienen es-
te valor de pH originan un desenrollamiento de la estruc-
tura molecular de los ácidos nucleicos, reforzando así -
la capacidad de absorción de cada célula. Si bien este -
30 fenómeno del desenrollamiento de las moléculas de los áci



dos nucleicos se ha puesto de manifiesto en otras partes, se tiene la creencia de que el método y el aparato del presente invento son los primeros en aplicar este fenómeno para reforzar la capacidad de absorción de radiaciones de las células individuales y obtener así una medición significativa acerca de la presencia o ausencia de células cancerosas en una muestra sometida a ensayo.

Las células a estudiar se filtran utilizando un tamiz de malla micrométrica de Buckbee Mears con 100 líneas por centímetro colocado en un filtro de Swinny, después de lo cual las células se ponen en suspensión en 2 ml de una solución acuosa de acetato sódico y ácido acético a un pH próximo a 2. Después de filtrar y poner en suspensión en la solución, la muestra se sigue tratando en el aparato de la figura 1.

En la figura 1, la muestra a tratar se pasa finalmente a un tubo de ensayo u otro recipiente conectado mediante una tubería 2 a uno de los lados de un canal de circulación 3. El otro lado de este canal de circulación 3 va conectado a un serpentín de almacenaje 4 hecho de tubo de Teflon, y una jeringa 5 conectada al serpentín 4 controla la circulación de fluido por la tubería y el canal 3. El serpentín de tubo de Teflon 4 puede ir montado en un sacudidor o agitador de pipeta (no representado en el dibujo) para mantener las células en suspensión. La muestra a ensayar se coloca inicialmente y se mantiene en el serpentín 4, hasta el comienzo del ensayo. A continuación, la muestra puede hacerse pasar al canal de circulación 3 a una velocidad o con un gasto dado, con el auxilio, por ejemplo, de una bomba de infusión/extracción

326044



de Harvard Apparatus. Una velocidad de infusión conveniente es, según se ha visto, la de 0,5 ml por minuto. Un detector de burbujas de aire que consta de una fotocélula 6 detecta la presencia de unas burbujas de aire colocadas al comienzo y al final de la muestra y que inician unas señales que ponen en marcha y detienen una presentación. La muestra se hace pasar por un estrechamiento de 100 por 100 micras intercalado en el canal de circulación 3, y se descarga en el recipiente 1 para ulterior uso. La figura 2 muestra los detalles del canal de circulación 3 a través del cual se hace pasar la muestra. El canal de circulación 3 tiene forma de "nudo de corbata", obtenida mediante cortes practicados en un portaobjetos de cuarzo 7 de microscopio, utilizando un cortador ultrasónico. Después de practicado el corte, el surco formado puede pulimentarse. En el portaobjetos se hicieron unos taladros 8 cerca de los extremos del canal de circulación 3. A continuación se puso sobre el canal 3 una cubierta de cuarzo 9, y se calentó el portaobjetos 7 haciendo que fluyese cera por acción capilar hasta llenar el área de debajo de la cubierta 9 en contacto con el portaobjetos 7. La tubería 2 de polietileno descarga la muestra en el recipiente 1, en tanto que la tubería 10 la lleva desde el serpentín de almacenaje 4 por medio de un adaptador de Touhy-Borst (no representado en el dibujo).

La cubierta 9 y el portaobjetos 7 de cuarzo que contiene el canal de circulación 3 y sus tuberías de polietileno asociadas 2, 10 se montan luego en la platina de un microscopio 11 dotado de un objetivo 12 de ultravioleta flúor Carl Zeiss 100,1,25, de inmersión en glicerina, que

326044

17 JUN 1954



sitúa la imagen de la parte estrechada de 100 micras del centro del canal de circulación 3 en una abertura. En la montura de condensador del microscopio 11 hay colocados un manantial de luz 13, que consiste en una lámpara de -
5 mercurio Hanovia de baja presión montada en una camisa - refrigerada con agua, y un condensador de inmersión 14, Carl Zeiss, 0,85 NA, que pasa la imagen de la fuente de luz 13 al canal 3. El manantial de luz 13 es una fuente de radiaciones ultravioleta, que irradia buena parte de
10 su energía a una longitud de onda de 2537 \AA , próxima a - la de máxima absorción de radiaciones ultravioleta por - los ácidos nucleicos (DNA y RNA). Una lente de cuarzo 15 y un espejo dicróico 16 llevan la luz de longitudes de - onda mayores de 4000 \AA desde el plano posterior del obje
15 tivo 12 a un tubo fotomultiplicador 17 (un tubo EMR 541A) y reflejan las longitudes de onda más cortas con un ángu
lo de 90° , de tal modo que el haz reflejado se proyecta en un tubo fotomultiplicador 18 de tipo de pantalla o -
persiana solar (EMR 541P) después de pasar por un filtro
20 de células 19 de cuarzo de 3 mm. que contiene 1-4 difenil
butadieno disuelto en etanol. El filtro 19 y el tubo fo
tomultiplicador 18 actúan aislando efectivamente la luz
de 2537 \AA .

Las células, que circulan a velocidades superio
25 res a 500 células por segundo, producen impulsos, de al
rededor de 200 microsegundos de duración, a la salida de
losfotomultiplicadores 17 y 18. El fotomultiplicador 17
mide la luz diseminada por las células fuera del cono de
aceptación del objetivo, de gran abertura numérica, des-
30 de el condensador, de menor abertura numérica. El fotomu

326044 170



tiplicador 18 mide la absorción de luz de $2537 \overset{\circ}{\text{Å}}$ por cada célula, al pasar ésta por el canal de circulación 3. El impulso único resultante o procedente del fotomultiplicador 17, que mide la pérdida de luz por diseminación en las células, es 30 veces menor que el impulso de absorción, a igualdad de energía incidente en ambos fotomultiplicadores; pero aún queda energía suficiente para dar buena relación de señal a perturbación ("señal/ruido") en las señales procedentes de ambos fotomultiplicadores.

10 Las señales de diseminación de este orden de magnitud, según se ha demostrado por medio de experimentos, dan la mejor estimación del tamaño de las células, de entre varios métodos ensayados entre los que se incluían la medición del contenido de proteína de las células por absorción a $2900 \overset{\circ}{\text{Å}}$ o a $3130 \overset{\circ}{\text{Å}}$, y la variación de conductividad eléctrica en el canal 3, producida por el paso de las células.

Las salidas de los fotomultiplicadores 17 y 18 se limitaron en anchura de banda desde 500 c/s a 5 kc/s; se amplificaron en unos amplificadores 20 que pueden formar parte del osciloscopio previsto; y se fijaron a cero. La señal de salida amplificada procedente del fotomultiplicador 18, que puede caracterizarse como señal de absorción, se conecta a las placas de desviación vertical 21 de un osciloscopio 22 que, por ejemplo, puede ser el Tektronix 536. La señal de salida procedente del fotomultiplicador 17, que puede caracterizarse como señal de diseminación, se conecta a las placas de desviación horizontal 23 del osciloscopio 22. Así, cada célula, al pasar por el canal 3, produce una línea o resultante en el tu-

326044



bo indicador del osciloscopio 22, línea cuya punta o extre-
nidad tiene unas coordenadas determinadas por las mag-
nitudes de ambas señales. Para obtener una presentación
que tenga significado, la salida del fotonultiplicador -
5 13 se lleva también a un circuito diferenciador 24, de -
tipo ya conocido de las personas versadas en la técnica
de la electrónica. En él, el impulso o señal de absorción
es diferenciado, y el paso por cero de esta señal inicia
un impulso de una duración de 1 microsegundo, procedente
10 de un generador de impulsos 25, que está conectado a un
terminal 26 de modulación de intensidad o de eje Z, que
hace que solamente se intensifique el extremo de la tra-
za del osciloscopio. Ajustando la intensidad del haz del
osciloscopio de manera que no aparezca en la pantalla más
15 que un solo punto por cada célula, en coordenadas deter-
minadas por las mediciones del volumen de la célula y de
los ácidos nucleicos, es posible obtener para cada célu-
la una medición del contenido de ácidos nucleicos por --
unidad de volumen. Fijando una cámara fotográfica al os-
20 ciloscopio, es posible obtener un registro permanente de
la distribución de las células en una determinada mues-
tra particular. De lo que antecede se desprende que las
medidas de absorción por unidad de volumen llevarán o co-
locarán en la parte izquierda de la pantalla del oscilos-
25 copio una célula que tenga un elevado contenido de áci-
dos nucleicos. Así, recurriendo a enmascarar el oscilos-
copio de manera adecuada, es posible obtener con la cáma-
ra un registro del número de células que es más probable
que sean cancerosas. Una vez aplicada la máscara de ocul-
30 tación a la cara o pantalla del osciloscopio, las indica

326044

97 JUL 1977



ciones de células anormales o cancerosas pueden utilizar se para activar o disparar una fotocélula colocada junto al área no enmascarada. La fotocélula, a su vez, puede - activar un dispositivo de alarma que permite efectuar el
5 ensayo sin vigilancia hasta que se active la alarma. La salida prevista no necesita ser visual, sino que puede - ser una señal analógica o numérica susceptible de ser -- utilizada en combinación con un equipo de tratamiento de datos. Como se apreciará, también pueden obtenerse otros
10 parámetros relativos a la determinación de anomalías en las células biológicas, simultáneamente con las - mediciones ya descritas. Por ejemplo, puede medirse, a - otras longitudes de onda, la absorción de radiaciones ultravioleta por la proteína contenida en el citoplasma de
15 una célula. Así, las células que presenten una elevada - absorción debida a la proteína en otra longitud de onda, pueden proporcionar otra medida que, en combinación con las anteriormente descritas, por ejemplo, resulten úti--
20 ra, para dar una información más precisa y exacta de cada célula individual. La figura 3 representa gráficamente la absorción de ácidos nucleicos en función del volumen, para células de diferentes tipos. Es significativo que las células normales de un tipo dado adopten en la re
25 presentación gráfica una posición específica y concreta, en tanto que todas las células cancerosas adoptan una posición que esencialmente es la misma, con independencia del tipo de célula. Como se apreciará, las diversas re--
30 giones indicadas en silueta en la figura 3 son en realidad regiones que constan de gran número de células individuales, las cuales se presentan en la pantalla de un -

326044

17 JUN



osciloscopio en forma de una pluralidad de puntos indivi-
duales. Las siluetas designadas con las letras A a D in-
clusive presentan unas regiones en las que puede esperar-
se que caigan los diversos tipos de células normales, en
5 tanto que las siluetas E y F indican las regiones en las
que puede esperarse que caigan las células cancerosas y
las dañadas por radiaciones, respectivamente. La región
A muestra en silueta una región dentro de la cual puede
esperarse que caigan los glóbulos rojos normales de la -
10 sangre. De los diversos cuerpos celulares ensayados, los
glóbulos rojos dieron la mínima absorción de radiaciones
ultravioleta por unidad de volumen a una longitud de on-
da de 2537 \AA . Los leucocitos y las células epidermoideas
cayeron en las regiones B y C, respectivamente, y dieron
15 valores de absorción algo mayores que los obtenidos para
los glóbulos rojos. De las células normales, los linfoci-
tos de la región D dieron la más alta absorción por uni-
dad de volumen, debido a la gran cantidad de DNA que hay
en el núcleo de estas células. Los ensayos realizados --
20 con estos cuerpos celulares normales adoptan diseños ca-
racterísticos, hasta el punto de que para un ajuste dado
de la ganancia de los amplificadores de los fotomultipli-
cadores de la figura 1 es posible identificar los dife-
rentes tipos de células, cuando están presentes en una -
25 muestra dada.

En la región E es donde caen la mayoría de las
células anormales o cancerosas. En general, puede decir-
se que las células anormales muestran los máximos valo-
res de absorción por unidad de volumen, con excepción de
30 las células que han sido expuestas a la radiación, y da-

326044



ñadas por ésta. En el transcurso de los experimentos rea-
lizados, sólo uno de los tipos de cáncer ensayado, un --
sarcoma estromático de la mucosa uterina, presentó una -
distribución normal; y en otros casos las células norma-
5 les presentaron elevados valores de absorción indicati-
vos de cáncer. Ahora bien, tales distribuciones fueron -
excepcionales, y la desviación respecto a lo que se espe-
raba obtener puede explicarse por circunstancias poco --
frecuentes en cada caso. Por ejemplo, resultó que tales
10 células excepcionales aparecían en muestras obtenidas de
algunas mujeres postmenopáusicas, o después de tratadas
de un cáncer curado. Las excepciones surgidas caían en -
áreas clínicamente definidas, de manera que un paciente
cuyo historial cayera dentro de alguna de estas áreas --
15 bien definidas, podía ser considerado como caso aparte y
tomar con él medidas especiales, en vista de las circuns-
tancias, para llegar a unas pruebas más significativas.

Además del material uterino obtenido por irriga-
ción vaginal, se prepararon muestras de suspensiones de
20 células partiendo de una diversidad de tumores extraídos
por resección quirúrgica, y se establecieron comparacio-
nes, en todo lo posible, utilizando el aparato de la fi-
gura 1 con suspensiones de células de tejidos benignos -
comparables. Entre los tumores examinados había carcino-
25 mas epidermoideos del cuello uterino y del pulmón, carci-
nomas escamosos queratinizantes de la boca y de la farin-
ge, adenocarcinomas de la mucosa uterina, del colon, de
las mamas y de los ovarios, y ciertos linfomas. Se obtuvo
epitelio benigno del cuello uterino y de las mucosas oral
30 y cólica; y al ser comparado con las suspensiones prepa-



radas a base de los tumores, estas últimas suspensiones dieron de manera consecuente y homogénea mayores índices de absorción por unidad de volumen a 2537 \AA que las suspensiones preparadas partiendo de los tejidos benignos. De igual manera, resultó más alta la absorción por unidad de volumen para el sarcoma de las células reticulares, el linfosarcoma y el linfoma de Hodgkin, en comparación con los nodos linfáticos benignos. En todos los casos, los diseños de distribución obtenidos fueron homogéneos y consecuentes, y reproducibles con un mínimo de deterioro aun después de un uso repetido. En todos aquellos casos en que las muestras o suspensiones de células indicaron la presencia de cáncer, se obtuvo confirmación mediante examen de frotis citológicos realizado por un patólogo. Recíprocamente, se prepararon suspensiones partiendo de tejido canceroso, que fueron ensayadas por el experimentador sin previo conocimiento de la existencia del cáncer; y en todos los casos, con ciertas excepciones como las mencionadas más arriba, el aparato de la figura 1 dió indicación positiva de la existencia de cáncer.

Las ventajas proporcionadas por el aparato y el método aquí expuestos, en relación con los métodos ya conocidos, son importantes. El tiempo de tratamiento de 2 a 3 minutos por muestra, con registro permanente de los resultados por medio de una cámara fotográfica colocada en un osciloscopio o bien por métodos de almacenaje en máquinas calculadoras, hace que el aparato de la figura 1 se pueda adaptar a técnicas de clasificación y examen en masa. Así, las indicaciones positivas de la existencia

326044 17 JUN 1965



de cáncer en una muestra cualquiera pueden servir para -
que el personal médico inicie nuevas pruebas y explora--
ciones detalladas, lo que indudablemente aumentará la --
proporción de curaciones al permitir un precoz descubri-
5 miento de la presencia del cáncer.

Si bien la invención se ha ilustrado y descrito
en particular con referencia a una forma preferida de --
realización de la misma, se sobrentiende para aquellas -
personas versadas en la materia que es posible efectuar
10 en ella los precedentes y otros cambios de forma y de de
talle sin por eso apartarse del espíritu ni salirse del
ámbito de la invención.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada
en los Estados Unidos de América, con fecha 29 de abril
15 de 1965, bajo el número 451.947, se acoge a los benefi-
cios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propie--
dad Industrial.

N O T A

Los puntos de invención, propia y nueva, que se
20 presentan para que sean objeto de esta solicitud de Pa--
tente de Invención en España, por VEINTE años, son los -
siguientes:

1a. - Un método para detectar cantidades anorma
les de ácido nucléico en células biológicas, que compren
25 de las etapas de: preparar una muestra celular reforzando la diferencia de absorción de energía radiante entre células de grande y pequeña cantidad de ácido nucléico;

326044

17



someter dicha muestra a las radiaciones de una fuente de energía radiante; y medir la pérdida de energía radiante incidente, de cada célula de la muestra en por lo menos dos longitudes de onda, hasta obtener una salida eléctrica discontinua relativa a cada longitud de onda.

22. - El método del punto 1, que incluye además la etapa de proporcionar una salida, basada en la suma vectorial de las salidas eléctricas discontinuas en por lo menos dos longitudes de onda, para determinar las resultantes de las pérdidas medidas.

32. - El método del punto 2, en el cual la etapa de proporcionar una salida incluye además la de generar una presentación visual de las resultantes de las pérdidas medidas.

42. - El método del punto 3, en el que la etapa de generar una presentación visual incluye además la de presentar, en una superficie de presentación, por lo menos parte de una traza generada por la acción mutua ortogonal de dichas señales con un medio de escritura o inscripción, de modo que la posición de dicha traza en dicha superficie indica diferentes cantidades de ácido nucléico por unidad de volumen.

52. - El método del punto 4, en el cual la etapa de presentar en una superficie por lo menos parte de una traza generada por la acción mutua ortogonal de dichas señales con un medio de escritura o inscripción incluye las etapas de: amplificar dichas señales en un amplificador; aplicar una primera de dichas señales directamente a los elementos de deflexión de un dispositivo de presentación; diferenciar simultáneamente dicha prime

326044



ra señal para disparar un generador de impulsos destinado a dar una señal de salida cuando la señal diferenciada cruce por un eje de cero; aplicar la señal del generador de impulsos para controlar la intensidad del haz de dicho dispositivo de presentación; y aplicar la otra (segunda) de dichas señales a un elemento de deflexión, ortogonalmente dispuesto, de dicho dispositivo de presentación, proporcionando una presentación que da la medida de la cantidad de ácido nucléico por unidad de volumen, de cada una de dichas células.

62. - El método del punto 1, en el cual la etapa de preparar una muestra celular reforzando la diferencia de absorción de energía radiante entre células de grande y pequeña cantidad de ácido nucléico incluye además la etapa de poner en suspensión la muestra celular, en una solución que tenga un pH próximo a 2.

72. - El método del punto 1, en el que la etapa de preparar una muestra celular reforzando la diferencia de absorción de energía radiante entre células de grande y pequeña cantidad de ácido nucléico incluye además la etapa de poner en suspensión la muestra celular en una solución acuosa isotónica de acetato sódico y ácido acético que tenga un pH próximo a 2.

82. - El método del punto 1, en el cual la etapa de someter dicha muestra a radiaciones incluye las etapas de: introducir las células de dicha muestra en serie en un canal de circulación estrechado que es sometido a las radiaciones de dicha fuente; y someter cada una de las células de dicha muestra, individualmente, a las radiaciones de luz ultravioleta.

326044



92. - El método del punto 8, en el que la etapa de someter cada célula a las reacciones de luz ultravioleta incluye la etapa de someter cada célula a rayos ultravioleta de longitudes de onda que incluyen la de 2537 Å y las de más de 4000 Å.

102. - El método del punto 1, en el que la etapa de medir la pérdida de energía radiante incidente en por lo menos dos longitudes de onda incluye las etapas de: dividir la energía radiante en trayectorias independientes; filtrar la energía radiante recibida por una célula individual al ser sometida a la radiación; y suministrar dicha energía radiante filtrada a unos detectores de luz destinados a dar una señal proporcional a la cantidad de energía radiante incidente.

112. - El método del punto 2, en el que la etapa de proporcionar una salida incluye la de generar un registro permanente de las resultantes de las pérdidas medidas.

122. - Un método para detectar cantidades anormales de ácido nucleico en células biológicas.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintitrés hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid,

17 JUN 1962

P.A.A.

Alberto de Ezaburo

Por

JVL. M. M.



326044

FIG. 1

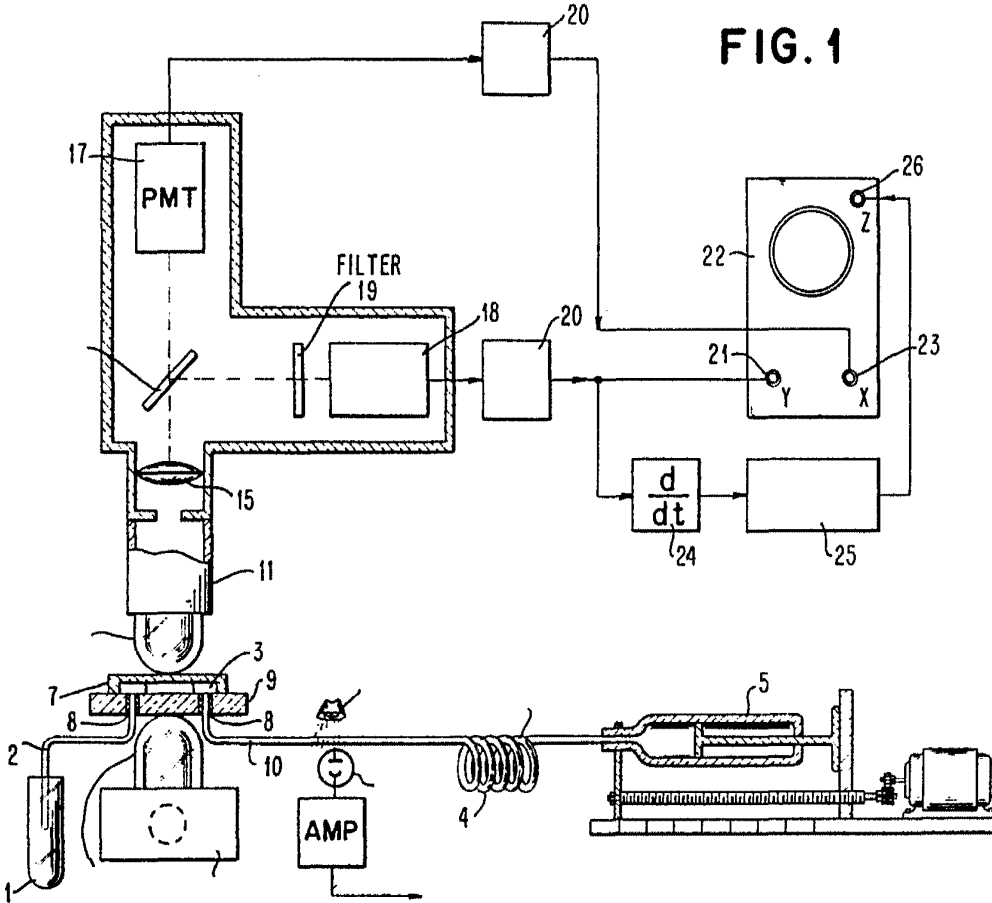
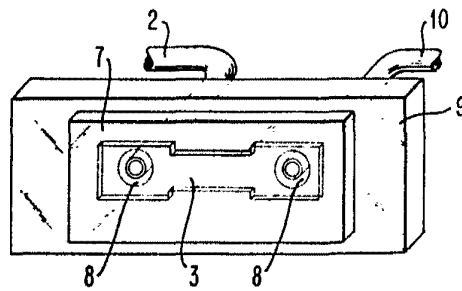


FIG. 2

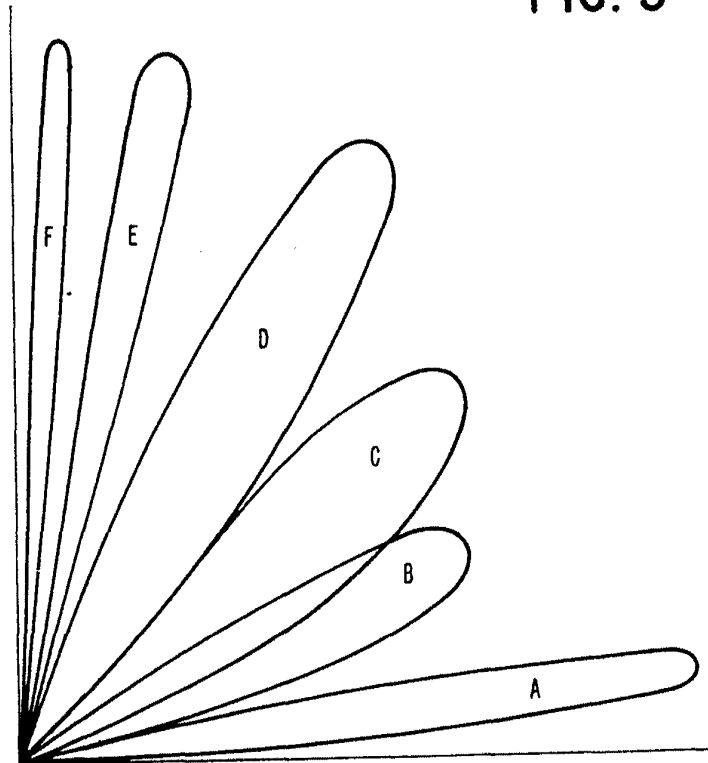


Alberio de Esaburu
For Patent

11 JUN -

326044

FIG. 3



Alberto de Sisti
For Patent