

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/160519 A2

(43) Fecha de publicación internacional
29 de noviembre de 2012 (29.11.2012) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/IB2012/052572

(22) Fecha de presentación internacional:
23 de mayo de 2012 (23.05.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
1209-2011 24 de mayo de 2011 (24.05.2011) CL

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE [CL/CL]; 340, Avenida Libertador Bernardo O'Higgins, Santiago, 8331150 (CL).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
GONZÁLEZ DÍAZ, Hernán [CL/CL]; 340, Avenida Libertador Bernardo O'Higgins, Santiago, 8331150 (CL).
KALERGIS PARRA, Alexis [CL/CL]; 340, Avenida Libertador Bernardo O'Higgins, Santiago, 8331150 (CL).

(74) Mandatario: **CLARKE MODET & CO - CHILE**; 835, Piso 10, Of. 1001, Huérfanos, Santiago, 8320176 (CL).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,

DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre el derecho del solicitante a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

(54) Title: DIAGNOSTIC METHOD FOR DETERMINING THE AGGRESSIVE AND PROGNOSIS OF PAPILLARY THYROID CANCER

(54) Título : MÉTODO DIAGNOSTICO QUE DETERMINA LA AGRESIVIDAD Y PRONOSTICO DEL CÁNCER PAPILAR DE TIROIDES

(57) Abstract: This invention provides a diagnostic method that allows differentiating aggressive forms of PTC from non-aggressive PTC. The method involves the measurement of the CCR3 expression in a thyroid FNA sample obtained from the patient that is under study. CCR3 can be measured by itself or in combination with other markers. The other markers that can be considered to determine prognosis of PTC correspond to the chemokine receptors CCR7 and CXCR4 and other any other available marker. An overexpression of CCR3 in a particular tumor correlates with its aggressive clinical parameters, such as capsule invasion and metastasis. The invention also refers to a kit to determine the prognosis of a PTC, which contains reagents for the detection of CCR3 in a thyroid tissue sample and usage instructions. In another embodiment of the invention a kit is provided to determine the prognosis of PTC, which includes reagents for the detection of PTC and other marker related to PTC. Other markers that can be quantified for the pronostic diagnosis of PTC correspond to the chemokine CCR7, CXCR4 and/or other any other available marker.

(57) Resumen: La presente invención provee un método de diagnóstico que permite diferenciar un CPT benigno de un CPT agresivo en un paciente. El método comprende la medición de la expresión de CCR3 en una muestra de tejido tiroideo obtenida del paciente en estudio. CCR3 puede medirse por si solo o en conjunto con otros marcadores. Otros marcadores que pueden cuantificarse para el diagnóstico de pronóstico de CPT corresponden a los receptores de quimocinas CCR7 y CXCR4 u otro tipo de marcadores distintos de receptores de quimocinas. La cuantificación de CCR3 por si sola o en conjunto con la cuantificación de otros marcadores permite comparar los resultados con los valores estándar de dichos marcadores y así determinar si el tumor analizado corresponde a un tumor de características agresivas o benignas. Específicamente, una sobreexpresión de CCR3 se correlaciona con un tumor con parámetros clínicos de agresividad, tal como invasión de la cápsula y metástasis. La invención también provee se refiere a un kit que permite determinar el pronóstico de un CPT, el cual comprende reactivos que permiten la detección de CCR3 en una muestra de tejido tiroideo e instrucciones de uso. En otra modalidad de la invención, se provee un kit para determinar el pronóstico de CPT, el cual comprende reactivos que permiten la detección de CCR3 y de otros marcadores relacionados al CPT. Otros marcadores que pueden cuantificarse para el diagnóstico de pronóstico de CPT corresponden a los receptores de quimocinas CCR7, CXCR4 y/u otro tipo de marcadores distintos de los receptores de quimocinas.



WO 2012/160519 A2

METODO DIAGNOSTICO QUE DETERMINA LA AGRESIVIDAD Y PRONOSTICO DEL CANCER PAPILAR DE TIROIDES

Campo de la Invención:

La presente invención se refiere a un método molecular para determinar la
5 agresividad del cáncer papilar de tiroides en un individuo que lo padece, lo cual permite
diferenciar pacientes con cáncer papilar de tiroides con características benignas de aquellos
con características agresivas. De esta manera, se puede determinar si el paciente requiere o
no un tratamiento radical y, al mismo tiempo, se evita que pacientes con tumores benignos
sean sometidos a tratamientos no necesarios que son de alto impacto.

10 Antecedentes de la Invención:

El cáncer de tiroides es la neoplasia endocrina más frecuente, siendo el carcinoma
papilar de tiroides (CPT) el subtipo que representa el 75 – 80% de los casos (Sherman, S.I.,
Lancet, 2003. 361(9356): p. 501-11). En los últimos años, el número de casos de CPT ha
aumentado en forma muy significativa, lo cual puede ser explicado en parte por la aparición
15 de mejores técnicas de detección. Sin embargo, numerosos estudios han alertado acerca de
un aumento de la incidencia de cáncer tiroideo en los EEUU (Sherman, 2003 y Jemal, A., et
al., 2004. CA Cancer J Clin, 2004. 54(1): p. 8-29) y en Francia [Leenhardt, L., et al., Eur J
Endocrinol, 2004. 150(2): p. 133-9 y Leenhardt, L et al. Thyroid, 2004. 14(12): p. 1056-60).
En Chile también se ha reportado un aumento progresivo de las tiroidectomías por cáncer
20 de tiroides, llegando a quintuplicarse los casos entre 1992 y 2003 (Fardella, C., et al., Rev
Med Chi, 2005).

Clásicamente, el tratamiento del CPT ha incluido la resección completa de la
tiroides (tiroidectomía total) asociado a la ablación con yodo radioactivo y la supresión
hormonal con levotiroxina. Con este esquema de manejo la supervivencia puede llegar a 85-
25 90% a 20 años (Sherman, 2003). A pesar de la evolución generalmente benigna del CPT,
existe un subgrupo de pacientes que presenta una forma de CPT más agresiva que hace

necesario un tratamiento más radical. Dicho tipo de cáncer de tiroides, normalmente es detectado luego de la cirugía de tiroides al hacer un análisis clínico del tumor. Los parámetros que se miden clínicamente para determinar la agresividad de un CPT corresponden al tipo histológico, el tamaño del tumor, la presencia de multifocalidad, compromiso de márgenes quirúrgicos, invasión al tejido peritiroideo e invasión linfo-vascular. En relación a la invasión linfo-vascular, se conoce que la presencia de metástasis linfáticas por CPT se asocia a mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad (20 – 30%), lo que a su vez implica mayor riesgo de metástasis a distancia y mortalidad a mediano plazo. Por este motivo, en presencia de metástasis linfáticas clínicamente evidentes, resulta necesario realizar una disección ganglionar cervical para remover todos los nódulos linfáticos comprometidos, lo cual constituye una cirugía de gran envergadura y potencialmente mórbida. Por otra parte, la recurrencia cervical del cáncer papilar de tiroides es de gran relevancia dado que la re-exploración quirúrgica tiene alto impacto para los pacientes, tanto física, por su morbilidad quirúrgica (Kupferman, M.E., et al., Laryngoscope, 2002. 112(7 Pt 1): p. 1209-12; Kim, M.K., et al., Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. 130(10): p. 1214-6), como psicológica por lo que implica la persistencia de una enfermedad rebelde al tratamiento (Esnaola, N.F., et al., Surgery, 2001. 130(6): p. 921-30). Dado que el CPT es una patología de alta prevalencia en nuestra población, resulta fundamental contar con métodos de evaluación que permitan identificar, antes de ser sometidos a una terapia definitiva, a este subgrupo de pacientes que presentan una forma más agresiva de la enfermedad, de manera de optimizar su manejo y tratamiento, y al mismo tiempo evitar que pacientes de bajo riesgo sean sometidos a tratamientos innecesarios y de tan alto impacto.

La identificación de pacientes con CPT que presentan tumores agresivos con riesgo de metástasis linfáticas, tradicionalmente se ha llevado a cabo analizando factores clínicos patológicos del tumor, tales como tipo histológico, tamaño tumoral, multifocalidad, invasión a tejido peritiroideo, invasión linfo-vascular y compromiso de márgenes quirúrgicos. Para el examen de varios de estos factores se hace necesaria una cirugía. Sin embargo, factores

moleculares, tales como la presencia de biomarcadores en muestras de tejido de tumor tiroideo pueden entregar información de pronóstico más objetiva al patólogo y al médico tratante. Además, un análisis de ese tipo no requiere de una cirugía, sino que puede ser realizado en una muestra de tejido tiroideo obtenida de una biopsia con aguja. Dicho
5 procedimiento se lleva a cabo con una aguja muy delgada que se introduce dentro de la tiroides y se extrae una muestra de células y líquido de esta glándula por aspiración.

En la literatura se han divulgado algunos marcadores que podrían ser útiles para detectar CPT agresivos con metástasis en los nódulos linfáticos, sin embargo, en la actualidad no se cuenta con marcadores eficientes, en cuanto a confiabilidad y costo. Los
10 marcadores divulgados en la literatura corresponden a BRAF con mutación T1796A (US2008241132), expresión aumentada de algunas proteínas entre las que se encuentran LIMD2, PTPRC, LTB, CD48 y ABCC3 (US2009068171 y WO2008130887) y los receptores de quimokinas CCR7 (Sancho et al. 2006. J. Endocrinol. 191:229-238) y CXCR4 (Yasouka et al. 2008. BMC Cancer 8:274; Wagner et al. 2008. Ann. Surg. Oncol. 15 (S2): abstract 32).

El cáncer papilar de tiroides posee la característica de ser altamente eficiente y selectivo para dar metástasis hacia los linfonodos. Esto sugiere la participación de un mecanismo de quimo-atracción celular mediado por sustancias liberadas desde los linfonodos, tal como quimokinas. Las quimokinas (también llamadas quimoquinas o quimosinas), mediadas por la activación de sus receptores específicos (receptores de
20 quimokinas), entre sus múltiples funciones tienen la propiedad de dirigir células a destinos específicos como los linfonodos. Por otra parte, la sobre-expresión de receptores de quimokinas ha sido descrita en distintas neoplasias incluyendo el cáncer de mama y melanoma, entre otros. Entonces, el fenotipo metastático del cáncer papilar de tiroides podría ser, en parte, inducido por la adquisición de estos receptores de quimokinas durante
25 el proceso de transformación maligna. Debido a esto, consideramos que ciertas quimokinas y/o sus receptores, tienen el potencial de ser efectivas como marcadores de agresividad en CPT. Sin embargo, los patrones de expresión de los receptores de quimokinas suelen ser

específicos para distintos tejidos y, entonces, no es posible predecir o suponer cual es el patrón normal de expresión en un tejido particular y qué tipo de alteraciones en dicho patrón, si es que las hay, pueden encontrarse en el caso del desarrollo de un cáncer agresivo. Por lo tanto, nuestro trabajo consistió en el estudio de la expresión de receptores de quimokinas en el cáncer papilar de tiroides con el objetivo, primero, de identificar y definir el perfil de expresión de un grupo amplio de receptores de quimiokinas y, luego, determinar cuál o cuáles de ellos podría ser apropiado como marcador de agresividad en el CPT. Los receptores de quimokinas seleccionados para el estudio llevado a cabo por nuestro grupo son: CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7 y CXCR4.

Al estudiar la expresión de distintos receptores de quimokinas en pacientes con CPT que presentan o no presentan parámetros clínicos de agresividad, hemos determinado que la expresión de los receptores CCR3, CCR7 y CXCR4 se encuentra aumentada en pacientes con CPT; y dentro de ese grupo de pacientes la expresión de CCR3 es más alta en aquellos que presentan parámetros clínicos de agresividad. Si bien, CCR7 y CXCR4 ya han sido mencionados en la literatura como posibles marcadores de agresividad en distintos tipos de tumores, de nuestro conocimiento, CCR3 nunca ha sido propuesto como marcador de agresividad en cáncer de tiroides u otro tipo de cáncer. El aumento de su expresión correlacionado con la agresividad del CPT es una observación novedosa que permite proponer el uso de CCR3 como marcador para la detección de tumores agresivos en pacientes con CPT. Este marcador, al diferenciar los tumores de CPT agresivos de los benignos, hace posible evitar un tratamiento de gran impacto en pacientes que no lo requieren. CCR3 puede ser usado por sí solo como marcador de agresividad del CPT o, también, puede utilizarse en combinación con otros marcadores moleculares.

Resumen de la Invención:

La presente invención provee un método de diagnóstico que permite diferenciar un CPT benigno de un CPT agresivo en un paciente. El método comprende la medición de la expresión de CCR3 en una muestra de tejido tiroideo obtenida del paciente en estudio.

CCR3 puede medirse por sí solo o en conjunto con otros marcadores. Otros marcadores que pueden cuantificarse para el diagnóstico de pronóstico de CPT corresponden a los receptores de quimokinas CCR7 y CXCR4 u otro tipo de marcadores distinto de receptores de quimokinas. La cuantificación de CCR3 por sí sola o en conjunto con la cuantificación de otros marcadores permite comparar los resultados con los valores estándar de dichos marcadores y así determinar si el tumor analizado corresponde a un tumor de características agresivas o benignas. Específicamente, una sobreexpresión de CCR3 se correlaciona con un tumor con parámetros clínicos de agresividad, tal como invasión de la cápsula y metástasis.

La invención también se refiere a un kit que permite determinar el pronóstico de un CPT, el cual comprende reactivos que permiten la detección de CCR3 en una muestra de tejido tiroideo e instrucciones de uso. En otra modalidad de la invención, se provee un kit para determinar el pronóstico de CPT, el cual comprende reactivos que permiten la detección de CCR3 y de otros marcadores relacionados al CPT. Otros marcadores que pueden cuantificarse para el diagnóstico de pronóstico de CPT corresponden a los receptores de quimokinas CCR7, CXCR4 y/u otro tipo de marcadores distintos de los receptores de quimokinas.

La abundancia del marcador CCR3 por sí sólo o en conjunto con otros marcadores en la muestra de tejido tiroideo puede llevarse a cabo utilizando técnicas como inmunohistoquímica, PCR semicuantitativo, PCR cuantitativo (PCR de tiempo real), ELISA, western blot, una combinación de las anteriores u otras técnicas apropiadas.

Descripción de las Figuras:

Figura 1. Inmunohistoquímica para CCR3. La figura muestra microfotografías representativas de la inmunohistoquímica realizada en 29 muestras de pacientes con CPT. Se muestra la expresión de CCR3 en tejido normal y proveniente de tumor y para cada uno de ellos se muestra el control de especificidad con sólo el anticuerpo secundario.

Figura 2. Análisis de la expresión del receptor CCR3 en muestras de CPT. La figura muestra la expresión relativa del receptor CCR3 (n=29) en muestras de tejido de CPT (tumor, barra negra) en relación a su tejido control (normal, barra blanca). * $P < 0.001$ Análisis estadístico Wilcoxon signed-rank test.

- 5 **Figura 3. Inmunohistoquímica para CXCR4.** La figura de la izquierda muestra las microfotografías representativas de la inmunohistoquímica realizada en 29 muestras de pacientes con CPT. Se muestra la expresión de CXCR4 en tejido normal y proveniente de una biopsia de tumor, para cada uno de ellos se muestra el control de especificidad con sólo el anticuerpo secundario. El gráfico de la derecha muestra la expresión relativa del
- 10 receptor CXCR4 (n=29) en muestras de tejido de CPT (tumor, barra negra) en relación a su tejido control (normal, barra blanca). * $P < 0.001$ Análisis estadístico Wilcoxon signed-rank test.

- Figura 4. Correlación de la expresión del receptor CCR3 con parámetros clínicos de agresividad tumoral.** La figura muestra la expresión relativa del receptor CCR3 (n=29) en
- 15 muestras de tejido de CPT. A, con y sin invasión a la cápsula; B, con y sin invasión al tejido adiposo; C, con y sin resección completa del tumor; D, con y sin invasión vascular y E, con y sin metástasis linfáticas.

- Figura 5. Estandarización de primers para β -actina y CCR3.** La figura muestra una fotografía del gel obtenido para los productos de PCR de CCR3 y β -actina en muestras de
- 20 tejido normal (N) y tumoral (T). El control positivo corresponde al ADNc de células TPC1 y el control negativo (-) corresponde a una muestra sin templado.

- Figura 6. Curvas de amplificación representativas de PCR en tiempo real.** Se observan las curvas de amplificación de los receptores CCR3, CCR7 y CXCR4, para un grupo de muestras de tiroides controles y procedentes de tumores. En todos los casos el
- 25 control positivo corresponde a ADNc de células TPC-1 y el control negativo corresponde a una muestra sin templado donde no se obtuvo amplificado.

Figura 7. Análisis de PCR en tiempo real para los receptores de quimiokinas. En la figura se muestra el análisis mediante $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando como gen de referencia 18S, en la expresión de los receptores CCR3, CXCR4 y CCR7 en las muestras tumorales comparadas con las muestras controles.

5 Descripción detallada de la invención:

La presente invención describe un método de diagnóstico que permite diferenciar un CPT benigno de un CPT agresivo en un paciente, el cual se basa en la medición de la expresión de receptores de quimokinas en una muestra de tejido tiroideo del paciente. En una modalidad preferida, el método comprende la medición de la expresión de CCR3 en una muestra de tejido tiroideo obtenida del paciente en estudio. CCR3 puede medirse por sí solo o en conjunto con otros marcadores.

La abundancia del marcador CCR3 por si sólo o en conjunto con otro marcadores en la muestra de tejido tiroideo puede llevarse a cabo utilizando técnicas como inmunohistoquímica, PCR semicuantitativo, PCR cuantitativo (PCR de tiempo real), ELISA, western blot, una combinación de las anteriores u otras técnicas apropiadas. En los kits propuestos para la medición de estos receptores se incluirán los reactivos necesarios para ello. En el caso del kit que se basa en inmunohistoquímica, este comprenderá el anticuerpo anti-CCR3 y opcionalmente, los anticuerpos seleccionados del grupo compuesto por los anticuerpos anti-CCR4, anti-CCR5, anti-CCR6, anti-CCR7 y/o anti-CXCR4. Además, el kit incluiría los anticuerpos secundarios apropiados. En el caso de un kit para PCR, este comprendería los partidores apropiados para CCR3 y opcionalmente comprendería partidores para la amplificación de CCR4, CCR5, CCR6, CCR7 y/o CXCR4. En ambos tipos de kits se pueden incluir todos los reactivos adicionales necesarios para el análisis de las muestras y un instructivo que indique los pasos a seguir. Los reactivos utilizados para este tipo de análisis se encuentran indicados en detalle en los ejemplos de la presente invención.

Un ejemplo de kit para inmunohistoquímica corresponde a uno que comprende un agente de bloqueo para disminuir la unión inespecífica del anticuerpo primario. Las

soluciones de bloqueo que se incluyen se escogen entre Dako, Perkin Elmer, etc. Además, en el caso de inmunohistoquímica directa, se incluye los anticuerpos necesarios, tales como α -CCR3, α -CCR7 y α -CXCR4, los cuales se encuentran marcados ya sea con alguna enzima, fluorocromos, oro coloidal u otros. Si los anticuerpos están marcados con biotina, se incluye el reactivo de amplificación DAB. En el caso de un kit para inmunohistoquímica indirecta, se incluyen anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios. Los anticuerpos primarios comprenden α -CCR3, α -CCR7 y α -CXCR4, pudiéndose incluir otros que se consideren apropiados. Los anticuerpos secundarios pueden ser monoclonales o policlonales correspondientes para los anticuerpos primarios incluidos en el kit. Los anticuerpos secundarios se encuentran marcados ya sea con alguna enzima, fluorocromos, oro coloidal u otros. Si los anticuerpos están marcados con biotina, se incluye el reactivo de amplificación DAB. El componente esencial del kit es el anticuerpo anti-CCR3 y las instrucciones de uso. Los demás componentes pueden incluirse dependiendo de la técnica de inmunohistoquímica para la cual se destina el kit.

Un kit de detección de CCR3 por medio de RT-PCR comprende los siguientes componentes: los partidores específicos para CCR3, que pueden ser los indicados en la tabla 3 u otros obtenidos de la literatura o diseñados por medio de un software de diseño de partidores; enzimas necesarias para la reacción en cadena de la polimerasa, donde dichas enzimas corresponden a una transcriptasa reversa, una DNA polimerasa (Taq polimerasa); agua libre de nucleasas y buffers para PCR. Se incluye un manual de instrucciones de uso para llevar a cabo la detección de CCR3 por medio del kit. En el caso de QPCR (PCR en tiempo real) se puede incluir un master mix.

Las quimiokinas son una familia de proteínas pequeñas (~8-14 kDa), inducibles, secretadas y proinflamatorias, que actúan como quimioatrayente para la migración celular. Entre las diversas funciones que tienen, ellas participan en procesos de la respuesta inmune, como la atracción de linfocitos hacia los nódulos linfáticos o zonas de infección. Actúan primordialmente induciendo reordenamiento del citoesqueleto, adhesión firme a

células endoteliales y migración celular dirigida. Hasta ahora se han descrito más de 50 tipos de quimiokinas y se clasifican en subgrupos altamente conservados – CXC, CC, C y CX3C – basado en la posición de los dos primeros residuos de cisteína adyacente al N-terminal. Por otra parte, se han identificado 18 receptores de quimiokinas humanas, los que
5 presentan siete dominios transmembrana formando parte de un subgrupo de receptores acoplados a proteína G. Los receptores de quimokinas se dividen en grupos dependiendo del tipo de quimiokina al que se unen; es así que los receptores CCR se unen a quimiokinas CC, los receptores CXCR se unen a quimiokinas CXC, y los CX3CR1 se unen a la única quimiocina CX3C (CX3CL1).

10 Desde el punto de vista de la inflamación, el tipo leucocito que infiltra un tejido se correlaciona con su patrón de expresión de receptores de quimiokinas y las concentraciones relativas de los respectivos ligandos presentes en un tejido determinado. La gradiente de quimiokinas que atrae células que infiltran es generada por las diversas células de un tejido particular. Aunque originalmente fueron identificados en leucocitos, los receptores de
15 quimiokinas funcionales también se han encontrado en células endoteliales y algunas células epiteliales, particularmente aquellas que han sufrido transformación maligna. La influencia de las quimiokinas en el potencial metastático y diseminación sitio-específica de células tumorales ha cobrado gran interés en el estudio de receptores de quimiokinas y cáncer. En relación a esto, estudios recientes han demostrado la expresión de receptores de
20 quimiokinas en múltiples neoplasias incluyendo el cáncer de mama, melanoma maligno , cáncer de pulmón y cáncer epidermoide de cabeza y cuello entre otros. Además, específicamente en el cáncer de mama, se ha observado que células tumorales expresan un patrón de receptores de quimiokinas que tienen afinidad por las quimiokinas expresadas en órganos a los cuales frecuentemente dan metástasis (Muller, A., et al.. Nature, 2001.
25 410(6824): p. 50-6). En ese estudio se encontró alta expresión de los receptores de quimiokinas CXCR4 y CCR7 en líneas celulares y biopsias de cáncer de mama, lo cual es consistente con los niveles elevados de sus respectivos ligandos – CXCL12 y CXCL21- en

los sitios en que frecuentemente da metástasis (linfonodos, pulmón e hígado). Más aún, el bloqueo de CXCR4 inhibió la metástasis de células de cáncer de mama en un modelo experimental animal.

Aparte de la destinación celular, las quimiokinas inducen variados procesos que favorecen la iniciación y consolidación de la metástasis incluyendo la regulación de la angiogénesis, la activación de metaloproteasas, activación de la proliferación, y la inhibición de la apoptosis. Por ejemplo, se ha demostrado que la activación del receptor de quimokina CXCR4 estimula la migración de células tumorales y aumenta su invasión a través de una matriz extracelular recompuesta (Matrigel) y monocapas de células endoteliales (Balkwill, F., Semin Cancer Biol, 2004. 14(3): p. 171-9; Koshiba, T., et al., Clin Cancer Res, 2000. 6(9): p. 3530-5). Por otra parte, en numerosos tipos de cáncer, incluyendo el glioma, el melanoma, ovario y riñón, la quimokina CXCL12 promueve la proliferación y supervivencia de células mantenidas en condiciones sub-óptimas, como es el cultivo celular en bajas concentraciones de suero en el medio (Scotton, C.J., et al., Cancer Res, 2002. 62(20): p. 5930-8; Zhou, Y., et al., J Biol Chem, 2002. 277(51): p. 49481-7). Esta adaptación a condiciones adversas inducidas por quimiokinas permitiría que células tumorales crezcan en sitios distantes que en otras condiciones les serían desfavorables. Así, la evidencia acumulada, tanto clínica como experimental, apoya la importancia de los receptores de quimiokinas en el proceso metastático. Sin embargo, los patrones de expresión de los receptores de quimiokinas suelen ser específicos para distintos tejidos y, entonces, no es posible predecir o suponer cual es el patrón normal de expresión en un tejido particular y qué tipo de alteraciones en dicho patrón, si es que las hay, pueden encontrarse en el caso del desarrollo de un cáncer agresivo. En nuestro desarrollo, enfocamos el análisis en la expresión de receptores de quimiokinas CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7 y CXCR4.

Ejemplo 1: Obtención de muestras de tejido tiroideo

Las muestras de tejido tiroideo, tanto normal como de cáncer papilar, fueron obtenidas de pacientes operados sometidos a tiroidectomía total por CPT. La cirugía de extracción se realizó previo consentimiento expreso de los pacientes. Los tejidos analizados durante este trabajo fueron los siguientes: Epitelio tiroideo normal y CPT, ambos tejidos fueron extraídos del mismo paciente.

Las muestras de tejido fueron transportadas en PBS frío desde el pabellón del hospital clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile al Laboratorio de Inmunología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. El tejido fue limpiado de restos de tejido adiposo y se dividió en dos partes (dependiendo del tamaño de la muestra) cada sección con un diámetro mínimo de 0,4 cm. Una parte del tejido se guardó a 4°C en RNA later, para posteriormente extraer ARNm para ser analizado por RT-PCR en tiempo real y una segunda parte se fijó en paraformaldehído para ser analizado el tejido por inmunohistoquímica.

15

Tabla 1. Características de los pacientes analizados por medio de inmunohistoquímica.

Característica		Pacientes (IHC) n
Edad	<45 años	16 (53,3%)
	>45 años	14 (46,7%)
Sexo	Masculino	6 (20%)
	Femenino	24 (80%)
Tamaño del tumor	<1,5 cm	11 (36,7%)
	>1,5 cm	19 (63,3%)
Focalidad	Unifocal	13
	Multifocal	16
Resección completa del tumor	si	16
	no	13
Extensión extratiroidea	si	8 (26,7%)
	no	22 (73,3%)
Invasión vascular	si	10 (33,3%)
	no	20 (66,7%)
Metástasis linfática	si	15 (50%)
	no	15 (50%)

Ejemplo 2: Detección de receptores de quimokinas en muestras de tejido tiroideo utilizando inmunohistoquímica

a) Procesamiento de muestras.

El tejido fresco que se seleccionó para ser analizado por inmunohistoquímica se fijó
5 en paraformaldehído al 3% en TBS por 18 horas a 4°C. Los tejidos se deshidrataron usando una batería de alcoholes.

Brevemente, los tejidos fueron sumergidos en etanol al 70% tres veces por 20 min; luego en etanol al 95% tres veces por 20 min; después en etanol al 100% tres veces por 20 min; y finalmente los tejidos se sumergen en Xilol/Etanol (1:2) por 30 min, luego en
10 Xilol/Etanol (1:1) por 30 min, Xilol/Etanol (2:1) por 30 min, Xilol 100% tres veces por 30 min, Xilol/parafina una vez por 1 hr. (56°C), luego los cortes se dejan en parafina al 100% toda la noche a 56°C y se realizan cambios a parafina 100% por 1 hr (56-60°C). Los tejidos en parafina líquida son traspasados a placas Lewkart para la formación de los tacos. Una vez fría la parafina, ésta se solidifica y los cortes quedan embebidos dentro de ésta. Los tacos
15 se usan para cortar los tejidos en el micrótopo (Leica, RM2235). Se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor que fueron depositados en portaobjetos silanizados (Marienfeld) guardados a 4°C hasta su utilización. Previamente a la inmunohistoquímica los cortes deben ser desparafinados y rehidratados. Las muestras se sumergieron en xilol al 100% dos veces por 10 min; luego en etanol 100% dos veces por 10 min; etanol 95% dos veces por 2 min; etanol
20 70% dos veces por 2 min; y finalmente se rehidrataron en agua destilada por 5 min y TBS por 5 min. Para recuperar los epítomos perdidos de los antígenos debido al paso por parafina, los cortes rehidratados se sumergieron en buffer AC (buffer ácido cítrico) pH 6 (41 mL citrato de sodio 10mM, 9 mL ácido cítrico 0.1M, 450 mL H₂O destilada) por 10 min a máxima potencia en un horno microondas. Luego se enfrió a temperatura ambiente con
25 buffer AC frío y se lavó tres veces con H₂O destilada. Posteriormente se procedió a bloquear la actividad peroxidásica endógena con H₂O₂ al 3% en TBS por 15 min y se lavó tres veces con TBS por 5 min. Los cortes de tejido fueron bloqueados para disminuir la unión

inespecífica del anticuerpo primario: El bloqueo consistió en incubar los cortes en solución de bloqueo (Dako, n° catálogo X0909) 1 hora a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario se realizó en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C.. Los anticuerpos primarios que se utilizaron en la inmunohistoquímica fueron: α -CCR3 monoclonal de rata (1:1000, RyD Systems, MAB155), α -CCR7 monoclonal humano (1:250, RyD Systems) y α -CXCR4 monoclonal humano (1:250, RyD Systems, MAB173). Posteriormente, los cortes fueron lavados tres veces con TBS-T por 5 minutos. Luego a los cortes se les agregó el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes fueron lavados tres veces con TBS-T por 5 minutos y a continuación los cortes dese incubaron con ABC por 45 minutos. Se lavaron los cortes tres veces con TBS-T por 5 minutos. El revelado se llevó a cabo en una caja oscura utilizando el reactivo de amplificación DAB (SIGMA, número de catálogo D5905). La incubación con DAB puede demorar entre 30 segundos a 20 min. Posteriormente se detuvo el revelado lavando los cortes con agua destilada. Para identificar los núcleos celulares en las muestras, se tiñó con hematoxilina durante 2 segundos y se lavó con agua potable. Finalmente, los cortes fueron deshidratados (etanol 70% dos veces cada vez por 3 minutos; etanol 95% dos veces cada vez por 3 minutos; etanol 100% dos veces cada vez por 3 minutos; xilol 100% dos veces por 3 minutos) y se montaron con entellán. Una vez secado el medio de montaje, las muestras se observaron en microscopio (OLYMPUS BX4) y se tomaron 4 fotos de cada tejido (control y tumor) de cada paciente, usando una cámara Infinity 2 acoplada al microscopio; las condiciones bajo las que se tomaron las fotografías, tiempo de exposición, apertura del diafragma y temperatura de la lámpara fueron ajustadas y guardadas, de manera tal que todas las fotografías se tomaron en las mismas condiciones.

El análisis de la inmunohistoquímica se realizó usando el programa Image – pro plus versión 6.0 (Media Cybernetic Inc.). Este software permite contar los núcleos con o sin marca café. De esta forma, es posible identificar cualitativamente la marca de cada imagen y

ésta se normaliza por el número de núcleos observados, obteniéndose así el un porcentaje de células marcadas.

b) Resultados de expresión de receptores de quimokinas en tejido tiroideo de acuerdo al análisis inmunohistoquímico

5 Los resultados del análisis por inmunohistoquímica de tejidos de pacientes con CPT muestran que los receptores CCR4, CCR5 y CCR6 no tienen diferencias significativas de expresión entre las muestras de tiroides normal y de tejido tumoral. Por otra parte, los receptores CCR3, CCR7 y CXCR4 se encuentran sobreexpresados en las muestras de tejido tumoral con respecto al epitelio tiroideo normal (tabla 2) (Figs. 1y 2). CCR3 se encuentra sobreexpresado en el 100% de los pacientes con CPT estudiados, mientras que CCR7 se encuentra sobreexpresado en un 60% de los pacientes estudiados y CXCR4 en un 80% de los pacientes. Los resultados obtenidos con CCR7 y CXCR4 confirman los ya descritos en la literatura respecto de un aumento en su expresión en el CPT. Sin embargo, sorprenden los datos obtenidos con CCR3 que muestran que el 100% de los pacientes con CPT tienen una expresión aumentada en el tejido tumoral. Esto hace a CCR3 un excelente marcador para diferenciar tejido normal de tejido tumoral en cáncer de tiroides.

Tabla 2. Resultados de marcación de receptores de quimokinas por inmunohistoquímica en muestras de pacientes con CPT.

RECEPTOR	Nº Pacientes	% Positivos	Intensidad
CCR3	30	100	++++
CCR4	8	<10	-
CCR5	8	<10	-
CCR6	8	<10	-
CCR7	30	60	++
CXCR4	30	80	+++

Ejemplo 3: Correlación entre parámetros clínicos de agresividad y expresión del receptor de quimokinas CCR3

Para poder determinar la relevancia de la sobreexpresión del receptor CCR3 en el tejido tumoral, realizamos una correlación entre los parámetros clínicos que sugieren la agresividad y progresión de la enfermedad y los niveles de expresión de del receptor. Entre los parámetros clínicos seleccionados se encuentran: la invasión de la cápsula, la invasión al tejido adiposo y la presencia o ausencia de borde del tumor (resección completa del tumor), parámetros sugerentes de que las células tumorales son capaces de invadir en forma local los tejidos adyacentes a la tiroides. Además, se analizaron parámetros que sugieren que las células tiene la capacidad de diseminarse en tejidos distantes como: la invasión vascular y la metástasis a los nódulos linfáticos. El análisis de estos parámetros indica que el receptor CCR3 aumenta en aquellos tumores que presentan parámetros de mayor agresividad (Fig. 3A y 3E). Se observa un patrón similar con el receptor CXCR4, lo cual confirma resultados previos, ya publicados por nuestro grupo. Sin embargo, en el análisis de los otros receptores de quimokinas no se encontró ninguna relación entre su nivel de expresión y los parámetros clínicos de agresividad. La observación respecto de la relación entre el aumento de expresión de CCR3 y una mayor agresividad del tumor, es novedosa y no podría haberse deducido de manera obvia a partir de la literatura disponible.

Ejemplo 4: Extracción de RNA y RT-PCR en tiempo real de biopsias de pacientes con cáncer papilar de tiroides.

a) Extracción de ARN total y obtención del ADNc

Con el fin de evaluar el segundo objetivo específico de este proyecto, se realizó la extracción de ARN total de 19 muestras de tejido tiroideo obtenidas de pacientes con CPT sometidos a tiroidectomía. La biopsia del lóbulo de la tiroides que presentaba el tumor se consideró tejido con CPT y la biopsia del lóbulo contralateral se consideró como tejido

control. La obtención del ARN se realizó utilizando el kit comercial RNeasy Plus mini, siguiendo las instrucciones del fabricante.

A partir de 1 µg del ARN obtenido se preparó el ADN complementario (ADNc). Se agregó 1 µL de random primers (1 µg/1 µL), y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 5 µL, se llevó a 70°C por 5 minutos en termociclador (PCR Sprint Thermal Cycler, de Thermo Electron Corporation). Se preparó un mix que contenía: 4 µL de Improm II 5x (Buffer de reacción), 1,2 µL MgCl₂ (1,5 mM), 1 µL dNTPs mix (0,5 mM), 0,5 µL Inhibidor de RNasa, 1 µL Improm II RT 0,25 unidades (enzima Transcriptasa Reversa), 7,3 µL de agua libre de nucleasas. Se utilizó ARNm de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como control positivo. Las muestras se incubaron a 25 °C por 5 minutos y a 42 °C por 1 hora. El producto se guardó a – 20 °C.

b) Amplificaciones de transcritos mediante RT-PCR

Para estandarizar la técnica, se amplificó los transcritos específicos de CCR3 y CXCR3 con el ADNc obtenido con Taq polimerasa. En cada reacción se preparó un mix, el cual contenía 2,5 µL de tampón de reacción de PCR 10X, 1,25 µL de mezcla de partidores 10 µM cada uno (tabla 1, las secuencias de los partidores para CCR3 CCR7 y CXCR4 se obtuvieron de la literatura. Los partidores para 18S y β-actina fueron diseñados utilizando el software AmplifX.), 0,5 µL de MgCl₂ 1,5 mM, 0,5 µL mezcla de dNTPs 0,2 mM y 1 µL de Taq polimerasa. En la reacción de amplificación se utilizó 2µL de ADNc por cada reacción y se le agregó agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 µL. En cada reacción se incluyó un control positivo, que corresponde a ADNc de TPC-I o ADNc de PBMC, y un control sin templado que corresponde al mix de reacción más agua libre de nucleasas en lugar de ADNc. Todas las reacciones de PCR se realizaron usando un ciclo de denaturación a 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos de amplificación (denaturación a 95 °C por 20 segundos, temperatura de alineamiento correspondiente a los partidores por 20 segundos y extensión a 72 °C por 20 segundos) y un ciclo de extensión final a 72°C por 5 minutos, en el termociclador (PCR Sprint Thermal Cycler, de Thermo Electron Corporation).

Tabla 3. Partidores utilizados para PCR en tiempo real.

Gen blanco	Secuencia (5' 3')	Producto (pb)	Marca
CCR3	S:AAAGCTGATACCAGAGCACTGATG A:GTCATAATTCCGAGCCTCCTGTA	131	Invitrogen
18S	S:CGGTACAGTGAAACTGCGAAT A:TCTGATAAATGCACGCATCC	154	IDT
β -Actina	S:CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT A:AGCACTGTGTTGGCGTACAG	140	Invitrogen

5 c) Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar el resultado de los productos del PCR se prepararon geles de agarosa 2% (Invitrogen) en tampón TBE pH 8.3 (Promega). Los productos de PCR se mezclaron con el volumen requerido de tampón Blue II (6x) antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis de agarosa BioJSP, a una diferencia de potencial constante de 150 V, usando una fuente de poder Bio-Rad (modelo 200/2.0). El gel fue teñido con una solución de SYBR safe DNA (Invitrogen) y las bandas correspondientes a los productos se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV (Vilber Lourmat).

Utilizando el método antes descrito se logró aislar exitosamente el RNAm de las muestras de pacientes y a su vez se obtuvo el ADNc para realizar el RT-PCR en tiempo real. En la fig. 1.5 se observa que en el PCR de las muestras de pacientes se obtiene un producto único de amplificación para los transcritos de nuestros genes de interés. Además, se obtiene un producto del tamaño esperado para cada gen analizado (tabla 2).

d) PCR en tiempo real (QPCR)

Para el PCR en tiempo real se preparó una mezcla con volumen final de 20 μ l con SYBR-Green QPCR Master Mix, para lo cual se tomaron 2 μ L de cDNA y fueron puestos en 18 μ l de mezcla de reacción de PCR, que contiene 10 μ l de Master Mix, 0,2 μ L de cada primer (sense y antisense) (100 nM de cada uno) y 7,6 μ L de agua libre de nucleasas. La reacción de PCR se inició con 10 min de denaturación a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C

de denaturación por 20 seg, 58°C de annealing por 20 seg y 72°C de extensión por 20 seg. La detección de la fluorescencia se realizó al final de cada ciclo. La curva de disociación se realizó por un ciclo de 95°C por un min, y un incremento de temperatura desde 60°C a 95°C por 0,6 seg cada temperatura. La estandarización del QPCR muestra un producto único en la

5 curva de disociación y una amplificación aproximadamente entre los ciclos 18 y 38, dependiendo del gen en estudio (Fig. 1.5).

Para poder determinar los umbrales de ciclos (CT) de cada amplificado, se realizó una curva estándar con diluciones seriadas conocidas y se analizaron los datos mediante el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$, con lo cual se comparó la expresión de nuestros genes de interés en

10 los tejidos control y tumor en relación al gen de referencia 18S (Fig. 1.6). Los resultados obtenidos del análisis del QPCR para los receptores de quimiokinas estudiados en 19 muestras de pacientes mostraron un aumento significativo del RNA en el tejido proveniente de CPT, en relación al tejido control del paciente.

PLIEGO DE REIVINDICACIONES

1. Uso de la medición de expresión de receptores de quimokina para determinar el pronóstico de un cáncer papilar de tiroides CARACTERIZADO porque comprende cuantificar, en una muestra de tejido tumoral de un paciente, la expresión del receptor de quimokina CCR3 y donde la sobreexpresión de CCR3 respecto de un valor de referencia indica que el tumor tiene características agresivas.
2. Método *in vitro* para determinar pronóstico de un cáncer papilar de tiroides, CARACTERIZADO porque comprende cuantificar, en una muestra de tejido tumoral de un paciente, la expresión del receptor de quimokina CCR3 y donde la sobreexpresión de CCR3 respecto de un valor de referencia indica que el tumor tiene características agresivas.
3. Método de acuerdo a la reivindicación 2 CARACTERIZADO porque la muestra de tejido tumoral corresponde a una biopsia con aguja o biopsia de la pieza quirúrgica.
4. Método de acuerdo a la reivindicación 2 CARACTERIZADO porque la expresión de CCR3 se cuantifica utilizando técnicas seleccionadas de inmunohistoquímica, PCR semicuantitativo y/o PCR cuantitativo (de tiempo real).
5. Método de acuerdo a la reivindicación 2 CARACTERIZADO porque, además de cuantificar la expresión de CCR3, se cuantifica la expresión de otros receptores de quimokinas y/o de otras moléculas marcadoras de pronosis de cáncer de tiroides.
6. Método de acuerdo a la reivindicación 5 CARACTERIZADO porque los receptores de quimokinas adicionales cuantificados se seleccionan del grupo compuesto por CXCR4 y CCR7.
7. Kit para determinar pronóstico de cáncer papilar de tiroides CARACTERIZADO porque comprende reactivos e instrucciones de uso para cuantificar los niveles de expresión de CCR3 en una muestra de tejido tiroideo.

8. Kit para determinar pronóstico de cáncer papilar de tiroides de acuerdo a la reivindicación 7 CARACTERIZADO porque los reactivos incluidos que permiten cuantificar los niveles de expresión de CCR3 son aquellos apropiados para inmunohistoquímica, PCR semicuantitativo y/o PCR cuantitativo (de tiempo real).
9. Kit de diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 7 CARACTERIZADO porque comprende, además, reactivos para cuantificar los niveles de expresión de otros receptores de quimokinas y/o otras moléculas marcadoras de pronóstico de cáncer de tiroides.
10. Kit de diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 7 CARACTERIZADO porque comprende reactivos para cuantificar los niveles de expresión de CXCR4 y/o CCR7.

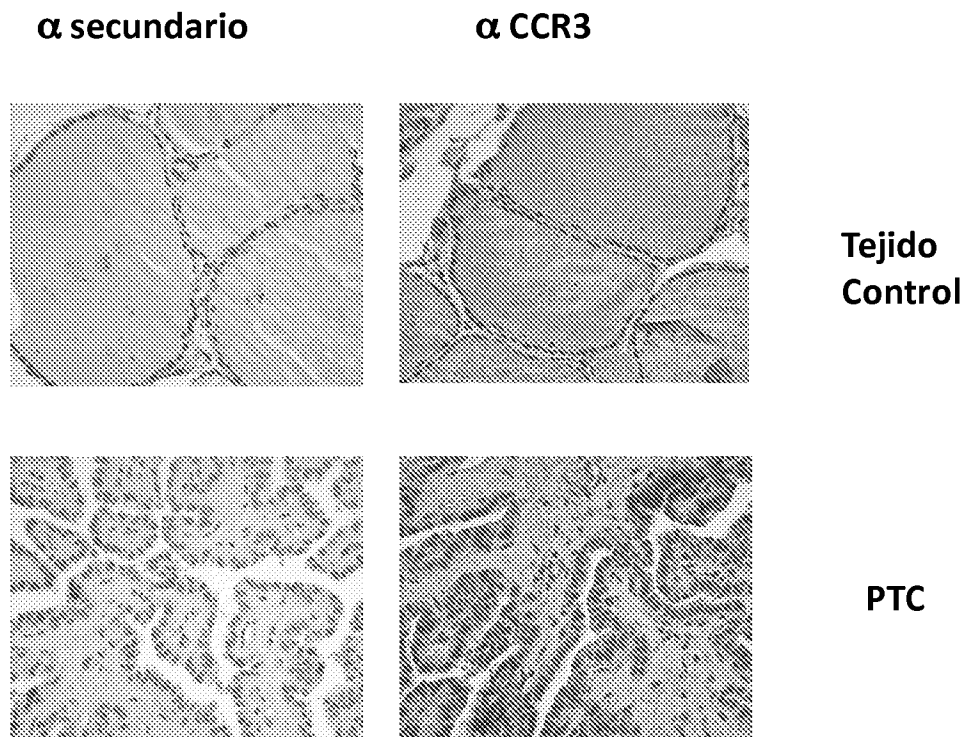


FIGURA 1

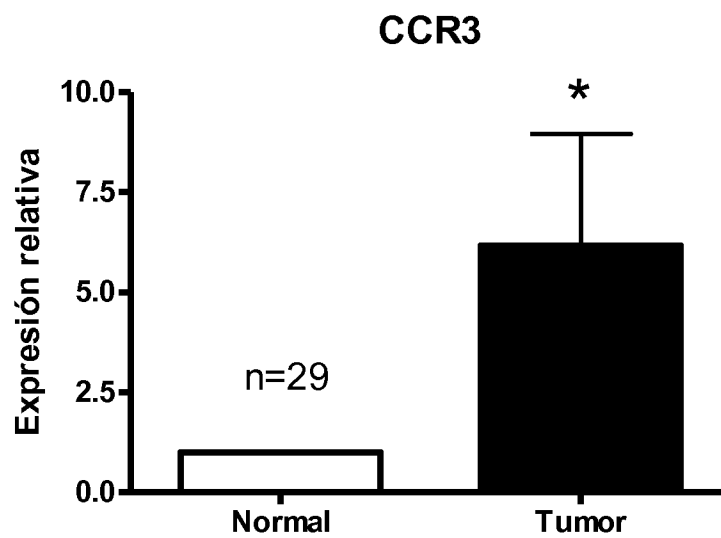


FIGURA 2

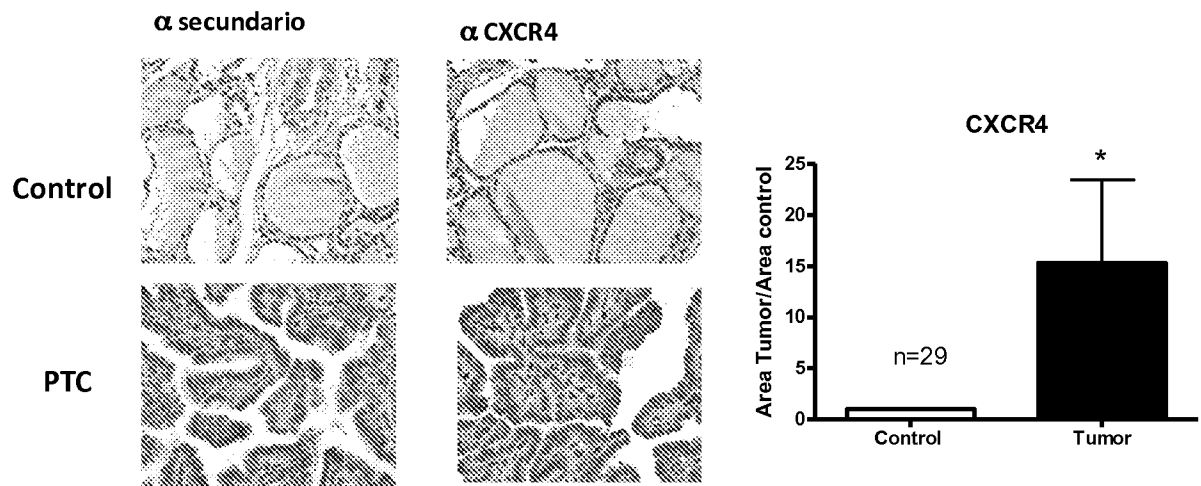


FIGURA 3

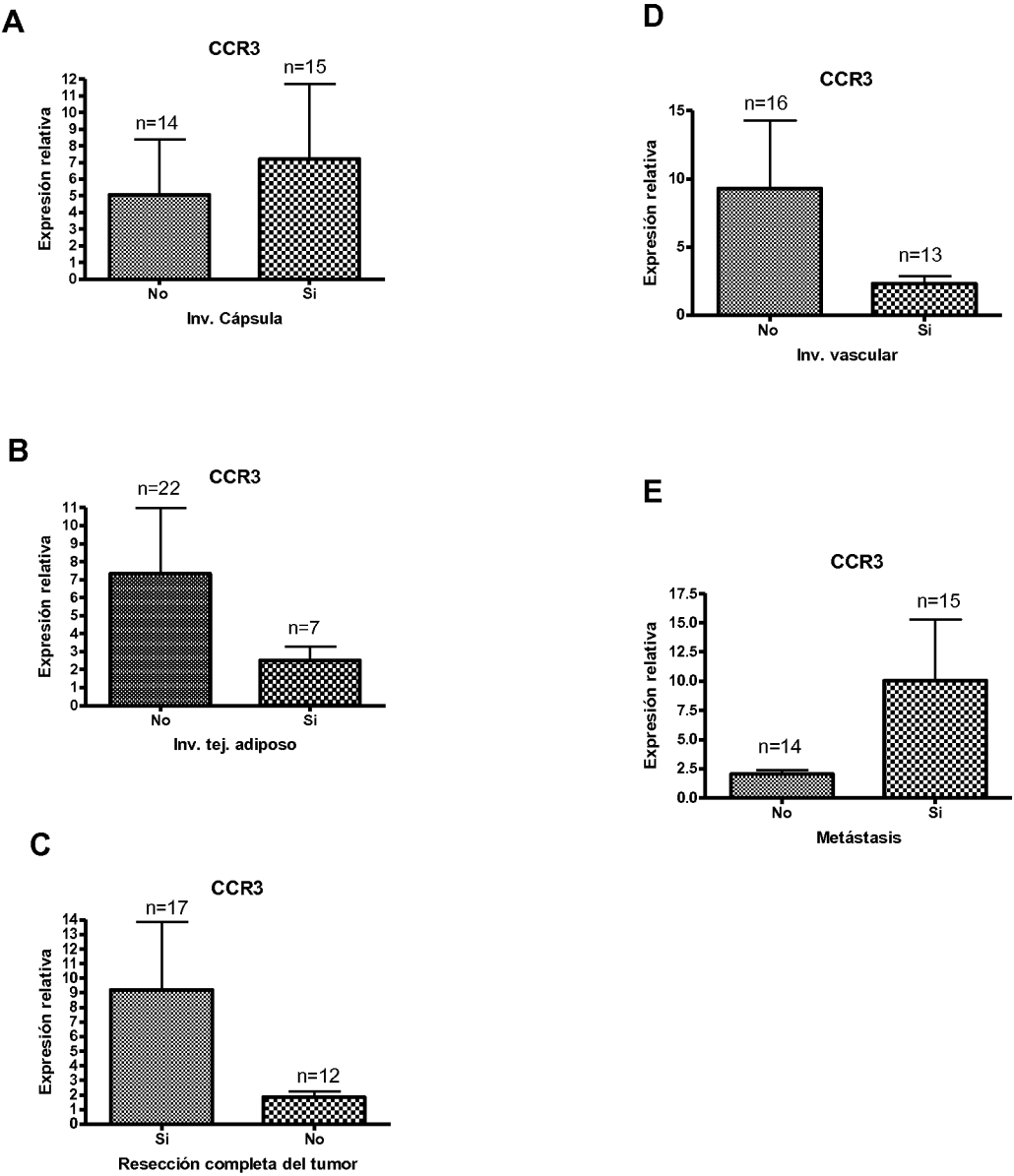


FIGURA 4

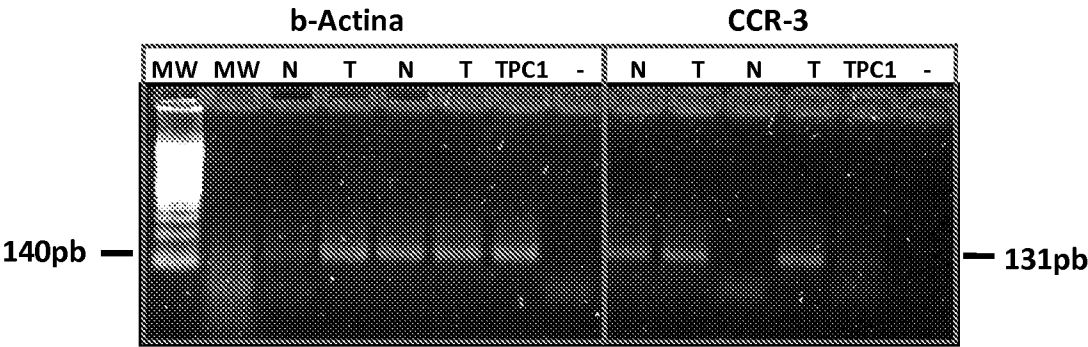


FIGURE 5

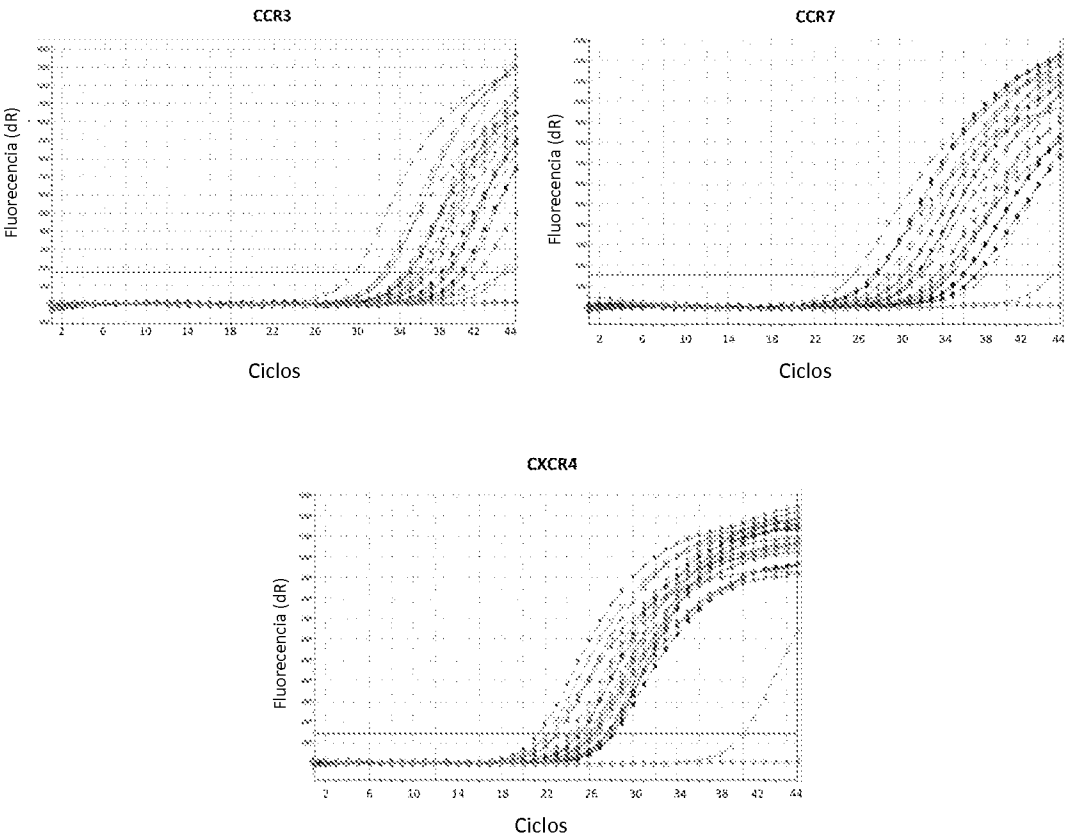


FIGURA 6

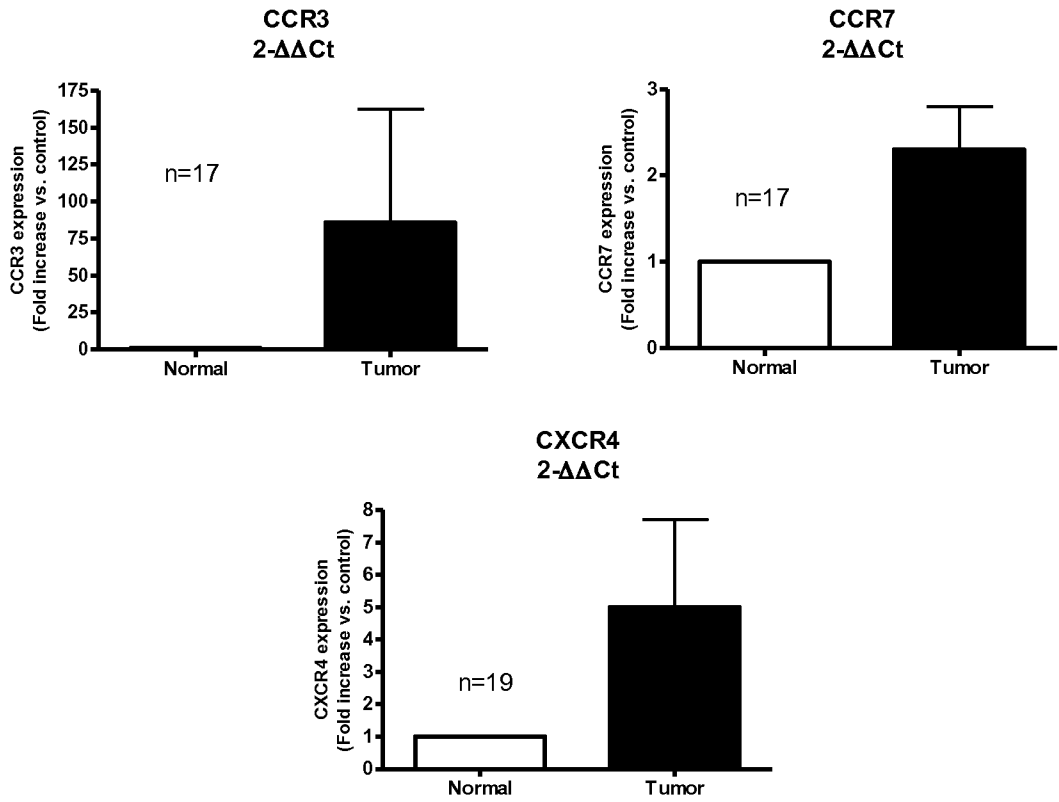


FIGURA 7