

UCH-FC  
Biotecnología  
L 525  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**EVALUACION DE LA EXPRESION DE RECEPTORES DE QUIMIOKINAS EN EL  
CÁNCER PAPILAR DE TIROIDES.**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Andrea Nelly Leiva Martínez

Abril, 2008  
Santiago – Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Alexis Kalergis

Codirectores de Memoria de Título: Dr. Hernán González, Dra. Claudia Riedel

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN  
MEMORIA DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Ciencias de la Facultad de Ciencias que la memoria de Título presentada por el candidato.

ANDREA NELLY LEIVA MARTÍNEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de la Memoria rendido el día 4, de Abril del 2008.

Director de Memoria de Título:

Dr. Alexis Kalergis

Codirectores de Memoria de Título:

Dra. Claudia Riedel

Dr. Hernán González

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título:

Dra. María Rosa Bono

Dr. Mario Rosemblat

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alexis Kalergis por aceptarme en su laboratorio y permitir el desarrollo de mi memoria con el financiamiento del proyecto Fondecyt 1030557. Al Dr. Hernán González por su interés en los resultados y la entrega de muestras, además del financiamiento a través de los proyectos DIPUC 2005 y Proyecto División de Cirugía 2006. A la Dra. Claudia Riedel por su ayuda, disposición y gran aporte en la discusión de los resultados y los detalles de la presentación. Al Dr. Mauricio González por toda la confianza y apoyo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por todo lo que aprendí junto a ellos, en especial a aquellos con los que más compartí, Susan, Hugo, Jorge, J. P. Lezana, Claudio y J. P. Zúñiga. También agradezco a todas las personas que trabajan en el laboratorio de la Dra. Claudia Riedel. A la Señora Emilia, secretaria del departamento de microbiología, por su apoyo, comprensión y amistad. A Isabel Capitan por su ayuda con la impresión de las primeras versiones del escrito de esta memoria.

A mis grandes amigos: Marlene, Andrea Flores, M. José y Daniela, Juan Ugalde y Sebastián Rubio gracias por la paciencia, toda la ayuda y disposición.

Finalmente agradezco a mi familia, mi mamá Araceli Martínez, mi hermana Carolina, mi hermano Christian, mi abuelita Irene, mi mima Nelly y mi tía Gladys.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Abreviaturas	vii
Resumen	ix
Abstract	xi
1.Introducción	1
1.1 Hipótesis	12
1.2 Objetivos generales y específicos	13
2.Materiales y Métodos	14
2.1 Obtención de tiroides normal y de cáncer papilar humano	14
2.2 Microdissección del tejido	15
2.3 Extracción de RNA de tejido tiroideo microdisecado	15
2.4 Síntesis de cDNA	16
2.5 Reacciones de amplificación mediante PCR	17
2.6 Verificación de los productos de amplificación	18
2.7 Inmunohistoquímica	18
2.8 Análisis de expresión de CCR3 por Citometría de flujo	21
2.9 Permeabilización de células	22
2.10 Buffers	22
3.Resultados	23
3.1 Detección de transcritos de receptores de quimioquinas en tejido normal y cáncer papilar de tiroides	23

3.2 Análisis de la expresión de CCR3, CCR7 y CXCR4 en tejido normal y tumoral de tiroides por inmunohistoquímica	29
3.3 Cuantificación de CCR3 por Citometría de flujo	35
4. Discusión	42
4.1 Detección de transcritos de receptores de quimioquinas en tejido normal y cáncer papilar de tiroides	42
4.2 Análisis de la expresión de CCR3, CCR7 y CXCR4 en tejido normal y tumoral de tiroides por inmunohistoquímica	45
4.3 Cuantificación de la expresión de CCR3 por citometría de flujo	47
5. Conclusiones	52
6. Referencias	53
Anexo 1	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Glándula tiroides	1
Figura 1.2: Histología del tejido tiroideo	2
Figura 1.3: Estructura química de las principales hormonas tiroideas	2
Figura 1.4: Etapas del proceso de metástasis	5
Figura 1.5: Quimioquinas	8
Figura 3.1: Detección de productos de PCR del tamaño esperado para los receptores de quimioquinas en muestras de tejido normal y tumoral	26
Figura 3.2: Detección de productos de PCR del tamaño esperado para los receptores de quimioquinas en tejido microdisecado de cáncer papilar y tejido normal	27
Figura 3.3: Detección de amplificadores de los receptores de quimioquinas	28
Figura 3.4: Inmunohistoquímica de CCR3 en tejido tiroideo normal y cáncer papilar de tiroides de pacientes sometidos a tiroidectomía total	31
Figura 3.5: Inmunohistoquímica de CCR7 en tejido tiroideo normal y cáncer papilar de tiroides de pacientes sometidos a tiroidectomía total	32
Figura 3.6: Inmunohistoquímica de CXCR4 en tejido tiroideo normal y cáncer papilar de tiroides de pacientes sometidos a tiroidectomía total	33
Figura 3.7: Citometría de flujo paciente 26	38
Figura 3.8: Citometría de flujo paciente 27 y 28	39
Figura 3.9: Citometría de flujo paciente 29, 30 y 31	40
Figura 4.1: Modelo de metástasis a nodos linfáticos en CPT	51

## INDICE DE TABLAS

Tabla 3.1: Receptores de quimioquinas expresados en cáncer.	25
Tabla 3.2: Resumen del análisis cualitativo de los tejidos mediante inmunohistoquímica.	34
Tabla 3.3: Porcentaje de células que unieron el anticuerpo contra CCR3, en las muestras analizadas por citometría de flujo.	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	: Albúmina Sérica Bobina
C+	: Control positivo
C-	: Control negativo
cDNA	: DNA complementario
CPT	: Cáncer papilar de tiroides
Col	: colaboradores
°C	: grado celcius
DAB	: Diaminobenzidina
DNA	: Acido desoxirribonucleico
EDTA	: Acido Etilendiamino tetraacético
FITC	: Isotiocianato de fluoresceína
GADPH	: Gliceraldehido-3-fosfato Dehidrogenasa
hr	: hora
HRP	: peroxidasa
KDa	: Kilo Dalton
M	: molar
min	: minutos
ml	: mili litro
mM	: mili molar
mRNA	: RNA mensajero
OCT	: Optimal Cutting Temperature
pb	: pares de bases
PBS	: Tampón fosfato salino



PCR	: Polimerase chain reaction
PFA	: Paraformaldehido
R1	: Region 1
RNA	: Acído ribonucleico
RT-PCR	: PCR transcriptasa reversa
St	: Estandar
T3	: Triyodotironina
T4	: Tiroxina
TBS	: Tampón tris salino
TG	: Tiroglobulina
Tm	: Temperatura media
TRH	: Hormona liberadora de tiotropina
TSH	: Hormona estimulante de la tiroides
TSHR	: Receptor de TSH
UV	: Ultra violeta
µg	: micro gramo
µl	: micro litro
µm	: micro metro

## RESUMEN

El carcinoma papilar de tiroides es la neoplasia más frecuente de la tiroides, representando aproximadamente un 75 a 80% de los casos de cáncer de tiroides. En general la evolución del carcinoma papilar de tiroides tiende a ser benigno, sin embargo en algunos casos puede ser agresivo y eventualmente fatal. Estos tumores presentan una alta frecuencia de metástasis a tejido linfático. Los factores moleculares involucrados en la regulación de estas metástasis son desconocidos. Nosotros proponemos que existen señales específicas que promueven la diseminación de las células tumorales hacia el tejido linfático. Estas moléculas de atracción podrían participar en la destinación de la célula tumoral hacia los nodos linfáticos. Se ha demostrado que quimioquinas y sus receptores participan durante el proceso de metástasis de múltiples neoplasias como cáncer de mama, próstata y melanoma. Nuestra hipótesis de trabajo propone que la expresión de receptores de quimioquinas en las células tumorales de tiroides, podría ayudar al proceso de metástasis al tejido linfático. En el presente trabajo analizamos la expresión y localización de receptores de quimioquinas en tiroides de pacientes con cáncer papilar de tiroides con y sin metástasis linfáticas. Se obtuvieron muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer papilar de tiroides y como control se utilizó tejido tiroideo normal del mismo paciente. Se encontró mRNA de los receptores CCR4, CCR5 y CCR10 en ambos tejidos, normal y tumor, por RT-PCR semicuantitativo. Análisis de expresión y localización de receptores de quimioquinas fueron realizados por inmunohistoquímica y citometría de flujo. Se observó un aumento de la expresión de los receptores de quimioquinas CXCR4, CCR3 y CCR7 en el tejido tumoral. El receptor CXCR4 fue expresado al mismo nivel en tejido tumoral de pacientes con y sin metástasis linfáticas. El receptor

CCR7 solo se detectó en tejido tumoral de pacientes con metástasis linfáticas y no en tiroides normal. Estos hallazgos sugieren que la expresión del receptor CCR7 correlaciona con la capacidad de las células tumorales para hacer metástasis linfáticas.

## ABSTRACT

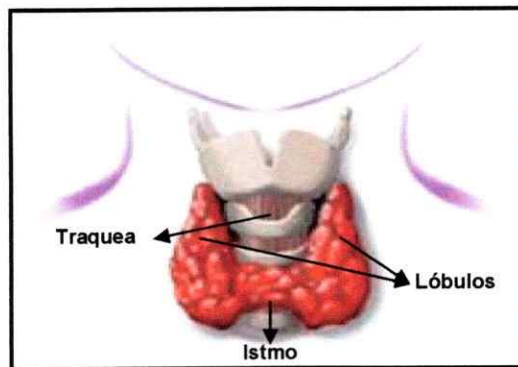
Papillary thyroid carcinoma is the most frequent malignant neoplasm of the thyroid, representing 75 to 80% of the thyroids cancers. In general, papillary thyroid carcinoma follows a benign clinical course, however, some cases can be aggressive and even fatal. This tumor has a high metastatic potential, which occurs most frequently to the lymphatic tissues and through the blood stream. The molecular mechanisms that regulate this highly selective metastatic pattern are unknown. It is possible that specific factors may act as signals that promote tumor cells to migrate to the lymphatic tissue. These molecules will participate in the destination of the tumoral cells towards the lymphatic nodules. It has been shown that chemokines and their receptors participate in the metastatic process of multiples neoplasms such as the breast cancer, prostate cancer and melanoma. Our working hypothesis proposes that the expression of the chemokines receptors in the thyroid tumor cells will promote metastasis process towards the lymphatic tissue. In the present work, we investigated the expression and localization of chemokine receptors in patients with thyroid cancer with and without lymphatic metastasis. Samples were obtained from patients diagnosed with papillary thyroid cancer. As control we obtained non-malignant thyroid tissue from the same patient. By semiquantitative RT-PCR analysis, we found mRNA of CCR4, CCR5 and CCR10 receptors both tumor and normal thyroid tissues . Analysis of the expression and localization of chemokine receptor proteins was performed by flow cytometry and immunohistochemistry . Overall, an increased expression of chemokines receptors CXCR4, CCR3 and CCR7 was detected in malignant tissue compared to normal thyroid tissue. The increased expression of CXCR4 receptor in patients with papillary thyroid carcinoma was was not different in patients with and without lymphatic metastasis.

Interestingly, detection of CCR7 receptor was highly specific, and found only in tumor samples of patients with metastasis, but not in patients without metastasis or in normal tissue . Our results suggest that the expression of CCR7 receptor correlates with the capacity of the tumor cells to make lymphatic metastasis.

## 1. INTRODUCCIÓN

### La Glándula Tiroides

La tiroides fue identificada durante la época del renacimiento, alrededor del 1500, Vesalius (anatomista flamenco, fundador de la anatomía moderna) utilizó el término de glándula laríngea y en 1656 Thomas Wharton la llamó glándula tiroides (Werner and Ingbar's, 2000). Esta es una glándula endocrina ya que produce hormonas que son liberadas al torrente sanguíneo, pesa entre 10 y 20 gramos, posee dos lóbulos y una unión entre ellos llamada istmo. En ocasiones se presenta un tercer lóbulo en la zona del istmo, llamado lóbulo piramidal. La tiroides se encuentra ubicada alrededor de la traquea debajo del cartílago cricoides (fig. 1.1) (Werner and Ingbar's, 2000).

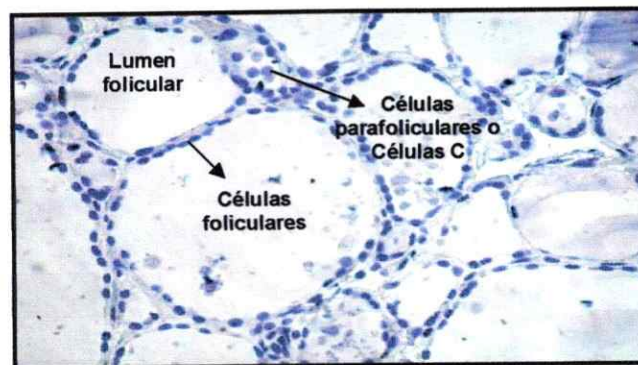


**Figura 1.1: Glándula tiroides.** La glándula tiroides aparece en rojo, se observan los dos lóbulos que rodean la traquea, unidos a través del istmo.  
([www.teknon.es/consultorio/centeno/intervenciones/tiroides.htm](http://www.teknon.es/consultorio/centeno/intervenciones/tiroides.htm))

La glándula tiroides está constituida por folículos cerrados de tamaño variable, estos son la unidad funcional básica de la tiroides madura y están revestidos de células

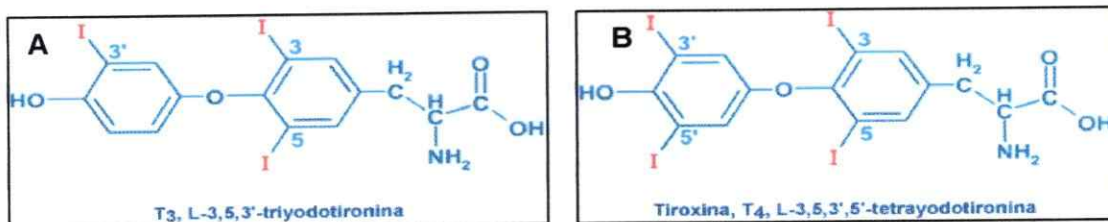
epiteliales cilíndricas llamadas células foliculares (fig. 1.2). Estas se encuentran formando una monocapa de células que rodean un lumen constituido por un coloide homogéneo donde se secretan las hormonas tiroideas en su forma inactiva, es decir, unidas a una glicoproteína, formando la tiroglobulina (TG) (Kuehnel, pag. 262-264, 2003).

Entre los folículos de la tiroides se encuentran las células parafoliculares (células C) las cuales están encargadas de producir la hormona calcitonina que participa en el metabolismo de calcio.



**Figura 1.2: Histología del tejido tiroideo.** Las células foliculares se ubican en monocapa formando los folículos donde son liberadas las hormonas tiroideas. Las células parafoliculares se encuentran entre los folículos, tienen núcleos más grandes y redondos que las células foliculares. Fotografía de tejido normal de tiroides. Tinción Hematoxilina (núcleos) (40x).

Las células epiteliales o foliculares que conforman el folículo se les denomina tirocitos. Las principales hormonas producidas por los tirocitos son la triyodotironina ( $T_3$ ) y tiroxina ( $T_4$ ), (fig. 1.3).



**Figura 1.3: Estructura química de las principales hormonas tiroideas.** A) Triyodotironina o  $T_3$ , B) Tiroxina o  $T_4$ .

La función de la glándula tiroides esta regulada por la Hormona estimulante de la Tiroides (TSH). Esta hormona es producida por la glándula pituitaria, la que a su vez es regulada por el hipotálamo por medio de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Werner and Ingbar's, 2000).

### Cáncer de Tiroides

En el sistema endocrino son frecuentes las enfermedades de la tiroides, las cuales presentan una alta incidencia de neoplasias, las que han aumentado significativamente en los últimos años (González y Mosso, 2006). El cáncer de tiroides en Chile tiene una incidencia de 0.7% en mujeres y 0.3% en hombres (Ministerio de Salud del Gobierno de Chile, Estadísticas, 2004, <http://deis.minsal.cl/deis/indexmc33.asp>).

Se conocen cuatro tipos principales de cáncer de tiroides:

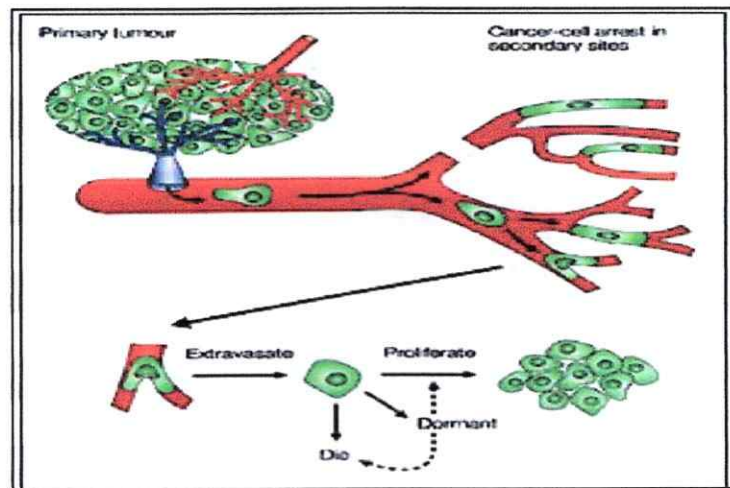
- Cáncer anaplásico, que se desarrolla a partir de las células foliculares.
- cáncer medular, que se desarrolla partir de las células parafoliculares.
- cáncer folicular, que se desarrolla a partir de células foliculares.
- cáncer papilar, que se desarrolla a partir de células foliculares.

Entre los que afectan a las células foliculares, los más frecuentes son el cáncer papilar y el cáncer folicular de tiroides. Dos tercios de los diagnósticos de cáncer de tiroides corresponden a cáncer papilar de tiroides (CPT). (American Cancer Society®. [http://www.cancer.org/docroot/esp/content/esp\\_5\\_1x\\_que\\_e\\_s\\_43.asp](http://www.cancer.org/docroot/esp/content/esp_5_1x_que_e_s_43.asp)).



El diagnóstico de CPT se basa en la morfología nuclear de las células tumorales, ya que estas presentan núcleos más grandes, alargados, apretados y sobrepuestos, con contorno nuclear irregular, marginación periférica de cromatina y micro-nucleolos múltiples ubicados inmediatamente bajo la membrana nuclear (Al-Brahim y col., 2006; Gheriani 2006). Como consecuencia del cambio de morfología se pierde la organización normal del tejido, adoptando una estructura en forma de papilas, la cual es característica de este tipo de cáncer, aun cuando no se observa en todos los casos (Al-Brahim y col., 2006). El CPT presenta una tendencia a generar metástasis hacia los linfonodos del cuello, las cuales son detectadas en un 20-30% de los casos por exámenes habituales como la ecografía (Hall y col., 2003). Las células del CPT mantienen características del tejido normal, como la expresión del receptor de TSH lo que estimula el crecimiento del tumor, sin embargo la suspensión de TSH no es suficiente para prevenir metástasis (Mineo y col., 2004). Machens investigó en pacientes mayores de 45 años los factores de riesgo que determinan las metástasis linfáticas y metástasis distantes en cáncer de tiroides, sus resultados muestran que las metástasis linfáticas se relacionan con el tamaño del tumor primario y la extensión extratiroidal de las células malignas en tumores no encapsulados (Machens y col., 2003).

La metástasis es un proceso complejo (fig.1.4), en el cual las células tumorales rompen la matriz y se desplazan a través del sistema linfático o de los vasos sanguíneos, hasta llegar a un tejido con condiciones favorables, donde se aloja y forma un nuevo tumor (Kaplan y col., 2006).



**Figura 1.4: Etapas del proceso de metástasis.** Las células van desde el tumor primario, pasan a los vasos sanguíneos, luego se produce la extravasación y proliferación en el sitio de metástasis. (Chambers y col., 2002)

El proceso de metástasis tiene múltiples etapas que incluyen: la invasión, vascularización, embolización, adhesión capilar, extravasación y proliferación celular asociada a angiogénesis en el órgano secundario (Chambers y col., 2002).

Cada una de estas etapas requiere que la célula maligna exprese los genes necesarios para superar los mecanismos de defensa del tejido huésped y consolidar el proceso metastático (Chambers y col., 2002). En términos generales, se considera que las etapas iniciales del proceso metastático son altamente eficientes lo que contrasta con las etapas finales en donde la supervivencia de las células en su destino final es muy baja (Chambers y col., 2002). Las etapas iniciales, desde el momento de la intravasación hasta la adhesión, son de gran importancia para explicar el patrón específico de metástasis a diferentes órganos.

Sobre este punto, existen dos teorías predominantes:

1. El patrón de flujo circulatorio entre el tumor primario y los órganos secundarios es suficiente para explicar las metástasis órgano-específicas.
2. La dependencia de la célula maligna por un tipo apropiado de órgano secundario (donde se implanta), es de gran importancia para determinar el patrón específico de metástasis (Kaplan y col., 2006).

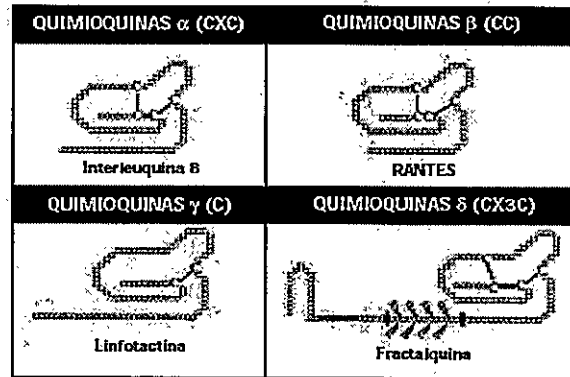
Ambos factores son apoyados por la evidencia actual. Por un lado, las metástasis a los pulmones e hígado son altamente dependientes del patrón de flujo sanguíneo, en donde las células son retenidas eficientemente por restricción de tamaño; mientras que en las metástasis óseas y linfáticas el patrón circulatorio es menos relevante, cobrando mayor importancia la atracción y afinidad de la célula maligna por un órgano determinado (Chambers y col., 2002). Por otra parte, también se ha sugerido que existen factores moleculares que comunican a la célula tumoral con el sitio de metástasis, los que estarían jugando un rol como moléculas de atracción en el proceso metastático (Liotta, 2001).

Los mecanismos moleculares que regulan el proceso de metástasis en el CPT se desconocen. Dado que el proceso metastático a los linfonodos no depende del patrón de flujo circulatorio, no existe comunicación sanguínea directa entre la tiroides y los linfonodos, es posible pensar que hay señales específicas de atracción que participarían en la destinación de la célula maligna hacia los linfonodos. Siguiendo esta línea de pensamiento, las quimioquinas y sus receptores surgen como candidatos muy atractivos (Malcolm 2001).

### Quimioquinas y Receptores de Quimioquinas

Las quimioquinas son una familia de pequeñas proteínas quimio-atractivas de 8 a 14 KDa, que tienen la capacidad de regular diversos aspectos de la respuesta inmune, jugando un rol fundamental en el homing de las células del sistema inmune (Förster y col., 1999; Zlotnik y col., 2000). Las quimioquinas son secretadas por diversos tipos celulares, entre ellos, células del sistema inmune y células epiteliales (Locati y col., 2002). Hasta ahora se han descrito más de 50 tipos de quimioquinas y se clasifican, basados en la posición de los dos primeros residuos de cisteína adyacentes al N-terminal, en cuatro familias altamente conservadas: CL, CCL, CXCL y CX<sub>3</sub>CL (Zlotnik y col., 2000) (fig. 1.5).

Por otra parte, se han identificado 18 receptores de quimioquinas en el ser humano, estos receptores presentan siete dominios transmembrana formando parte de la familia de receptores acoplados a proteína G, las regiones intracelulares intervienen en la transducción de señales y en los dominios extracelulares se encuentran lugares susceptibles a la glicosilación (Allen y col., 2007). Estas proteínas de membrana tienen un peso molecular aproximado de 40 KDa (Zlotnik y col., 2000). La mayor parte de estos receptores pueden activarse por la unión de diferentes quimioquinas y una quimioquina puede activar distintos receptores, sin embargo existe un pequeño grupo que tiene un ligando específico (Zlotnik y col., 2000).



**Figura 1.5: Quimioquinas.** En la figura se observan representantes de cada una de las familias de quimioquinas C, CC, CXC y CX<sub>3</sub>C (Canol y col., 2001).

La interacción entre el receptor y su ligando induce la activación de múltiples vías de señalización dirigidas a coordinar el proceso de quimiotaxis celular (Tanaka y col., 2005). Se ha observado que en el proceso de inflamación la capacidad de los leucocitos de infiltrar un tejido se correlaciona con:

- El patrón de expresión de receptores de quimioquinas.
- Las concentraciones relativas de las quimioquinas en el tejido estudiado.

El gradiente de quimioquinas, que atrae a células que infiltran es generado por las diversas células presentes en ese tejido en particular. Aunque originalmente fueron identificados en leucocitos, los receptores de quimioquinas funcionales también se han encontrado en células dendríticas, endoteliales y algunas células epiteliales, particularmente aquellas que han sufrido transformación maligna (Gunn 2003; Mora y col., 2003; Müller y col., 2001; Scotton y col., 2001).

### Quimioquinas, Receptores de Quimioquinas y Cáncer

La expresión diferencial de ciertos receptores de quimioquinas está relacionada con múltiples neoplasias incluyendo el cáncer de mama, melanoma maligno, cáncer de pulmón, cáncer de esófago y cáncer epidermoide de cabeza y cuello, entre otros (Ding y col., 2003; Wang y col., 2004). Además, se ha observado la expresión de receptores de quimioquinas en algunos tipos de cáncer con metástasis específicas, como son el cáncer de próstata y el melanoma (Chambers y col., 2002; Kakinuma y col., 2006). Estudios anátomo-patológicos en biopsias de pacientes con cáncer de próstata y de mama han mostrado que la expresión de receptores de quimioquinas es más intensa en aquellos pacientes que han presentado metástasis (Kato y col., 2003). Por otra parte, se ha observado que las células tumorales de cáncer de mama expresan un patrón de receptores de quimioquinas que tienen afinidad por las quimioquinas expresadas principalmente en los órganos en donde frecuentemente genera metástasis (Müller y col., 2001). En estos estudios se encontró una alta expresión de los receptores de quimioquinas CXCR4 y CCR7 lo cual es consistente con los niveles elevados de sus respectivos ligandos CXCL12 y CXCL21 en los sitios de metástasis (linfonodos, pulmón e hígado) (Müller y col., 2001). Además, el bloqueo de CXCR4 inhibe la metástasis de células de cáncer de mama en un modelo experimental animal, lo que apoya la participación de estos receptores en el proceso metastático (Müller y col., 2001). Considerando esta evidencia, se sostiene que las quimioquinas (como señales) y sus receptores participarían en el proceso de atracción durante la metástasis (Philip y Murphy 2001; Müller 2001; Liotta 2001; Scotton 2001; Chambers 2002; Balkwill 2004).

Aparte de la destinación celular, las quimioquinas inducen variados procesos que favorecen la iniciación y consolidación de la metástasis, incluyendo: la regulación de la angiogenesis, activación de metaloproteinasas, activación de proliferación e inhibición de apoptosis (Mantovani, 1999; Homey y col., 2002). Por ejemplo, se ha observado que la activación del receptor de quimioquina CXCR4 estimula la migración de células tumorales y aumenta su capacidad de invasión a través de una matriz extracelular recompuesta (Matrigel) y a través de monocapas de células endoteliales (Scotton y col., 2002; Balkwill, 2004). Por otra parte, en numerosos tipos de cáncer como el glioma, el melanoma, cáncer de ovario y riñón, la quimioquina CXCL12 promueve la proliferación y supervivencia de células mantenidas en condiciones sub-óptimas, por ejemplo en cultivo celular con bajas concentraciones de suero (Scotton y col., 2002). Esta adaptación a condiciones adversas inducidas por quimioquinas permitiría que células tumorales crezcan en sitios distantes que en otras condiciones serían desfavorables. Así, la evidencia acumulada, tanto clínica como experimental, apoya la importancia de los receptores de quimioquinas en el proceso metastático.

En este trabajo proponemos que los receptores de quimioquinas también juegan un rol importante en el CPT y en la capacidad de estas células para generar metástasis. Experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio muestran diferencias en la expresión del mRNA del receptor CCR3 en el CPT respecto al tejido normal. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que un cambio en el patrón de expresión de receptores de quimioquinas podría ser importante en el proceso metastático hacia los linfonodos de los tumores que se desarrollan en la tiroides.

Dado que la metástasis es uno de los grandes determinantes de morbilidad y/o mortalidad del cáncer, estudios dirigidos a conocer los mecanismos moleculares son de gran importancia para la optimización de decisiones terapéuticas y posiblemente el

desarrollo de terapias biológicamente más específicas. Esta realidad hace imperativo identificar los mecanismos moleculares que regulan las metástasis linfáticas en el CPT.

La dilucidación de los mecanismos que subyacen la metástasis a los tejidos linfáticos contribuirá al entendimiento de la función de los receptores de quimioquinas en el cáncer, como en el manejo general de esta enfermedad.



## HIPÓTESIS

“Durante el proceso de transformación maligna, las células del cáncer papilar de tiroides adquieren un patrón de expresión de receptores de quimioquinas”

## **Objetivos Generales y Específicos**

### **1) Objetivo General**

Determinar diferencias en el patrón de expresión de receptores de quimioquinas en el CPT.

### **2) Objetivos Específicos**

a) Determinar el subtipo de receptores de quimioquinas, a nivel de mRNA, expresado en tejido tiroideo normal y tumoral.

b) Determinar la expresión de receptores de quimioquinas a nivel de proteína, en tejido normal y tumoral.

c) Analizar la localización celular de los receptores de quimioquinas identificados en el segundo objetivo tanto en el tejido tiroideo tumoral como en el normal.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Obtención de tiroides normal y de cáncer papilar humano.

Las muestras de tejido tiroidal tanto normal como de cáncer papilar humano fueron obtenidas de pacientes operados sometidos a tiroidectomía total por CPT. La cirugía de extracción se realizó previo consentimiento expreso de los pacientes (ver anexo 1). 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 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, en medio de cultivo RPMI 1640 sin suplementar (Invitrogen). El tejido fue limpiado de restos de tejido adiposo y se dividió en tres partes (dependiendo del tamaño de la muestra) cada sección con un diámetro mínimo de 0,4 cm. Una parte del tejido se congeló en medio para congelar tejidos O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) (Sakura) a  $-80^{\circ}\text{C}$  (REVCO modelo Ultima II); una segunda parte se mantuvo en frío para ser analizada inmediatamente por citometría de flujo; la tercera parte se fijó en paraformaldehído para ser analizado el tejido por inmunohistoquímica. En los casos en que la cantidad de tejido no era suficiente para dividirlo en tres partes, la muestra se usó en citometría de flujo e inmunohistoquímica.

## **2.2 Microdissección del tejido.**

Las muestras de tejido que se usarían para analizar la expresión del mRNA mensajero de los receptores de quimioquinas fueron sometidas a microdissección para seleccionar sólo células provenientes de tejido tiroideo. El tejido en medio O.C.T. se sumergió en un recipiente con isopropanol, y este recipiente se sumergió a su vez en nitrógeno líquido por 1 minuto aproximadamente. Si el tejido no fue procesado inmediatamente se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Secciones de  $7\mu\text{m}$  de espesor fueron cortadas en crióstato (Leica CM 15105). Luego estas secciones fueron guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  o fijadas directamente en metanol 70% en agua libre de nucleasas. Los cortes fijados fueron rehidratados en agua libre de nucleasas, después se incubó con hematoxilina de Mayer por 3 minutos. La hematoxilina tiñe los núcleos de las células por lo que es posible distinguir la forma de las células y así poder diferenciarlas. Luego los cortes se lavaron en agua libre de nucleasas y se deshidrataron en una batería de alcoholes (etanol  $70^{\circ}$  1 min;  $80^{\circ}$  1 min;  $95^{\circ}$  1 min;  $100^{\circ}$  5 min;  $100^{\circ}$  10 min). La microdissección de tejidos se realizó con bisturí (n°11) en un microscopio invertido (Olympus CKX41), para minimizar posibles contaminaciones con componentes inflamatorios que pueden alterar los resultados. El tejido seleccionado es depositado en tubos Eppendorf de 1.5 ml.

## **2.3 Extracción de RNA de tejido tiroideo microdisecado.**

Las muestras de tejido tiroideo microdisecado se centrifugaron a 13.000 g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en microcentrífuga (Micromax RF IEC Centra CL3R termo IEC). El tejido microdisecado se homogenizó mediante resuspensión con pipeta con 1 ml de Trizol (Invitrogen), El homogenizado se incubó en Trizol 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Luego al homogenizado en trizol se le agregó 0,2 ml de cloroformo (Merck), se mezcló por vortex (modelo VX10, Labnet International) durante 15 segundos,

posteriormente se incubó por 3 minutos a 4°C y se centrifugó a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Se rescató la fase acuosa a la que se le agregó 0,5 ml de isopropanol (Merck). Esta mezcla se incubó por 10 minutos a 4°C, se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El pellet resultante se lavó con 1 ml de alcohol 75°C (Merck), se mezcló por vortex y se centrifugó a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se secó el pellet que corresponde al RNA. Éste fue secado al aire y se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas, después se incubó a 55°C por 10 minutos y el RNA extraído se guardó a -80°C.

#### **2.4 Síntesis de cDNA.**

En tubos de 0,2 ml se agregó de 4 a 10 µl del RNA purificado de tejido de tiroides microdisecado. No se pudo determinar por espectrofotométrica la concentración de RNA en las muestras. A las muestras de RNA se les agregó 1µl de random primers (1µg/1µl) (Kit Improm II de Promega). Las muestras se calentaron a 70°C por 5 minutos en termociclador (PCR Sprint Thermal Cycler, de Thermo Electron Corporation). Luego los tubos se mantuvieron en hielo. En esta etapa se preparó una mezcla con todos los reactivos para el RT-PCR: 4µl de Improm II 5x (Buffer de reacción), 1,2µl MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1µl dNTPs mix 0,5 mM, 0,5µl Inhibidor de RNAsa (20 unidades), 1µl Improm II RT 0,25 unidades (enzima Transcriptasa Reversa), 0-7µl de agua libre de nucleasas (dependiendo del volumen de RNA usado). Esta mezcla se preparó calculando el número de muestras más los controles tanto positivo como negativo. 15µl del mix fueron añadidos a cada muestra de RNA. Las muestras fueron incubadas con el mix a 25°C por 5 minutos y 42°C por 1 hora. El producto de cDNA se guardó a -20°C.

## 2.5 Reacciones de amplificación mediante PCR

En las reacciones de amplificación de los receptores de quimioquinas se usó 2  $\mu$ l del cDNA. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l. La mezcla de reactantes contenía 2,5  $\mu$ l de buffer de reacción Impron II 5x; 1,25  $\mu$ l de mezcla de partidores a una concentración de 10 $\mu$ M cada uno; 0,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,5  $\mu$ l mezcla de dNTPs 0,2mM, el volumen se completó con agua destilada tratada con DEPC. Una vez que los reactivos se han agregado se le colocó 1 $\mu$ l de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen 1 unidad). En cada reacción se incluyó un control positivo. Éste corresponde a una muestra de cDNA proveniente de tejido total o cDNA de linfocitos de sangre periférica. Se contó con un control negativo el que corresponde a la mezcla de reacción sin cDNA. Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador detallado anteriormente.

Los partidores utilizados en las reacciones de PCR, son los siguientes:

GADPH, (producto de 400pb, Tm 58°C), Gene Link.

F: GTCAACGGATTTGGTCTGTATT, R: AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

CCR3, (producto de 354 pb, Tm 55°C), Invitrogen.

F: ATGGTGGTGACAGAGGTGAT, R: AGGTGAGTGTGGAAGGCTTA

CCR4, (producto de 473pb, Tm 60°C), Gene Link.

F: TGCTCTTCGTGTTTTCCCTC, R: CATCTTCACCGCCTTGTCT

CCR5, (producto de 311pb, Tm 60°C), Gene Link.

F: CAGATATTTCTGCTCCCCA, R: CTTCTGGGCTCCCTACAACA

CCR6, (producto de 308pb, Tm 50°C), Invitrogen.

F: AATACAACACCCAAGGCAGC, R: ATAAGCTTTTCGCTCTGGCA

CCR7, (producto de 529pb, Tm 55°C), Invitrogen.

F: GAGGCAGCCCAGGTCCTTGAA, R: TCCTTCTCATCAGCAAGCTGTC

CCR10, (producto de 493pb, Tm 60°C), Gene Link.

F: GGGTTTCTCCTTCCACTCCT, R: TATTCCCCACATCCTCCTTG

CXCR2, (producto de 202pb, Tm 58°C), Invitrogen.

F: ATTGTGGGCATCCTTCACAG, R: TGCACCTTAGGCAGGAGCTCT

CXCR4, (producto de 702pb, Tm 58°C), Invitrogen.

F: AGAACCAGCGGTTACCATGGA, R: GAGTGTGACAGCTTGGACATG

Las reacciones de PCR se realizaron usando un ciclo de desnaturación a 95°C por 3 minutos, 39 ciclos de amplificación (desnaturación a 94°C por 45 segundos, temperatura de alineamiento de partidores por 45 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos) y un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos.

## **2.6 Verificación de los productos de amplificación**

Los productos de las amplificaciones se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (Invitrogen) en tampón TAE (Tris-acetato 40mM, pH8.0; EDTA 1mM). 1µl de SyberGreen fue agregado a 10 ml de agarosa para posteriormente poder visualizar el DNA en el gel. Los productos de DNA se mezclaron con el tampón Blue II (6x) de carga (Invitrogen). La electroforesis se realizó a un potencial constante de 100 V (fuente de poder Bio-Rad, modelo 200/2.0). Las bandas de DNA presentes en los geles se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV Vilber Lourmat. Se usó un estándar de peso molecular de 100pb GeneLink.

## **2.7 Inmunohistoquímica.**

El tejido fresco que se seleccionó para analizarlo por inmunohistoquímica se fijó 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

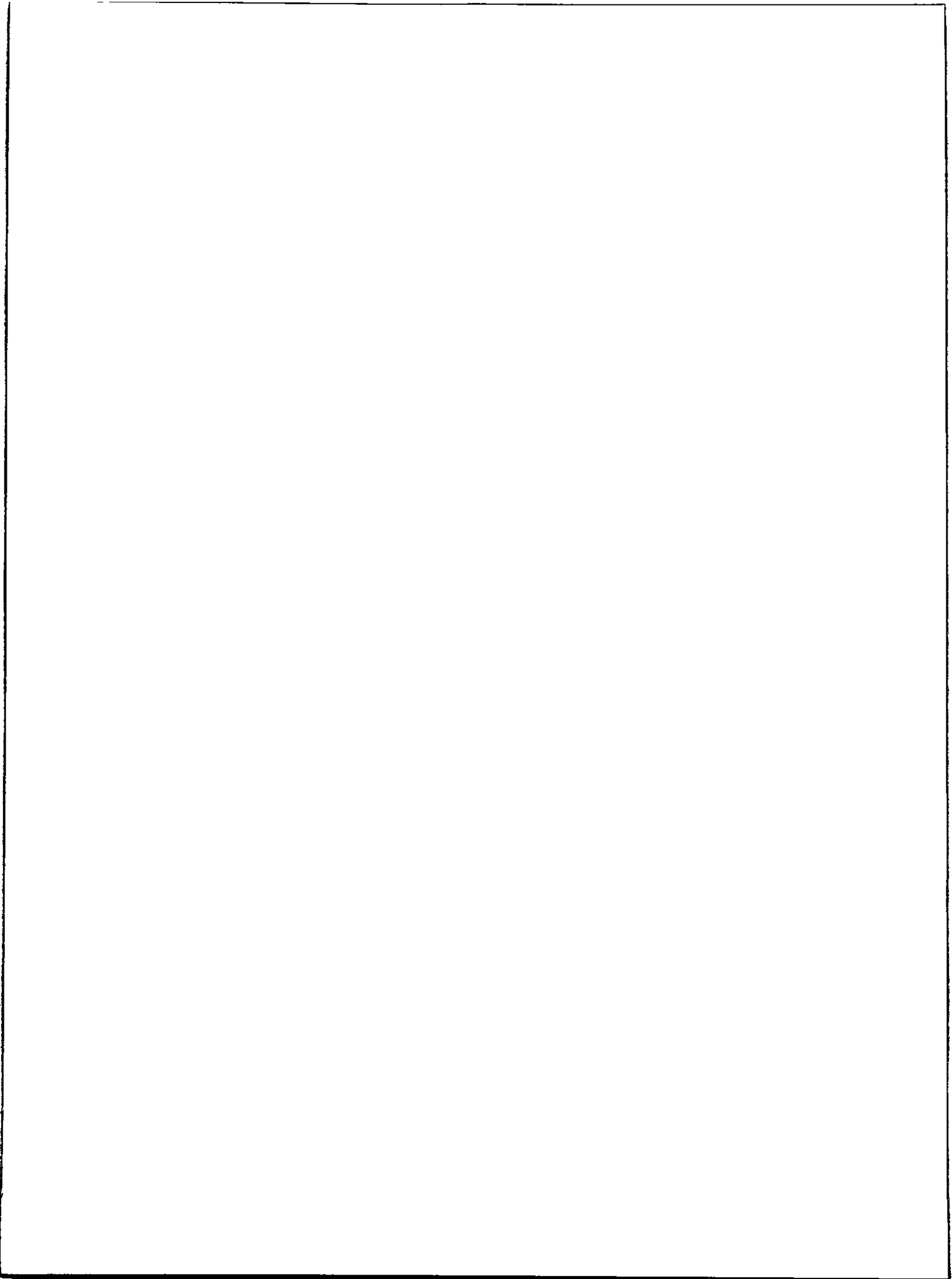
al 70% tres veces por 20 min; luego en etanol al 95% tres veces por 20 min; después en etanol al 100% tres veces por 20 min; y finalmente los tejidos se sumergen en Xilol/Etanol (1:2) por 30 min, luego en Xilol/Etanol (1:1) por 30 min, Xilol/Etanol (2:1) por 30 min, Xilol 100% tres veces por 30 min, 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 se usan para cortar los tejidos en el micrótopo. Se obtuvo cortes de 5 µm de grosor y estos fueron depositados en portaobjetos silanizados (Marienfeld). Los cortes pueden ser guardados a temperatura ambiente hasta ser utilizados para inmunohistoquímica. Previamente a la inmunohistoquímica los cortes deben ser rehidratados. Se les removió la parafina y se hidrataron. Brevemente, las muestras se sumergieron en xilol al 100% tres veces por 10 min; luego en etanol 100% tres veces por 10 min; etanol 95% tres veces por 2 min; etanol 70% tres veces por 2 min; y finalmente se rehidrataron en 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 H<sub>2</sub>O destilada) por 10 min a máxima potencia en un horno microondas. Luego se enfrió a temperatura ambiente con buffer AC frío y se lavó tres veces con H<sub>2</sub>O destilada. Posteriormente se procedió a bloquear la actividad peroxidásica endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en TBS por 15 min y se lavó tres veces con TBS por 5 min.

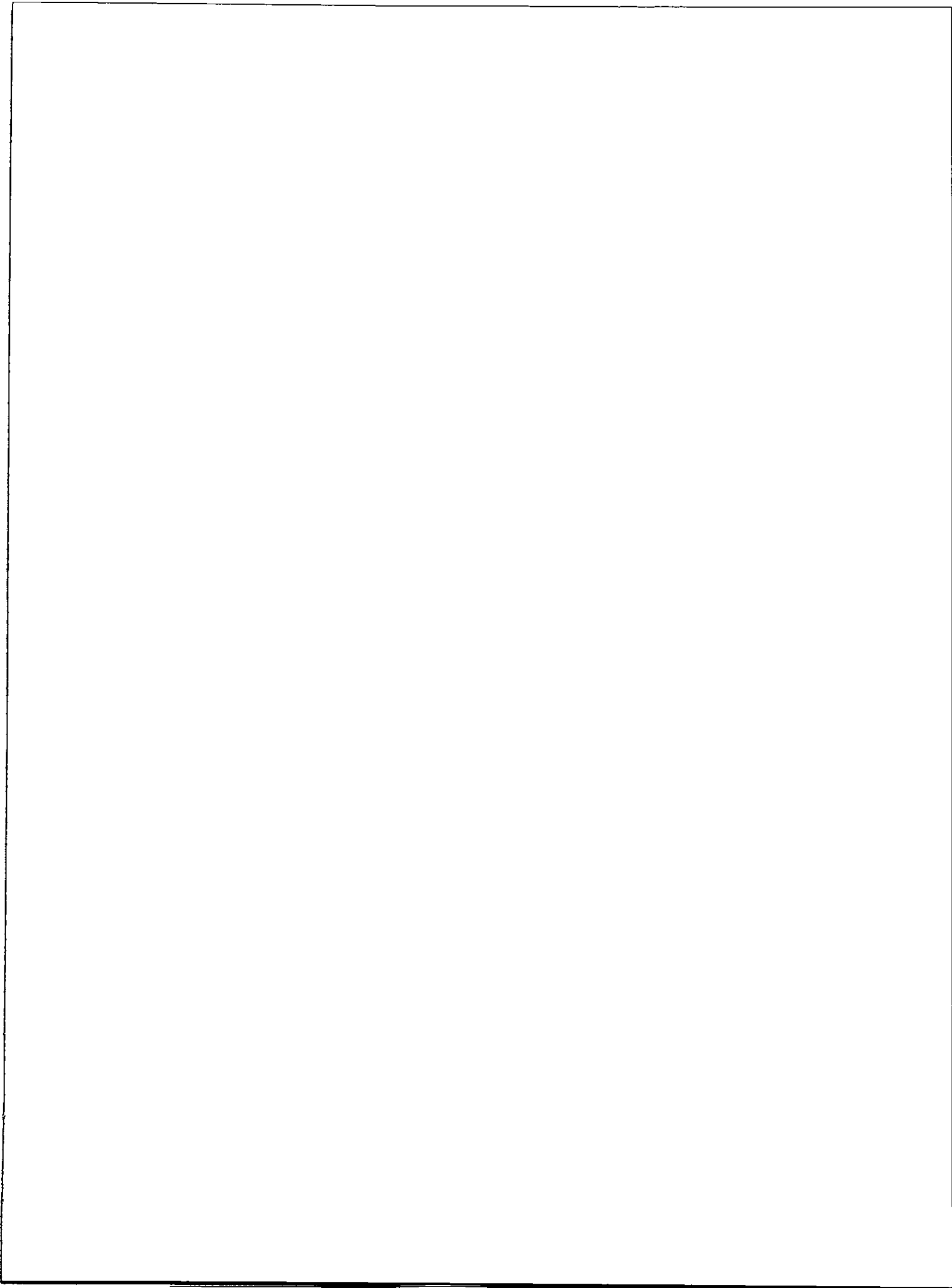
Los cortes de tejido fueron bloqueados para disminuir la unión inespecífica del anticuerpo primario: El bloqueo consistió en incubar los cortes con leche al 5% en TBS-Tween 0.1% por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se procedió a incubar con los



anticuerpos primarios en TBS-Tween 0.1%, leche 0,5 % por toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios que se utilizaron en la inmunohistoquímica fueron:  $\alpha$ -CCR3 monoclonal de rata usado a una concentración de 500 $\mu$ g/ml (RyD Systems, n° catálogo MAB155);  $\alpha$ -CCR7 monoclonal de ratón usado a una concentración de 500 $\mu$ g/ml (RyD Systems, n° catálogo MAB197); y  $\alpha$ -CXCR4 anticuerpo monoclonal de ratón usado a una concentración de 500 $\mu$ g/ml (RyD Systems, n° catálogo MAB173)

Los cortes se lavaron 6 veces por 5 min con leche 0,5% en TBS. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (biotinilado) en TBS-Tween 0,1% con leche 0,5 % por 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron 4 veces por 5 min con leche 0,5% en TBS. Posteriormente se agregó estreptavidina/HRP 1/250 (ABC-Vector PK4000) a los cortes y se incubaron por 45 min. Los cortes se lavaron 4 veces con leche 0,5% en TBS por 5 min. El revelado se llevo 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. Luego los cortes fueron teñidos con Hematoxilina por 30 segundos. Los cortes deshidratados en una batería de alcoholes. Brevemente, los cortes se sumergieron en etanol al 70% tres veces por 3 min; en etanol al 95% tres veces por 3 min; en etanol al 100% tres veces por 5 min; y en xilol al 100% tres veces por 5 min. Los cortes se secaron y fueron cubiertos con entellán. Una vez secado el medio de montaje se observaron y fotografiaron las muestras en microscopio.





## 2.8 Análisis de expresión de CCR3 por Citometría de flujo.

La fracción de tejido fresco que se usaría para el análisis de citometría de flujo fue disgregada mecánicamente en medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen) sin suplementar. Se descartó el tejido conectivo y el tejido remanente se disgregó mecánicamente pasándolo por una jeringa (0,5 x15 25 G5/8 de 1 ml). La disgregación mecánica del tejido permite separar las células. Las células fueron traspasadas a tubos eppendorf en medio de cultivo y centrifugadas a 250 g por 6 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en PBS/BSA 3% (aprox. 200.000 células por tubo). Luego se adicionó 0,5µl de estreptavidina fría 10mg/ml (Invitrogen, n° catálogo S-888), a todos los tubos, incluyendo los controles (autofluorescencia, sólo TSHR-FITC, CCR3, sólo secundario y control de isotipo). Luego se agregó el marcador de tirocitos, α-TSHR policlonal hecho en cabra 200µg/ml a una dilución de 1/100 (Santa Cruz Biotechnology n° catálogo sc-7816), se agregó el anticuerpo primario α-CCR3, monoclonal de rata 500µg/ml que se usó a una dilución de 1/200 (RyD Systems, n° catálogo MAB155). Para realizar el control de isotipo se usó un anticuerpo hecho en rata IgG 2<sup>a</sup> (PharMingen, n° catálogo 553929). Las células se incubaron por 45 min a 4°C con los anticuerpos primarios. Terminada la incubación, las células se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS/BSA 3%. Luego las células se centrifugaron a 250 g por 6 minutos. Después se agregó el anticuerpo secundario α-rata-biotinilado de conejo 1/200, (1,5mg, n° catálogo BA-4000, Vector Laboratories) y las células se incubaron por 30 minutos a 4°C. Luego se lavaron las células al igual que en el paso anterior. Se agregó estreptavidina-PerCP 1/300 de concentración 0,2 mg/ml (BD Pharmingen, n° catálogo 554064) y α-goat-FITC de conejo, (Santa Cruz Biotechnology, n° catálogo sc-2777). Esta mezcla se incubó por 30 minutos, terminada la incubación las células se

lavaron como ya se ha descrito y se resuspendieron en 300µl de PBS/PFA 2%. Se procedió a analizar las muestras por citómetro de flujo (BD modelo FACS Calibur).

## 2.9 Permeabilización de células

Con el objetivo de evaluar por citometría de flujo el porcentaje de este receptor que se encuentran dentro de la célula (en el citoplasma), se procedió a permeabilizar las células. Brevemente, las células fueron fijadas en PBS/PFA 2% por 20 minutos a temperatura ambiente, después se lavaron y se resuspendieron en PBS/BSA 3% saponina 0.25% con la dilución de anticuerpo primario (ya descrita en la sección anterior) más 1µl de estreptavidina. Esta mezcla se incubó por 2 horas 4°C, se lavó y se le agregó el anticuerpo secundario en PBS/BSA 3% saponina 0.25% se incubó por 30 minutos a 4°C. Por último las células se lavaron en PBS/BSA 3% y se incubaron con streptavidina-PerCP en PBS/BSA 3% saponina 0.25% por 30 minutos a 4°C. Las células se volvieron a lavar con PBS/BSA 3%, se resuspendieron en 300µl de PBS/PFA 2% y se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta ser analizadas por citometría de flujo. Los anticuerpos, sus concentraciones y controles se realizaron como se describió en la sección anterior. Los análisis se realizaron con los programas CellQuest Pro, BD Biosciences, Winmdl 2.8 y Weasel v 2.3.1, GraphPad Prism 4.

## 2.10 Buffers

1- Fosfate Buffer Saline (PBS) pH 7,4

140 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2- Tris Buffer Saline (TBS) pH 8,0

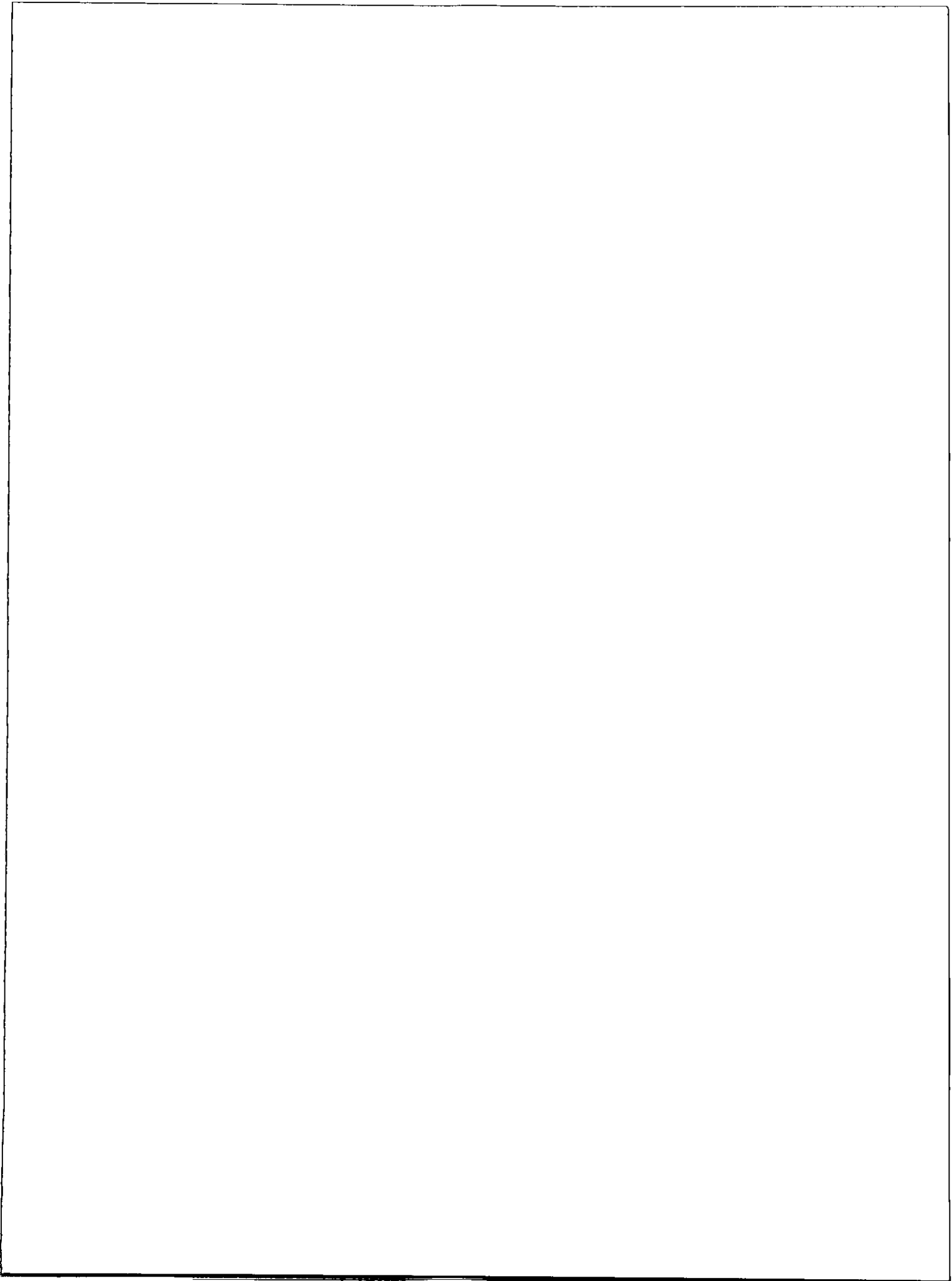
140 mM NaCl; 3 mM KCl; 20 mM Tris.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Detección de transcritos de receptores de quimioquinas en tejido normal y cáncer papilar de tiroides.

Con el objetivo de evaluar el perfil de expresión de receptores de quimioquinas en tejido tiroideo normal y en CPT, se analizó la presencia de RNA mensajero (mRNA) para los siguientes receptores de quimioquinas: CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR10, CXCR2 y CXCR4, se eligieron estos receptores porque se ha descrito su expresión en otros tipos de cáncer (tabla 3.1). Utilizando cDNAs sintetizados a partir de RNAs de tejido total, y con partidores específicos, se realizaron reacciones de PCR para amplificar los transcritos recién nombrados. En la figura 3.1 se muestra una fotografía donde se observan los productos de las primeras reacciones de PCR. Se detectó la presencia de amplificados de los tamaños esperados, para todos los receptores y en todos los pacientes analizados, tanto en tejido normal como tumoral (fig. 3.1). Este resultado nos llevó a pensar que la amplificación homogénea de los receptores de quimioquinas se podía deber al infiltrado linfocitario que existe en estos tejidos. Por lo tanto, para descartar la posible contaminación con células infiltradas, se decidió microdisecar los tejidos para extraer RNA sólo de células tiroideas. Luego se analizó la amplificación de los transcritos de los receptores de quimioquinas en muestras de 11 pacientes (fig. 3.2). A diferencia de las primeras muestras (fig. 3.1), no se observó banda para todos los pacientes. Sin embargo, al comparar las muestras de tejido normal y tumoral, no se identificó un patrón o preferencia por un tipo de tejido en la aparición de bandas de los receptores. En las figuras 3.1 y 3.2 se indican con un asterisco los pacientes que tienen metástasis en nodos linfáticos.

Se detectaron bandas del tamaño del amplificado de CCR3 en 5 pacientes, 2 de ellos en tejido normal y tumoral, dos pacientes solo en tejido normal y 1 paciente sólo en tejido tumoral. Una banda del tamaño del amplificado de CCR4 fue detectada en casi todos los pacientes (10 de 11), en 5 de ellos se detectó en ambos tejidos normal y tumoral, 2 solo en tejido normal y 3 sólo en tejido tumoral. Similar a CCR4 fue la detección de productos de amplificación del receptor CCR5, se observó banda en 10 pacientes, 5 de ellos en ambos tejidos, 3 pacientes sólo en tejido normal y 2 pacientes sólo en tejido tumoral. La amplificación de un producto del tamaño esperado para CCR7 fue detectada en 4 pacientes, todos en tejido normal y tumoral. Bandas del tamaño esperado para CCR10 fueron detectadas en 8 pacientes, en 2 pacientes se detectó sólo en tejido normal y en 4 pacientes se detectó sólo en tejido tumoral. No se observó amplificación de los transcritos de los receptores CCR6, CXCR2 y CXCR4 en muestras microdisecadas. Todos los productos de amplificación fueron de tamaño único y corresponden al tamaño esperado para los productos de amplificación de los receptores analizados, esto permite pensar que los amplificados corresponden efectivamente a los transcritos de los receptores. En la fig. 3.3 se muestra un resumen de los resultados que se exponen en la figura 3.2, en esta figura se puede apreciar la falta de un patrón definido en la detección de transcritos entre los tejidos normal y tumoral.





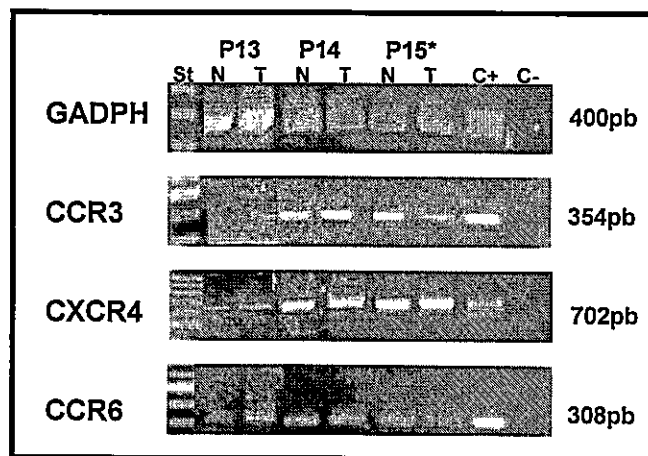
Receptor	Ligando	Cáncer	Metástasis frecuente	Expresión normal	Referencia
CCR3	CCL5,7,11,13,15,24,26,28	Renal, linfoma, leucemia LT	-	Eo, Bs, Th2, DC	Murdoch y col. 2000 Balkwill 2004
CCR4	CCL2,3,5,17,22	Leucemia LT	Piel	T, P	Murdoch y col. 2000 Balkwill 2004 Kakinuma 2006
CCR5	CCL3,4,5,8	Seno	-	T, M, MØ, DC	Murdoch y col. 2000 Balkwill 2004
CCR6	CCL20	Páncreas, renal	-	T, B, DC	Murdoch y col. 2000 Balkwill 2004
CCR7	CCL19,21	Colon, Seno, tiroides, gástrico, esófago, pulmón	Linfonodos	T, B, DC	Murdoch y col. 2000 Balkwill 2004 Kakinuma 2006
CCR10	CCL27,28	Melanoma	piel	Placenta, hígado	Murdoch y col. 2000 Balkwill 2004 Kakinuma 2006
CXCR2	CXCL1,2,3,5,6,7,8	Melanoma, renal	-	N,M,T,NK, As,Nn,Ms, En	Murdoch y col. 2000 Balkwill 2004
CXCR4	CXCL12	Más de 23 tipos de cáncer**	Linfonodos, pulmón, hueso	T,B,Ep,En, DC	Murdoch y col. 2000 Balkwill 2004

As: Astrocito  
B: Linfocito B  
Bs: Basófilo  
DC: Célula Dendrítica  
En: Célula endotelial

Eo: Eosinófilo  
Ep: Células Epitelial  
M: Monocito/Macrófago  
MØ: Macrófago  
Ms: Mastocito

N: Neutrófilo  
NK: Natural Killer  
P: Plaqueta  
Th2: Linfocito T helper 2  
T: Linfocito T

**Tabla 3.1: Receptores de quimioquinas expresados en cáncer.** En la tabla se muestra los distintos tipos de cáncer, en los que se ha descrito la expresión de los receptores de quimioquinas analizados en este trabajo.



**Figura 3.1: Detección de productos de PCR del tamaño esperado para los receptores de quimioquinas en muestras de tejido normal y tumoral.** En el cuadro se observa el resultado de RT-PCR de muestras de tejido total de los pacientes P13, P14 y P15. La primera columna, de izquierda a derecha, corresponde al estándar de peso molecular (St), la columna que sigue corresponde al tejido normal (N) y tumor (T) del paciente 13, seguido por las muestras de tejido normal y tumoral de los pacientes 14 y 15, por último se encuentra el control positivo (C+) que corresponde a RNA de tejido total y el control negativo (C-) que corresponde al mix sin templado. Los números a la derecha corresponden al peso molecular de los fragmentos amplificados.

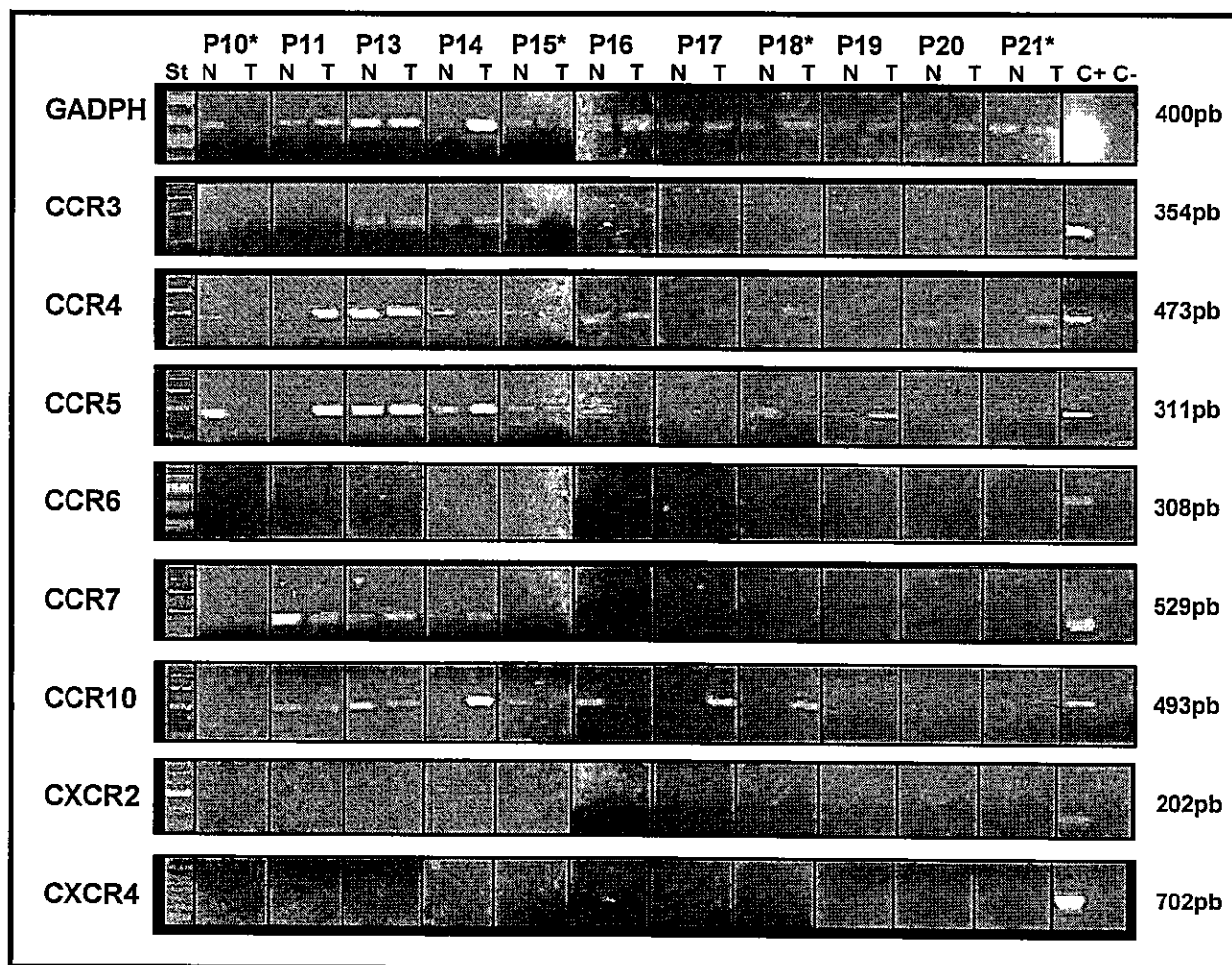
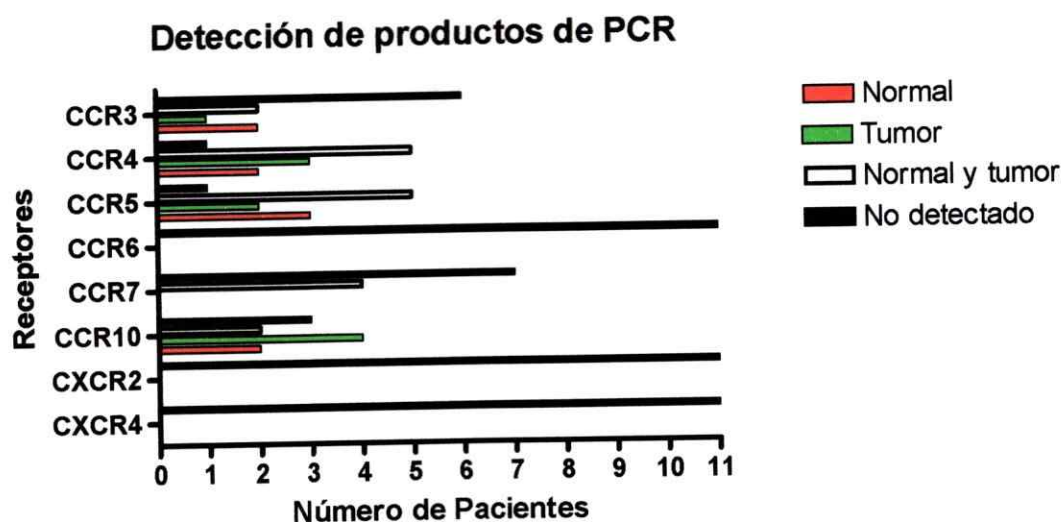


Figura 3.2: Detección de productos de PCR del tamaño esperado para los de receptores de quimioquinas en tejido microdisecado de cáncer papilar y tejido normal. En el cuadro se observa el resultado de RT-PCR de los pacientes 10-11 y 13-21. La primera columna, de izquierda a derecha, corresponde al estándar de peso molecular (St), la columna que sigue corresponde al tejido normal (N) y tejido tumoral (T) del paciente 10, seguido por las muestras de tejido normal y tumoral de los pacientes 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21(\* paciente con metástasis linfática), por ultimo se encuentra el control positivo (C+) que corresponde a RNA de tejido total y el control negativo (C-) que corresponde al mix sin templado. Los números a la derecha corresponden al peso molecular de los fragmentos amplificados.



**Figura 3.3: Detección de amplificados de los receptores de quimioquinas.** En el gráfico se muestra un resumen de los 11 pacientes analizados por RT-PCR (transcriptasa reversa). La barra negra corresponde al número de casos en que no fue detectado el producto de amplificación correspondiente al receptor, la barra blanca indica el número de muestras en las que se observó banda en el tejido normal y tumoral, la barra verde corresponde a la detección de banda solo en la muestra de tejido tumoral y la barra roja representa el número de muestras en las que se detectó el amplificado solo en tejido normal.

### **3.2 Análisis de la expresión de CCR3, CCR7 y CXCR4 en tejido normal y tumoral de tiroides por inmunohistoquímica.**

Dado que los estudios de expresión de mRNA no permitieron identificar diferencias, se optó por evaluar la expresión proteica de los receptores CCR3, CCR7 y CXCR4 por inmunohistoquímica. Se escogió estos receptores por que han sido directamente involucrados en la progresión tumoral de diversos tipos de cáncer (tabla 3.1) y metástasis a linfonodos en el caso de los receptores CCR7 y CXCR4 (Müller y col., 2001; Günther y col., 2005; Shields y col., 2007). Se muestra a continuación el resultado del análisis de 5 pacientes (26 a 30) (fig. 3.4, 3.5 y 3.6).

En la figura 3.4 se muestran fotografías de inmunohistoquímica del receptor CCR3 en cortes de tejido normal de tiroides, tejidos tumorales (CPT) y el control negativo (sin anticuerpo primario), el asterisco que aparece en algunos pacientes indica metástasis linfática. En los pacientes 26 y 27 se observó marca en los folículos de ambos tejidos normal y tumor (fig. 3.4, P26N, P26T, P27N y P27T). Se observó marca más intensa para CCR3 en los folículos del tejido tumoral del paciente 27 (fig. 3.4, P27T). En el tejido normal del paciente 28 se observó una marca débil en células parafoliculares y no se observó marca en las células foliculares (fig. 3.4, P28N). En el tejido tumoral se observó marca intensa en las células foliculares (fig. 3.4, P28T). En el tejido normal del paciente 29 se observó marca tanto en las células foliculares como en células infiltradas (fig. 3.4, P29N). En el tejido tumoral de este paciente se observó marca en las células foliculares (fig. 3.4, P29T). El paciente 30 presentó marca tanto en el tejido normal como el tumoral, aunque la marca fue mucho más intensa en las células foliculares del tejido tumoral (fig. 3.4, P30N y P30T).

En la figura 3.5 se muestran fotografías de inmunohistoquímica del receptor CCR7 en cortes de tejido normal, tumoral (CPT) y el control negativo (sin anticuerpo

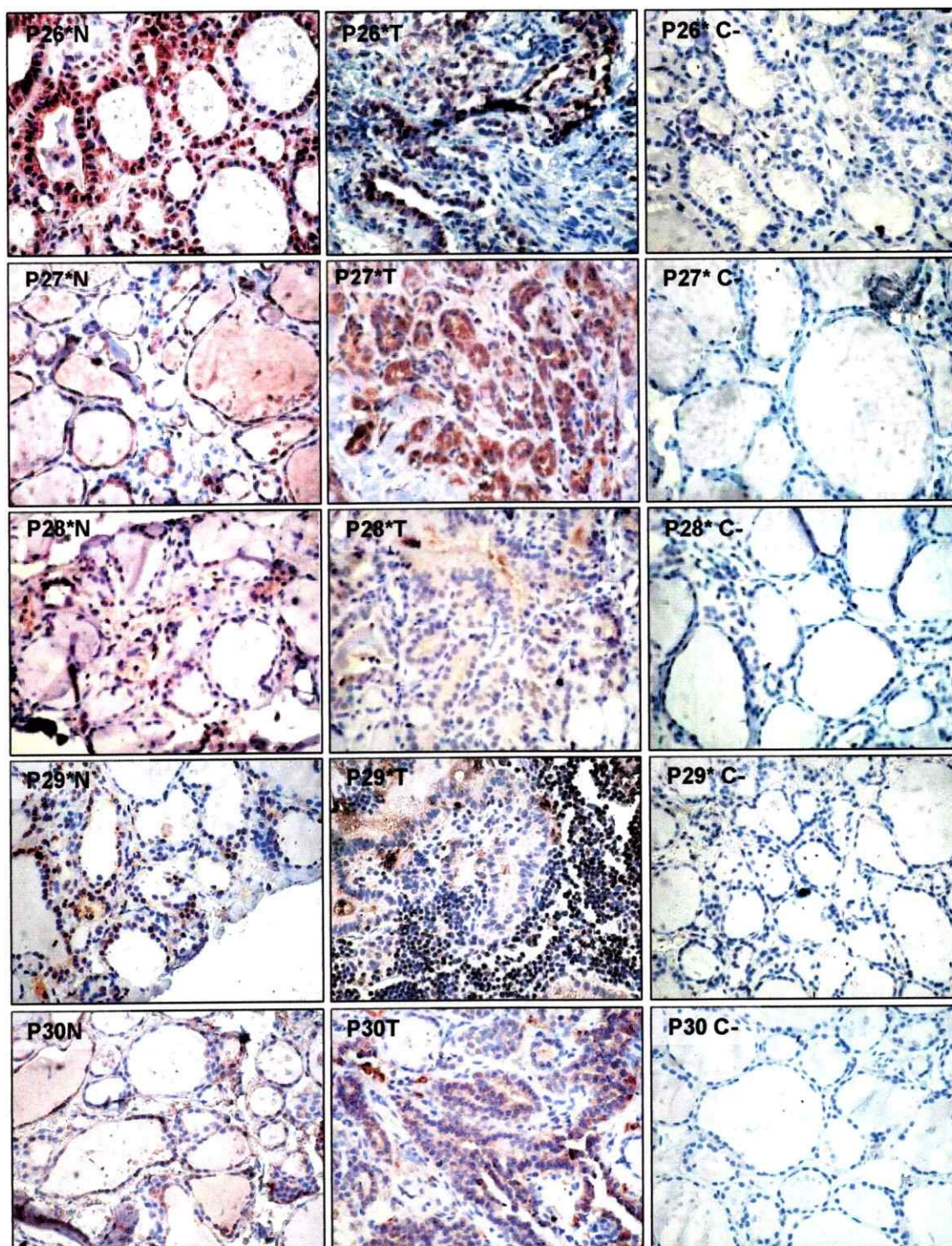
primario). El paciente 26 no presentó marca para CCR7 en tejido normal (fig. 3.4, P26N). En el tejido tumoral de este paciente se observó marca en algunas células, las que pueden corresponder a infiltrado inflamatorio (fig. 3.5, P26T). Los pacientes 27 y 28 no presentaron marca para CCR7 en el tejido normal (fig. 3.5, P27N, P28N), pero se observó marca del receptor en las células foliculares del tejido tumoral del paciente 27 (fig. 3.5, P27T). El paciente 29 no presentó marca en tejido normal ni tumoral (fig. 3.5, P29N y P29T). El paciente 30 presentó marca para CCR7 en células no foliculares del tejido tumoral (fig. 3.5, P30T).

En la figura 3.6 se muestran fotografías de inmunohistoquímica de CXCR4 en cortes de tejido normal, tumoral (CPT) y el control negativo (sin anticuerpo primario). Se observó una intensa marca para CXCR4 en las células foliculares de los tejidos normal y tumoral del paciente 26 (fig. 3.6, P26N y P26T). El paciente 27 no presentó marca en el tejido normal. Sin embargo, el coloide reaccionó positivamente con la tinción de DAB (fig. 3.6, P27N). El tejido tumoral del paciente 27 presentó una fuerte marca en las células que forman las papilas (fig. 3.6, P27T). El paciente 28 no presentó marca en el tejido normal ni en el tejido tumoral (fig. 3.6, P28N y P28T). En el paciente 29 se observó marca para CXCR4 solamente en algunas células que forman papilas en el tejido tumoral al igual que el paciente 30 (fig. 3.6, P29T y P30T).

Debido a la ausencia de marca en los controles negativos, podemos inferir que la marca observada es específica y corresponde a la detección de los receptores de quimioquinas.

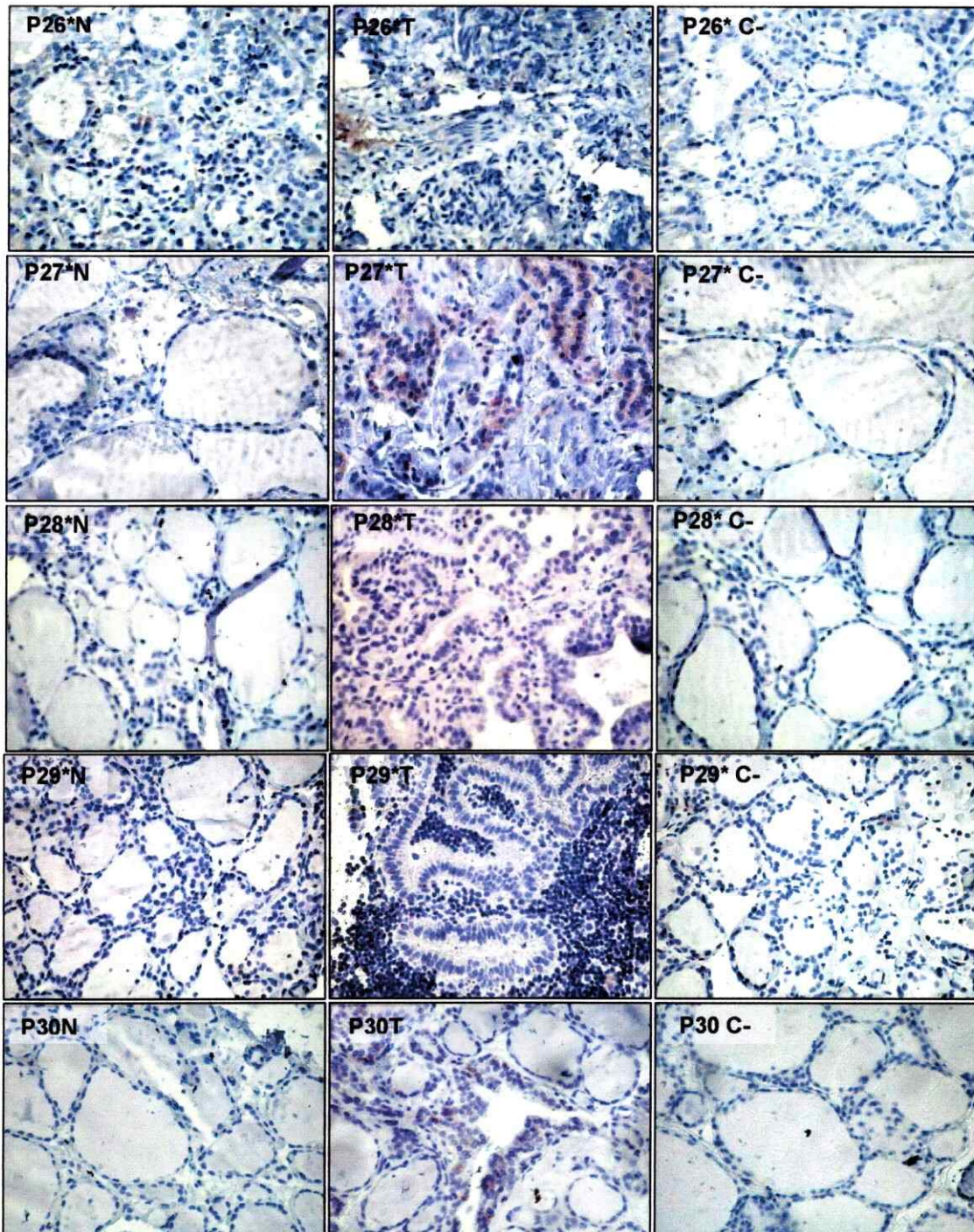
En la tabla 3.2 se resumen los resultados de inmunohistoquímica, en ella se muestra la ausencia o presencia de marca y su intensidad cualitativamente, observándose una mayor intensidad de la marca de los receptores CCR3 y CXCR4 en los tejidos tumorales, y la expresión de CCR7 exclusivamente en tejido tumoral.





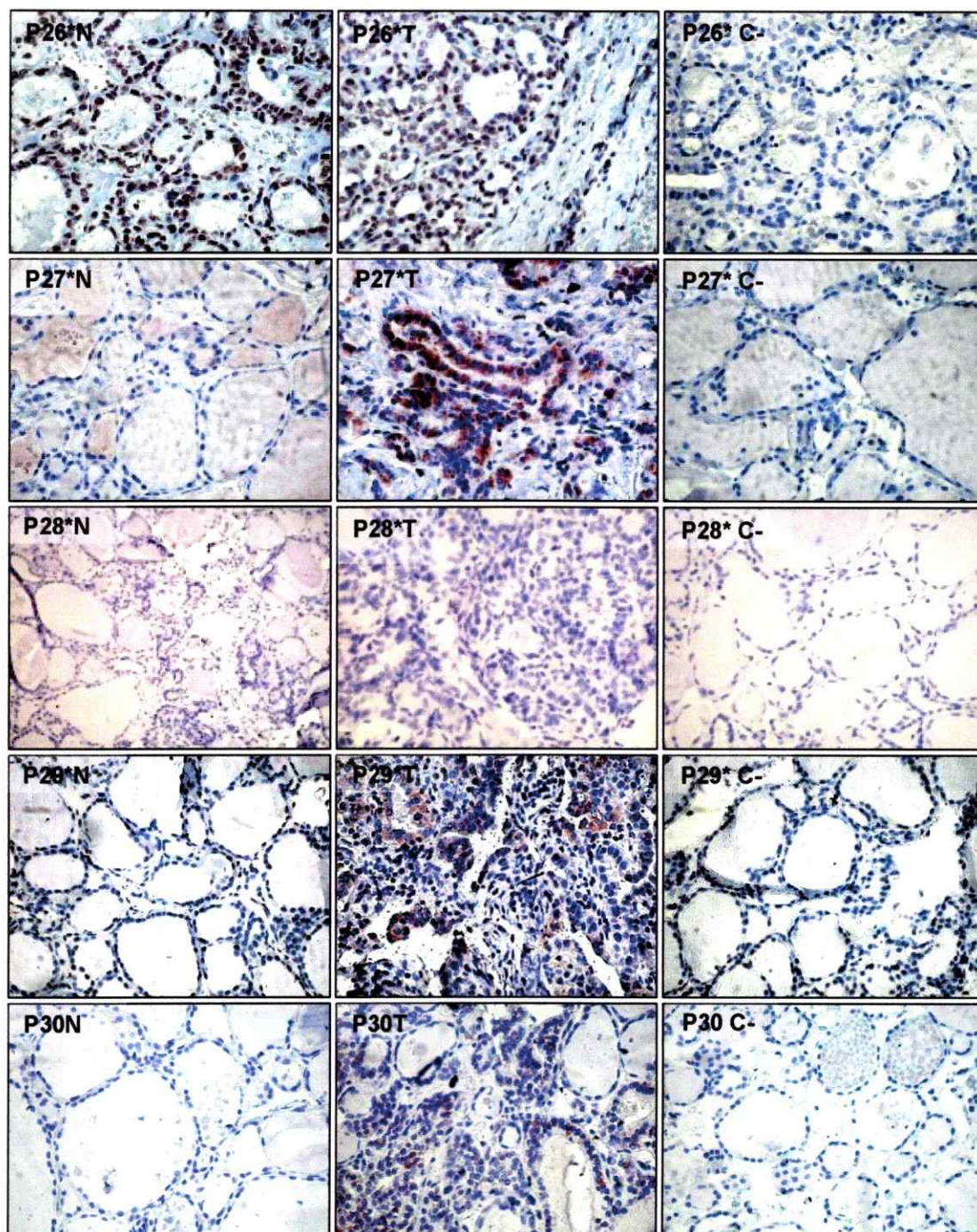
**Figura 3.4:** Inmunohistoquímica de CCR3 en tejido tiroideo normal y CPT de pacientes sometidos a tiroidectomía total. Se extrajeron las tiroides de los pacientes 26 al 30. De todos estos pacientes se aisló tejido normal (columna izquierda) (N); tejido con CPT (columna central) (T); y en la columna derecha se encuentran los controles negativos (C-) que corresponden al tejido normal en presencia de sólo el anticuerpo secundario. El asterisco indica que el paciente tiene metástasis en nodos linfáticos. Las inmunohistoquímicas fueron fotografiadas con un aumento de. (40X).





**Figura 3.5: Inmunohistoquímica de CCR7 en tejido tiroideo normal y CPT de pacientes sometidos a tiroidectomía total.** Se extrajeron las tiroides de los pacientes 26 al 30. De todos estos pacientes se aisló tejido normal (columna izquierda) (N); tejido con CPT (columna central) (T); y en la columna derecha se encuentran los controles negativos (C-) que corresponden al tejido normal en presencia de sólo el anticuerpo secundario. El asterisco indica que el paciente tiene metástasis en nodos linfáticos. Las inmunohistoquímicas fueron fotografiadas con una aumento de. (40X).





**Figura 3.6: Inmunohistoquímica de CXCR4 en tejido tiroideo normal y CPT de pacientes sometidos a tiroidectomía total.** Se extrajeron las tiroides de los pacientes 26 al 30. De todos estos pacientes se aisló tejido normal (columna izquierda) (N); tejido con CPT (columna central) (T); y en la columna derecha se encuentran los controles negativos (C-) que corresponden al tejido normal en presencia de sólo el anticuerpo secundario. El asterisco indica que el paciente tiene metástasis en nodos linfáticos. Las inmunohistoquímicas fueron fotografiadas con un aumento de. (40X).

Paciente	Receptor CCR3		Receptor CCR7		Receptor CXCR4		Morfología	
	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor
P26*	++	++	-	+	+	+	Folículos definidos	Papilas poco definidas, núcleo celular de gran tamaño y con presencia de invaginaciones, metástasis
P27*	+	++	-	++	-	++	Hiperplasia folicular	Papilas definidas, metástasis pequeña
P28*	+	+	-	-	-	-	Hiperplasia folicular	No se observan papilas definidas, metástasis pequeña
P29*	+++	++	-	-	-	+	Folículos definidos	Papilas definidas, metástasis pequeña
P30	++	+++	-	+	-	-	Hiperplasia folicular, con infiltrado leucocitario	No se observan papilas definidas

**Tabla 3.2: Resumen del análisis cualitativo de los tejidos mediante inmunohistoquímica.** Los símbolos utilizados indican la cantidad de expresión: (-) Ausente; (+) Limitada; (++) Abundante; y (+++) Muy abundante.

### 3.3 Cuantificación de CCR3 por Citometría de flujo.

Con el fin de cuantificar la expresión del receptor CCR3, se analizaron muestras de los pacientes 22, 24 y del 26 al 31 por citometría de flujo, el asterisco al lado del número del paciente indica metástasis linfática. La citometría de flujo fue realizada a células sin cultivar. En las primeras muestras (pacientes 22, 24 y 26) se utilizó células provenientes de tiroides disgregadas con colagenasa. En los pacientes 22 y 24 no se detectó inmunorreactividad para el receptor CCR3 en células de tejido normal ni en células de tejido tumoral, sólo en el paciente 26 se detectó fluorescencia para CCR3 en un pequeño porcentaje (resultado que no concordaba con lo esperado, según lo visto por inmunohistoquímica). Este resultado nos llevó a pensar que la colagenasa podría estar afectando la detección del epítipo de la membrana. Por esta razón las siguientes muestras de tiroides se disgregaron mecánicamente con bisturí. Luego de disgregar las células en medio de cultivo, se centrifugaron y posteriormente se incubaron con el anticuerpo específico para el receptor CCR3. Se utilizó un anticuerpo contra el receptor de TSH, como marcador de tirocitos, lamentablemente no logramos una buena marca de este receptor (resultados no mostrados) y los resultados se muestran tomando el total de células obtenidas de cada muestra. En el citómetro se seleccionó una población de células vivas, basados en el tamaño celular y la complejidad de la membrana, utilizando los parámetros FSC (Forward Scatter) y SSC (Side Scatter), respectivamente. En esta población (R1) se analizó la marca para el receptor de quimioquina.

Del paciente 26 se analizó células provenientes de tejido normal, tumoral y ganglionar (fig. 3.7). Como se menciona antes, esta muestra fue disgregada con colagenasa y se observó un bajo porcentaje de células que unieron el anticuerpo específico para CCR3 en todos los tejidos (fig. 3.7, B).

El paciente 27 presentó un porcentaje levemente más alto de células que presentaron inmunorreactividad en el tejido tumoral (fig. 3.8, B). El paciente 28 también presentó mayor porcentaje en el tejido tumoral, pero la diferencia es mucho mayor que en el paciente 27 (fig. 3.8, B).

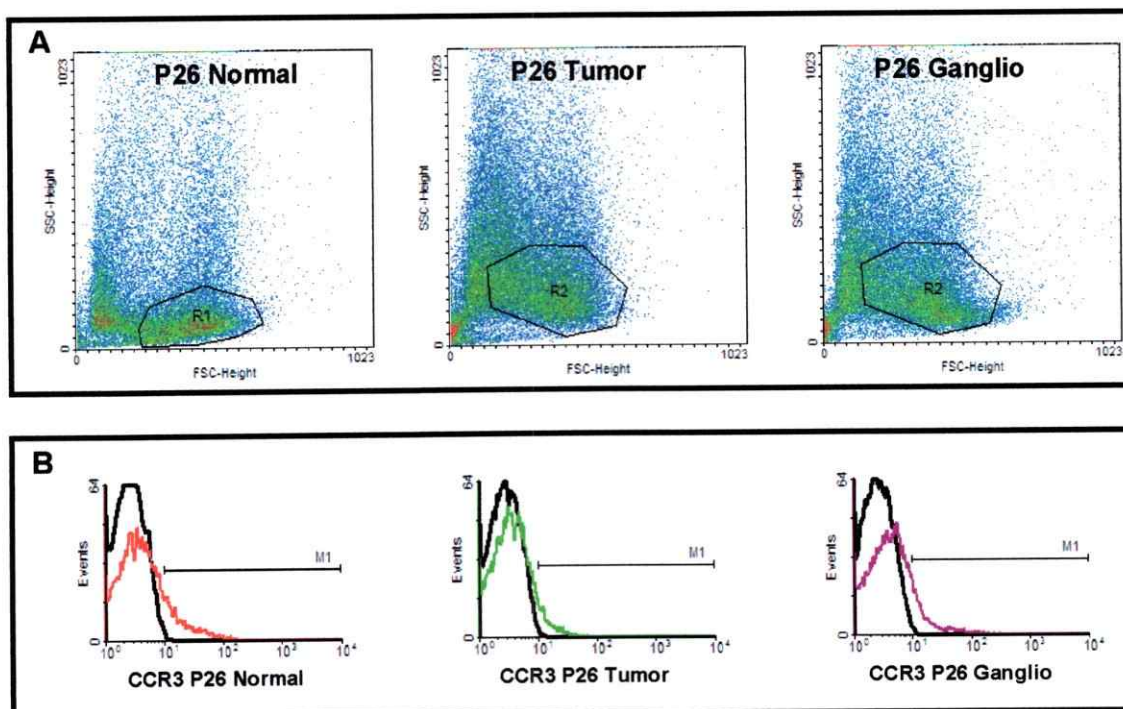
Dado que buscamos receptores de membrana, pensamos que podrían también encontrarse en el citoplasma (tráfico o almacenamiento). Por esta razón a partir del paciente 29, se separó la mitad de las células de cada muestra, una mitad se usó para la tinción normal y la otra mitad se permeabilizó.

Una vez fijadas las células, se permeabilizó la mitad de las muestras y se repitió el protocolo de tinción, de esta manera se suma la marca de CCR3 en el citoplasma, a la señal que proviene de la marca de CCR3 en la membrana. El paciente 29 presentó mayor marca de CCR3 en el tejido tumoral, en las muestras no permeabilizadas (fig. 3.9, B) y se observó marca a nivel citoplasmático de CCR3 tanto en tejido normal como tumoral, siendo levemente mayor en el tejido normal (tabla 3.3). En el paciente 30 se observó un mayor porcentaje de células que unieron el anticuerpo contra CCR3 en el tejido tumoral, esta diferencia también se observó en las muestras permeabilizadas. El paciente 31 presentó niveles de inmunorreactividad similares en tejido normal y tumoral, siendo ligeramente mayor en el tejido normal, las muestras permeabilizadas de este paciente también presentaron una pequeña diferencia en el porcentaje de células que presentan marca, pero el tejido tumoral es el que presentó mayor porcentaje (fig. 3.9).

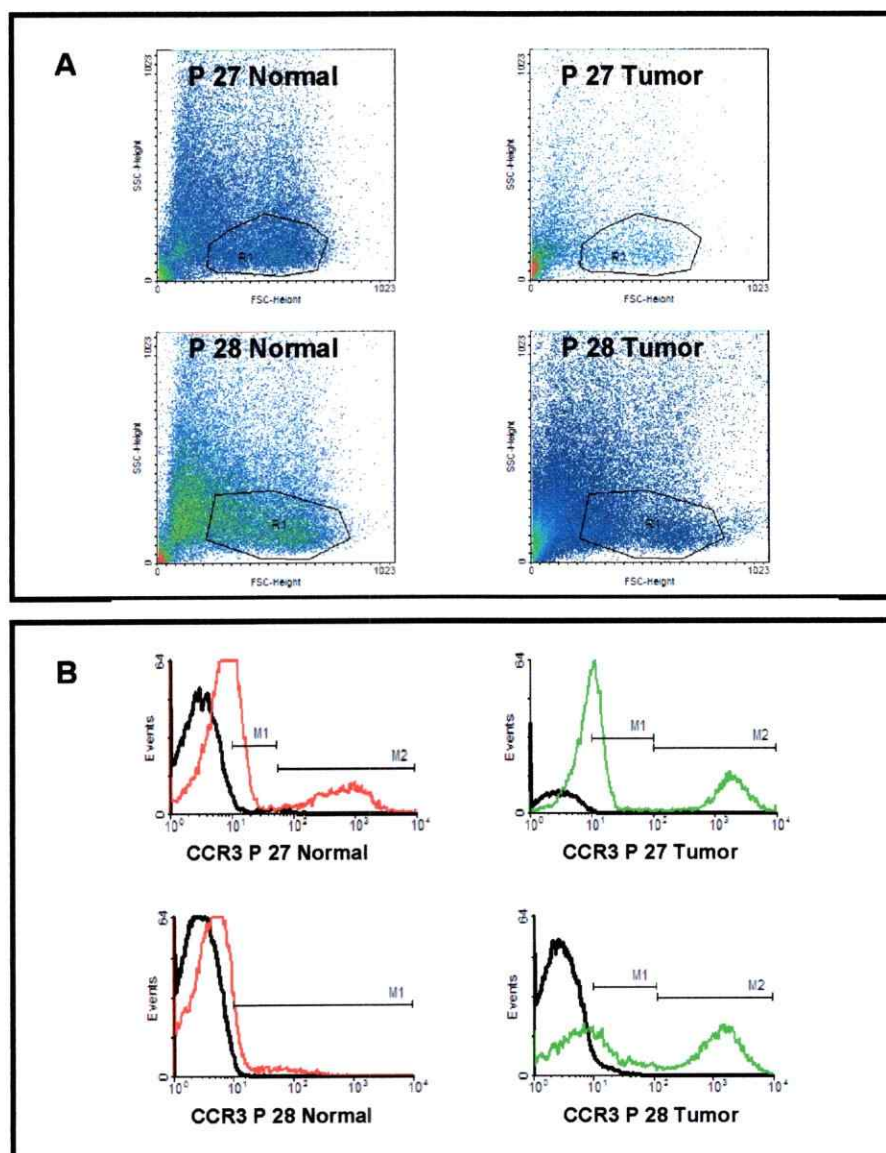
En la tabla 3.3 se muestran los porcentajes de células que presentan fluorescencia como resultado de la unión del anticuerpo específico contra CCR3 en cada paciente, donde se observa un mayor porcentaje de células marcadas en el tejido

tumoral con respecto al normal y un gran porcentaje de células que presentan el marcador intracelularmente en ambos tejidos.

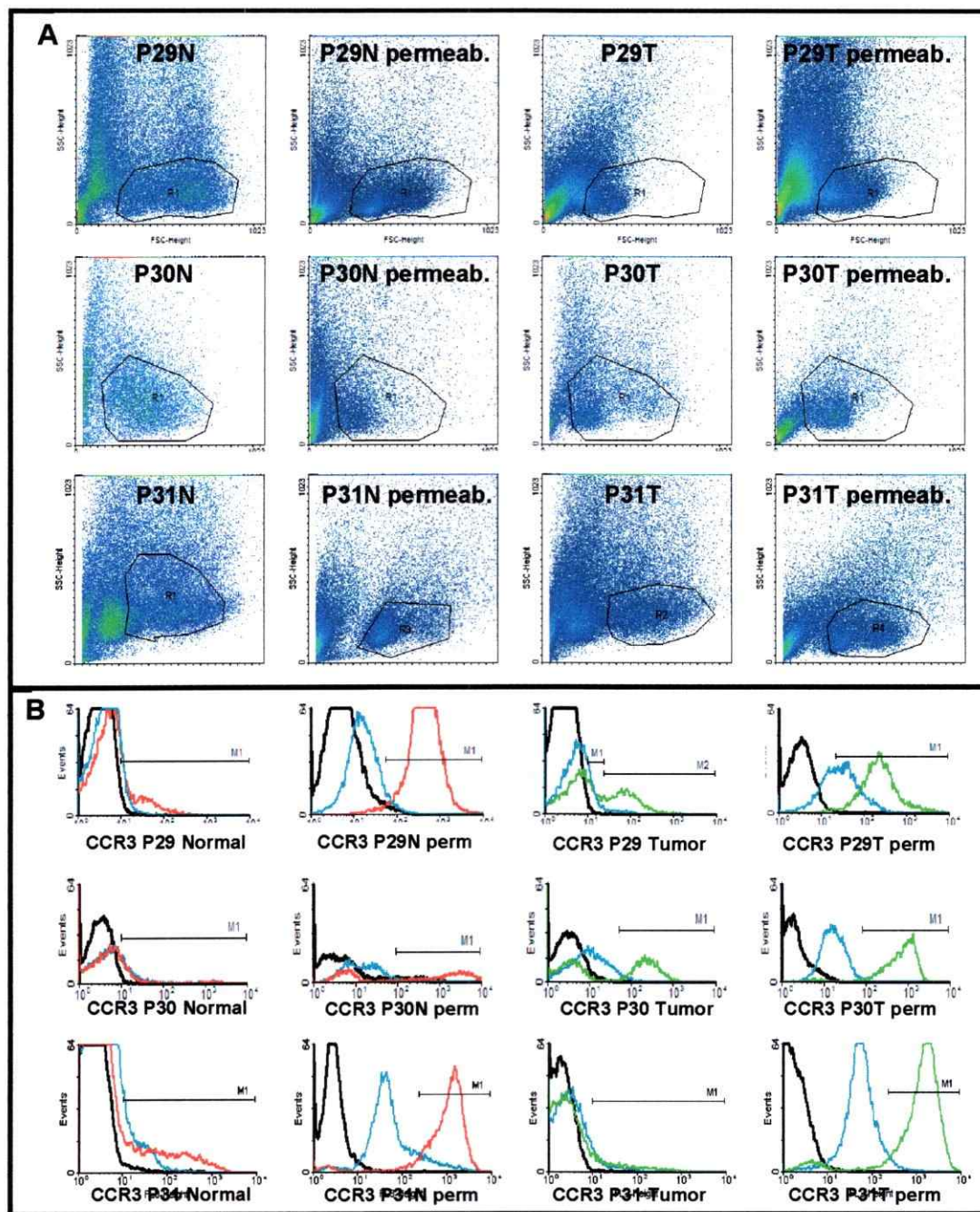




**Figura 3.7: Citometría de flujo paciente 26\*.** A) La zona cerrada (R1) representa la población de células a analizar la expresión de los receptores. B) Histogramas que muestran la unión del anticuerpo específico para el receptor CCR3. La línea negra corresponde a la autofluorescencia, la línea roja corresponde a la detección del receptor en el tejido normal de tiroides, la línea verde corresponde a la detección del receptor en el tejido tumoral, y la línea violeta corresponde a la detección del receptor de quimioquina en el tejido ganglionar (control positivo).



**Figura 3.8: Citometría de flujo pacientes 27\* y 28\*.** A) La zona encerrada representa la población de células a analizar la expresión de los receptores. B). Histogramas que muestran la unión del anticuerpo específico para el receptor CCR3. La línea negra corresponde a la autofluorescencia; la línea roja corresponde a la detección del receptor en el tejido normal de tiroides; la línea verde corresponde a la detección del receptor en el tejido tumoral.



**Figura 3.9: Citometría de flujo pacientes 29\*, 30 y 31\*.** A) La zona encerrada representa la población de células a analizar la expresión del receptor. B) Histogramas que muestran la unión del anticuerpo específico para el receptor CCR3. La línea negra corresponde a la autofluorescencia de las células; la línea roja a la detección del receptor en el tejido normal de tiroides; la línea verde claro a la detección del receptor en células tumorales y la línea verde oscuro corresponde a la fluorescencia debida a la unión inespecífica del anticuerpo secundario a las células. De izquierda a derecha: tejido normal no permeabilizado, tejido normal permeabilizado, tejido tumoral no permeabilizado y tejido tumoral permeabilizado.



Tejido	P26*	P27*	P28*	P29*	P30	P31*
Normal	17,27	20,68	11,47	14,93	23,68	19,04
Tumor	8,18	28,43	21,20	33,03	50,20	14,39
Normal Permeabilizado				98,43	54,53	86,19
Tumor permeabilizado				96,02	90,93	87,35

**Tabla 3.3: Porcentaje de células que unieron el anticuerpo contra CCR3, en las muestras analizadas por citometría de flujo.** La tabla muestra los porcentajes de células que unieron el anticuerpo contra CCR3 en cada paciente y en cada tejido. No se muestra en la tabla el porcentaje de las células de ganglio (14,20%). (\*) Pacientes con metástasis en nodos linfáticos.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Detección de transcritos de receptores de quimioquinas en tejido normal y cáncer papilar de tiroides.

Existen numerosos receptores de quimioquinas, muchos de los cuales han sido involucrados en el desarrollo de células tumorales. En este estudio, se escogió receptores que están asociados en la progresión de distintos tipos de cáncer. Para analizar el perfil de expresión de receptores de quimioquinas realizamos RT-PCR (transcriptasa reversa) en muestras de pacientes con CPT y en tejido normal extraído del mismo paciente. Se analizó la expresión de los mRNA de los siguientes receptores: CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR10, CXCR2 y CXCR4. Contrario a lo esperado, en las primeras muestras analizadas no fue posible distinguir un patrón en los productos de amplificación de receptores, puesto que se observaron bandas en todas las muestras analizadas y para todos los receptores analizados. Debido a que estos tejidos tienen abundante infiltrado linfocitario, pensamos que gran parte de la expresión de receptores de quimioquinas se localiza en linfocitos y no en células tumorales. (Simchen y col., 2000; Tsuge y col., 2005). Distintas subpoblaciones de linfocitos expresan normalmente los receptores de quimioquinas que analizamos en este estudio (Beaulieu y col., 2002; Müller y col., 2002). Por esta razón decidimos microdisecar las muestras para tratar de seleccionar sólo tirocitos. En la práctica el proceso de microdisección no siempre fue del todo eficiente, ya que en algunos casos había un exceso de infiltrado muy difícil de eliminar. Además, no pudimos eliminar el tejido linfocitario que se encontraba en las capas interiores del tejido.

El amplificado del receptor CCR3 se detectó en 5 pacientes. No se observó una preferencia por el tejido tumoral. Tampoco observamos diferencias en los amplificados del receptor CCR3 (presencia o ausencia de banda), entre los pacientes con o sin metástasis linfáticas (fig. 3.2). El receptor CCR3 se expresa en células T en procesos de leucemia (Balkwill, 2004) y en cáncer renal (Jöhrer y col., 2005). Este receptor también se expresa en diferentes linajes de células dendríticas (Beaulieu y col., 2002), que podrían estar infiltrando tumores. Es posible que la falta de un patrón de amplificación específico del transcrito de CCR3 se deba a la inducción generalizada de este receptor por la presencia de alguno de sus ligandos, expresado por células dendríticas presentes en la tiroides (Tsuge y col., 2005) o por otras células infiltradas.

Se ha descrito la presencia del receptor CCR4 en leucemia de linfocitos T y está involucrado en procesos de metástasis a la piel (tabla 3.1). Este receptor fue detectado en la mayoría de los pacientes. No se observó diferencias en la amplificación del transcrito para CCR4 entre tejido normal y tumoral. Los pacientes que presentaban metástasis linfáticas también presentaron amplificados de este receptor en tejido normal y tumoral, sólo un paciente presentó amplificado del transcrito únicamente en el tejido normal.

Se ha observado la expresión del receptor CCR5 en cáncer de seno y hasta ahora no se ha asociado a metástasis a tejidos específicos (tabla 3.1). El transcrito de este receptor presenta el mismo patrón observado para el transcrito de CCR4 en los pacientes con metástasis linfáticas.

La expresión del receptor CCR7 ha sido descrita en varios tipos de cáncer y asociada a metástasis a linfonodos, como en el cáncer de mama, en leucemia linfocitaria CLL (Chronic lymphocytic leucemia), y cáncer gástrico (Mashino y col., 2002; Müller y col., 2001; Ruffini, 2007). Normalmente el receptor CCR7 está

involucrado en el tráfico de linfocitos y células dendríticas (Zlotnik y col., 2000). En este estudio no se observó un patrón en la detección de los transcritos de este receptor en los pacientes con metástasis linfáticas. Estos resultados apoyaron los resultados del grupo de Sancho (Sancho y col., 2006). Estos autores no encontraron diferencias significativas en los niveles de mRNA de CCR7 entre tejido normal y tumoral tampoco hay diferencias entre pacientes con o sin metástasis.

Se ha descrito la expresión de CCR10 en melanoma y se ha relacionado con metástasis a la piel. Observamos amplificadas del transcrito de este receptor preferentemente en tejido tumoral, pero no hay un patrón en los pacientes con metástasis.

CXCR4 se ha descrito en más de 23 tipos distintos de cáncer (Murdoch y Finn, 2000; Burger y col., 2006), también participa en el tráfico de linfocitos a nodos linfáticos (Balkwill, 2004). Además se ha demostrado la expresión de CXCR4 en cáncer anaplásico de tiroides (Hwang y col., 2003). Se ha observado que la expresión de CXCR4 en CPT es inducida por la oncoproteína RET/PTC, mutación presente frecuentemente en CPT. (Castellone y col., 2004). Contrario a lo esperado según los antecedentes expuestos, no se detectó productos de PCR para el mRNA de CXCR4.

En resumen el análisis de nuestros resultados indica que no existe un patrón definido en el amplificado de los transcritos de los receptores de quimioquinas entre los tejidos normal y tumoral. Estos resultados carecen de un control de RT-PCR adecuado, como se observa en la figura 3.2. El control de RT-PCR corresponde a la detección del transcrito de GDPH. Cómo puede observarse en algunas muestras GDPH fue apenas detectable. Esto se debe a que en el proceso de microdissección se pierde muestra de tejido y por tanto de RNA total. Frente a la pérdida de tejido decidimos realizar el análisis de RT-PCR sin determinar la concentración de RNA total usado en el ensayo.

Lo que nos llevan a pensar que en algunos pacientes la cantidad de mRNA, correspondiente al receptor analizado, pudo estar por debajo del límite de detección de la técnica y por esta razón concluimos que el método de RT-PCR no es un método de análisis adecuado para la detección del transcrito de los receptores de quimioquinas en estas condiciones de trabajo. Cabe destacar que al referirnos a diferencias queremos decir presencia o ausencia de banda para los productos de amplificación.

#### **4.2 Análisis de la expresión de CCR3, CCR7 y CXCR4 en tejido normal y tumoral de tiroides por inmunohistoquímica.**

La regulación de la expresión de los receptores de quimioquinas puede ocurrir a nivel transcripcional y/o post-transcripcional. Por lo tanto, además de analizar la expresión de los transcritos se analizó la expresión proteica de los receptores CCR3, CCR7 y CXCR4. Se eligieron estos receptores debido a que se ha descrito su participación en otros tipos de cáncer, además se ha descrito la participación de CCR7 y CXCR4 en metástasis a los nodos linfáticos (Müller y col., 2001; Balkwill, 2004; Tanaka y col., 2005; Zlotnik, 2006).

El análisis de tejidos tiroideos por inmunohistoquímica para el receptor CCR3, mostró inmunorreactividad en todos los pacientes analizados, tanto en tejido normal como tumoral (fig. 3.4). Cualitativamente observamos mayor inmunoreactividad para el receptor de CCR3 en el tejido tumoral con respecto al tejido normal, sugiriendo mayor expresión de este receptor en CPT. La expresión del receptor CCR3 se ha relacionado con etapas avanzadas de cáncer de mama (Luboshits, 1999). También se ha visto que CCL5 (ligando de CCR3, también llamado RANTES) es expresado en distintas líneas celulares de cáncer de tiroides, incluyendo la línea de CPT 8505C (Simchen, 2000). Es importante tener en consideración que el tejido normal corresponde al tejido de tiroides

del lóbulo opuesto al tumor del mismo paciente. Por lo tanto, la expresión del receptor en el tejido normal puede deberse a que este tejido está en proceso de transformación maligna. Un mejor control para este experimento es evaluar la expresión de CCR3 en tiroides de pacientes operados por enfermedad benigna. No hay estudios que relacionen este receptor con metástasis, tampoco se ha descrito la presencia de este receptor en cultivos primarios de cáncer de tiroides, sin embargo se ha descrito en cáncer renal, relacionando su nivel de expresión con el grado de malignidad de las células tumorales (Jöhrer y col., 2005).

El análisis inmunohistoquímico para el receptor CCR7 indicó inmunorreactividad en el tejido tumoral en dos de los cinco pacientes analizados (tabla 3.2). En el paciente 26 se observó una marca que podría corresponder a células inflamatorias (Tsuge y col., 2005). Es importante destacar que no se detectó la presencia de este receptor en tejido normal de ningún paciente. En el paciente 27 se observó una marca bien definida en las papilas, cabe destacar que este paciente presenta metástasis linfáticas. Excepto por un sólo paciente, todos los otros pacientes presentaron metástasis. CCR7 ha sido asociado a metástasis a linfonodos en cáncer gástrico (Mashino y col., 2002). Gunn demostró que la quimioquina homeostática CCL21, ligando de CCR7, se expresa abundantemente en células endoteliales y células T de las regiones paracorticales de los nodos linfáticos. CCL21 es responsable de la atracción de células CCR7 positivas (Gunn y col., 1998). Durante el desarrollo de este trabajo se publicó un artículo donde se demuestra la relación de CCR7 con la predominancia de metástasis linfáticas en cáncer de tiroides (Sancho y col., 2006). En el cual se muestra que la expresión de CCR7 es más alta en cáncer papilar de tiroides que en cáncer folicular y que la expresión de este receptor en células tumorales es regulada por condiciones extracelulares, como la falta de nutrientes. Además mostraron que CCL21 estimula la

migración, invasión y proliferación de células tumorales de la línea TPC-1 (Sancho y col., 2006).

Se observó inmunorreactividad para el receptor CXCR4 en el tejido tumoral en 4 de 5 pacientes (fig. 3.6). Llama la atención que sólo el paciente 26 presentó marca para el receptor en el tejido normal y con una señal muy intensa (tabla 3.2). Dada la información disponible de este receptor y su relación con cáncer y metástasis esperábamos encontrar una marcada presencia en los pacientes con metástasis linfáticas. Efectivamente, en nuestro estudio confirmamos esos estudios al encontrar una mayor expresión de CXCR4 en pacientes con metástasis. La expresión de este receptor se ha relacionado con metástasis a medula ósea, nodos linfáticos y pulmón (tabla 3.1). No se encontró expresión de este receptor en el paciente 28 a pesar de tener metástasis pequeña y en el paciente 30 se observó células infiltradas CXCR4<sup>+</sup>.

#### **4.3 Cuantificación de la expresión de CCR3 por Citometría de flujo.**

Puesto que no se ha descrito la expresión de CCR3 en cáncer papilar de tiroides, decidimos cuantificar la expresión de este receptor por citometría de flujo. Cabe destacar que para los análisis de citometría de flujo se utilizaron células que no fueron cultivadas, de esta manera se evitó que el proceso de cultivo celular afectara la expresión de los receptores.

La disgregación del tejido se realizó con la enzima colagenasa hasta el paciente 26 (pacientes 22 y 24 no mostrados) y del paciente 27 en adelante el tejido se disgregó de forma mecánica. Análisis del paciente 26 (figura 3.6) mostró inmunorreactividad para CCR3 en células normales y ganglio. Estos datos no confirman los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, donde se observa una intensa marca del receptor en tejido normal y tumoral. En los pacientes 29 y 30 se observó inmunorreactividad en

ambos tipos de células tanto tumorales como normales. La fluorescencia detectada para CCR3 fue mucho mayor en células tumorales, en relación a la intensidad de fluorescencia y al porcentaje de células marcadas. A partir del paciente 29 las células se separaron en dos partes. Una parte se utilizó para observar la expresión del receptor en la membrana (células no permeabilizadas). La segunda parte se permeabilizó para detectar el receptor que se localiza intracelularmente. En forma llamativa, se observó un elevado porcentaje de células marcadas y con alta intensidad de fluorescencia en células normales de los pacientes evaluados (tabla 3.3), lo que sugiere una alta concentración del receptor al interior de las células. Al comparar la inmunorreactividad en células normales con la de células tumorales, se observó que la marca de CCR3 es ligeramente mayor en estas últimas. Las diferencias en la inmunorreactividad de CCR3 entre células normales y tumorales es mayor en las muestras no permeabilizadas. Este resultado podría estar indicando que se esté sintetizando una mayor cantidad de CCR3 que se mantiene intracelularmente. Otra posibilidad es que exista una mayor cantidad de CCR3 intracelular debido a que el receptor se está internalizando más frecuentemente debido a la interacción con su ligando. Esto último también ha sido descrito en una línea celular de cáncer de riñón (A-498), (Jöhrer y col., 2005). Por otra parte se ha descrito una alta expresión de CCR3 en el citoplasma de células dendríticas, lo que indica el almacenamiento de este receptor posiblemente para un rápido intercambio a nivel de membrana (Beaulieu y col., 2002).

Es posible que la alta expresión de CCR3 en células normales y tumorales sea causada por una alta expresión de citoquinas y/o quimioquinas inflamatorias en el ambiente del tumor ya sea por la inflamación causada por la infiltración de células o por alguna otra patología de la tiroides asociada al tumor. Se ha visto también que la



expresión de este receptor estimula la proliferación y supervivencia de células tumorales (Jöhrer y col., 2005).

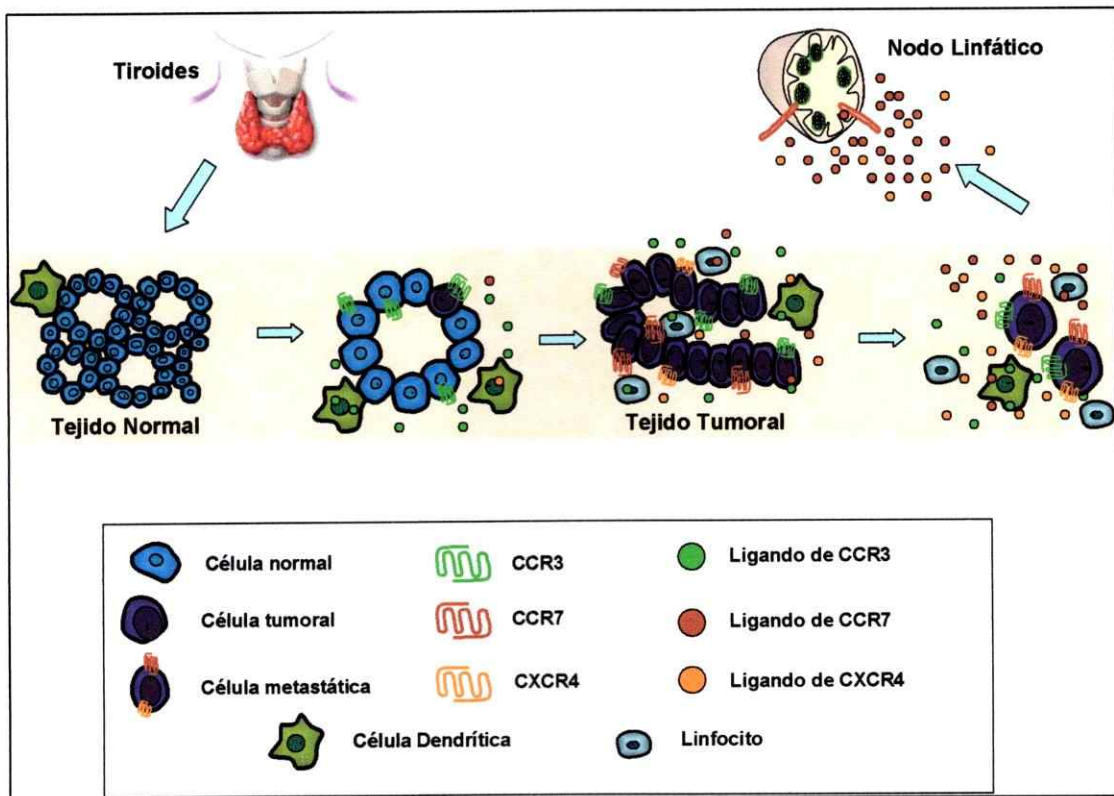
Los resultados indican que existe una tendencia a aumentar la expresión de receptores de quimioquinas en las células tumorales de PTC. Las células tumorales también pueden liberar quimioquinas, ya que se ha visto que células tumorales de CPT expresan MIP-3 $\alpha$  (Tsuge y col., 2005), lo que podría contribuir a la expresión de receptores de quimioquinas en el micro ambiente tumoral que estén ayudando al desarrollo del mismo.

### Perspectivas

La influencia de las quimioquinas en el potencial metastático y diseminación sitio-específica de las células tumorales ha cobrado gran interés gracias a la asociación entre el patrón de expresión de receptores de quimioquinas y la malignidad del cáncer. La metástasis es un proceso complejo, que puede llegar a ser mortal, y que no ocurre al azar, es órgano-específico y requiere el cumplimiento de etapas secuenciales por el cual las células tumorales pueden lograr su consolidación (Chambers y col., 2002; Kakinuma y col., 2006). Los mecanismos celulares y moleculares que regulan la invasión local y el proceso de metástasis hacia los linfonodos son desconocidos (Jen-Der Lin, 2007). Se ha sugerido en distintas publicaciones que las quimioquinas y sus receptores pueden jugar un rol crucial en el proceso de regulación y destinación de metástasis órgano-específicas (Philip y Murphy 2001; Müller y col., 2001; Liotta 2001; Scotton 2001; Chambers 2002; Balkwill 2004), recientemente se ha demostrado la expresión de receptores de quimioquinas funcionales en varios tipos de células tumorales (Müller y col., 2001).

El conocimiento específico de los receptores expresados en el tumor y la relación entre el patrón de expresión y el progreso del tumor podría permitir el desarrollo de terapias basadas en quimioquinas y/o inhibidores de los receptores de quimioquinas, llegando incluso a prevenir metástasis distantes o a linfonodos.

Basados en estos resultados y recopilando la evidencia actual podemos proponer el siguiente modelo (fig.4.1), donde se muestra la presencia de quimioquinas que podrían ser liberadas por células que infiltran el tejido, entre ellas, dendríticas y linfocitos. Estas quimioquinas podrían estar induciendo la expresión de receptores y contribuyendo al proceso de transformación maligna. Finalmente el patrón de expresión de receptores de quimioquinas en las células malignas estaría determinando la especificidad y capacidad de sobrevivir en el tejido donde se desarrolla la metástasis.



**Figura 4.1: Modelo de metástasis a nodos linfáticos en CPT.** En la figura se muestran algunos factores involucrados en la metástasis órgano-específica de CPT.

## 5. CONCLUSIONES

- La metodología de RT-PCR no mostró un patrón definido en la expresión de los transcritos para los receptores de quimioquinas.
- Los análisis realizados por inmunohistoquímica sugieren que los receptores CCR3 y CXCR4 se expresan tanto en tejido normal como tumoral, pero con una tendencia a mayor concentración en el tumor.
- Se observó inmunorreactividad para el receptor CCR7 sólo en tejido tumoral, y en particular en pacientes con metástasis, lo que sugiere que su expresión podría ser utilizada como marcador tumoral.
- Se observó un aumento en la fluorescencia detectada del receptor CCR3 en las células tumorales de todos los pacientes, lo que sugiere que este receptor se sobre expresa en el tejido tumoral.
- Los análisis de las muestras de tejido permeabilizado muestran un alto porcentaje de células marcadas con una alta intensidad de fluorescencia para el receptor CCR3, lo que sugiere que este receptor también se encuentra expresado en tejido normal, pero se encuentra en el citoplasma.

## 6. REFERENCIAS

1. Allen S., Crown S., Handel T. 2007. *Annu. Rev. Immunol.* **25**:787-820.
2. Al-Brahim N., Asa S. 2006. *Arch Pathol Lab Med.* **130**:1057-1062.
3. Balkwill F. 2004. *Semin Cancer Biol.* **14**(3):171-179.
4. Beaulieu S., Robbiani D., Du X., et al. 2002. *The J. of Immunology* **169**(6):2925-36.
5. Burger J. A., Kipps T. J. 2006. *Blood* **107**(5):1761-1767.
6. Canol N., Montoya C. 2001. *IATREIA.* **14**(1):57-72.
7. Castellone M. D., Guarino V., De Falco V., et al. 2004. *Oncogene* **23**:5958-5967.
8. Chambers A., Groom, MacDonald. 2002. *Nat Rev Cancer.* **2**(8):563-572.
9. Ding Y., Shimada Y., Maeda M. 2003. *Clinical Cancer Research.* **9**:3406-3412.
10. Forster R., Schubel A., Breitfeld D., et al. 1999. *Cell.* **99**(1):23-33.
11. Gherani H. 2006. *Libyan J Med AOP*:060514.
12. González H., Mosso L. 2006. *Boletín de la Escuela de Medicina.* **31**:87-91.
13. Gunn M. D., Tangemann K., Tam C., et al. 1998. *PNAS.* **95**:258-263.
14. Gunn M. D. 2003. *Seminars in Immunology* **15**:271-276.
15. Günther K., Leier J., Henning G., et al. 2005. *Int. J. Cancer.* **116**:726-73
16. Hall F., Freeman J., et al. 2003. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* **129**:716-719.
17. Homey B., Muller A., Zlotnik A. 2002. *Nat Rev Immunol.* **2**(3):175-184.
18. Hwang J., Hwang J., Chung H., Kim D., et al. 2003. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **88**:408-416.
19. Jöhrer K., Zelle-Rieser C., Perathoner A., et al. 2005. *Clin Cancer Res* **11**(7):2459-65.
20. Kakinuma T., Hwang S. T., 2006. *Journal of Leukocyte Biology.* **79**:1-13.

21. Kaplan R. N., Rafii S., Lyden D. 2006. *Cancer Res.* **66**(23):11089-93.
22. Kato M., Kitayama J., Kazama S., Nagawa H. 2003. *Breast Cancer Res.* **5**(5):R144-150.
23. Kuehnel Wolfgang. 2003. *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy.* (4 eds) Thyroid Gland, pp 262-267. Thieme.Stutt, New York.
24. Lin Jen-Der. 2007. *Growth Factors.* **25**(1):41-49.
25. Liotta L. A. 2001. *Nature.* **410**:24-25.
26. Locati M., Otero K., Schioppa T., et al. 2002 *Allergy.* **57**(11):972-982.
27. Luboshits G., Shina S., Kaplan O., et al. 1999. *Cancer Research* **59**:4681-4687.
28. Machens A., Holzhausen H., Lautenschläger C., et al. 2003. *American Cancer Society* **98**(4):712-719.
29. Malcolm A. S., Moore. 2001. *BioEssays.* **23**:674-676.
30. Mantovani A. 1999. *Immunol Today.* **20**(6):254-257.
31. Mashino K., Sadanaga N., Yamaguchi H., et al. 2002. *Cancer Res.* **62**:2937-41.
32. Mineo R., Costantino A., Frasca F., et al. 2004. *Endocrinology.* **145**(9):4355-4365.
33. Mora , J.R., et al. 2003. *Nature* **424** (6944):88-93.
34. Müller A., Homey B., Soto H., et al. 2001. *Nature.* **410**(6824):50-56.
35. Müller G., Höpken U., Stein H., et al. 2002. *Journal of Leukocyte Biology.* **72**:1-8.
36. Murdoch C. & Finn A. 2000. *Blood* **95**(10):3032-3042.
37. Murphy Philip. 2001. *N Engl J Med.* **345**(11):833-835
38. Ruffini P. A., Morandi P., Cabioglu N., et al. 2007. *Cancer.* **109**(12):2392-2404.
39. Sancho M., Vieira J. M., Casalou C., et al. 2006. *J. of Endocrinology* **191**:229-238.
40. Scotton C., Wilson J., Milliken D., et al. 2001. *Cancer Research* **61**(13):4961-4965.
41. Scotton C., Wilson J., Scott K., et al. 2002. *Cancer Res.* **62**(20):5930-5938.
42. Shields J., Feury M., Yong C., et al. 2007. *Cancer Cell.* **11**:526-538.

43. Simchen C., Lehmann I., Sittig D., et al. 2000. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:4758–64.
44. Tanaka T., Bai Z., Srinoulprasert Y., et al. 2005. *Cancer Sci.* **96**:317-322.
45. Tsuge K., Takeda H., Kawada S., et al. 2005. *Journal of Pathology.* **205**:565-576
46. Wang J., Xi L., Hunt JL., et al. 2004. *Cancer Res.* **64**(5):1861-1866.
47. Werner and Ingbar's. 2000. *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text.*  
(8th edition). By Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
48. Zlotnik A., Yoshie O. 2000. *Immunity.* **12**(2):121-127.
49. Zlotnik A. 2006. *Int. J. Cancer.* **119**:2026-2029

#### Páginas Web

##### 1. Imagen Tiroides

[www.teknon.es/consultorio/centeno/intervenciones/tiroides.htm](http://www.teknon.es/consultorio/centeno/intervenciones/tiroides.htm)

##### 2. Ministerio de Salud del Gobierno de Chile, Estadísticas, 2004

<http://deis.minsal.cl/deis/indexmc33.asp>.

##### 3. American Cancer Society®

[http://www.cancer.org/docroot/esp/content/esp\\_5\\_1x\\_que\\_es\\_43.asp](http://www.cancer.org/docroot/esp/content/esp_5_1x_que_es_43.asp).

ANEXO 1: ACTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

FECHA.....

Se me ha solicitado la autorización para ocupar tejido para fines de investigación científica obtenido a partir de la cirugía tiroidea a la que seré sometido en torno al tema "Mecanismos de cáncer de tiroides". Al dar mi autorización, yo estoy de acuerdo en que se utilicen las muestras de tejidos en el entendido que:

1. Mi participación es totalmente voluntaria
2. La obtención de las muestras no modificará en modo alguno la técnica quirúrgica a emplear durante mi cirugía.
3. La utilización de las muestras se realizará sin que esto afecte en modo alguno mi futuro control y tratamiento.
4. Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero mi nombre o identidad no será revelada y mis datos clínicos o experimentales serán confidenciales.
5. Todos mis resultados que pudieran ser relevantes clínicamente, así como los del estudio en general me serán dados a conocer a mí y a mi médico a cargo.
6. Todos los estudios que se realizarán para fines de investigación serán totalmente gratuitos para mí.
7. El médico a cargo de este estudio son el doctor Hernán González (cirujano) de la Pontificia Universidad Católica de Chile y estarán disponibles para cualquier consulta que desee realizar en relación al estudio en curso en el teléfono: 6863095.

Para constancia firman y se entrega copia a los interesados

.....  
Paciente.....  
Investigador