(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 813 374**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2015 PCT/EP2015/001753**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16030020**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2015 E 15763832 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3186391**

(54) Título: **Procedimientos y kit para la identificación del cáncer**

(30) Prioridad:

28.08.2014 EP 14182681
27.03.2015 GB 201505294

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2021

(73) Titular/es:

THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION SCHOLARS, & THE OTHER MEMBERS OF BOARD, OF THE COLLEGE OF HOLY AND UNDIV. (100.0%)
Trinity of Queen El, College Green
2 Dublin, IE

(72) Inventor/es:

CREAGH, EMMA;
FLOOD, BRIAN;
KAY, ELAINE;
OFICJALSKA, KATARZYNA;
RYAN, ELIZABETH;
DOHERTY, GLEN y
SALTO-TELLEZ, MANUAL

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y kit para la identificación del cáncer

Esta invención se refiere a procedimientos in vitro para el diagnóstico, la identificación y/o la estadificación de un carcinoma o adenocarcinoma del tracto GI, lo que incluye el diagnóstico, la identificación y/o la estadificación de tejido inflamado o maligno y/o un estado patológico asociado. La invención también se refiere a caspasas o moduladores de caspasas para uso en el tratamiento del carcinoma en un sujeto.

ANTECEDENTES

Cáncer

El cáncer se desarrolla a partir de un crecimiento de una única población de células de un tejido del cuerpo. Los carcinomas son neoplasias malignas que comienzan en los tejidos epiteliales. El tejido epitelial está especializado en formar el recubrimiento o revestimiento de todas las superficies corporales internas y externas, y está compuesto por células estrechamente empaquetadas y dispuestas en una o más capas. El tejido epitelial que se encuentra sobre superficies del interior del cuerpo se conoce como endotelio. Los tejidos epiteliales incluyen la piel, que cubre el cuerpo, y otros tejidos que revisten o cubren órganos internos, tales como los del sistema digestivo. Hay varios tipos diferentes de células epiteliales, que dan lugar a varios subtipos de carcinomas, que incluyen: adenocarcinomas, que se originan a partir de células adenomatosas glandulares (tales como las que revisten el colon y el recto); carcinomas epidermoides, que se originan a partir de células epiteliales escamosas (tales como las que revisten la garganta y el esófago); carcinoma de células transicionales, que se origina a partir de células epiteliales transicionales, que pueden expandirse con el órgano (tales como las que revisten la vejiga) y carcinoma basocelular, que se origina a partir de la capa más profunda de células de la piel y es poco común.

Los adenocarcinomas son el tipo más común de carcinoma, y son responsables de la mayoría de las neoplasias malignas asociadas al colon, el tracto gastrointestinal, la mama, la vagina, la próstata y la garganta. Aproximadamente 40 % de las neoplasias malignas de pulmón son adenocarcinomas, siendo el carcinoma epidermoide, el carcinoma microcítico y el carcinoma de células grandes responsables del 60 % restante.

Tumor maligno gastrointestinal (GI) es un término para un grupo de neoplasias malignas, principalmente adenocarcinomas, que afectan al sistema digestivo. El cáncer GI es la forma más común de cáncer e incluye neoplasias malignas del esófago, estómago, vías biliares, páncreas, intestino delgado, intestino grueso (colon), recto y ano. La mayoría de las neoplasias malignas GI son carcinomas, tal como los habitualmente denominados cáncer de estómago, cáncer de colon, etc. La mayoría de las neoplasias malignas GI se detectan durante procedimientos endoscópicos, durante los cuales se toman biopsias de tejido y se evalúan mediante anatomía patológica para confirmar y estadificar el tumor maligno. En el caso de las neoplasias malignas pancreáticas y de las vías biliares, normalmente se emplean técnicas de diagnóstico por imágenes para identificar el tejido maligno; sin embargo, se realizan procedimientos de ecografía endoscópica (EE) posteriores, que incluyen el muestreo de tejido usando aspiración con aguja fina, para estadificar el tumor maligno. La estadificación exacta de las neoplasias malignas invasivas es esencial para determinar el pronóstico y tratamiento, por tanto, se requiere un muestreo exhaustivo de los tumores.

Neoplasias malignas de mama es un término colectivo aplicado a todas las neoplasias malignas que se forman en los tejidos de la mama. Al igual que las neoplasias malignas GI, la mayoría de las neoplasias malignas de mama son carcinomas (es decir, el cáncer se deriva del tejido epitelial). El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal, que comienza en el revestimiento epitelial de los conductos galactóforos (tubos finos que transportan la leche desde los lobulillos de la mama hasta el pezón). Otro tipo de cáncer de mama es el carcinoma lobulillar, que comienza en la capa epitelial de los lobulillos mamarios (glándulas mamarias). El cáncer de mama invasivo es el cáncer de mama que se ha diseminado desde donde comenzó en los conductos galactóforos o los lobulillos de la mama al tejido normal circundante. El cáncer mama se presenta tanto en hombres como en mujeres, aunque el cáncer de mama masculino es raro.

Las causas de los carcinomas son multifactoriales, que pueden incluir factores genéticos y ambientales, tales como el estilo de vida y la dieta. Los factores de riesgo varían según el tejido al que está asociado el carcinoma, por ejemplo, las mutaciones heredadas en los genes BRCA1 o BRCA2 aumentan el riesgo de cáncer de mama y/u ovario; y el tabaquismo aumenta el riesgo de adenocarcinoma de pulmón, garganta y esófago.

El desarrollo de cáncer depende de siete características fundamentales de la célula/el tumor canceroso: 1. la

capacidad de evadir la muerte celular (apoptosis); 2. la activación de la inmortalidad replicativa; 3. el mantenimiento de la señalización proliferativa; 4. la evasión de los supresores del crecimiento; 5. la inducción de angiogénesis; 6. la activación de la invasión y metástasis y 7. un microentorno inflamatorio. Cada una de estas características se está investigando intensamente para mejorar la comprensión de los mecanismos de desarrollo del cáncer y para desarrollar estrategias para detener la progresión del cáncer. La característica final enumerada anteriormente, la presencia de un microentorno inflamatorio, solo se ha añadido a la lista recientemente. También es evidente que la inflamación persistente y continua en el tejido celular puede predisponer al área inflamada al desarrollo de un tumor maligno. Por ejemplo, en el esófago, la inflamación prolongada causada por el reflujo ácido provoca que las células escamosas sean reemplazadas por células epiteliales columnares (conocido como esófago de Barrett). Los pacientes con esófago de Barrett tienen mayor riesgo de desarrollar adenocarcinoma esofágico (ACE). Los pacientes con antecedentes de inflamación persistente del revestimiento del estómago, conocida como gastritis, tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico. Los pacientes con inflamación de la vesícula biliar, causada por infección o cálculos biliares, tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de la vesícula biliar, y los pacientes con colangitis esclerosante primaria (CEP) tienen las vías biliares inflamadas y mayor riesgo de padecer cáncer de la vesícula biliar y las vías biliares. Cabe señalar que muchos pacientes con CEP también presentan colitis ulcerosa (CU), esta enfermedad se conoce como CEP-EII y, por lo tanto, estos pacientes tienen un riesgo aún mayor de desarrollar un tumor maligno en el colon o la vesícula biliar. Asimismo, la pancreatitis crónica o hereditaria es un factor de riesgo para el cáncer pancreático.

La presente invención se refiere a procedimientos in vitro para el diagnóstico de tejido inflamado o maligno. Además, los nuevos procedimientos también pueden ayudar en el diagnóstico de carcinomas, preferentemente adenocarcinomas, de colon y del GI. Preferentemente, el procedimiento también puede ayudar en el diagnóstico precoz de adenocarcinomas de colon y del GI.

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y cáncer colorrectal (CCR)

Como se comentó anteriormente, hay mayor riesgo de cáncer en los tejidos gravemente inflamados, y la patogénesis de 15 % de todas las neoplasias malignas humanas se ha vinculado actualmente a la inflamación. Una de las neoplasias malignas de origen inflamatorio más prevalentes es el cáncer colorrectal asociado a colitis. El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más común en el mundo. En Irlanda, el CCR es responsable de 15 % de todas las muertes relacionadas con el cáncer, con un promedio de 1445 casos (tanto en hombres como en mujeres) diagnosticados cada año (Registro Nacional del Cáncer de Irlanda). El cáncer se puede desarrollar espontáneamente (neoplásico) o como resultado de inflamación crónica (displásico).

Los tumores colorrectales derivan predominantemente de las células epiteliales y están presentes con un amplio espectro de neoplasias, que van desde crecimientos benignos hasta metástasis invasivas. Aproximadamente 95 % de los CCR son adenocarcinomas, que se definen como neoplasias del tejido epitelial con características u origen glandulares, o ambos. La mayoría de los adenocarcinomas surgen de pólipos adenomatosos (adenomas). Es bien sabido que los pólipos adenomatosos son tumores benignos que pueden (o no) experimentar una transformación maligna. Es ampliamente aceptado que la extirpación de pólipos adenomatosos está asociada a un riesgo reducido de CCR.

La progresión adenoma-carcinoma observada en el CCR esporádico no se observa en la EII. En la EII, particularmente en la CU, se sugiere que la progresión pasa de inflamación a displasia y a continuación a cáncer, la secuencia displasia-carcinoma. Sin embargo, hay excepciones a este paradigma, en las que se observa que los pacientes desarrollan CCR sin haber tenido displasia.

La EII es un ejemplo de una afección inflamatoria crónica que puede aumentar enormemente el riesgo de padecer CCR. La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se caracteriza por la inflamación crónica y recurrente del tracto gastrointestinal y tiene dos formas principales: enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). Las personas con EII (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) tienen mayor riesgo de cáncer de colon. Hasta la fecha, aunque la inflamación intestinal es una característica de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y el cáncer colorrectal (CCR), los mecanismos que provocan la inflamación aún no están claros.

La prevalencia de EII en los países occidentales se estima en 1/1000 habitantes, con una prevalencia mundial creciente en los últimos 50 años. Numerosos estudios han respaldado sistemáticamente el impacto oncogénico de la inflamación crónica en la mucosa colorrectal, por tanto, los pacientes con EII tienen un riesgo asociado de desarrollar cáncer colorrectal (CCR), con un riesgo acumulado de presentar CCR asociado a UC en 30 años cercano a 20 %. El CCR representa el segundo cáncer de órganos sólidos incidente más habitual en mujeres (después del cáncer de mama) y hombres (después del cáncer de próstata), con una incidencia anual estimada en 2008 de 1,2 millones en todo el mundo. La patogénesis del CCR es compleja y está influenciada por la genética, el estilo de vida y factores

dietéticos, sin embargo, un microentorno inflamatorio es un componente crítico para la progresión del CCR, independientemente de la vía de inicio.

Actualmente, los anatomopatólogos analizan el tejido de biopsia/resección usando técnicas de tinción con hematoxilina-eosina estándar para observar la histología del tejido y caracterizar el tejido como normal/inflamado/displásico/neoplásico, además del tamaño, frecuencia y tipo de adenomas. Los adenocarcinomas moderadamente diferenciados normalmente están presentes en las neoplasias malignas colorrectales, y estos se estadifican normalmente usando el sistema de Duke (estadio A: confinado a la pared muscular del intestino, estadio B: invasión a través de la pared muscular y estadio C: presencia de metástasis en los ganglios linfáticos) y el Sistema TNM (Tumor-Ganglios-Metástasis). Las directrices del anatomopatólogo para asignar los grados tumorales (T) son: T1, el tumor está confinado a la capa interior del intestino; T2, el tumor ha avanzado hacia la capa muscular de la pared intestinal; T3, el tumor ha crecido hacia el revestimiento exterior de la pared intestinal y T4, el tumor ha invadido la pared intestinal con ulceración y/o invasión de órganos adyacentes. El sistema TNM tiene la ventaja de subdividir los tumores en estadio B de Duke en T3 y T4.

Una vez consolidado, el carcinoma colorrectal es fácilmente detectable por los anatomopatólogos. Sin embargo, los estadios incipientes de progresión a CCR, particularmente la distinción entre inflamación y verdadera displasia, no es tan sencilla, y hay una amplia discrepancia entre los anatomopatólogos en lo que respecta a la identificación y clasificación de la displasia. Se recomienda a los pacientes que han padecido colitis durante >10 años que se sometan a una colonoscopia periódica para detectar lesiones neoplásicas preinvasivas. La detección de displasia de grado alto también se considera una indicación para someterse a colectomía. Sin embargo, la colectomía es un procedimiento grave para el paciente y tiene un impacto importante en su calidad de vida, por lo tanto, esta decisión no se toma a la ligera. Los anatomopatólogos a menudo dudan acerca de si el tejido de resección de un paciente está inflamado, y desaparecerá, o se ha vuelto realmente displásico, en cuyo caso la mejor opción es la colectomía.

Por tanto, no hay características clínicas definidas para predecir la progresión de inflamación a displasia de grado bajo, y a continuación a neoplasia avanzada, y la evaluación histológica del tejido de la biopsia se basa en gran medida en cuándo tomar decisiones relativas al tratamiento de la EII y al riesgo asociado de desarrollo de CCR. Por lo tanto, hay una necesidad importante de identificadores de displasia y neoplasia novedosos, que se puedan evaluar mediante anatomía patológica en paralelo con el sistema actual de evaluación histológica del tejido, para la identificación y el diagnóstico de CCR.

El documento WO 2012158385 describe un procedimiento para detectar neoplasias malignas colorrectales (CCR) deficientes en MSH6 en un sujeto humano que comprende las etapas de: identificar al sujeto humano con presunto CCR deficiente en MSH6; obtener una muestra de tejido del sujeto humano; aislar un ADN de la muestra de tejido; amplificar el ADN en un sistema PCR que comprende: un marcador de mononucleótidos CAT25; y al menos otro marcador seleccionado del grupo que consiste en BAT25, BAT26, NR21, NR22, NR24, NR27; detectar la presencia del CCR deficiente en MSH6 en base a una expresión reducida o una inactivación del gen MSH6, la proteína MSH6, o ambas, en la muestra de tejido del sujeto humano con presunto CCR deficiente en MSH6.

El documento WO 2009120877 describe un procedimiento para determinar si un sujeto padece una enfermedad o afección inflamatoria intestinal o un subtipo de la misma, comprendiendo el procedimiento: a) determinar el nivel de expresión o actividad de un biomarcador enumerado en las Tablas 2-14 o un fragmento del mismo en una muestra del sujeto; b) determinar el nivel de expresión o actividad normales del biomarcador en una muestra de control; y c) comparar el nivel de expresión o actividad de dicho biomarcador detectado en las etapas a) y b); donde una modulación significativa en el nivel de expresión o actividad del biomarcador en la muestra del sujeto con respecto al nivel normal de expresión o actividad del biomarcador en una muestra de control es un indicio de que el sujeto padece una enfermedad o afección inflamatoria intestinal o un subtipo de la misma.

Las caspasas son un grupo de enzimas proteolíticas implicadas en la coordinación de los procesos celulares, que incluyen la homeostasis celular, la inflamación y la muerte celular. En los seres humanos, las caspasas-1, -4 y -5 constituyen la subfamilia de las caspasas inflamatorias. En los seres humanos, los genes CASP1, CASP5 y CASP4 forman un conglomerado en el cromosoma 11. La caspasa-1 comparte 53 % de identidad con la caspasa-4 y 51 % de identidad con la caspasa-5. La caspasa-1 tiene dos sustratos conocidos, IL-1beta e IL-18, los cuales son potentes mediadores proinflamatorios. Sin embargo, hasta la fecha no se han identificado sustratos para las caspasas-4 o -5. Aunque presentan una identidad de secuencia de aminoácidos significativa con la caspasa-1, se ha demostrado que las caspasas-4 y -5 tienen afinidades y especificidades de sustrato diferentes a la caspasa-1. Por ejemplo, las caspasas-4 y -5 no pueden escindir IL-1beta o IL-18 a concentraciones fisiológicas. Asimismo, un inhibidor peptídico de la caspasa-1 no inhibe la actividad de la caspasa-4 o -5 [1]. La producción excesiva de las citocinas inflamatorias IL-1β e IL-18 se encuentra en los cólones inflamados de pacientes con EII [2, 3]. La expresión de IL-1β también está

mejorada durante el CCR y se ha identificado como un factor clave en la progresión y metástasis tumoral [4].

Aunque la activación de la caspasa-4 se ha vinculado anteriormente a la formación de úlceras gástricas, no se ha asociado previamente con el cáncer gástrico [5]. Se han llevado a cabo varios estudios de análisis mutacional para determinar si las alteraciones en los genes de las caspasas inflamatorias pueden estar implicadas en el desarrollo de neoplasias malignas humanas. [6]. Estos han revelado que la incidencia total de las mutaciones de los tumores sólidos es rara para la caspasa-1 y -4 y ocasional para la caspasa-5 [6, 7], lo que sugiere que las mutaciones en las caspasas inflamatorias no están causalmente implicadas en la oncogénesis.

La revelación de que la caspasa-11 murina está implicada en la regulación de la producción de IL-1β tras una infección bacteriana gramnegativa [8] nos ha conducido a investigar si las caspasas-4 y -5 humanas, que se han propuesto como homólogos funcionales de la caspasa-11 murina, pueden estar implicadas en la mediación de la inflamación intestinal durante la EII y el CCR. Sin embargo, recientemente se ha descrito que los ratones con genes inactivados de la caspasa-11 presentan inflamación intestinal excesiva en un modelo experimental de colitis, lo que sugiere que la caspasa-11 regula negativamente la inflamación intestinal [9].

La presente invención se refiere a un procedimiento in vitro para el diagnóstico de tejido inflamado o maligno y, ventajosamente, un tumor maligno del tracto GI asociado. Además, el procedimiento también puede ayudar en el diagnóstico de un tumor maligno del tracto GI, preferentemente un tumor maligno incipiente y del tracto GI.

Específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos in vitro para el diagnóstico de tejido intestinal inflamado o maligno asociado a enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU) y cáncer colorrectal (CCR) . Además, los nuevos procedimientos también pueden ayudar en el diagnóstico de EII y el diagnóstico de displasia y neoplasia a partir de muestras intestinales.

AFIRMACIONES DE LA INVENCIÓN

A menos que se defina de otro modo, todos los términos de la técnica, notaciones y otra terminología científica empleada en esta invención tienen los significados entendidos habitualmente por los expertos en la materia a la que pertenece esta descripción. En algunos casos, los términos con los significados entendidos habitualmente se definen en esta invención a fin de clarificar y/o facilitar las referencias; por tanto, la inclusión de tales definiciones en esta invención no se debe interpretar que representa una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende generalmente en la técnica.

El término “aproximadamente”, en esta invención, se refiere al intervalo del error experimental que se puede producir en una medición.

Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan “que incluye, pero no se limita a”) y se debe considerar que incluyen y/o abarcan términos como “consiste esencialmente en”, “que consiste esencialmente en”, “consiste en” o “que consiste en”.

Como se emplean en esta invención, los términos “cantidad terapéuticamente efectiva” y “cantidad efectiva” se refieren a una cantidad suficiente para provocar la respuesta biológica deseada. En la presente invención, la respuesta biológica deseada es inhibir, reducir o mejorar la gravedad, duración, progresión o aparición de una enfermedad, trastorno o afección, prevenir el avance, la recurrencia o la progresión de una enfermedad, trastorno o afección o de un síntoma asociado a una enfermedad, trastorno o afección. La cantidad precisa de compuesto administrado a un sujeto dependerá de la vía de administración, el tipo y la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección y de las características del sujeto, tales como la salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a los fármacos. El experto en la materia podrá determinar las dosificaciones apropiadas en función de estos y otros factores.

Como se emplean en esta invención, los términos “tratar”, “tratamiento” y “tratando” se refieren a tratamientos terapéuticos e incluyen la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de una enfermedad, trastorno o afección, o la mejora de uno o más síntomas (específicamente, uno o más síntomas discernibles) de una enfermedad, trastorno o afección, como consecuencia de la administración de una o más terapias (p. ej., uno o más agentes terapéuticos tales como un compuesto o una composición de la invención). En realizaciones específicas, el tratamiento terapéutico incluye la mejora de al menos un parámetro físico mensurable de una enfermedad, trastorno o afección. En otras realizaciones, el tratamiento terapéutico incluye la inhibición de la progresión de una afección, ya sea físicamente mediante, p. ej., estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente mediante, p. ej., estabilización de un parámetro físico, o ambas. En otras realizaciones, el tratamiento terapéutico incluye la reducción o estabilización de una enfermedad, trastorno o afección.

Como se emplean en esta invención, los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente. Los términos “sujeto” y “paciente” se refieren a un animal (p. ej., un ave, tal como una gallina, codorniz o pavo, o un mamífero), específicamente un “mamífero” que incluye un no primate (p. ej., una vaca, cerdo, caballo, oveja, conejo, cobaya, rata, gato, perro y ratón) y un primate (p. ej., un mono, chimpancé y un ser humano) y, más específicamente, un ser humano. En una realización, el sujeto es un ser humano.

Los términos “gravemente inflamado” y “displásico” son equivalentes y, en esta memoria descriptiva, los términos “inflamado”, “gravemente inflamado” y “displásico” son todos equivalentes.

En esta memoria descriptiva, los términos “maligno” y “neoplásico” son equivalentes. Se entenderá que una neoplasia surge en ausencia de inflamación, tal como un cáncer espontáneo. Sin embargo, la displasia se presenta durante la inflamación, etc., y conduce a un tumor maligno. Además, se entenderá que la referencia a carcinoma surge tanto de un tumor maligno como de una neoplasia. El cáncer de colon se puede denominar cáncer o carcinoma colorrectal (CCR). El cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de esófago son todos adenocarcinomas.

De esta manera, la invención en su conjunto se refiere al diagnóstico y/o tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, que incluyen neoplasias malignas y metástasis, preferentemente tumores sólidos, particularmente tumores epiteliales del tracto GI.

En esta memoria descriptiva, el cáncer al que se hace referencia es preferiblemente un cáncer de las células epiteliales, a saber, un carcinoma y preferentemente un adenocarcinoma que representa el grupo más grande de carcinomas del tracto GI.

Según un aspecto general de la invención, se proporciona un procedimiento in vitro para el diagnóstico y/o la detección de un carcinoma del tracto GI, preferentemente un adenocarcinoma, que comprende las etapas de

a. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un tejido y/o células epiteliales del tracto GI de una muestra o biopsia del sujeto;
b. comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
c. identificar y/o diagnosticar un carcinoma del tracto GI cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales del tracto GI.

Según este aspecto general, la presente invención proporciona un procedimiento in vitro para el diagnóstico y/o la detección de un carcinoma del tracto GI, que comprende las etapas de

a. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un tejido y/o células epiteliales del tracto GI de una muestra o biopsia del sujeto;
b. comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
c. identificar y/o diagnosticar un carcinoma del tracto GI cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales del tracto GI.

Según una realización de este aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento in vitro para la identificación de tejido intestinal inflamado o maligno y/o un estado patológico asociado, que comprende las etapas de

a. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en una muestra de tejido intestinal o una muestra de heces que comprende células intestinales, preferentemente células epiteliales intestinales y/o estromales intestinales, de un sujeto;

b. comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e

c. identificar tejido intestinal inflamado o maligno y/o un estado patológico asociado cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva (expresión aumentada o mejorada) de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra de tejido intestinal o una muestra de heces.

En este aspecto, el estado patológico asociado puede ser un cáncer o un carcinoma.

Este procedimiento permite la identificación de tejido intestinal inflamado y/o un estado patológico asociado seleccionado de entre enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU) cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra de tejido estromal intestinal o una muestra de heces.

Este procedimiento también permite la identificación de tejido intestinal maligno y/o un estado patológico asociado, que incluye adenoma incipiente y/o cáncer colorrectal (CCR), cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra de tejido epitelial intestinal o una muestra de heces.

Según esta realización, se proporciona un procedimiento in vitro para la identificación y el diagnóstico precoces de EII, que incluye enfermedad de Crohn (EC) y/o colitis ulcerosa (CU), donde la expresión detectable, aumentada o mejorada de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células estromales no inflamadas de la muestra del sujeto, en comparación con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células estromales de un control normal, es indicativa de EII, que incluye EC y/o CU.

Según una realización de la invención, se proporciona un procedimiento in vitro para la identificación y el diagnóstico precoces del cáncer colorrectal (CCR), donde la expresión detectable, aumentada o mejorada de los niveles de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células epiteliales de la muestra del sujeto, en comparación con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células epiteliales de un control normal, es indicativa de la presencia de CCR incipiente.

También se describe un kit o una matriz para preparar un perfil de ácidos nucleicos de la caspasa-4 y/o caspasa-5 que comprende conjuntos de sondas diseñados para dirigirse a la caspasa-4 y/o caspasa-5, seleccionados de entre uno o más de los conjuntos de sondas de SEQ ID NO 3 y 4, 5 y 6, 9 y 10, 11 y 12, 15 y 16, 17 y 18, 21 y 22, 23 y 24.

Según otro aspecto de la invención, se proporcionan inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para uso en el tratamiento del carcinoma del tracto GI en un sujeto con necesidad del mismo, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de caspasa-4 y/o caspasa-5 para inhibir la expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un sujeto. También se describe un procedimiento para el tratamiento o la prevención de la inflamación intestinal en un sujeto que comprende la etapa de inhibir la expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un sujeto.

Según otro aspecto más de la invención, se proporcionan inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para su uso en el tratamiento del carcinoma del tracto GI. También se describen inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para uso en el tratamiento y/o la prevención de la inflamación intestinal en un sujeto.

También se describen inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 o moduladores de caspasa-1/caspasa-1 recombinante para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del carcinoma. Una descripción preferida son inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 o moduladores de caspasa-1/caspasa-1 recombinante para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la inflamación intestinal en un sujeto.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento in vitro para el tratamiento del carcinoma del tracto GI, que comprende las etapas de

a. proporcionar tejido y/o células epiteliales de una muestra o biopsia del sujeto;
b. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en tejido y/o células epiteliales de una muestra o biopsia del sujeto;
c. comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
d. identificar y/o diagnosticar un tumor maligno cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales.

También se describe el tratamiento del sujeto cuando se le diagnostica un tumor maligno con tratamiento convencional para el cáncer, que incluye radioterapia o quimioterapia.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un modulador de caspasa-1 para aumentar los niveles de expresión de caspasa-1 o caspasa-1 recombinante para uso en el tratamiento del carcinoma del tracto GI.

También se describe un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención del carcinoma y/o la inflamación en un sujeto con necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un modulador de caspasa-1 o caspasa-1 recombinante para aumentar la expresión de caspasa-1 en un sujeto.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un modulador de caspasa-1 para aumentar los niveles de expresión de caspasa-1 o caspasa-1 recombinante para uso en el tratamiento del carcinoma del tracto GI, que comprende las etapas de

a. proporcionar tejido y/o células epiteliales de una muestra o biopsia del sujeto;
b. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-1 en tejido y/o células epiteliales de una muestra o biopsia del sujeto;
c. comparar el nivel de expresión de caspasa-1 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-1 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
d. identificar y/o diagnosticar un tumor maligno cuando hay presente un nivel detectable o una desviación negativa de los niveles de expresión de caspasa-1, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales.

También se describe el tratamiento del sujeto cuando se le diagnostica un tumor maligno con tratamiento convencional para el cáncer, que incluye radioterapia o quimioterapia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

CARCINOMAS

La invención está basada en nuestros hallazgos de que las células epiteliales normales no expresan caspasa-4 y/o -5, sin embargo, hemos encontrado que las células epiteliales malignas (neoplásicas) expresan caspasa-4 y/o -5. Esta expresión diferencial de caspasa-4 y/o -5 se puede usar ventajosamente para el diagnóstico y la detección de carcinomas, en particular carcinomas incipientes. También hemos encontrado que la expresión de caspasa-1 es deficiente a medida que el grado tumoral/tumor maligno progresa.

Según un aspecto general de la invención, se proporciona un procedimiento in vitro para el diagnóstico y/o la detección de un carcinoma del tracto GI, preferentemente un adenocarcinoma, que comprende las etapas de

a. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un tejido y/o células epiteliales del tracto GI de una muestra o biopsia del sujeto;
b. comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
c. identificar y/o diagnosticar un carcinoma del tracto GI cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales.

Según este aspecto general, la presente invención proporciona un procedimiento in vitro para el diagnóstico y/o la detección de un carcinoma del tracto GI, que comprende las etapas de

a. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un tejido y/o células epiteliales del tracto GI de una muestra o biopsia del sujeto;
b. comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
c. identificar y/o diagnosticar un carcinoma del tracto GI cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales del tracto GI.

Ventajosamente, la invención permite el diagnóstico y/o la detección precoces de tales carcinomas. Esto es ventajoso cuando los resultados histológicos son difíciles de diagnosticar, por ejemplo, en circunstancias en las que existen niveles significativos de inflamación en el tejido. Los anatomopatólogos a menudo tienen dificultades para diferenciar entre tejido inflamado y tejido de cáncer incipiente. En base a estos hallazgos, que demuestran niveles elevados de expresión de las caspasas-4 y -5 en las células epiteliales malignas, se pueden emplear estrategias complementarias

a la tinción con hematoxilina-eosina, que examinarán la expresión epitelial de caspasa-4 y/o -5, para ayudar en el diagnóstico y/o la detección de carcinomas.

Según una realización, el procedimiento de la invención permite el diagnóstico y/o la detección precoces del carcinoma en el que los niveles de expresión de caspasa-5 aumentados permiten el diagnóstico y/o la detección precoces del carcinoma.

Según otra realización, el procedimiento permite la clasificación y/o estadificación del carcinoma en el que los niveles de expresión de caspasa-1 se reducen al aumentar el grado tumoral y/o los niveles de expresión de caspasa-4 aumentan al aumentar el grado tumoral.

Idealmente, la muestra es una biopsia o tejido de resección y puede comprender una sección transversal de tejido de las capas de células epiteliales, estromales y posiblemente otras. De esta manera, la muestra comprende al menos tejido y/o células epiteliales de un sujeto.

Opcionalmente, también se mide el nivel de expresión de caspasa-1, caspasa-4 y/o caspasa 5 en tejido y/o células estromales y los niveles de expresión aumentados son indicativos de inflamación tisular.

También hemos observado que los niveles de caspasa-1 pueden ser indicativos de progresión y/o estadificación de las células tumorales. De esta manera, una realización de la invención comprende las etapas de

a. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-1 en tejido y/o células epiteliales de una muestra o biopsia del sujeto;
b. comparar el nivel de expresión de caspasa-1 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-1 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
c. identificar y/o diagnosticar un tumor maligno cuando hay presente un nivel detectable o una desviación negativa de los niveles de expresión de caspasa-1, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales.

Hemos demostrado que los niveles de expresión de caspasa-1 se reducen al aumentar el grado tumoral y/o los niveles de expresión de caspasa-4 aumentan al aumentar el grado tumoral. Estos resultados pueden permitir la estadificación más exacta de la progresión del grado tumoral, por ejemplo, de T1 a T3 y opcionalmente T4.

De esta manera, el análisis del nivel de tinción/expresión de caspasa-1 se puede usar en combinación con el análisis del nivel de tinción/expresión de caspasa-4 y/o -5 para evaluar el estadio/la progresión del tumor maligno o tumor.

El carcinoma se puede seleccionar de entre un adenocarcinoma, carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular o carcinoma de células transicionales. Opcionalmente, según cualquiera de las realizaciones de la invención, el carcinoma excluye el cáncer colorrectal. También opcionalmente, según cualquiera de las realizaciones de la invención, el carcinoma excluye el adenocarcinoma esofágico (ACE).

El carcinoma está presente idealmente en el tracto GI, y es preferiblemente adenocarcinoma esofágico (ACE) o cáncer colorrectal.

El carcinoma del tracto GI se selecciona idealmente de entre las neoplasias malignas del esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso (colon), recto y ano. Opcionalmente, el carcinoma del tracto GI excluye el cáncer colorrectal.

Hemos demostrado ventajosamente que los niveles de expresión de caspasa-1, caspasa-4 y caspasa-5 proporcionan un diagnóstico valioso para muchos tipos diferentes de carcinomas, que incluyen cáncer colorrectal (CCR) y adenocarcinoma esofágico (ACE).

Según otro aspecto de la invención, se proporcionan inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para uso en el tratamiento del carcinoma del tracto GI, que comprende las etapas

a. proporcionar tejido y/o células epiteliales de una muestra o biopsia del sujeto;
b. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en tejido y/o células epiteliales de una muestra o biopsia del sujeto;
c. comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e

d. identificar y/o diagnosticar un tumor maligno cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales.

También se describe el tratamiento del sujeto cuando se le diagnostica un tumor maligno con tratamiento convencional para el cáncer, que incluye radioterapia o quimioterapia.

Estos hallazgos han conducido a posibles tratamientos para el carcinoma. Según un aspecto, se proporcionan inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para uso en el tratamiento y/o la prevención del carcinoma. El carcinoma puede ser un adenocarcinoma.

Idealmente, los inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 se dirigen a, e inhiben o reducen, la expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en tejidos y/o células epiteliales de un sujeto.

Otro aspecto son inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para uso en el tratamiento del carcinoma del tracto GI en un sujeto con necesidad del mismo, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de caspasa-4 y/o caspasa-5 para inhibir la expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un sujeto.

Se entenderá que el inhibidor de caspasa-4 y/o caspasa-5 puede un siRNA que se dirige a la caspasa-4 y/o caspasa-5.

Como los niveles de caspasa-1 se reducen al aumentar el grado tumoral, asumimos que el uso de un modulador para aumentar la expresión y/o actividad de la caspasa-1 en las células epiteliales tendrá un impacto antitumorigénico. Por consiguiente, otro aspecto es un modulador de caspasa-1 o caspasa-1 recombinante para aumentar los niveles de expresión de caspasa-1 para uso en el tratamiento y/o la prevención del carcinoma del tracto GI.

Otro aspecto más es un modulador de caspasa-1 para aumentar los niveles de expresión de caspasa-1 o caspasa-1 recombinante para uso en el tratamiento del carcinoma del tracto GI en un sujeto con necesidad del mismo, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un modulador de caspasa-1 o caspasa-1 recombinante para aumentar la expresión de caspasa-1 en un sujeto.

Alternativamente, en lugar de un modulador de caspasa-1, se puede administrar caspasa-1 recombinante o los productos (productos aguas abajo) de la actividad de la caspasa-1, tales como IL-18 o IL-1beta, usando medios convencionales (p. ej., mediante sistemas de electroporación, microinyección o macromoleculares), a las células epiteliales, tales como las células epiteliales de CCR.

Estos procedimientos representan terapias novedosas para retrasar la progresión del carcinoma.

CÁNCER COLORRECTAL (CCR)

Nuestros hallazgos han demostrado que los niveles de expresión de caspasa-1, caspasa-4 y/o caspasa-5 proporcionan un diagnóstico valioso para pacientes con cáncer colorrectal. De esta manera, los niveles de expresión de caspasa-1, caspasa-4 y/o caspasa-5 se pueden usar para evaluar la progresión del cáncer colorrectal en un individuo. A diferencia de la caspasa-1, la caspasa-4 y caspasa-5 no se expresan en células epiteliales normales. Nuestros hallazgos demuestran que cualquier nivel detectable de indistintamente caspasa-4 o -5 en las células epiteliales es indicativo de cáncer.

Hemos encontrado que los niveles de expresión de caspasa-1 y caspasa-4 en las células epiteliales intestinales (CEI) de pacientes con CCR son indicativos de un grado tumoral, por ejemplo, de T1 (tumores de grado inferior) a T2/T3 (tumores de grado avanzado) o T4. Se ha encontrado que los niveles de caspasa-1 se reducen al aumentar el grado tumoral (p. ej., de T1 a T3 o T4). Se ha encontrado que los niveles de caspasa-4 aumentan al aumentar el grado tumoral (p. ej., de T1 a T3 o T4).

También hemos encontrado que los niveles de expresión de caspasa-5 en las CEI están elevados en todos los grados tumorales. Nuestros hallazgos demostraron que los niveles de expresión de caspasa-5 están elevados de manera máxima incluso en T1, el estadio tumoral más incipiente, cuando el crecimiento tumoral no se ha diseminado más allá de la capa interior del colon. Por estas razones, la caspasa-5 puede proporcionar ventajosamente la detección de tumores incipientes.

Según esta realización, se proporciona un procedimiento in vitro para el diagnóstico y/o la detección de cáncer

colorrectal (CCR) según la reivindicación 1, que comprende las etapas de

a. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un tejido y/o células epiteliales del tracto GI de una muestra o biopsia del sujeto;
b. comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
c. identificar y/o diagnosticar el CCR cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales del tracto GI.

Ventajosamente, donde los niveles de expresión de caspasa-5 aumentados permiten el diagnóstico y/o la detección precoces del carcinoma.

Los niveles de caspasa-1 también se pueden monitorizar de manera similar y se puede identificar y/o diagnosticar el CCR cuando hay presente una desviación negativa de los niveles de expresión de caspasa-1, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales.

Ventajosamente, se puede monitorizar el estadio o la progresión tumoral usando este procedimiento. Hemos encontrado que los niveles de expresión de caspasa-1 se reducen al aumentar el grado tumoral y/o los niveles de expresión de caspasa-4 aumentan al aumentar el grado tumoral.

Estos hallazgos también han conducido a posibles terapias para el carcinoma.

Según una realización, se pueden usar inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 en el tratamiento del carcinoma del tracto GI.

El carcinoma puede ser un adenocarcinoma. Opcionalmente, el carcinoma es un cáncer del tracto GI seleccionado opcionalmente de entre tumores malignos del esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, recto y ano, cáncer colorrectal (CCR) o adenoma incipiente en un sujeto. Preferentemente, el carcinoma es cáncer colorrectal (CCR), carcinoma de mama o carcinoma esofágico.

De esta manera, los inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 se dirigen a, e inhiben o reducen, la expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en tejidos y/o células epiteliales de un sujeto. Por ejemplo, el inhibidor de caspasa-4 y/o caspasa-5 puede ser un siRNA que se dirige a la caspasa-4 y/o la caspasa-5.

Ventajosamente, los inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 se pueden usar en el tratamiento del carcinoma incipiente.

Según otra realización, se proporcionan inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para uso en el tratamiento del carcinoma del tracto GI en un sujeto con necesidad del mismo, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de caspasa-4 y/o caspasa-5 para inhibir la expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un sujeto.

De nuevo, el inhibidor de caspasa-4 y/o caspasa-5 puede ser un siRNA que se dirige a la caspasa-4 y/o la caspasa-5.

El carcinoma puede ser un adenocarcinoma. Opcionalmente, el carcinoma es un cáncer del tracto GI seleccionado opcionalmente de entre tumores malignos del esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, recto y ano, cáncer colorrectal (CCR) o adenoma incipiente en un sujeto. Preferentemente, el carcinoma es cáncer colorrectal (CCR), carcinoma de mama o carcinoma esofágico.

El sujeto es idealmente un mamífero, preferentemente un ser humano.

Según otra realización, se proporciona un modulador de caspasa-1 para aumentar los niveles de expresión de caspasa-1 o caspasa-1 recombinante para uso en el tratamiento y/o la prevención del carcinoma.

El carcinoma puede ser un adenocarcinoma. Opcionalmente, el carcinoma es un cáncer del tracto GI seleccionado opcionalmente de entre tumores malignos del esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, recto y ano, cáncer colorrectal (CCR) o adenoma incipiente en un sujeto. Preferentemente, el carcinoma es cáncer colorrectal (CCR), carcinoma de mama o carcinoma esofágico.

De esta manera, los inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 se dirigen a, e inhiben o reducen, la expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en tejidos y/o células epiteliales de un sujeto. Por ejemplo, el inhibidor de caspasa-4 y/o caspasa-5 puede ser un siRNA que se dirige a la caspasa-4 y/o la caspasa-5.

Según otra realización, se proporciona un modulador de caspasa-1 para aumentar los niveles de expresión de caspasa-1 o caspasa-1 recombinante para uso en el tratamiento del carcinoma del tracto GI en un sujeto con necesidad del mismo, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un modulador de caspasa-1 o caspasa-1 recombinante para aumentar la expresión de caspasa-1 en un sujeto.

El carcinoma puede ser un adenocarcinoma. Opcionalmente, el carcinoma es un cáncer del tracto GI seleccionado opcionalmente de entre tumores malignos del esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, recto y ano, cáncer colorrectal (CCR) o adenoma incipiente en un sujeto. Preferentemente, el carcinoma es cáncer colorrectal (CCR), carcinoma de mama o carcinoma esofágico.

El sujeto es idealmente un mamífero, preferentemente un ser humano.

ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)

Según un aspecto general de la invención, se proporciona un procedimiento in vitro para la identificación de tejido intestinal inflamado o maligno y/o un estado patológico asociado, que comprende las etapas de

a. monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en una muestra de tejido intestinal o una muestra de heces que comprende células intestinales, preferentemente células intestinales y/o intestinales estromales, de un sujeto;
b. comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
c. identificar tejido intestinal inflamado o maligno y/o un estado patológico asociado cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva (expresión aumentada o mejorada) de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra de tejido intestinal o una muestra de heces.

De esta manera, el tejido y/o las células intestinales inflamados generalmente están asociados a EII y trastornos relacionados. El tejido y/o las células intestinales malignos generalmente están asociados a un carcinoma tal como cáncer colorrectal o adenoma.

Nuestros estudios sobre la expresión de las caspasas-1, -4 y -5 en pacientes sanos, con EII y con CCR (tanto CCR espontáneo como CCR asociado a EII) han generado algunos resultados inesperados. Sorprendentemente, hemos encontrado que la expresión elevada de las caspasas-4 y-5 en muestras de tejido intestinal puede predecir la EII y, asimismo, que la expresión diferencial de las caspasas-4 y -5 en las capas de células epiteliales y estromales se puede usar ventajosamente en la identificación de cáncer colorrectal, tejido intestinal maligno y/o progresión de la enfermedad asociada de enfermedad inflamatoria intestinal a cáncer. Usando técnicas de IHQ, hemos encontrado que la expresión de caspasas inflamatorias en las células epiteliales y estromales intestinales se puede utilizar en nuevos procedimientos de diagnóstico.

Específicamente, hemos encontrado sorprendentemente que la expresión de caspasa-4 y caspasa-5 en células inflamatorias infiltrantes del tejido estromal indica EII, sin embargo, la expresión en células epiteliales indica un tumor maligno y la presencia de CCR. Estos hallazgos inesperados permiten la distinción mejorada de varias enfermedades del colon asociadas a inflamación usando células específicas para el análisis de la expresión. Esto conduce ventajosamente a un procedimiento para permitir la diferenciación entre tejido de EII inflamado y tejido de CCR incipiente.

Hemos encontrado inesperadamente que la expresión de caspasa-4 y -5 en células inflamatorias del tejido estromal (expresión estromal) está fuertemente interrelacionada con los niveles de inflamación y actividad de la enfermedad en pacientes con EII, mientras que los niveles de expresión de caspasa-1 no presentaron interrelaciones tan claras. Esto nos permite identificar el tejido intestinal inflamado y/o un estado patológico asociado que incluye enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU).

También hemos encontrado que la expresión de caspasa-4 y -5 solo se produce en células epiteliales intestinales malignas (que provienen de indistintamente neoplasia o displasia). Las células epiteliales de pacientes sanos, e incluso con inflamación grave, son negativas para la expresión de caspasa-4 y -5. Esto es inesperado, ya que la caspasa-1

se expresa constitutivamente en las células epiteliales de pacientes sanos y con inflamación, y asimismo, al contrario que las caspasas-4 y -5, los niveles de expresión de caspasa-1 se reducen en las células epiteliales malignas. La implicación importante de estos hallazgos es para el diagnóstico del CCR, ya que las células epiteliales malignas se pueden identificar de forma inmediata y precoz si se encuentra que son positivas para la expresión de caspasa-4 y -5. Esto nos permite diagnosticar tejido intestinal maligno y/o un estado patológico asociado, que incluye adenoma incipiente y cáncer colorrectal (tanto CCR espontáneo como asociado a colitis).

Nuestra invención utiliza estos hallazgos de que las caspasas-4 y -5 se expresan exclusivamente en células del tejido estromal (células estromales) hasta la presencia de un tumor maligno, momento en que se expresan también de manera robusta en las células epiteliales. Por el contrario, la caspasa-1 se expresa tanto en células estromales como epiteliales, incluso en pacientes sanos. Aunque la expresión de caspasa-1 también aumenta en ambos tipos de células, epiteliales y estromales, durante la inflamación (fig. 2), difiere de la caspasa-4 y -5, ya que no está mejorada también en las células epiteliales malignas (fig. 5). Hemos encontrado que los niveles de expresión de caspasa-1 se reducen al aumentar el grado tumoral, por tanto, los niveles de expresión de caspasa-1 ayudan en la clasificación y/o estadificación del CCR.

Por tanto, a pesar de los hallazgos de que las mutaciones en las caspasas inflamatorias no están causalmente implicadas en la oncogénesis, sorprendentemente hemos encontrado que

- La PCR cuantitativa identificó aumentos estadísticamente significativos en la expresión de caspasa-1, -4 y -5 inflamatorias en el tejido inflamado de pacientes con EII (prueba estadística de Kruskal-Wallis con comparación retrospectiva de Dunn con el control). La PCR cuantitativa también identificó niveles elevados estadísticamente significativos de caspasa- 4 en el tejido no inflamado de pacientes con EII en comparación con el control sano, lo que sugiere que la caspasa-4 puede ser un marcador precoz de EII (prueba estadística de Kruskal-Wallis con comparación retrospectiva de Dunn con el control).
- Usando técnicas de tinción IHQ, también hemos ilustrado una interrelación significativa entre los niveles de expresión estromal de caspasa-4 y -5, la inflamación y la actividad de la enfermedad en pacientes con CU (pruebas estadísticas de Mann-Whitney). La expresión epitelial de caspasa-4 o -5 no se pudo detectar en el tejido normal o inflamado de pacientes sanos o con EII.
- También hemos encontrado una expresión estromal significativamente aumentada de las caspasas-4 y -5 en el tejido tumoral, en comparación con el tejido normal adyacente, de pacientes con CCR (pruebas estadísticas de Mann-Whitney)
- Sorprendentemente, identificamos una expresión robusta de las caspasas-4 y -5 en las células epiteliales intestinales, exclusivamente en el tejido neoplásico, de tumores colorrectales.
- Un examen del tejido adyacente normal, inflamado y tumoral de pacientes con CCR asociado a CU confirmó que la expresión estromal de las caspasas-4 y -5 aumenta en el tejido inflamado y maligno, mientras que la expresión epitelial se limita al tejido maligno.
- El cribado de un grupo de pruebas de estirpes celulares epiteliales confirmó que las caspasas-4 y -5 se expresan en todas las estirpes celulares epiteliales de CCR examinadas hasta la fecha.
- Asumimos que el “silenciamiento” basado en siRNA de la caspasa-4 y caspasa-5 en las células epiteliales del CCR afectará a la proliferación celular, muerte celular, migración celular U otras funciones celulares inflamatorias/carcinogénicas.
- En base a su expresión aumentada en las células estromales de tejido inflamado de pacientes con CU/CCR, la caspasa-4 y -5 se han identificado como dianas novedosas para el tratamiento clínico de la inflamación intestinal.

Se entenderá que la muestra es idealmente una muestra de tejido intestinal o una muestra de heces que comprende células intestinales de un sujeto. La muestra propiamente dicha se puede obtener del sujeto como una muestra o biopsia de tejido. El sujeto es un mamífero, preferentemente un ser humano.

Según una realización, la muestra es una muestra de tejido intestinal. Idealmente, la muestra de tejido intestinal es una muestra o biopsia de tejido estromal y/o una muestra o biopsia de tejido epitelial.

Según otra realización, la muestra es una muestra de heces que comprende células intestinales de un sujeto. La capa completa de células epiteliales del intestino se repone cada 4 a 7 días. Por tanto, debido a la descamación de las células epiteliales, una muestra de heces comprenderá idealmente células epiteliales intestinales y, por ejemplo, permitirá la detección mediante qPCR de caspasa-4 o -5 de células epiteliales malignas.

Se entenderá que la muestra puede ser de un sujeto que es un individuo sano, un individuo con antecedentes familiares de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) o cáncer colorrectal (CCR), o un individuo que padece EII , EC o colitis ulcerosa (CU). Por tanto, la muestra puede comprender células intestinales no inflamadas, inflamadas, malignas,

displásicas y/o neoplásicas procedentes del sujeto.

Tal tejido intestinal maligno se puede presentar esporádicamente en pacientes sanos. Alternativamente, el tejido intestinal maligno puede ser un resultado de la inflamación intestinal en pacientes diagnosticados con enfermedad inflamatoria intestinal, que también tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal.

Ventajosamente, la presente invención permite la diferenciación entre tejido intestinal sano, inflamado o maligno, que incluye displásico y/o neoplásico. En la actualidad, los anatomopatólogos analizan el tejido de la biopsia/resección usando técnicas de tinción con hematoxilina-eosina estándar para observar la histología del tejido, pero a menudo es muy difícil distinguir entre tejido inflamado y displásico/neoplásico mediante este procedimiento. Lamentablemente, este tipo de análisis puede dar como resultado un retraso o un diagnóstico erróneo de los estados patológicos. Por tanto, una ventaja significativa de la invención es que la identificación y el diagnóstico de tejido de CCR será más sencilla y más sensible que los procedimientos actuales. El uso de muestras de heces para el cribado también proporciona la ventaja de que el cribado del CCR se puede realizar en una etapa más incipiente de lo que era posible anteriormente. De hecho, la presente invención permite el diagnóstico precoz tanto de EII como de CCR.

Hemos encontrado que las caspasas-4 y -5 son discriminadores novedosos entre tejido inflamado y neoplásico, y esto sugiere que puede haber un campo de aplicación importante para la detección de caspasa-4 y -5 epiteliales como determinantes de la presencia de un tumor maligno en la mucosa colorrectal. La presencia de caspasa-4 y -5 en las células epiteliales se podría desarrollar como un marcador complementario a la evaluación histológica de displasia en el tejido del colon al predecir el riesgo de CCR en los pacientes.

Por tanto, el procedimiento de la invención permite la identificación precoz de tejido intestinal inflamado o maligno y/o un estado patológico asociado. El procedimiento de la invención ha reconocido que la expresión aumentada o mejorada de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control normal es indicativa de una progresión de tejido intestinal maligno o del fenotipo de progresión de la enfermedad asociada.

En esta memoria descriptiva, se entenderá que el término “desviación positiva” abarca y es equivalente a los términos “detectable”, “expresión aumentada o mejorada”. Por tanto, se ha encontrado que una desviación positiva en términos de nivel detectable, expresión aumentada o mejorada de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con la expresión de referencia de caspasa-4 y -5 en, por ejemplo, controles (negativos) normales y/o un control positivo, es indicativa de tejido intestinal inflamado o maligno (es decir, displásico/neoplásico).

Según una realización de la invención, el procedimiento permite la identificación precoz de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) donde la expresión aumentada o mejorada de caspasa-4 y/o caspasa-5 es indicativa de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) incipiente. Específicamente, el procedimiento permite la identificación y el diagnóstico precoz de EII, que incluye enfermedad de Crohn (EC) y/o colitis ulcerosa (CU), donde la expresión aumentada o mejorada de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células estromales intestinales no inflamadas de la muestra del sujeto, en comparación con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células estromales de un control normal, es indicativa de EII, que incluye EC y/o CU. De esta manera, hemos encontrado que el grado de inflamación y el aumento en la actividad de la enfermedad, en comparación con la expresión de referencia de caspasa-4 y -5, están interrelacionados con la expresión de caspasa-4 y -5 aumentada en tejido y/o células estromales intestinales.

Según otra realización de la invención, sorprendentemente hemos encontrado que la expresión epitelial intestinal de las caspasas-4 y -5 se limita al tejido neoplásico. Por tanto, el procedimiento permite la identificación y el diagnóstico precoz de CCR donde una desviación positiva en términos de una expresión detectable, aumentada o mejorada de los niveles de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células epiteliales intestinales de la muestra del sujeto, en comparación con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células epiteliales intestinales de un control normal, es indicativa de la presencia de CCR incipiente. De esta manera, hemos encontrado que un nivel detectable de caspasa-4 y -5 en el tejido y/o las células epiteliales es indicativo de CCR, mientras que el tejido normal circundante no presenta niveles detectables de caspasa-4 y -5, permitiendo de ese modo un diagnóstico positivo de CCR.

En todos los aspectos de la invención, se pueden usar diversas técnicas para monitorizar y medir la expresión de caspasa-1, caspasa-4 y caspasa-5. Estos métodos incluyen qPCR, inmunofluorescencia (IF), ELISA y/o inmunohistoquímica (IHQ). También se entenderá que el nivel de expresión de caspasa-1, caspasa-4 y/o caspasa-5 se determina evaluando la abundancia de transcripciones de ARN transcritas a partir del gen, evaluando la abundancia de polipéptidos traducidos a partir de dichas transcripciones de ARN, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 se determina cuantificando una transcripción de ARN funcional.

Según una realización de la invención, una desviación positiva del nivel de expresión superior a 1 vez, opcionalmente

superior a 1,5 veces, más opcionalmente superior a 2 veces, más opcionalmente superior a 3 veces, más opcionalmente superior a 4 veces, del nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control normal generalmente es indicativa de un tumor maligno, progresión de tejido intestinal maligno o fenotipo de progresión de la enfermedad asociada.

Específicamente, los niveles de caspasa-4 aumentan más de 1 vez, opcionalmente más de 1,5 veces, más opcionalmente más de 2 veces, más opcionalmente más de 3 veces, más opcionalmente más de 4 veces, a medida que aumenta el estadio tumoral (T1 a T3 y opcionalmente T4). Por estas razones, los niveles de caspasa-4 se pueden usar para determinar la progresión y/o estadificación tumoral.

Nuestros hallazgos indican que la caspasa-5 se expresa de manera máxima en el estadio tumoral incipiente (T1), indicando de ese modo presencia de un tumor maligno. Por tanto, los niveles elevados no indican realmente progresión del tumor maligno. Por estas razones, creemos que la caspasa-5 se puede usar para el diagnóstico precoz de un tumor maligno.

Se entenderá que, por ejemplo, en las células epiteliales intestinales, la detección de cualquiera de las caspasas-4 o -5 es lo que indica la presencia de un tumor maligno (displasia/neoplasia). En las células epiteliales, cualquier valor por encima del valor de referencia es indicativo de la presencia de un tumor maligno. Por ejemplo, cuando se usa IHQ, una puntuación superior a 1 es indicativa de la presencia de un tumor maligno.

La inmunohistoquímica (IHQ) o la inmunofluorescencia (IF) se pueden usar para identificar células epiteliales y/o células estromales en la muestra y para detectar el nivel de expresión de caspasa-1, caspasa-4 y/o caspasa-5 en el tejido y/o las células epiteliales y en el tejido y/o las células estromales.

Se entenderá que el control normal está asociado a un fenotipo exento de enfermedad. Alternativamente, se entenderá que el control normal está asociado a un estadio definido de progresión de tejido intestinal maligno o progresión de la enfermedad asociada.

Se entenderá que el control positivo está asociado a un fenotipo de enfermedad, por ejemplo, un sujeto con cáncer colorrectal (CCR).

Se entenderá que la muestra de tejido intestinal es una muestra o biopsia de tejido estromal y/o una muestra o biopsia de tejido epitelial.

Se entenderá que el estado patológico puede ser enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU) y/o cáncer colorrectal (CCR), que incluye CCR espontáneo y CCR asociado a colitis.

Según otra realización de la invención, el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 se determina usando polinucleótidos que tienen una secuencia de ácidos nucleicos capaz de hibridarse a algunas, opcionalmente todas, las secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas de los conjuntos de sondas de SEQ ID NO 3 y 4, 5 y 6, 9 y 10, 11 y 12, 15 y 16, 17 y 18, 21 y 22, 23 y 24.

También se describe un kit o una matriz para preparar un perfil de ácidos nucleicos de caspasa-4 y/o caspasa-5 que comprende conjuntos de sondas diseñados para dirigirse a la caspasa-4 y/o caspasa-5 seleccionados de entre uno o más de los conjuntos de sondas de SEQ ID NO 3 y 4, 5 y 6, 9 y 10, 11 y 12, 15 y 16, 17 y 18, 21 y 22, 23 y 24.

Los detalles completos de los cebadores usados para dirigirse a la caspasa-1, -4 y -5 se presentan en la tabla siguiente.

SECUENCIA	**NOMBRE DE LA SECUENCIA (F-directo R-inverso)**	**SEQ ID NO**
Conjunto de cebadores 1 (figura 1)		
TGCCTGTTCCTGTGATGTGGAGGA	CASP1F	SEQ ID NO 1
CAGTGGTGGGCATCTGCGCT	CASP1R	SEQ ID NO 2
ACCGTGGGGAACTGTGGGTCA	CASP4F	SEQ ID NO 3
CCAGGACACGTTGTGTGGCGT	CASP4R	SEQ ID NO 4
CGCAGACGCCTGGCTCTCAT	CASP5F	SEQ ID NO 5

SECUENCIA	NOMBRE DE LA SECUENCIA (F-directo R-inverso)	SEQ ID NO
AGCCCAGGCCTTGAAGCAGC	CASP5R	SEQ ID NO 6
Conjunto de cebadores 2		
ATCCGTTCCATGGGTGAAGG	CASP16F	SEQ ID NO 7
GCCCCTTTCGGAATAACGGA	CASP16R	SEQ ID NO 8
TCTGAGGCTCTTTCCAACGC	CASP4αF	SEQ ID NO 9
CCCAGGGATTCCAACACCTT	CASP4αR	SEQ ID NO 10
AGATGTTGGAATACCTGGGCA	CASP5eF	SEQ ID NO 11
TGATGAGCCACGCGATTCTT	CASP5eR	SEQ ID NO 12
Conjunto de cebadores 3		
GAAAAGCCATGGCCGACAAG	CASP1γF	SEQ ID NO 13
AGGAGCTTCACCCATGGAAC	CASP1γR	SEQ ID NO 14
TTCACCAACTGTCAGAAGGCA	CASP4γF	SEQ ID NO 15
GTCTGCCATGACCCGAACTT	CASP4γR	SEQ ID NO 16
TTAGCTATGGCTGCTCTTCTGC	CASP5cF	SEQ ID NO 17
GTCTGCGGTCCTCTCTCTTTTT	CASP5cR	SEQ ID NO 18
Conjunto de cebadores 4		
GTTCCATGGGTGAAGATAATGTTT	CASP1εF	SEQ ID NO 19
GCATCTGCGCTCTACCATCT	CASP1εR	SEQ ID NO 20
CTTCACCAACTGTCAGAAGGC	CASP4γF	SEQ ID NO 21
TCTGCCATGACCCGAACTTT	CASP4γR	SEQ ID NO 22
TGTTGGAATACCTGGGCAAAGA	CASP5eF	SEQ ID NO 23
TTGATGAGCCACGCGATTCT	CASP5eR	SEQ ID NO 24

También se describe un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de inflamación intestinal en un sujeto que comprende la etapa de inhibir la expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un sujeto. Este procedimiento comprende el uso de inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 o siRNA dirigido a la caspasa-4 y/o la caspasa-5.

También se describen inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para uso en el tratamiento y/o la prevención de inflamación intestinal en un sujeto, en particular enfermedad inflamatoria intestinal (EII), colitis ulcerosa (CU) y/o cáncer colorrectal (CCR).

También se describe el uso de inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de inflamación intestinal en un sujeto.

Según un aspecto de la invención, se proporcionan inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para uso en el tratamiento y/o la prevención del carcinoma en un sujeto con necesidad del mismo, comprendiendo el uso administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de caspasa-4 y/o caspasa-5 para inhibir la expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un sujeto.

Según una realización, los inhibidores se dirigen a, e inhiben o reducen, la expresión de caspasa-4 y/o de caspasa-5 en células estromales no inflamadas de un sujeto.

Según otra realización, los inhibidores se dirigen a, e inhiben o reducen, la expresión de caspasa-4 y/o de caspasa-5 en células epiteliales de un sujeto.

Según todas las realizaciones de la invención, los inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 se pueden seleccionar de entre inhibidores de caspasas de origen natural o inhibidores peptídicos sintetizados químicamente.

Los inhibidores de caspasas de origen natural incluyen inhibidores de caspasas procedentes de virus, tales como CrmA del virus de la viruela bovina, e inhibidores de caspasas procedentes de bacterias, tales como OspC3 de la shigelosis. Los inhibidores peptídicos sintetizados químicamente incluyen tri/tetrapéptidos cortos que imitan las secuencias de aminoácidos de sustratos a los que se dirigen las caspasas. Estos inhibidores peptídicos actúan como inhibidores competitivos y esencialmente "neutralizan" toda la caspasa activa para que ya no estén disponibles para llevar a cabo su función celular normal.

Opcionalmente, los inhibidores peptídicos sintetizados químicamente se seleccionan de entre péptidos que incluyen z-VAD-fmk, YVAD-fmk, LSTD.fmk y/o WEHD-fmk.

Alternativamente, el inhibidor de caspasas de origen natural es una proteína del virus de la viruela bovina, que incluye CrmA (modificador de la respuesta de citocinas A) y OspC3.

Se pueden usar otros inhibidores de caspasas convencionales según la invención.

La invención se describirá ahora en lo que respecta a las figuras y los ejemplos no limitantes siguientes.

Figura 1: expresión aumentada del gen de la caspasa inflamatoria en biopsias de pacientes con EII de una cohorte belga.
Expresión relativa de CASP1 (A), CASP4 (*B*) y CASP5 (*C*) en muestras de biopsia de un control sano sin EII (n = 21), pacientes con CU activa en áreas endoscópicamente sanas (n = 10) e inflamadas (n = 11) y pacientes con EC activa de colon e íleo sanos (n = 38) e inflamados (n = 21) como se cuantifica mediante qPCR. Los datos están normalizados a la mediana de 3 genes de referencia expresados de manera estable y representan la mediana y el intervalo; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001(prueba de Kruskal-Wallis con comparación retrospectiva de Dunn con el control).
Figura 2: la expresión de caspasa-1 inflamatoria está fuertemente interrelacionada con la enfermedad clínica y las puntuaciones de inflamación en biopsias de pacientes con colitis ulcerosa de una cohorte irlandesa.
(A) La puntuación de inflamación está interrelacionada con la puntuación endoscópica Mayo (puntuación de actividad de la enfermedad). La puntuación Mayo se calificó en una escala de 0-4 (con (0) indicando ausencia de actividad; (1) actividad mínima; (2) actividad leve; (3) actividad moderada y (4) actividad grave). La puntuación de inflamación se calificó en una escala de 0-3 (con (0) indicando ausencia de actividad; (1) actividad leve; (2) actividad moderada y (3) actividad grave. (*B*) Imágenes representativas del patrón de expresión de caspasa-1 en células epiteliales (grupo de pruebas superior) y células estromales (grupo de pruebas inferior) de secciones de biopsia de CU no inflamadas e inflamadas. Se observó tinción negativa para el control de isotipo de IgG de conejo/ratón (control negativo). Aumento original ×20. (*C*) Los niveles de expresión de caspasa-1 están interrelacionados con las puntuaciones inflamatorias histológicas para biopsias colónicas de CU (*D*) Niveles de expresión de caspasa-1 frente a la puntuación endoscópica Mayo. La IHQ se realizó en tejido del colon de 11 pacientes con CU sin inflamación y 25 pacientes con diversos grados de inflamación. Los datos representan media ± EEM; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 (prueba U de Mann-Whitney).
Figura 3: la expresión de caspasa-4 y -5 inflamatorias está fuertemente interrelacionada con la enfermedad clínica y las puntuaciones de inflamación en biopsias de pacientes con colitis ulcerosa de una cohorte irlandesa.
Imágenes representativas de los patrones de expresión de (A) caspasa-4 y (D) caspasa-5 en células estromales de secciones de biopsia de CU. Aumento original x20. Los niveles de expresión de (B) caspasa-4 y (E) caspasa-5 están interrelacionados con las puntuaciones inflamatorias histológicas para las biopsias colónicas de CU. La puntuación Mayo se calificó en una escala de 0-3 (con (0) indicando ausencia de actividad; (1) actividad leve; (2) actividad moderada y (3) actividad grave). (C) Niveles de expresión de caspasa-4 y (F) caspasa-5 frente a la puntuación endoscópica Mayo. La puntuación Mayo se calificó en una escala de 0-4 (con (0) indicando ausencia de actividad; (1) actividad mínima; (2) actividad leve; (3) actividad moderada y (4) actividad grave). La IHQ se realizó en tejido del colon de 11 pacientes con CU sin inflamación y 25 pacientes con diversos grados de inflamación. Los datos representan media ± EEM; *p < 0,05; **p < 0.01, ***p < 0,001 (prueba U de Mann-Whitney).
Figura 4: el análisis cuantitativo de la tinción IHQ revela expresión aumentada de caspasa-1, -4 y -5 en células estromales de tejido tumoral de CCR.
(A) Las áreas definidas de tejido tumoral (TT) y tejido normal (TN) adyacente de las resecciones de pacientes con CCR se puntuaron mediante IHQ para la expresión de caspasa-1, -4 y -5 en células estromales. (B) Imágenes representativas de los patrones de expresión de caspasa-1, -4 y -5 en células estromales de tejido de resección normal y tumoral de pacientes con CCR. Los datos representan media ± EEM; *p < 0,05; **p < 0.01, ***p < 0,001 (prueba U de Mann-Whitney). Caspasa-1 TN (n = 18), caspasa-1 TT (n = 22); caspasa-4 TN (n = 18), caspasa-4 TT (n = 23); y caspasa-5 TN (n = 18), caspasa-5 TT (n = 24). Barra de escala = 50 µm.
Figura 5: la expresión epitelial de caspasa-4 y -5 es específica de, y se limita a, tejido tumoral de CCR neoplásico.

(A) Las áreas definidas de tejido tumoral (TT) y tejido normal (TN) adyacente de resecciones de pacientes con CCR se puntuaron mediante IHQ para la expresión de caspasa-1, -4 y -5 en células epiteliales. (B) Imágenes representativas de los patrones de expresión de caspasa-1, -4 y -5 en células epiteliales de tejido de resección normal y tumoral de pacientes con CCR. Los datos representan media ± EEM; *p < 0,05; **p < 0.01, ***p < 0,001 (prueba U de Mann-Whitney). Caspasa-1 TN (n = 18), caspasa-1 TT (n = 22); caspasa-4 TN (n = 18), caspasa-4 TT (n = 23); y caspasa-5 TN (n = 18), caspasa-5 TT (n = 24). Barra de escala = 50 µm.

Figura 6: expresión estromal aumentada de caspasa-4 y -5 inflamatorias en secciones inflamadas y tumorales de tejido de CCR asociado a colitis.

(A) Las áreas definidas de tejido (N) normal (n = 6), (I) inflamado (n = 7) y (T) tumoral (n = 8) de pacientes con CAC se puntuaron para la expresión de caspasa-1, -4 y -5 en células estromales. (B) Imágenes representativas de los patrones de expresión de caspasa-1, -4 y -5 en tejido estromal normal, inflamado y tumoral de biopsias de pacientes con CAC. Los datos representan media ± EEM; *p < 0,05; *p < 0,01 (prueba U de Mann-Whitney); Barra de escala = 50 µm.

Figura 7: la tinción IHQ de biopsias de resecciones de pacientes con CAC (CCR asociado a colitis) confirma la expresión epitelial específica de tumor de las caspasas-4 y -5.

(A) Las áreas definidas de tejido (N) normal (n = 6), (I) inflamado (n = 7) y (T) tumoral (n = 8) de biopsias de pacientes con CAC se puntuaron para la expresión de caspasa-1, -4 y -5 en células epiteliales.

(B) Imágenes representativas de los patrones de expresión de caspasa-1, -4 y -5 en tejido epitelial normal, inflamado y tumoral de biopsias de pacientes con CAC. Los datos representan media ± EEM; *p < 0,05; *p < 0,01 (prueba U de Mann-Whitney); Barra de escala = 50 µm.

Figura 8: expresión aumentada de caspasa-4 y -5 en un panel de estirpes celulares de CCR.

La inmunoelectrotransferencia y densitometría posterior se realizaron analizando la caspasa-4 y caspasa-5 en lisados de células 293T (control), HCT116, SW480, SW620 y CACO2. Las proteínas (20 µg) se fraccionaron mediante SDS-PAGE y se detectaron mediante análisis por inmunoelectrotransferencia usando anti-caspasa-4 (A) y anti-caspasa-5 (B). Los niveles de expresión se normalizaron a β-actina para tener en cuenta los problemas de carga. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 9: inhibición de la expresión de caspasa-4 después de la transfección con siRNA.

Análisis de inmunoelectrotransferencia de células (A) Caco-2 y (B) SW620 tratadas con siCASP4 100 mM durante 24, 48 y 72 horas. Las proteínas (20 µg) se fraccionaron mediante SDS-PAGE y se detectaron mediante análisis por inmunoelectrotransferencia usando anti-caspasa-4. Se incluyó β-actina para evaluar la carga proteica equivalente.

Figura 10: los niveles aumentados de proteína caspasa-4 y -5 en tejido tumoral de pacientes con CCR son detectables mediante electroinmunotransferencia.

Los lisados de tejido normal (N) distal al tumor (no adyacente) y tejido tumoral (T) (20 µg) de resecciones de pacientes con CCR se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia para la caspasa-1, -4 y -5.

Figura 11: la tinción IHQ del tejido de pólipo confirma la expresión epitelial específica de tumor de las caspasas-4 y -5.

(A) Imágenes representativas de la expresión de caspasa-4 en áreas definidas de tejido normal (N) y displásico de grado bajo (DGB) de tejido de pólipo de colon. (B) Las áreas definidas de N y DGB de tejidos de pólipos de colon (n = 5) se puntuaron mediante IHQ para la expresión de caspasa-4 estromal y epitelial. Los datos representan media ± EEM; *p < 0,05; *p < 0,01 (prueba U de Mann-Whitney); Barra de escala = 50 µm.

Figura 12: el tejido esofágico teñido mediante IHQ de pacientes sanos, de Barrett (inflamado) y con adenocarcinoma (ACE) revela la tinción aumentada e inconfundible de la caspasa-4 y -5 en regiones metaplásicas y tumorales.

Las puntuaciones IHQ de áreas definidas de tejido normal adyacente, metaplasia intestinal (esófago de Barrett) y tejido tumoral de resecciones de pacientes con adenocarcinoma esofágico se puntuaron mediante IHQ para la expresión de (A y B) caspasa -4 y (D y E) caspasa-5 en células epiteliales y estromales. (C y F) Imágenes representativas de los patrones de expresión de caspasa-4 y -5 en células epiteliales y estromales de tejido de resección adyacente normal, con esófago de Barrett y con adenocarcinoma esofágico de pacientes. Los datos representan media ± EEM; *p < 0,05 (prueba U de Mann-Whitney). Caspasa-4 (n = 5), caspasa-5 (n = 5). Aumento original x10.

Figura 13: el tejido de carcinoma de mama teñido mediante IHQ revela positividad epitelial específica de tumor para la caspasa-4.

Imágenes representativas que muestran la expresión epitelial de caspasa-4 específica de tumor. (A) Aumento de 40X del área del tumor de mama (verde) con tinción positiva para caspasa-4 (rojo). (B) Aumento de 20X de tejido tumoral de mama de otra paciente que presenta positividad para caspasa-4 en las células epiteliales tumorales.

Figura 14: representación esquemática de los niveles de expresión de caspasa-4 y -5 en colon normal y enfermo. A.

A. En los cólones de individuos sanos, las células epiteliales son completamente negativas para la expresión de caspasa-4 y -5, y se detectan niveles de referencia bajos de caspasa-4 y -5 (C4, C5) en el estroma. Los cólones inflamados de pacientes con colitis ulcerosa presentan niveles de expresión crecientes de las caspasas-4 y -5 en el

estroma, que se interrelacionan con los niveles de inflamación y la actividad de la enfermedad. Las células epiteliales del tejido inflamado siguen siendo negativas para la expresión de caspasa-4 y -5. El tejido maligno de pacientes con cáncer colorrectal es positivo para la expresión de caspasa-4 y -5 tanto en las células epiteliales como en el estroma. Las imágenes representan tejido de la biopsia del paciente que se ha teñido inmunohistoquímicamente para la expresión de caspasa-4 en tejido de colon (A) sano (B) inflamado y (C) maligno.

Figura 15: representación esquemática de los niveles de expresión de caspasa-4 y -5 en adenocarcinoma de mama.

A. Representación esquemática de carcinoma ductal in situ e invasión local. Los adenocarcinomas de mama proceden del epitelio que reviste los conductos o los lobulillos. Imagen representativa que muestra la tinción con hematoxilina-eosina de tejido de adenocarcinoma de mama. Las células malignas están representadas mediante flechas rojas. Las células inflamatorias entremezcladas están resaltadas mediante círculos azules. Imagen representativa de tejido de adenocarcinoma que se ha teñido inmunohistoquímicamente para la expresión de caspasa-4. La línea verde representa el límite del tumor, el área roja resalta las células tumorales epiteliales positivas para caspasa-4.

Figura 16: perfil de expresión de las caspasas inflamatorias en diversos grados tumorales - Expresión epitelial aumentada de caspasa-4 en grados tumorales avanzados.

Las puntuaciones IHQ para la expresión de caspasa-1, -4 y -5 en áreas epiteliales (A, C y E) y estromales (B, D y F) de tejido tumoral de pacientes con CCR (n = 20) se interrelacionaron con su grado tumoral. Los grados tumorales (T1 (el tumor está confinado a la capa interior del intestino), n = 3; T2 (el tumor ha avanzado a la capa muscular de la pared intestinal), n = 3 y T3 (el tumor ha crecido al revestimiento exterior de la pared intestinal), n = 14) fueron asignados por un anatomopatólogo usando el TNM (sistema de clasificación clínica Tumor-Ganglio-Metástasis). Los datos representan media ± EEM; prueba *t* de Student independiente bilateral; $*p < 0,05$.

Figura 17: ausencia de diferencias significativas entre la expresión de caspasas inflamatorias y el estado de diferenciación "moderado" o "moderado invasivo" del CCR.

Las puntuaciones IHQ para la expresión de caspasa-1, -4 y -5 en compartimentos epiteliales (A, C y E) y estromales (B, D y F) de tejido tumoral de pacientes con CCR (n = 21) se interrelacionaron con su estado de diferenciación: M (adenocarcinoma moderadamente diferenciado, n = 9) y MI (adenocarcinoma diferenciado moderadamente invasivo, n = 12). Los datos representan media ± SEM; prueba t de Student independiente bilateral.

Figura 18: expresión aumentada de caspasa-1, -4 y -5 en áreas de inflamación (metaplasia) y tumor en tejido de esofagectomía de pacientes con adenocarcinoma (ACE). Imágenes representativas de la expresión de caspasa-1, -4 y-5 en células epiteliales (A, E, I) y células estromales (C, G, K) de áreas definidas de tejido de resección normal adyacente, con esófago de Barrett (metaplasia) y con adenocarcinoma esofágico (tumor) del paciente. Las áreas definidas de tejido normal adyacente, metaplasia intestinal y tumoral de pacientes con ACE se puntuaron mediante IHQ para la expresión de caspasa-1, -4 y -5 en regiones epiteliales (B, F, J) y estromales (D, H, L) usando un procedimiento de puntuación semicuantitativo validado (n = 32 pacientes por grupo). Los datos representan media ± EEM. Los valores de p se calcularon usando la prueba *U* de Mann-Whitney; $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ y ns (no significativo). Aumento original x20.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y ADENOCARCINOMA

Diseño Se examinó la expresión de caspasas inflamatorias en pacientes con EII de una cohorte belga mediante qPCR (n = 103); y en pacientes con colitis ulcerosa (CU) (n = 36), pacientes con CCR (n = 25) y pacientes con CCR asociado a CU (n = 8) de cohortes irlandesas mediante tinción inmunohistoquímica (IHQ).

PROCEDIMIENTOS

Muestras clínicas

Población de pacientes con EII belgas: este estudio fue aprobado por el comité de ética regional (CE 2000/242) y todos los pacientes participantes firmaron consentimientos informados. En total, se tomaron 103 biopsias de controles (n = 23; 10 hombres, 13 mujeres, edad promedio 51 (intervalo 22-69) y pacientes con EC (n = 54; 27 hombres, 27 mujeres, edad promedio 37 (intervalo 8-72)) o CU (n = 16; 8 hombres, 8 mujeres, edad promedio 38 (intervalo 7-61)). Todos los pacientes de esta cohorte no estaban recibiendo medicación o estaban recibiendo 5-ASA. Además, la mayoría de los pacientes habían sido incluidos anteriormente en un estudio del genoma completo.: este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Universitario St. Vincent. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito. Se tomaron biopsias intestinales de 36 pacientes con un diagnóstico de CU, con las puntuaciones Mayo prospectivas de actividad endoscópica: Mayo 0 (inactiva, n = 11; 3 hombres, 8 mujeres, edad promedio 46 (intervalo 19-60), Mayo 1 (mínima, n = 7; 6 hombres, 1 mujer, edad promedio 41 (intervalo 34-64), Mayo 2 (leve, n = 8; 8 hombres, edad promedio 37 (intervalo 22-76), Mayo 3 (moderada, n = 4; 4 hombres, edad

promedio 49 (intervalo 38-50)) y Mayo 4 (grave, n = 6; 3 hombres, 3 mujeres, edad promedio 31 (intervalo 20-72)). Todos excepto 4 pacientes de esta cohorte estaban recibiendo medicación, que incluía aminosalicilatos, corticosteroides, inmunomoduladores o terapia biológica (adalimumab o infliximab) según el mejor protocolo diagnóstico-terapéutico para el tratamiento de su enfermedad.

Población de pacientes con CCR y CCR asociado a EII irlandeses: el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Médica, Hospital Beaumont. Las áreas de tumor y tejido tumoral y normal adyacente de 25 pacientes con CCR espontáneo (véase la Tabla 1 para conocer las características) se evaluaron mediante IHQ para determinar los niveles de expresión de caspasa-1, -4 y -5 inflamatorias. El tejido de explante de 8 pacientes adicionales con CCR asociado a EII (véase la Tabla 2 para conocer las características) se evaluó para determinar la expresión de caspasas inflamatorias en áreas de tejido tumoral con inflamación y adyacente normal.

Tabla 1

N.º de paciente	Sexo	Edad	Ubicación	Tipo	Estadio
1	F	76	Hemicolectomía derecha	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	pT3 N2 Mx Duke C
2	M	51	Resección anterior	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	pT3 N1 Mx Duke C
3	F	78	Hemicolectomía derecha	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	pT3 N0 Mx Duke C
4	F	71	Resección anterior	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	pT4 N2 Mx Duke C
5	M	78	Hemicolectomía derecha	Adenoma velloso	pTis N0 Mx
6	F	41	Resección anterior	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado focalmente invasivo, después de quimioterapia prequirúrgica	ypT3 N0 Duke B
7	M	61	Sigmoideo	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	pT3 N0 Mx Duke C
8	F	78	Hemicolectomía derecha	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	pT2 N0 Mx Duke A
9	M	64	Recto	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	pT2 N2 Mx Duke C
10	M	59	Recto	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo, después de quimioterapia prequirúrgica	ypT3 N0 Duke B
11	F	50	Hemicolectomía derecha	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado ulcerado	pT3 N0 Mx
12	M	74	Sigmoideo	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	pT3 N1 Mx Duke C
13	F	62	Resección anterior	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado infiltrante	pT1 N0 Duke A
14	F	44	Recto-sigmoide	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	pT2 N0 Mx Duke A
15	F	39	Proctocolectomía	Adenocarcinoma sincrónico en PAF	pT3 N1 Mx Duke C
16	M	64	Hemicolectomía derecha	Adenocarcinoma mucinoso moderadamente diferenciado invasivo	pT3 N2 Mx Duke C
17	F	53	Hemicolectomía	Adenocarcinoma moderadamente	pT3 N0 Mx

N.º de paciente	Sexo	Edad	Ubicación	Tipo	Estadio
			derecha	diferenciado invasivo	Duke C
18	F	65	Hemicolectomía derecha	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	pT3 N0 M1
19	F	72	Sigmoideo	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	pT1 N0 Mx
20	F	81	Recto	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	pT1 N0 Mx
21	F	69	Hemicolectomía derecha	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	pT3 N1 Mx Duke C
22	F	78	Colon (ningún área especificada)	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado ulcerado	pT4 N0
23	F	81	Colon (ningún área especificada)	Adenocarcinoma bien diferenciado	pT3 N1 Mx Duke C
24	M	83	Resección anterior	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	pT3 N2
25	M	70	Recto-sigmoide	Adenocarcinoma poco diferenciado, después de quimioterapia prequirúrgica	ypT3 N0 Mx

Tabla 2

N.º de paciente	Sexo	Edad	Tipo de tumor	Estadio
1	F	76	Adenocarcinoma poco diferenciado invasivo	pT4 N2
2	M	56	Adenocarcinoma mucinoso moderadamente diferenciado ulcerado	pT4 N2
3	M	49	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	pT1 N1, Duke C
4	F	66	Adenocarcinoma de bien a moderadamente diferenciado, después de quimioterapia prequirúrgica	ypT3 N0
5	M	42	Adenocarcinoma de células en anillo de sello invasivo	pT3 N1 Mx
6	M	70	Adenocarcinoma poco diferenciado	pT3 N2
7	M	36	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado focalmente invasivo	Duke A
8	M	44	Adenocarcinoma mucinoso moderadamente diferenciado	pT3 N0 Duke B

Aislamiento de ARN y conversión a ADNc

El ARN total de las biopsias se extrajo usando RNeasy Mini Kit de Qiagen, con tratamiento de DNAsa en columna según las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración del ARN se evaluaron sometiendo las muestras a electroforesis en gel automatizada y análisis con Experion (Bio-Rad). Las muestras con una relación de 28S/18S entre 1,6 y 1,8 y un índice mínimo de calidad del ARN de 7 se incluyeron en el análisis. El sistema WT-Ovation™ de NuGEN se usó para preparar y amplificar el ADNc, partiendo de 50 ng de ARN total, según las instrucciones del fabricante.

PCR cuantitativa

Diseño de cebadores: se usó RTprimerDB para el diseño de los cebadores y la evaluación de los cebadores con

simulación por ordenador (ausencia de estructuras secundarias, SNP y unión inespecífica mediante BLAST). Las condiciones de la qPCR se ajustaron a temperatura de hibridación de 60 ºC, Na^+ 50 mM y Mg^{2+} 3 mM. Para ensayar la eficiencia de la PCR de un conjunto de cebadores, se sometieron una serie de diluciones de ADNc o ADNg a qPCR y se calculó la eficiencia como $10^{-1/pendiente}$ - 1) x 100. Se usaron conjuntos de cebadores con eficiencias de 90-110 %. Las secuencias de cebadores usadas fueron las siguientes:

CASP1F-TGCCTGTTCCTGTGATGTGGAGGA; CASP1R-CAGTGGTGGGCATCTGCGCT;

CASP4F-ACCGTGGGGAACTGTGGGTCA; CASP4R- CCAGGACACGTTGTGTGGCGT;

CASP5F-CGCAGACGCCTGGCTCTCAT; CASP5R- AGCCCAGGCCTTGAAGCAGC.

La tinción SYBR green I que contenía las mezclas de PCR (Roche, volumen de reacción de 8 µl) se sometió a PCR en un sistema LightCycler en formato de 384 pocillos (LC480, Roche). Las condiciones de los ciclos fueron 10 min 95 ºC y 40 ciclos a 95 ºC durante 15 s y 60 ºC durante 60 s. Para cada conjunto de cebadores, se realizó un análisis del punto máximo de fusión para verificar la especificidad de la reacción en cada pocillo. Los datos de expresión se normalizaron usando la mediana de la expresión de SDHA, HPRT y GAPDH como genes de referencia. Los análisis de datos se realizaron usando el software acompañante y los resultados se importaron a Prism (software de Graphpad) para su análisis adicional.

Validación de la recogida de ADNc usando interleucina 8 (IL-8)

Cabe esperar que los niveles de IL-8 en las biopsias macroscópicas con inflamación estén elevados en comparación con el tejido obtenido de individuos de control sanos. Sin embargo, no se puede descartar que las biopsias sin afectación aisladas de pacientes con EII estén completamente desprovistas de inflamación microscópica. Por lo tanto, se midieron los niveles de IL-8 de todas las muestras mediante qPCR. Se encontró una interrelación alta entre la evaluación endoscópica (macroscópica) de la inflamación y los niveles de IL8, con una especificidad de 81 % y una sensibilidad de 72 %.

Inmunohistoquímica de biopsias de pacientes con CU

La inmunohistoquímica se realizó usando tejidos incluidos en parafina y fijados en formalina (FFPE) obtenidos de pacientes con CU. Se usó una técnica de marcado de inmunoperoxidasa de tres etapas rutinaria que incorpora complejo de inmunoperoxidasa con avidina-biotina (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Las secciones se incubaron con anticuerpos primarios anti-caspasa-1 (Santa Cruz Biotech.), anti-caspasa-4 y -5 (Abcam/MBL) durante 1 h. Las secciones también se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón/conejo apropiado compatible con el isotipo como control negativo. Se usó DAB, tetraclorhidrato de diaminobenzadina (Sigma) para visualizar la tinción. Las imágenes se capturaron con el microscopio óptico Olympus DP50 y el software AnalySIS (Soft Imaging System Corporation, Lakewood, Colorado, EE. UU.). La expresión de caspasas fue evaluada por dos evaluadores que desconocían los anticuerpos usados mediante un procedimiento de puntuación semicuantitativo validado. Todas las células con tinción IHQ fueron evaluadas mediante una puntuación combinada de intensidad y porcentaje de tinción nuclear y citoplasmática. La intensidad de tinción se calificó usando una escala de 0-3 donde 0 = negativa, 1 = débil, 2 = moderada y 3 = fuerte. El porcentaje de positividad se calificó usando una escala de 0-4 donde 0 = ausencia de células teñidas, 1 = 1-25 % de células teñidas, 2 = 25-50 % de células teñidas, 3 = 50-75 % de células teñidas y 4 = 75-100 % de células teñidas.

Análisis inmunohistoquímico del CCR

El análisis IHQ de las caspasas inflamatorias se llevó a cabo en un sistema de inmunotinción BOND-III de Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido. El sistema Bond-III desparafinó los portaobjetos antes del pretratamiento con solución de recuperación de epítopos BOND I (n.º de cat. AR9961). Los anticuerpos primarios se diluyeron en diluyente de anticuerpos primarios BOND (n.º de cat. AR9352) - anti-Casp-4 (n.º de cat. M029-3; MBL); anti-Casp-5 (n.º de cat. M060-3; MBL) y anti-Casp-1 (n.º de cat. SC 622; Santa Cruz Biotechnology). La detección y visualización de las células teñidas se consiguió usando el kit de detección polimérico Bond (n.º de cat. DS9800), usando diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina y se cubrieron con cubreobjetos. Se utilizaron controles negativos apropiados (omisión de anticuerpos primarios) en todos los ensayos.

Análisis estadístico

Los valores se expresan como mediana e intervalo o como media ± EEM. El paquete de software Prism de GraphPad,

versión 5 (GraphPad Software, CA, EE. UU.) se usó para realizar el análisis estadístico. Las diferencias en los parámetros entre dos grupos se realizaron usando la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica (con comparación retrospectiva de Dunn con el control) para los análisis mediante qPCR y pruebas de Mann-Whitney de datos no emparejados para los datos de expresión IHQ. Los valores de p de <0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El análisis por correlación se realizó calculando el coeficiente de correlación de Spearman. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró significativo.

RESULTADOS

Niveles de expresión de caspasas inflamatorias elevados en muestras de pacientes con EII con inflamación

Se diseñó un estudio para examinar el grado de expresión de caspasas inflamatorias en biopsias intestinales de pacientes con EII. Usamos PCR en tiempo real para amplificar y cuantificar r*CASP1, CASP4* y CASP5 a partir de ADNc preparado a partir de 103 biopsias de 53 pacientes con EC, 26 pacientes con CU y 24 pacientes sanos. El tejido sano o inflamado de CU/EC se obtuvo de pacientes con CU/EC con y sin indicios endoscópicos de inflamación y el tejido de control se obtuvo de biopsias endoscópicamente normales de individuos de control sin EII. La expresión de caspasa-1 fue significativamente elevada en las muestras de tejido de pacientes con CU/EC con inflamación (figura 1A). La expresión de caspasa-4 y caspasa-5 también fue significativamente elevada en el tejido inflamado, lo que sugiere que, además de la caspasa-1, las caspasas-4 y -5 también pueden jugar un papel durante la inflamación intestinal (figura 1B, C). Los datos presentados en la figura 1C revelaron que la expresión de caspasa-4 es superior en el tejido no inflamado de pacientes con EII (tanto en íleon como en colon), lo que sugiere que puede ser un marcador precoz de EII. Por el contrario, la expresión de caspasa-1 y -5 fue significativamente superior en el tejido colónico, no en el ileal, inflamado (figura 1A, C), lo que sugiere su implicación en la colitis, y no en la ileítis. Tomados en conjunto, estos datos respaldan la hipótesis de que las caspasas-4 y -5 inflamatorias tienen juegan un papel importante en la inflamación intestinal observada durante la EII.

Los niveles de expresión estromal de caspasa-4 y -5 están interrelacionados con la inflamación patológica y las puntuaciones clínicas de enfermedad en pacientes con CU

Para confirmar esta hipótesis, examinamos la relación entre la expresión de caspasas inflamatorias y tanto la inflamación como la actividad de la enfermedad en pacientes con CU. Las puntuaciones de actividad de la enfermedad (Mayo) fueron asignadas prospectivamente a los pacientes con EII por el médico en el momento de la endoscopia, y las biopsias de 36 pacientes con CU con puntuaciones Mayo que oscilaban de 0 a 4 (es decir, enfermedad normal/inactiva a enfermedad a enfermedad grave) fueron codificadas y seccionadas para la evaluación histológica, para asignar una puntuación inflamatoria, y la evaluación inmunohistoquímica (IHQ), para teñir para determinar la expresión de caspasa-1, -4 y -5. Los datos demuestran una interrelación FUERTE entre las puntuaciones clínicas Mayo y las puntuaciones de inflamación histológicas (RHO DE SPEARMAN 0,631, P < 0,0001) (figura 2A), lo que confirma la validez de ambos sistemas de puntuación. Los datos presentados en la figura 2B revelaron que, aunque la caspasa-1 parece expresarse a niveles bajos en el tejido no inflamado, se expresa fuertemente en las células epiteliales y los inmunocitos infiltrantes en la lámina propia durante la inflamación. Una comparación de las puntuaciones IHQ de la caspasa-1 con las puntuaciones de inflamación revela que la caspasa-1 parece expresarse de manera máxima una vez que comienza la inflamación y se mantiene durante la inflamación moderada y fuerte (figura 2C). Similarmente, la tinción aumentada de caspasa-1 también se interrelacionó DÉBILMENTE con la puntuación endoscópica Mayo hasta un nivel moderado (puntuación de 3), (figura 2D). Los patrones de expresión de caspasa-4 y -5 fueron muy similares, coherentes con sus niveles de distribución tisular descritos anteriormente y su identidad de secuencia de 74 %, y se limitaron a los inmunocitos infiltrantes de la lámina propia (figura 3A, D). Al contrario que la caspasa-1, las caspasas-4 y -5 no fueron detectables en las células epiteliales de pacientes con CU, independientemente del grado de inflamación (figura 3A, D). La expresión de caspasa-4 en el tejido estaba muy claramente interrelacionada con el grado de inflamación (RHO DE SPEARMAN 0,502, P < 0,0003) (figura 3B), con la expresión máxima de caspasa-4 presente en secciones con puntuaciones inflamatorias de moderadas a fuertes (puntuaciones de 2 y 3); y también estaba FUERTEMENTE INTERRELACIONADA con la actividad de la enfermedad hasta un nivel moderado (RHO DE SEARMAN 0,622, P < 0,0006) (figura 3C). Similarmente, la intensidad y el porcentaje de tinción IHQ de la caspasa-5 estromal estaban FUERTEMENTE interrelacionados con puntuaciones crecientes de ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD (RHO DE SPEARMAN 0,713, P < 0,0001) (figura 3E) y con PUNTUACIONES DE INFLAMACIÓN crecientes hasta un nivel moderado (RHO DE SPEARMAN 0,422, p < 0,0038) (figura 3F). Por tanto, los datos de este estudio revelan una implicación evidente de las caspasas-4 y -5 en la inflamación asociada a la CU, y representan dianas novedosas para el tratamiento de la inflamación intestinal en pacientes con EII.

Expresión de las caspasas-4 y -5 en células epiteliales de tejido tumoral, pero no adyacente-normal, de

pacientes con CCR

La EII es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal (CCR). Habiendo demostrado la participación de las caspasas inflamatorias durante la EII, buscamos determinar si su expresión también era elevada en el CCR. Las muestras de tejido de tumor colorrectal y adyacente-normal de 25 pacientes con CCR se tiñeron para determinar la expresión de caspasa-1, -4 y -5 mediante IHQ. Cada una de las muestras de CCR, independientemente del estadio de progresión tumoral o la vía de inestabilidad genética (tabla 1), presentó perfiles similares para cada una de las caspasas inflamatorias. En las capas de células estromales, la caspasa-1 se expresó en los inmunocitos infiltrantes del tejido tumoral y, en menor medida, en las del tejido normal adyacente. Interesantemente, hubo un aumento más marcado en la expresión estromal de caspasa-4 y -5 entre el tejido tumoral y el tejido normal adyacente, lo que probablemente refleja la inflamación intensificada que se produce en el microentorno local del tumor (figura 4A, B). La expresión de caspasas inflamatorias en las capas de células epiteliales contrastaba enormemente con los perfiles observados en el estroma (figura 5A, B). Las capas de células epiteliales presentaron una diferencia sorprendente en los niveles de expresión de caspasa-4 y -5 entre el tejido normal y el neoplásico. De forma similar a nuestras observaciones de las biopsias de pacientes con CU, no se pudo detectar la expresión de indistintamente caspasa-4 o -5 en el tejido normal adyacente, sin embargo, hay presentes niveles altos de caspasa-4 y -5 en las células epiteliales tumorales (figura 5A, B). Por el contrario, la expresión de caspasa-1 parece ser deficiente en las células del carcinoma epitelial (figura 5A, B), lo que concuerda con los hallazgos anteriores [10]. Este dato sugiere que las caspasas-4 y -5 pueden ser marcadores novedosos del carcinoma de colon.

Las figuras 16 y 17 forman parte del mismo estudio que los resultados presentados en las figuras 4 y 5. Son de la misma cohorte de pacientes, pero la información se ha diseccionado adicionalmente en grado tumoral (T1-T3) y estado de diferenciación (M/MI) de los pacientes dentro de esa cohorte.

Figuras 16 y 17: llevamos a cabo análisis adicionales de los niveles de expresión de caspasas en la misma cohorte de pacientes. Este análisis adicional de los niveles de expresión de caspasas en cada uno de los grados tumorales (T1-T3) confirma que la expresión epitelial de caspasa-1 parece reducirse al aumentar el grado tumoral (figura 16A), mientras que los niveles epiteliales de caspasa-4 parecen aumentar al aumentar el grado tumoral. (figura 16C), lo que sugiere que la determinación de niveles de caspasa-1 y -4 en los pacientes con CCR puede ser indicativa del grado tumoral. Por el contrario, los niveles de caspasa-5 parecen estar fuertemente elevados incluso en T1, el estadio tumoral más incipiente, cuando el crecimiento tumoral no se ha diseminado más allá de la capa interior del colon (figura 16E). Esta es una observación importante, ya que sugiere que la caspasa-5 puede ser más relevante que la caspasa-4 en términos de detección de tumores incipientes.

Los niveles de expresión de caspasas también se examinaron según el estado de diferenciación de los tumores malignos. Los adenocarcinomas moderadamente diferenciados, que normalmente están presentes en los tumores malignos colorrectales, representaron la mayoría de los tumores en esta cohorte. Estos fueron clasificados adicionalmente en moderado (M) o moderadamente diferenciado-invasivo (MI) por un anatomopatólogo clínico. El análisis de los niveles de expresión de caspasas tanto en las capas de células epiteliales como estromales no reveló diferencias significativas entre cualquiera de los estados de diferenciación (figura 17). Esta observación sugiere que los niveles de expresión de caspasas inflamatorias no influyen en la invasividad de los tumores malignos de CCR.

Expresión de las caspasas-4 y -5 en células epiteliales de tejido tumoral, pero no adyacente-normal o inflamado, de pacientes con CCR asociado a CU

Las estrategias actuales de quimioprofilaxis para pacientes con EII incluyen medicamentos antiinflamatorios de mantenimiento para impedir el desarrollo de cáncer/displasia; y colonoscopia de seguimiento para identificar y tratar las lesiones incipientes. Sin embargo, las lesiones displásicas asociadas a EII-CCR a menudo son difíciles de detectar y estadificar su gravedad [11]. Para determinar en qué punto de la secuencia inflamación-displasia-carcinoma se mejora la expresión de caspasa-4 y -5 en las células epiteliales, se examinó un conjunto de resecciones de pacientes con CCR asociado a CU en áreas de tejido normal, inflamado y tumoral para determinar la expresión de caspasas inflamatorias. El tejido estromal de estos pacientes presentaba perfiles de expresión similares a los observados anteriormente en pacientes con CU (figura 3) y pacientes con CCR (figura 4A, B); con expresión aumentada de las caspasas-4 y -5 tanto en el tejido inflamado como tumoral, mientras que el tejido normal presentaba niveles altos de caspasa-1, lo que lo hacía menos específico del estado inflamatorio/maligno del tejido (figura 6A, B). Sorprendentemente, la expresión epitelial de las caspasas-4 y -5 seguía estando drásticamente limitada al tejido neoplásico, incluso en áreas de tejido gravemente inflamado (figura 7A, B). Las áreas de tejido normal, inflamado y displásico de las resecciones de pacientes con CCR se mantuvieron totalmente negativas para la expresión epitelial de caspasa-4 y -5 (figura 7A, B), aunque se observó un aumento marcado de los linfocitos y macrófagos infiltrantes estromales e intraepiteliales en las áreas de tejido displásico.

Como respaldo a estos hallazgos, también se encontró que un grupo completo de pruebas de estirpes celulares de CCR era positivo para la expresión de las caspasas-4 y -5 (figura 8a, b). Los experimentos para silenciar específicamente las caspasas-4 y - 5, usando siRNA, tienen como objetivo determinar las implicaciones funcionales de su expresión durante la presencia de un tumor maligno (figura 9). Estos hallazgos revelan que las caspasas-4 y -5 son discriminadores novedosos entre tejido inflamado y neoplásico, y sugieren que puede haber un campo de aplicación importante para la detección epitelial de caspasa-4 y -5 como determinantes de la presencia de un tumor maligno en la mucosa colorrectal. La presencia de caspasa-4 y -5 en las células epiteliales se podría desarrollar como un marcador complementario a la evaluación histológica de displasia en el tejido del colon al predecir el riesgo de CCR en los pacientes.

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra que las caspasas inflamatorias se expresan altamente infiltrando los inmunocitos en áreas de inflamación activa en el tracto gastrointestinal de los pacientes con EII. Los niveles de expresión relativa, particularmente de las caspasas-4 y -5, están muy estrechamente interrelacionados con el nivel de inflamación del tejido y el grado de actividad de la enfermedad en los pacientes con CU, lo que sugiere que su expresión intensificada juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Similarmente, demostramos que había niveles altos de expresión de caspasa-4 y -5 en el compartimento estromal del cáncer colorrectal. Sorprendentemente, encontramos un cambio dramático en el patrón de expresión de la caspasa-4 y -5 en las células epiteliales, desde ausencia de expresión en los tejidos normales o inflamados, hasta expresión fuerte en el tejido neoplásico.

La expresión de caspasas inflamatorias en el estroma tanto de pacientes con EII como de pacientes con CCR parece producirse principalmente en los inmunocitos infiltrantes, encontrando que los macrófagos, los linfocitos y las células plasmáticas expresan caspasa-4 y -5. Se observó una fuerte interrelación entre la puntuación de inflamación y la expresión de caspasa-4 y -5 en las biopsias de pacientes con CU, lo que respalda la hipótesis de que las caspasas-4 y -5 contribuyen a la inflamación intestinal, lo más probablemente a través de la activación del inflamasoma no canónico, lo que conduce a la producción aumentada de IL-1beta e IL-18. Aunque están surgiendo indicios de la importancia de la activación del inflamasoma no canónico mediada por caspasa-4/-5 durante la inflamación en seres humanos[12], la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha que caracterizan la activación del inflamasoma no canónico se han llevado a cabo en ratones. Nuestros novedosos hallazgos proporcionan indicios de la activación del inflamasoma no canónico mediada por caspasa-4 y -5 durante la inflamación intestinal en pacientes con CU.

La inflamación es una fuerza motriz esencial en el desarrollo de tumores de origen epitelial, y nuestra observación de una infiltración aumentada de inmunocitos que expresan caspasa-4 y -5 en el punto del tumor en desarrollo puede servir para establecer el microentorno inflamatorio del tumor[]. En lugar de reprimir el crecimiento tumoral, las células inflamatorias pueden favorecer el crecimiento tumoral, particularmente durante el cáncer asociado a inflamación. Otra observación importante de este estudio es la fuerte expresión de las caspasas-4 y -5 en el epitelio neoplásico de pacientes con CCR. En las áreas tumorales, la tinción estromal para las caspasas-4 y -5 fue incluso más fuerte que la observada en el tejido inflamado, y las células epiteliales se volvieron fuertemente positivas para la caspasa-4 y -5, lo que sugiere que las células inflamatorias pueden jugar un papel en la inducción de la expresión de caspasa-4 y -5 en los carcinomas de colon. La exposición de las células epiteliales, o más probablemente de sus células madre intestinales precursoras, a las citocinas proinflamatorias puede inducir marcadores de células madre cancerosas (CMC) y causar la formación de tumores *in vivo*. Este puede ser un mecanismo viable para el cambio a la expresión de caspasa-4 y -5 en las células epiteliales neoplásicas. Los niveles altos de inmunocitos infiltrantes que presentan activación del inflamasoma mediada por caspasa-4 y -5, que impulsa la producción de citocinas proinflamatorias, pueden facilitar la expresión de marcadores de CMC, y las caspasas-4 y -5, en las células epiteliales neoplásicas. La expresión de las caspasas-4 y -5 en las células epiteliales puede jugar un papel diferente que en los inmunocitos infiltrantes del estroma. El análisis anterior del papel del NF-KAPPAB en las células mieloides tanto epiteliales como infiltrantes durante un modelo murino de CCR asociado a colitis reveló que la activación de este factor de transcripción inflamatorio en los dos tipos celulares diferentes provoca la carcinogénesis a través de mecanismos distintos, que implican la estimulación de las citocinas proinflamatorias por las células mieloides infiltrantes y la prevención de la muerte de las CEI con potencial tumorigénico_ENREF_32. A la caspasa-4 se le ha atribuido anteriormente un papel en el impulso de la activación del NF-KAPPAB mediada por LPS_ENREF_33. Por tanto, las caspasas-4 y -5 pueden ser responsables de impulsar el inicio del tumor evitando la muerte de CEI durante el CCR.

Presentamos la expresión de caspasa-4 y -5 en las células epiteliales intestinales como biomarcadores novedosos y altamente específicos del carcinoma colorrectal. En vista de estas observaciones, nuestros hallazgos pueden ser relevantes para el diagnóstico del CCR, como pruebas de diagnóstico para evaluar los niveles de expresión de caspasa-4/-5 en los que pueden desarrollarse las CEI. Asimismo, nuestros hallazgos de que la caspasa-4 y -5

contribuyen al estado inflamatorio en pacientes con EII revela estas dos caspasas como dianas novedosas para amortiguar la inflamación intestinal.

EJEMPLO 2A - INFLAMACIÓN ESOFÁGICA (BARRETT) Y ADENOCARCINOMA ESOFÁGICO (ACE)

Habiendo observado diferencias sorprendentes en los niveles de expresión celular de las caspasas-4 y -5 en el tejido de colon normal, inflamado y maligno, buscamos determinar si también resultaban evidentes diferencias similares en otros tejidos del tracto GI.

Procedimientos

Muestras clínicas: tejido esofágico

La aprobación ética se obtuvo del Comité de Ética del hospital St. James Hospital/TCD. El tejido de resección de cinco pacientes con Barrett/ACE fue evaluado por un anatomopatólogo clínico y se identificaron áreas definidas de regiones adyacentes normales, metaplásicas y tumorales. La tinción IHQ para caspasa-4 y -5 se llevó a cabo en cada región definida usando un sistema de inmunotinción BOND-III de Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido. El sistema Bond-III desparafinó los portaobjetos antes del pretratamiento con solución de recuperación de epítopos BOND I (n.º de cat. AR9961). La puntuación IHQ se realizó (con enmascaramiento) multiplicando el porcentaje de células positivas (P) por la intensidad (I) de tinción citoplasmática. El porcentaje de células positivas se evaluó usando 6 categorías. (0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 % y 100 %). La intensidad de la tinción se calificó usando una escala de tinción de 0-3 donde 0 = negativa, 1 = débil, 2 = moderada y 3 = fuerte.

Resultados

Las enfermedades inflamatorias en tejidos del tracto GI, tales como garganta, esófago, estómago y páncreas, están asociadas al desarrollo de adenocarcinoma. Las resecciones de tejido de cinco pacientes con ACE tiñeron con hematoxilina-eosina y un anatomopatólogo clínico experimentado identificó regiones definidas de tejido normal, inflamado y tumoral. Se tomaron 3 núcleos de cada una de las áreas normales, inflamadas y tumorales de cada resección del paciente y se generó un portaobjetos de micromatrices tisulares (TMA). Los portaobjetos de TMA se sometieron a tinción IHQ para las caspasas-4 y -5 y se puntuó con enmascaramiento la intensidad y el porcentaje de positividad (figura 12). La puntuación y las imágenes representativas de los tejidos teñidos para caspasa-4 (figura 12A-C) presentan una expresión baja de caspasa-4 en el tejido normal y expresión aumentada de caspasa-4 en las capas tanto epiteliales como estromales de los tejidos metaplásicos y tumorales. La tinción para caspasa-5 presentó un patrón de expresión muy similar, con niveles proteicos crecientes a partir del tejido tumoral de referencia de las capas de células tanto estromales como epiteliales (figura 12D-F).

Discusión

Estos resultados identifican las caspasas-4 y -5 como marcadores novedosos de inflamación esofágica y ACE. Aunque no observamos la expresión específica de las caspasas-4 y -5 solo en el tejido esofágico maligno, asumimos que esto es debido al hecho de que hay dos tipos de células epiteliales presentes en el tejido esofágico: células epiteliales escamosas y columnares. El sistema de puntuación usado para generar los datos aquí presentados incluía ambos tipos de células epiteliales, ya que es difícil distinguir los dos tipos de células, particularmente para observadores inexpertos. Asumimos que, de manera similar a nuestras observaciones en el tejido del colon, las células epiteliales adenomatosas pueden permanecer negativas para la expresión de caspasa-4/caspasa-5 en el tejido inflamado/metaplásico, y solo se tiñen positivamente en el tejido maligno.

EJEMPLO 2B - INFLAMACIÓN ESOFÁGICA (BARRETT) Y ADENOCARCINOMA ESOFÁGICO (ACE)

Procedimientos

Muestras clínicas: tejido esofágico

Se recogieron tejidos de esofagectomía de 32 pacientes con adenocarcinoma esofágico (ACE) y se construyeron micromatrices tisulares (TMA) a partir de biopsias de tumores incluidas en parafina y fijadas en formalina como pretratamiento (véase la Tabla 3 para conocer las características de los pacientes). Para tener en cuenta la heterogeneidad, se muestrearon tres núcleos de diferentes áreas de tejidos de resección normales, con esófago de Barrett (metaplasia) y con adenocarcinoma esofágico (tumor) de los pacientes. Las áreas definidas de grados tumorales fueron asignadas por un anatomopatólogo con la escala de clasificación de la estadificación clínica TNM

(Tumor-Ganglio-Metástasis). 13 pacientes de esta cohorte recibieron un ciclo de terapia prequirúrgica (NAT) según el mejor protocolo diagnóstico-terapéutico para el tratamiento de su enfermedad.

La tinción IHQ para caspasa-4 y -5 se llevó a cabo en cada región definida usando un sistema de inmunotinción BOND-III de Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido. El sistema Bond-III desparafinó los portaobjetos antes del pretratamiento con solución de recuperación de epítopos BOND I (n.º de cat. AR9961). La puntuación IHQ se realizó (con enmascaramiento) multiplicando el porcentaje de células positivas (P) por la intensidad (I) de tinción citoplasmática. El porcentaje de células positivas se evaluó usando 6 categorías. (0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 % y 100 %). La intensidad de la tinción se calificó usando una escala de tinción de 0-3 donde 0 = negativa, 1 = débil, 2 = moderada y 3 = fuerte.

Tabla 3.

N.º de paciente	**NAT (Sí/No)**	**Diferenciación**	**Grado**	**Ganglio linfático**
1	N.º	Adenocarcinoma poco diferenciado de la unión gastrointestinal	No indicado	2/8 ganglios positivos
2	Sí	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	No indicado	Nodo negativo
3	N.º	Adenocarcinoma, moderadamente diferenciado	No indicado	19 ganglios negativos
4	N.º	Adenocarcinoma poco diferenciado, difuso, de tipo sello derecho	No indicado	11 ganglios negativos
5	Sí	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	ypT2N0Mx	Nodo negativo
7	N.º	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	No indicado	5/17 ganglios positivos
9	Sí	Adenocarcinoma poco diferenciado	yPT3N1Mx	1 ganglio positivo
10	N.º	Adenocarcinoma intramucoso, bien diferenciado	pT1N0Mx	Nodo negativo
11	Sí	Adenocarcinoma poco diferenciado residual extenso	ypT3, N1	3/10 positivos
12	N.º	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	pT3N1Mx	4/6 positivos
14	N.º	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado invasivo	No indicado	7 ganglios negativos
15	N.º	Adenocarcinoma, moderadamente a poco diferenciado	TIcN0MX	25 ganglios negativos
16	N.º	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	pT3N1Mx	4/14 ganglios positivos
17	N.º	Adenocarcinoma poco diferenciado invasivo ulcerado	pT3N1Mx	4/10 ganglios positivos
18	N.º	Adenocarcinoma sin signos de invasión submucosa o profunda	pT1N0Mx	22 ganglios negativos
19	Sí	Adenocarcinoma poco diferenciado invasivo residual con morfología de anillo de sello y ulceración superficial	ypT3N1Mx	1/10 positivos
20	Sí	Adenocarcinoma, diferenciación: moderada	yPT2N0Mx	40 ganglios negativos
21	N.º	Adenocarcinoma poco diferenciado invasivo ulcerado	pT3N0(ITC)Mx	19 ganglios negativos
22	Sí	Adenocarcinoma invasivo residual focal	ypT2N0Mx	5 ganglios negativos
23	N.º	Adenocarcinoma bien diferenciado con invasión perineural focal	pT3N0Mx	10 ganglios positivos

N.º de paciente	NAT (Sí/No)	Diferenciación	Grado	Ganglio linfático
24	N.º	Adenocarcinoma moderadamente y poco diferenciado invasivo ulcerado	pT3pNlMx	5/12 ganglios positivos
25	N.º	Adenocarcinoma poco diferenciado invasivo ulcerado	pT2N0Mx	14 ganglios negativos
27	Sí	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado extenso	yPT3N1	1/8 ganglios negativos
28	N.º	Adenocarcinoma de moderada a focalmente poco diferenciado invasivo	ypT3N0Mx	12 ganglios negativos
29	Sí	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	ypT1N1Mx	2/7 ganglios positivos
30	Sí	Adenocarcinoma poco diferenciado invasivo	pT3N1Mx	2/17 ganglios positivos
31	Sí	Adenocarcinoma de bien a moderadamente diferenciado invasivo	ypT3N1Mx	3/18 ganglios positivos
32	Sí	Adenocarcinoma de moderadamente a poco diferenciado	pT3N2Mx	6/17 ganglios positivos
34	Sí	Adenocarcinoma poco diferenciado	ypT3N1Mx	1/9 ganglios positivos
35	N.º	Adenocarcinoma de moderado a bien diferenciado en la unión gastroesofágica	pT1	Nodos negativos
38	N.º	Adenocarcinoma esofágico moderadamente diferenciado invasivo	pT1bN0Mx	Nodos negativos
39	N.º	Adenocarcinoma intramucoso, moderadamente diferenciado	pT1aN0Mx	17 ganglios negativos

Resultados

Los resultados se presentan en la figura 18.

El análisis posterior de las tres caspasas inflamatorias en una cohorte de pacientes más grande (n = 32) confirmó la observación anterior de que la expresión epitelial de caspasa-5 es baja en el tejido normal y aumenta significativamente durante la inflamación (metaplasia) y la presencia de un tumor maligno (figura 18I, J). Aunque no es tan significativa, la expresión de caspasa-4 también aumenta durante la metaplasia (figura 18F, H). La caspasa-1 se expresó a niveles bajos en el tejido no inflamado y a niveles significativamente aumentados en los tejidos metaplásicos y tumorales (tanto en células estromales como epiteliales), lo que sugiere su implicación en la inflamación asociada al EB y al ACE (figura 18A-D). Por lo tanto, los niveles de expresión de las caspasas-1 y -5 parecen estar interrelacionados con la inflamación/metaplasia durante el esófago de Barrett, y los niveles de expresión epitelial de caspasa-5 son los únicos que están significativamente elevados durante la presencia de un tumor maligno de ACE en comparación con la metaplasia (figura 18J).

Discusión de los ejemplos 2A y 2B

Estos resultados identifican las caspasas-1 y -5 como marcadores novedosos de inflamación esofágica y la caspasa-5 como marcador para el ACE. Aunque no observamos expresión de caspasa-5 exclusivamente en el tejido esofágico epitelial maligno, sus niveles de expresión aumentaron significativamente tanto durante la metaplasia como durante la presencia de un tumor maligno, lo que sugiere que esta puede servir como un biomarcador novedoso para el tejido esofágico inflamado y maligno.

Asimismo, merece la pena considerar que hay dos tipos de células epiteliales presentes en el tejido esofágico: células epiteliales escamosas y columnares. El sistema de puntuación usado para generar los datos aquí presentados incluía ambos tipos de células epiteliales, ya que es difícil distinguir los dos tipos de células, particularmente para

observadores inexpertos. Asumimos que, de manera similar a nuestras observaciones en el tejido del colon, las células epiteliales adenomatosas pueden permanecer negativas para la expresión de caspasa-5 en el tejido inflamado/metaplásico, y solo se tiñen positivamente en el tejido maligno.

EJEMPLO 3: ADENOCARCINOMA DE MAMA

Procedimientos

Muestras clínicas: tejido mamario

La aprobación ética se obtuvo del Comité de Ética del Hospital Beaumont. Los portaobjetos de micromatrices tisulares (TMA) se habían construido anteriormente como TMA de validación, por lo que todos los núcleos estaban dirigidos a áreas tumorales de tejido de adenocarcinoma de mama. La tinción IHQ para caspasa-4 y -5 se llevó a cabo en TMA usando un sistema de inmunotinción BOND-III de Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido. El sistema Bond-III desparafinó los portaobjetos antes del pretratamiento con solución de recuperación de epítopos BOND I (n.º de cat. AR9961). Las imágenes de IHQ se analizaron en colaboración con el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Beaumont.

Resultados

Para explorar la hipótesis de que las caspasas-4 y -5 pueden ser marcadores generales de adenocarcinoma, y que su expresión específica en células epiteliales adenomatosas malignas puede no estar limitada al colon o al tracto GI, sometimos a tinción IHQ una serie de TMA de adenocarcinoma de mama para determinar la expresión de caspasa-4 y -5. Los patrones de tinción se examinaron cuidadosamente con un anatomopatólogo clínico. Las imágenes representativas presentadas en la figura 13 evidencian las observaciones de que, aunque la tinción de linfocitos/estromal es positiva para la caspasa-4 en todas las áreas de tejido, la positividad epitelial parece estar limitada a las áreas tumorales. También se observaron patrones de tinción similares con la tinción de caspasa-5 (datos no mostrados). Estos datos sugieren que la expresión epitelial de caspasa-4 y -5 puede ser un marcador específico del adenocarcinoma de mama. En vista de estos hallazgos recientes, asumimos que las caspasas-4 y -5 pueden existir como marcadores generales de adenocarcinoma en otros tejidos, tal como en áreas adicionales del tracto GI, la laringe, la próstata, la vagina y el pulmón, etc.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kamada S, Funahashi Y and Tsujimoto Y. (1997) Caspase-4 and caspase-5, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases, are CrmA-inhibitable proteases. Cell Death Differ. 4; 473-8.
2. Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. Gut 1989;30(6):835-8.
3. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is upregulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. J Immunol 1999;162(11):6829-35.
4. Apte RN, Krelin Y, Song X, et al. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions. European journal of cancer (Oxford, England: 1990) 2006;42(6):751-9.
5. Yaguchi T, Saito M, Yasuda Y and Nishizaki T. (2010) Caspase-4 activation in association with decreased adenosine deaminase activity may be a factor for gastric ulcer. Digestión. 81:62-7. doi: 10.1159/000252771.
6. Soung YH, Jeong EG, Ahn CH, et al. Mutational analysis of caspase 1, 4, and 5 genes in common human cancers. Human pathology 2008;39(6):895-900.
7. Schwartz S, Jr., Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. Cancer Res 1999; 59(12):2995-3002.
8. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. Nature 2011;479(7371):117-21.
9. Demon D, Kuchmiy A, Fossoul A, Zhu Q, Kanneganti TD and Lamkanfi M. (2014) Caspase-11 is expressed in the colonic mucosa and protects against dextran sodium sulfate-induced colitis. Mucosal Immunol. 2014 May 21. doi: 10.1038/mi.2014.36. [Publicación electrónica antes de impresión]
10.Jarry A, Vallette G, Cassagnau E, et al. Interleukin 1 and interleukin 1beta converting enzyme (caspase 1) expression in the human colonic epithelial barrier. Caspase 1 downregulation in colon cancer. Gut 1999;45(2):246-51.
11.Ullman T, Odze R, Farraye FA. Diagnosis and management of dysplasia in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. Inflamm Bowel Dis 2009;15(4):630-8.

12.Sollberger G, Strittmatter GE, Kistowska M, French LE, Beer HD. Caspase-4 is required for activation of inflammasomes. J Immunol 2012;188(4):1992-2000.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento in vitro para el diagnóstico y/o la detección de un carcinoma del tracto GI, que comprende las etapas de

(a) monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en un tejido y/o células epiteliales del tracto GI de una muestra o biopsia del sujeto;
(b) comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
(c) identificar y/o diagnosticar un carcinoma del tracto GI cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales del tracto GI.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además las etapas de

(a) monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-1 en tejido y/o células epiteliales de una muestra o biopsia del sujeto;
(b) comparar el nivel de expresión de caspasa-1 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-1 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e
(c) identificar y/o diagnosticar un tumor maligno cuando hay presente una desviación negativa de los niveles de expresión de caspasa-1, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células epiteliales.

3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el diagnóstico y/o la detección precoces de un carcinoma, donde los niveles de expresión de caspasa-5 aumentados permiten el diagnóstico y/o la detección precoces del carcinoma.

4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el carcinoma se selecciona de entre un adenocarcinoma, carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular o carcinoma de células transicionales.

5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el carcinoma del tracto GI se selecciona de entre cáncer del esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, recto y ano.

6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la identificación de tejido intestinal inflamado y/o maligno y/o un estado patológico asociado que comprende las etapas de

(a) monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en una muestra de tejido estromal y/o epitelial intestinal o una muestra de heces que comprende células intestinales estromales y/o epiteliales de un sujeto;
(b) comparar el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en la muestra o biopsia con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 de un control (negativo) normal y/o un control positivo;
(c) identificar tejido intestinal inflamado y/o un estado patológico asociado cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra de tejido estromal intestinal o una muestra de heces; y/o
(d) identificar tejido intestinal maligno y/o un estado patológico asociado, que incluye adenoma incipiente y/o cáncer colorrectal (CCR), cuando hay presente un nivel detectable o una desviación positiva de los niveles de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra de tejido epitelial intestinal o una muestra de heces.

7. El procedimiento según la reivindicación 6, donde el estado patológico asociado de la etapa (c) se selecciona de entre enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU).

8. El procedimiento según la reivindicación 6 para la identificación y el diagnóstico precoces de EII, que incluye enfermedad de Crohn (EC) y/o colitis ulcerosa (CU), donde la expresión detectable, aumentada o mejorada de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células estromales no inflamadas de la muestra del sujeto, en comparación con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células estromales de un control normal, es indicativa de EII, que incluye EC y/o CU.

9. El procedimiento según la reivindicación 6 para la identificación y el diagnóstico precoces de CCR,

donde la expresión detectable, aumentada o mejorada de niveles de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células epiteliales de la muestra del sujeto, en comparación con el nivel de expresión de caspasa-4 y/o caspasa-5 en células epiteliales de un control normal, es indicativa de cáncer colorrectal (CCR) incipiente.

10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende además monitorizar y/o detectar el nivel de expresión de caspasa-1 en una muestra de tejido epitelial intestinal o una muestra de heces que comprende células intestinales epiteliales de un sujeto; comparar el nivel de expresión de caspasa-1 en la muestra con el nivel de expresión de caspasa-1 de un control (negativo) normal y/o un control positivo; e identificar y/o diagnosticar un tumor maligno cuando hay presente una desviación negativa de los niveles de expresión de caspasa-1, en comparación con un control (negativo) normal y/o un control positivo, en la muestra o biopsia de tejido y/o células.

11. Inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para uso en el tratamiento de un carcinoma, donde el carcinoma es un cáncer del tracto GI seleccionado opcionalmente de entre tumores malignos del esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, recto y ano, cáncer colorrectal (CCR) o adenoma incipiente en un sujeto.

12. Inhibidores de caspasa-4 y/o caspasa-5 para uso según la reivindicación 11 en el tratamiento de un carcinoma incipiente.

13. Un modulador de caspasa-1 para aumentar los niveles de expresión de caspasa-1 o caspasa-1 recombinante para uso en el tratamiento de un carcinoma, donde el carcinoma es un cáncer del tracto GI seleccionado opcionalmente de entre tumores malignos del esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, recto y ano, cáncer colorrectal (CCR) o adenoma incipiente en un sujeto.

14. Un modulador de caspasa-1 para uso según la reivindicación 13 en el tratamiento de un carcinoma incipiente.

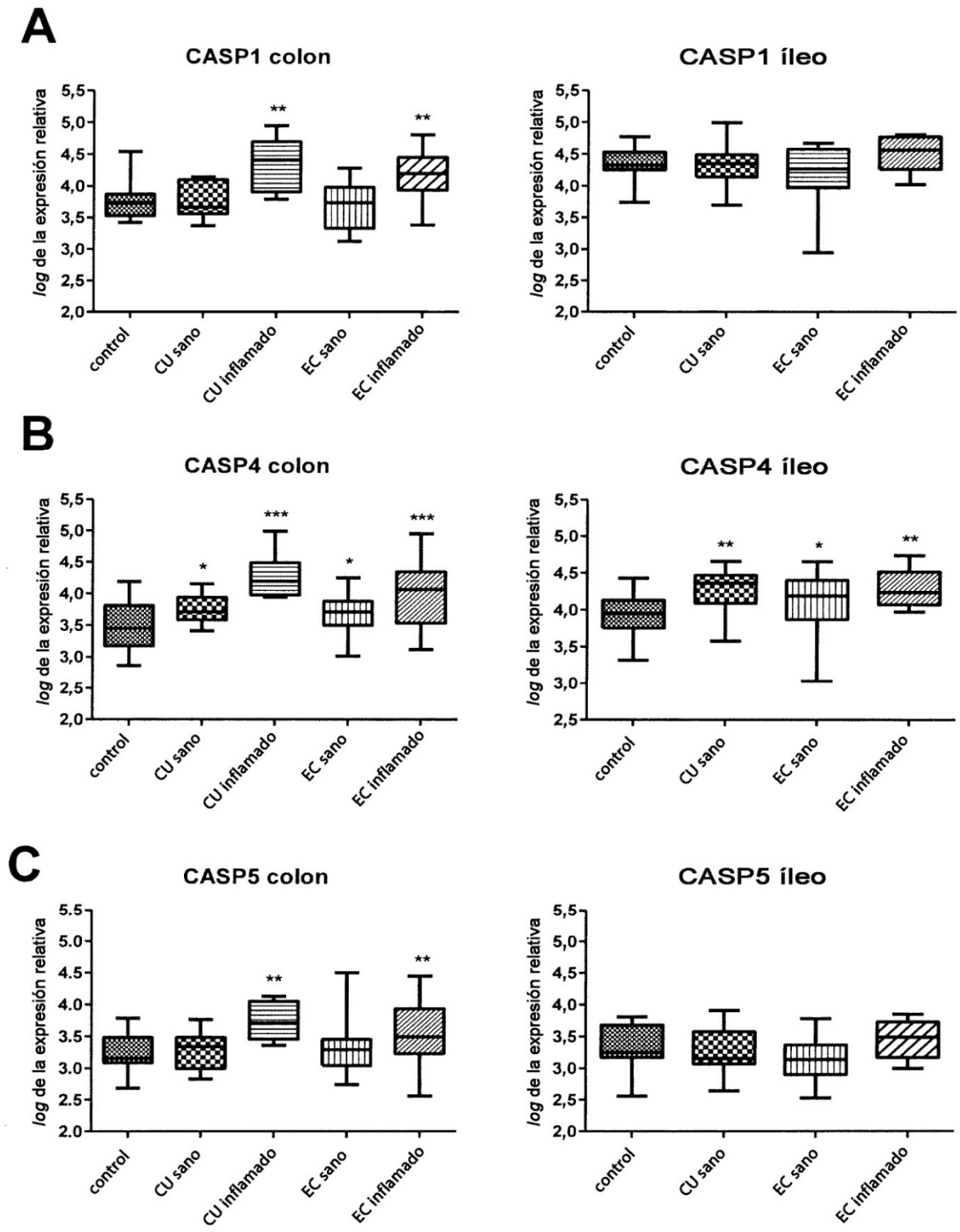

A
CASP1 colon
CASP1 íleo
log de la expresión relativa
5,5
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
**
**
control
CU sano
CU inflamado
EC sano
EC inflamado
B
CASP4 colon
CASP4 íleo
*
***
*
***
**
*
**
C
CASP5 colon
CASP5 íleo
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
**
**

Figura 1

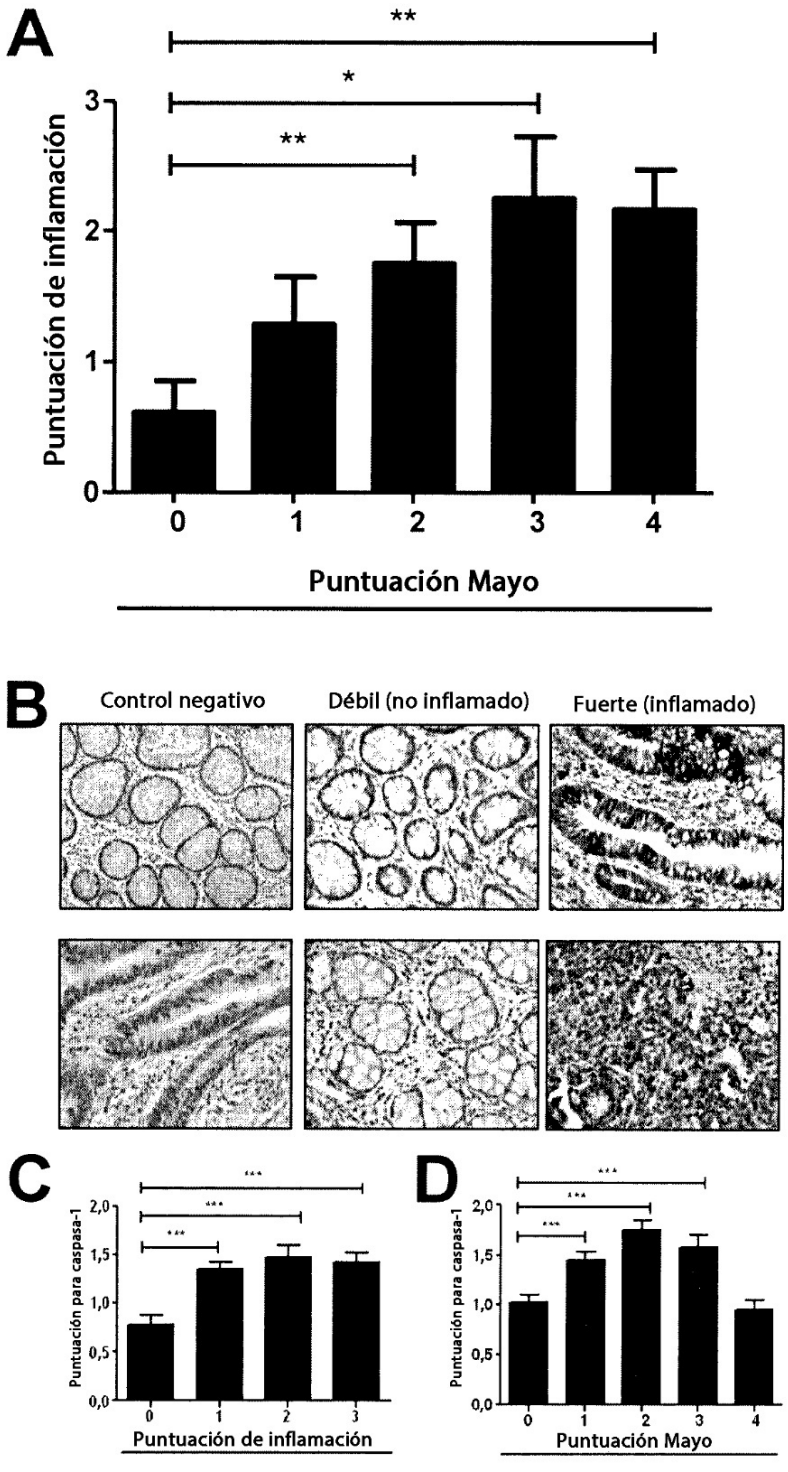

A
**
*
**
Puntuación de inflamación
0
1
2
3
0
1
2
3
4
Puntuación Mayo
B
Control negativo
Débil (no inflamado)
Fuerte (inflamado)
C
Puntuación para caspasa-1
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
0
1
2
3
Puntuación de inflamación
D
Puntuación para caspasa-1
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
0
1
2
3
4
Puntuación Mayo

Figura 2

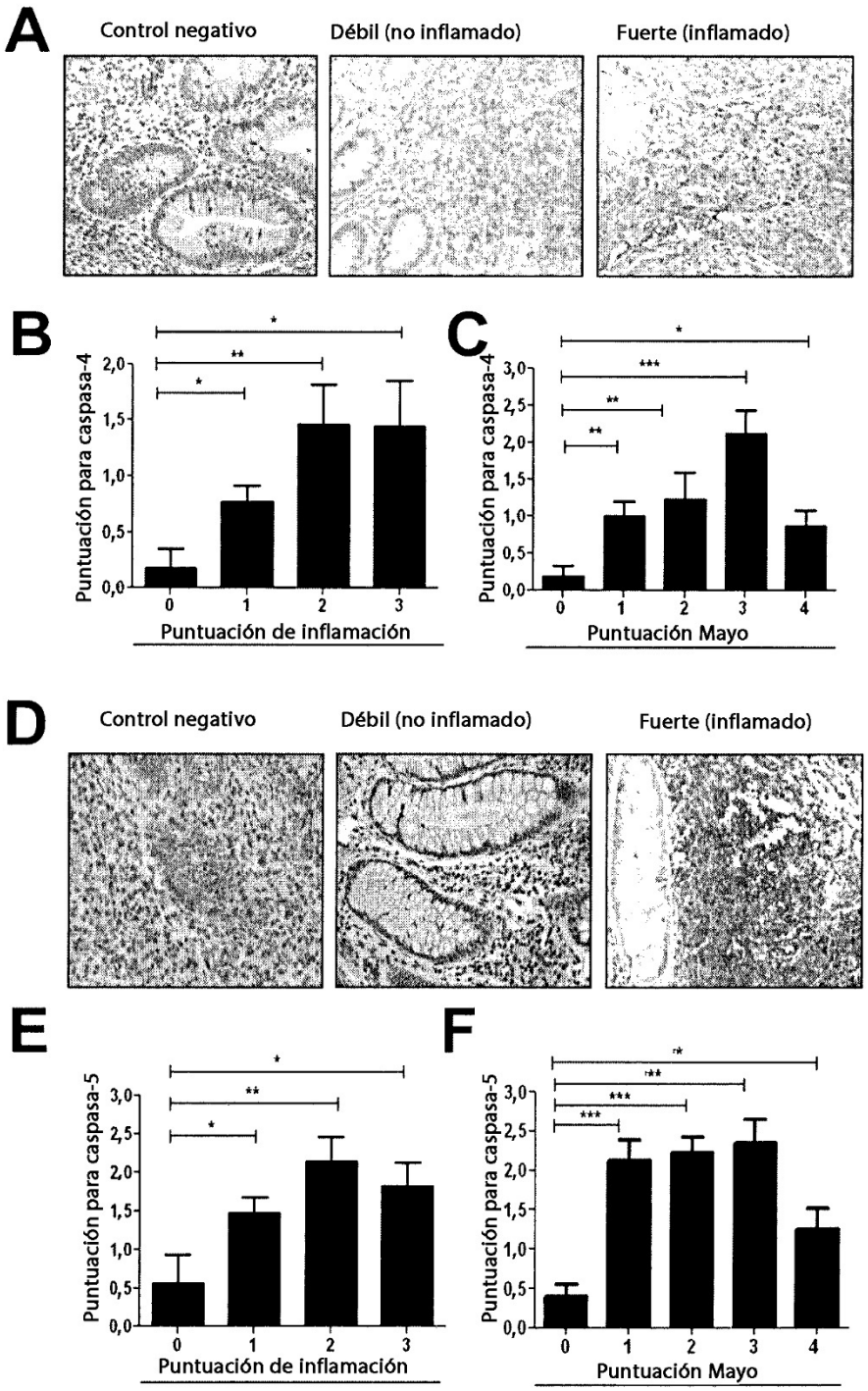

A
Control negativo
Débil (no inflamado)
Fuerte (inflamado)
B
Puntuación para caspasa-4
Puntuación de inflamación
C
Puntuación para caspasa-4
Puntuación Mayo
D
Control negativo
Débil (no inflamado)
Fuerte (inflamado)
E
Puntuación para caspasa-5
Puntuación de inflamación
F
Puntuación para caspasa-5
Puntuación Mayo

Figura 3

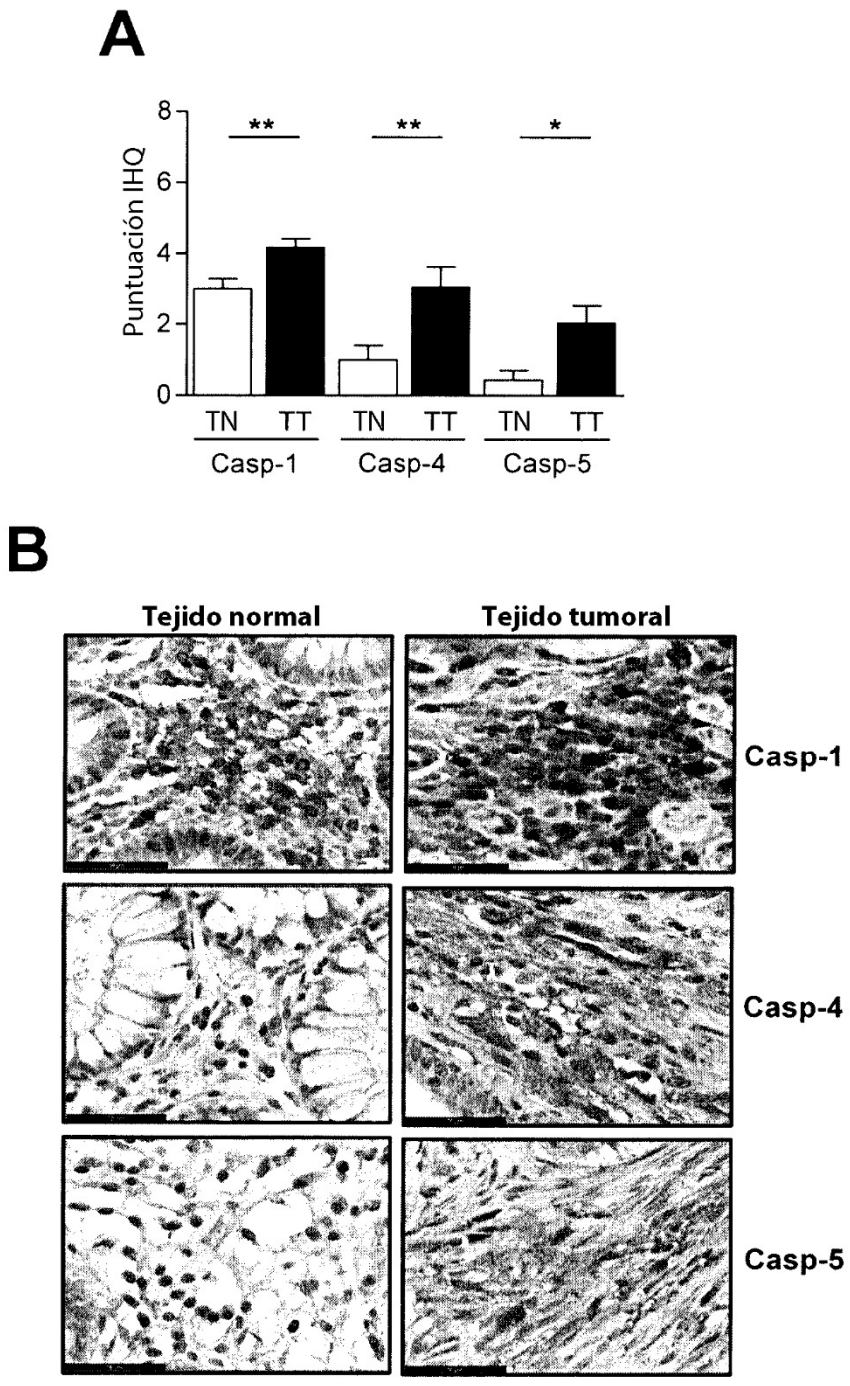

A
Puntuación IHQ
8
6
4
2
0
**
**
*
TN
TT
TN
TT
TN
TT
Casp-1
Casp-4
Casp-5
B
Tejido normal
Tejido tumoral
Casp-1
Casp-4
Casp-5

Figura 4

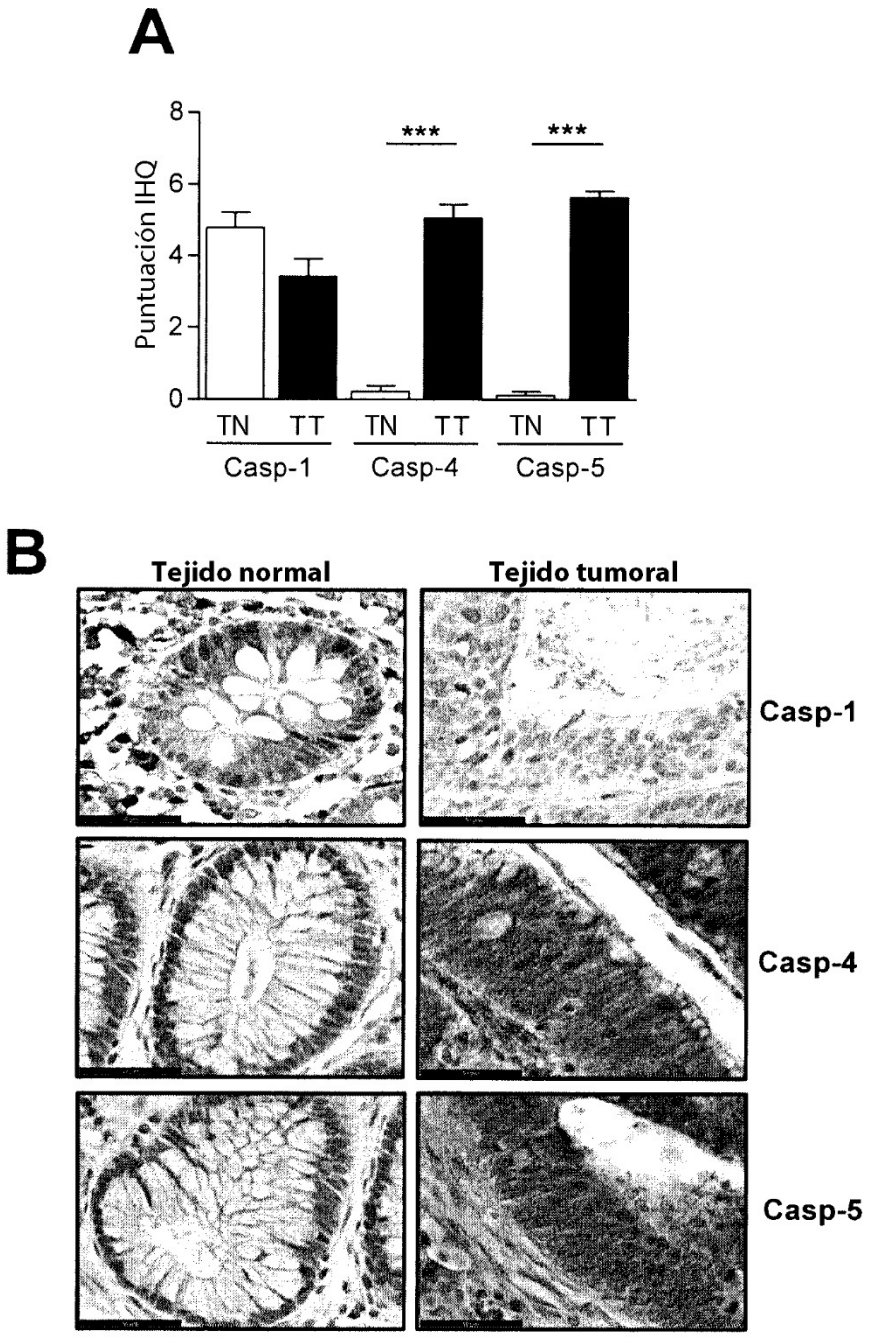

A
Puntuación IHQ
8
6
4
2
0
***
***
TN
TT
TN
TT
TN
TT
Casp-1
Casp-4
Casp-5
B
Tejido normal
Tejido tumoral
Casp-1
Casp-4
Casp-5

Figura 5

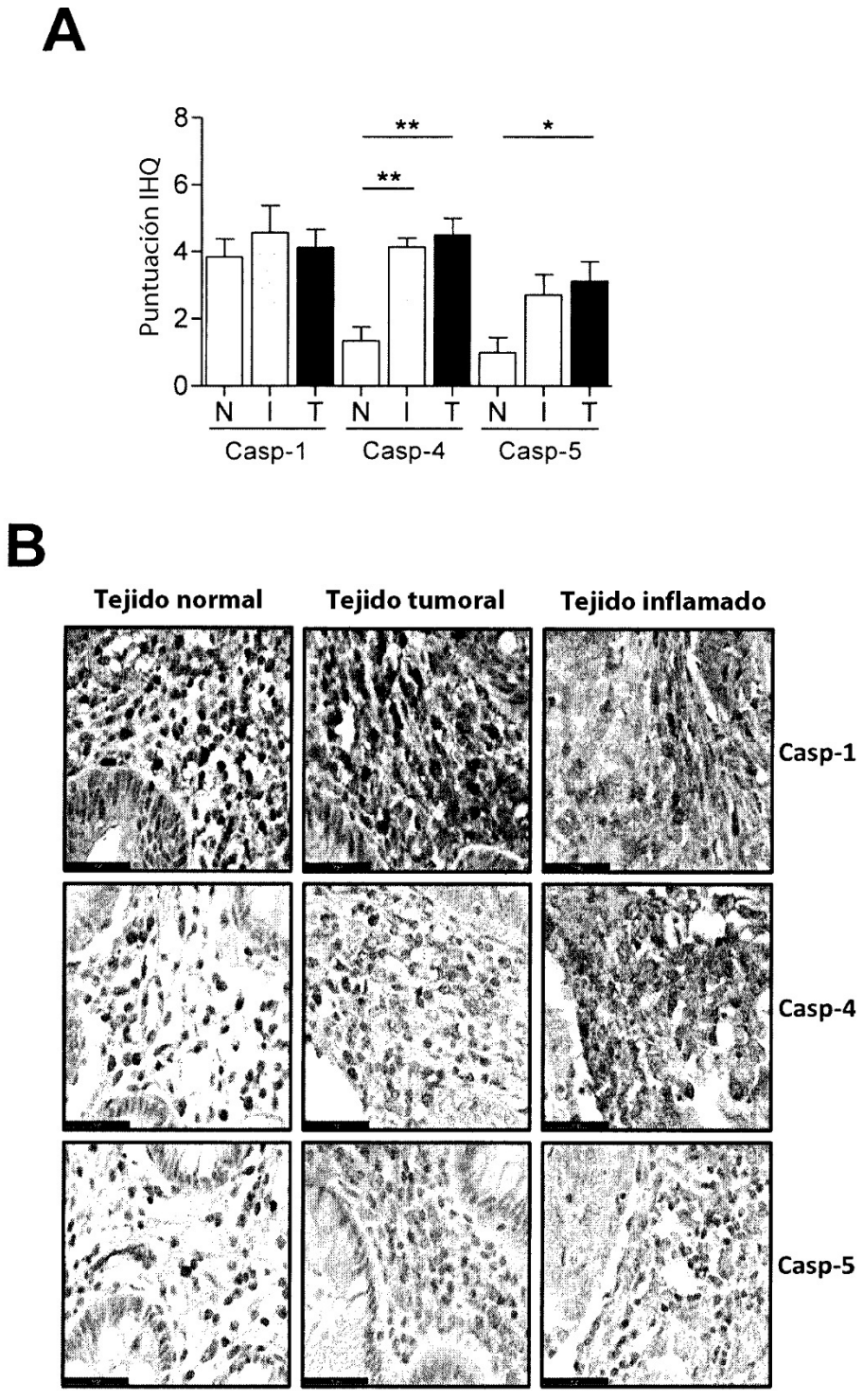

A
Puntuación IHQ
8
6
4
2
0
**
**
*
N I T N I T N I T
Casp-1
Casp-4
Casp-5
B
Tejido normal
Tejido tumoral
Tejido inflamado
Casp-1
Casp-4
Casp-5

Figura 6

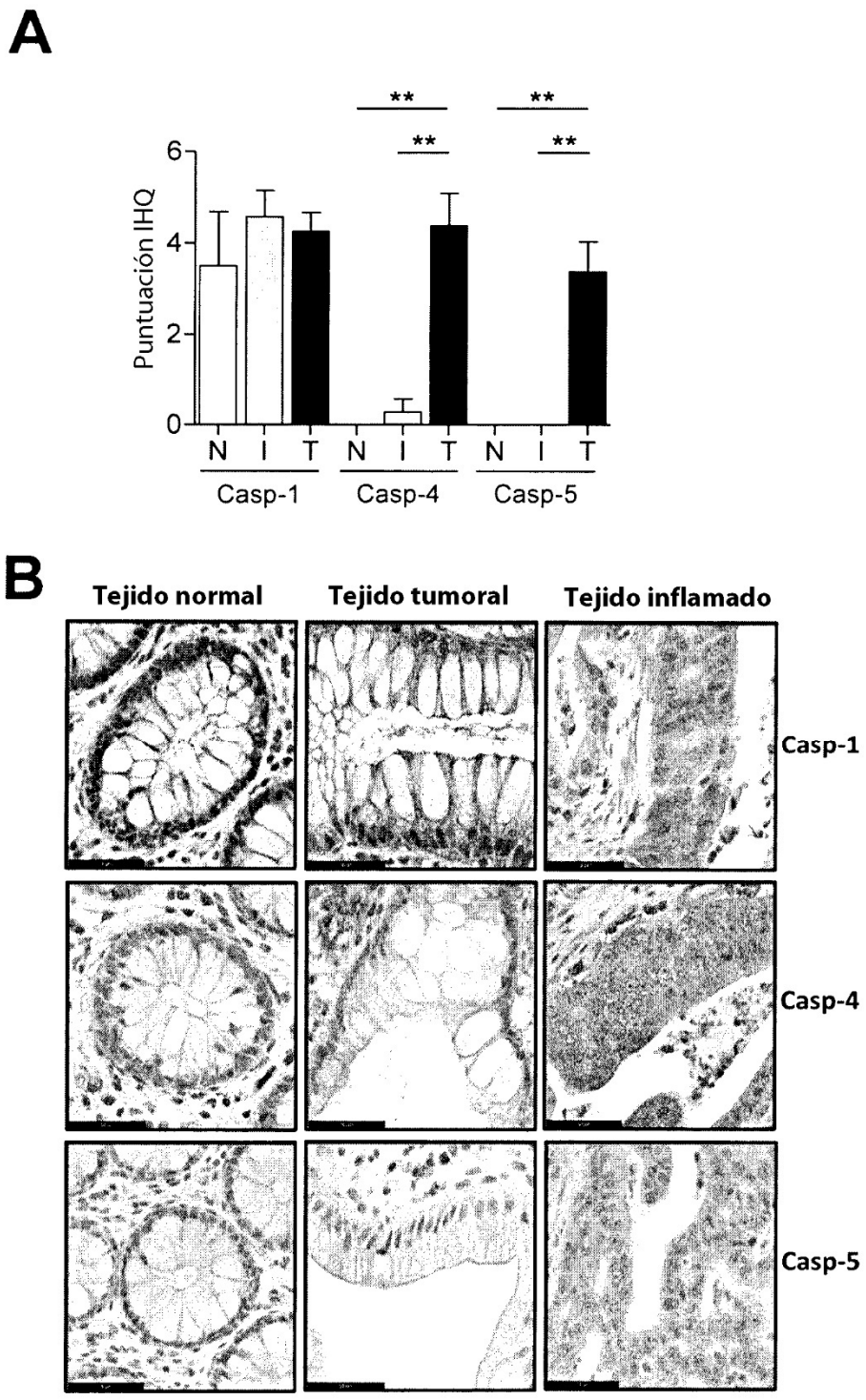

A
**
**
**
**
6
4
2
0
Puntuación IHQ
N I T N I T N I T
Casp-1
Casp-4
Casp-5
B
Tejido normal
Tejido tumoral
Tejido inflamado
Casp-1
Casp-4
Casp-5

Figura 7

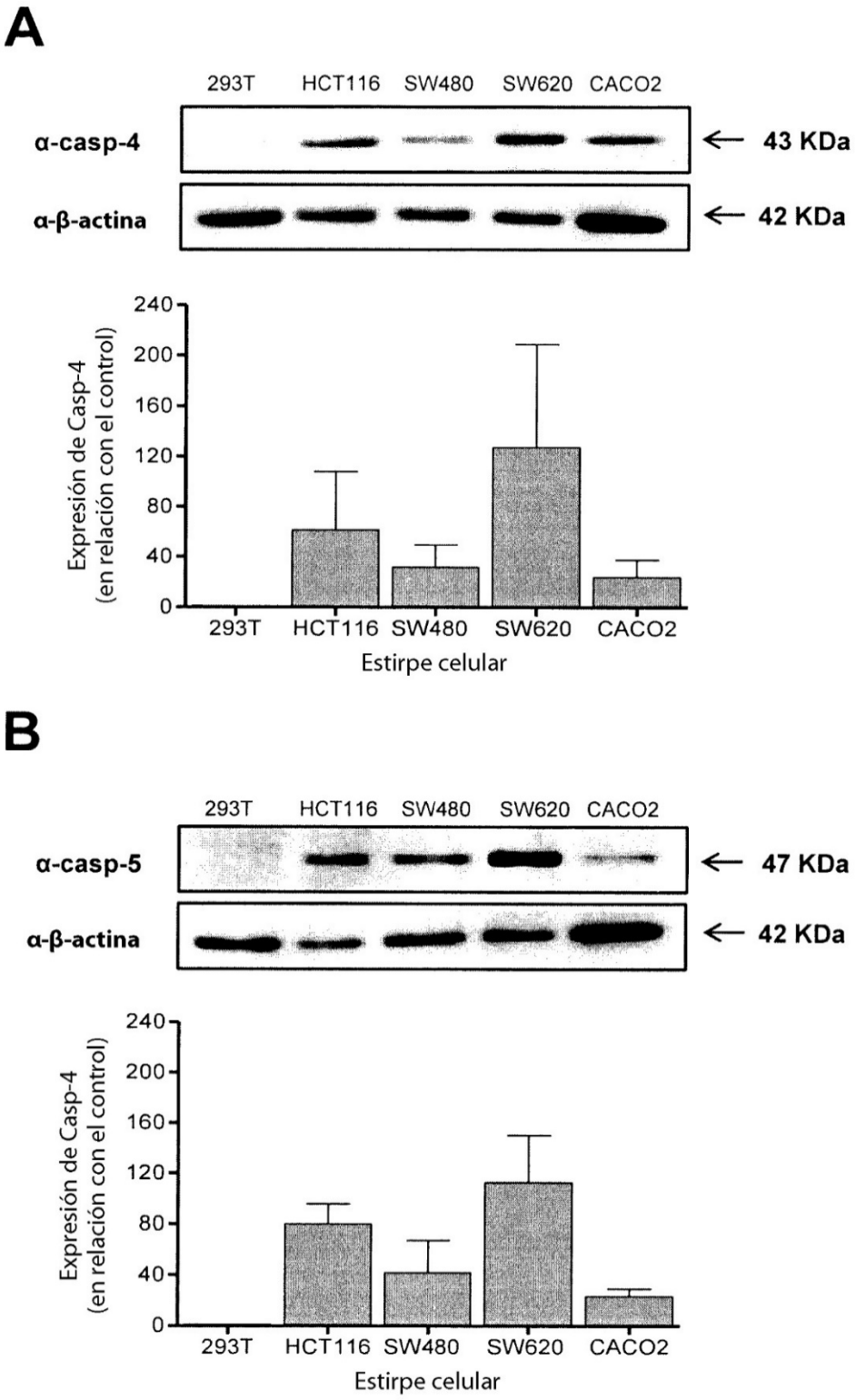

A
293T
HCT116
SW480
SW620
CACO2
α-casp-4
43 KDa
α-β-actina
42 KDa
Expresión de Casp-4
(en relación con el control)
240
200
160
120
80
40
0
293T
HCT116
SW480
SW620
CACO2
Estirpe celular
B
293T
HCT116
SW480
SW620
CACO2
α-casp-5
47 KDa
α-β-actina
42 KDa
Expresión de Casp-4
(en relación con el control)
240
200
160
120
80
40
0
293T
HCT116
SW480
SW620
CACO2
Estirpe celular

Figura 8

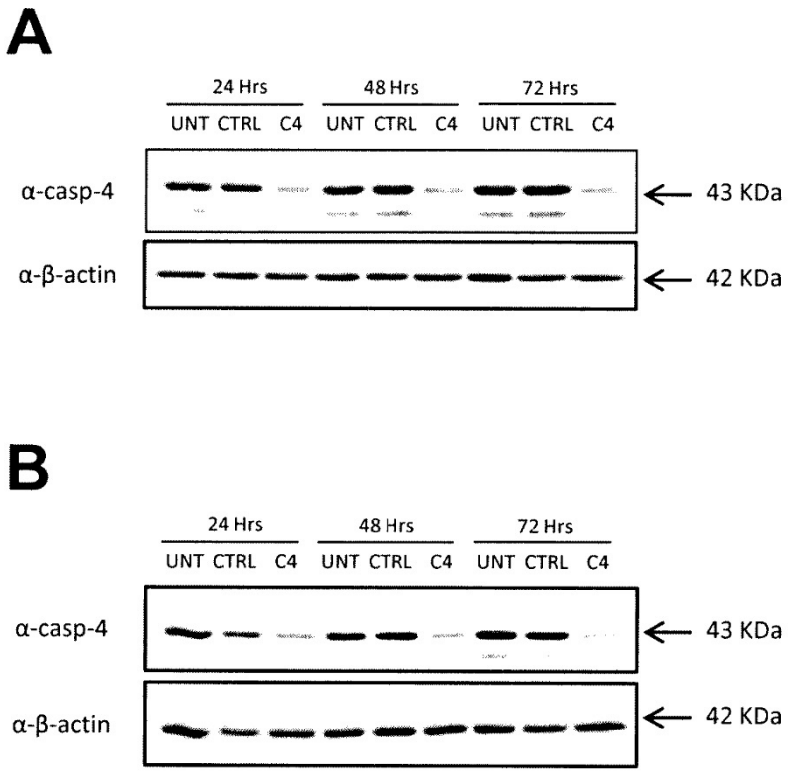

A
24 Hrs
48 Hrs
72 Hrs
UNT CTRL C4
UNT CTRL C4
UNT CTRL C4
α-casp-4
43 KDa
α-β-actin
42 KDa
B
24 Hrs
48 Hrs
72 Hrs
UNT CTRL C4
UNT CTRL C4
UNT CTRL C4
α-casp-4
43 KDa
α-β-actin
42 KDa

Figura 9

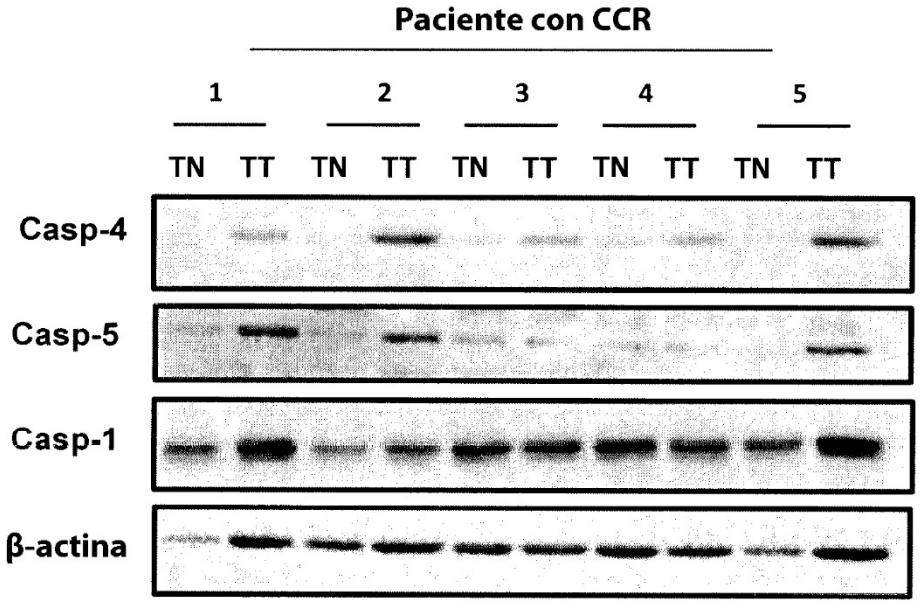
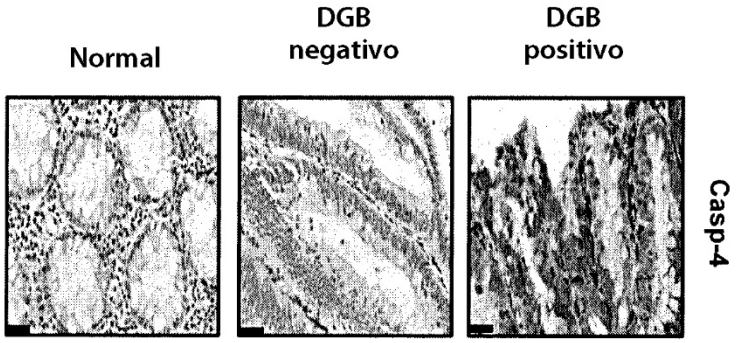

Paciente con CCR
1
2
3
4
5
TN TT TN TT TN TT TN TT TN TT
Casp-4
Casp-5
Casp-1
β-actina

Figura 10

A


Normal
DGB negativo
DGB positivo
Casp-4

B

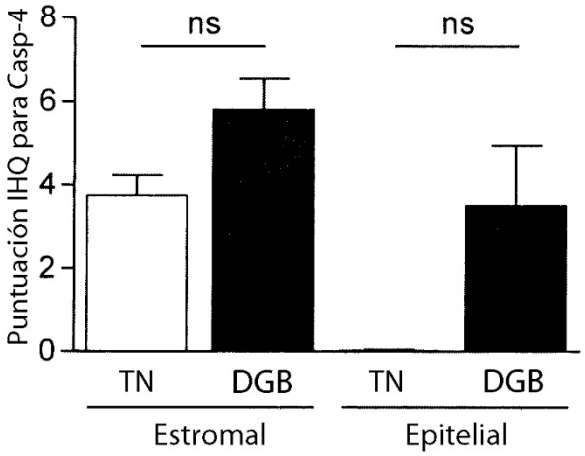

Puntuación IHQ para Casp-4
8
6
4
2
0
ns
ns
TN
DGB
TN
DGB
Estromal
Epitelial

Figura 11

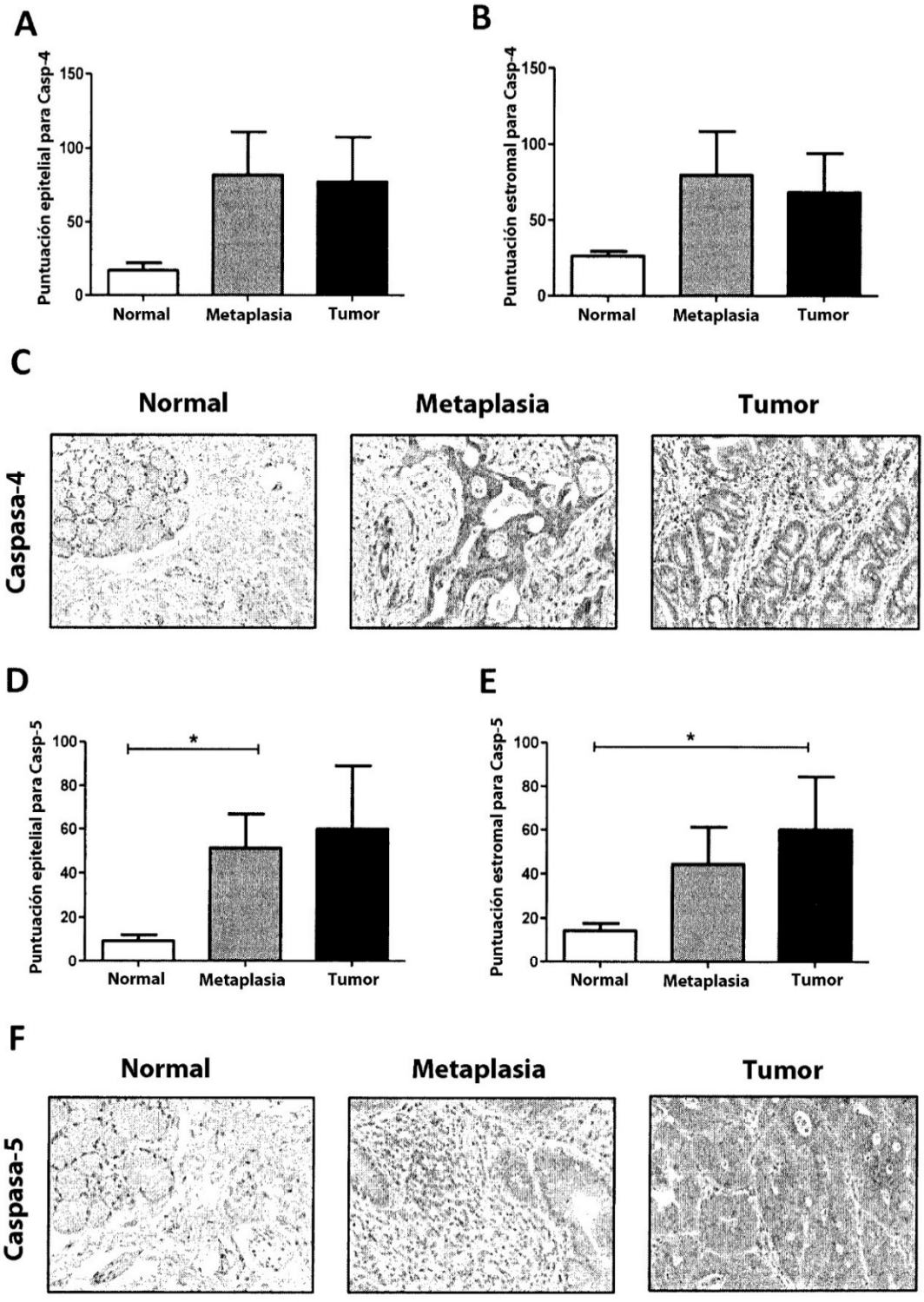

A
Puntuación epitelial para Casp-4
150
100
50
0
Normal
Metaplasia
Tumor
B
Puntuación estromal para Casp-4
150
100
50
0
Normal
Metaplasia
Tumor
C
Normal
Metaplasia
Tumor
Caspasa-4
D
Puntuación epitelial para Casp-5
100
80
60
40
20
0
*
Normal
Metaplasia
Tumor
E
Puntuación estromal para Casp-5
100
80
60
40
20
0
*
Normal
Metaplasia
Tumor
F
Normal
Metaplasia
Tumor
Caspasa-5

Figura 12

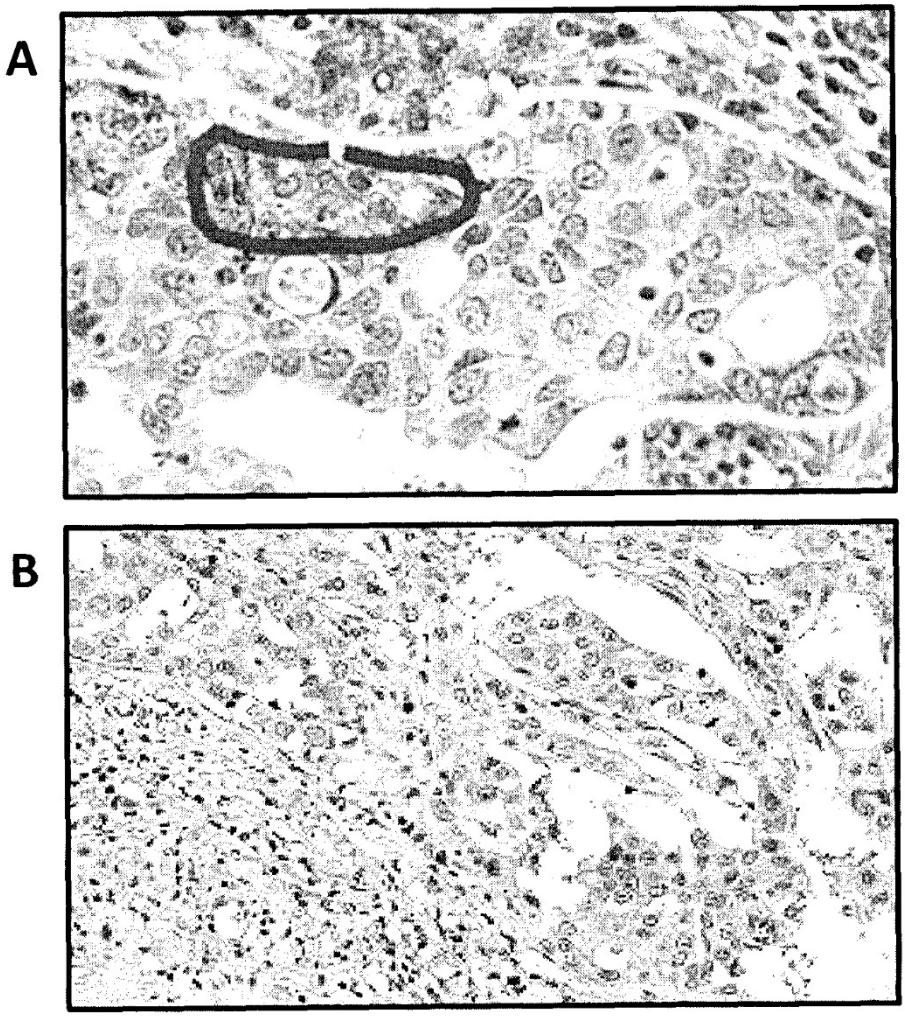


Figura 13

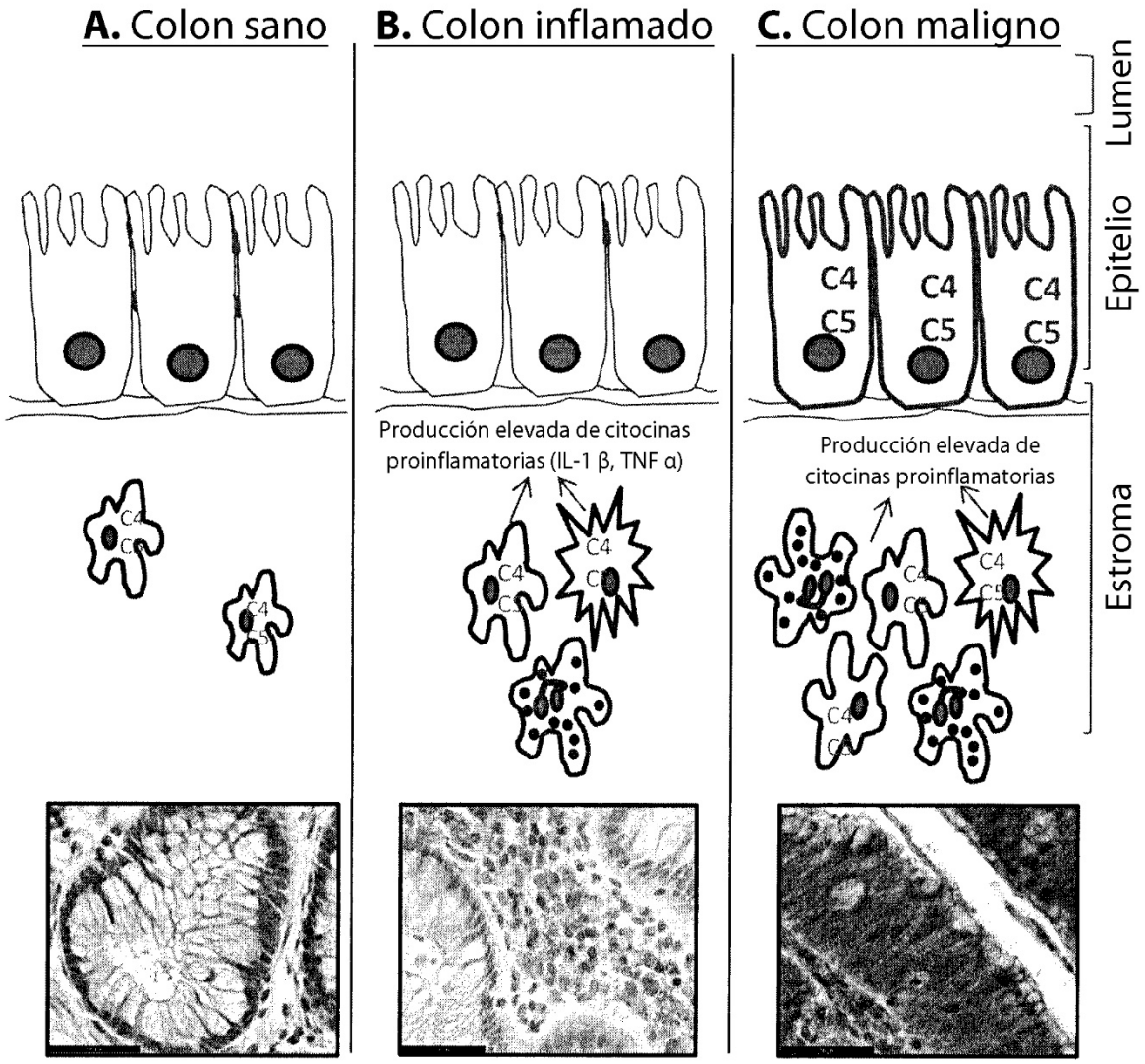

A. Colon sano
B. Colon inflamado
C. Colon maligno
Lumen
Epitelio
Estroma
C4
C5
Producción elevada de citocinas proinflamatorias (IL-1 β, TNF α)
Producción elevada de citocinas proinflamatorias

Figura 14

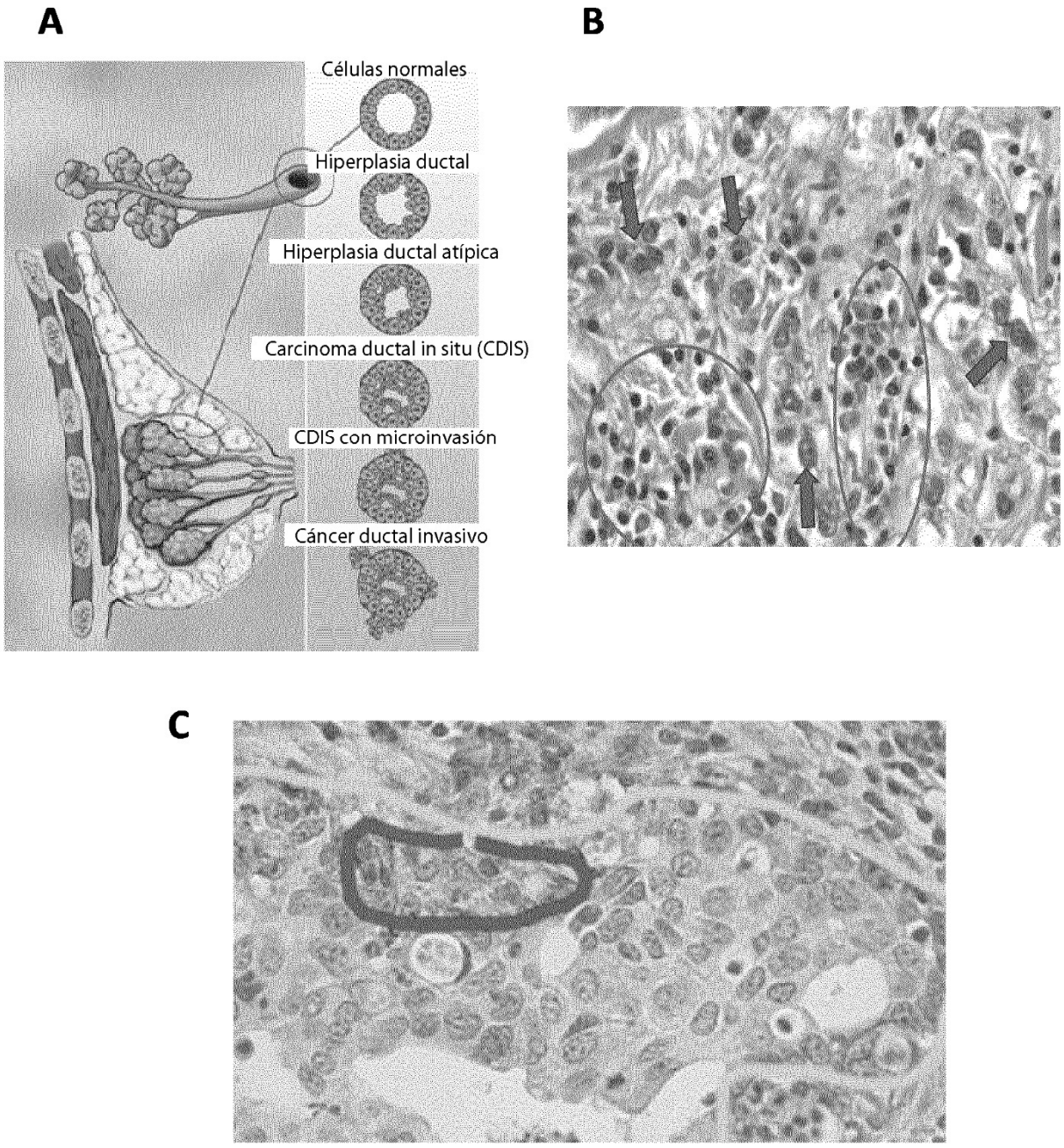

A
Células normales
Hiperplasia ductal
Hiperplasia ductal atípica
Carcinoma ductal in situ (CDIS)
CDIS con microinvasión
Cáncer ductal invasivo
B
C

Figura 15

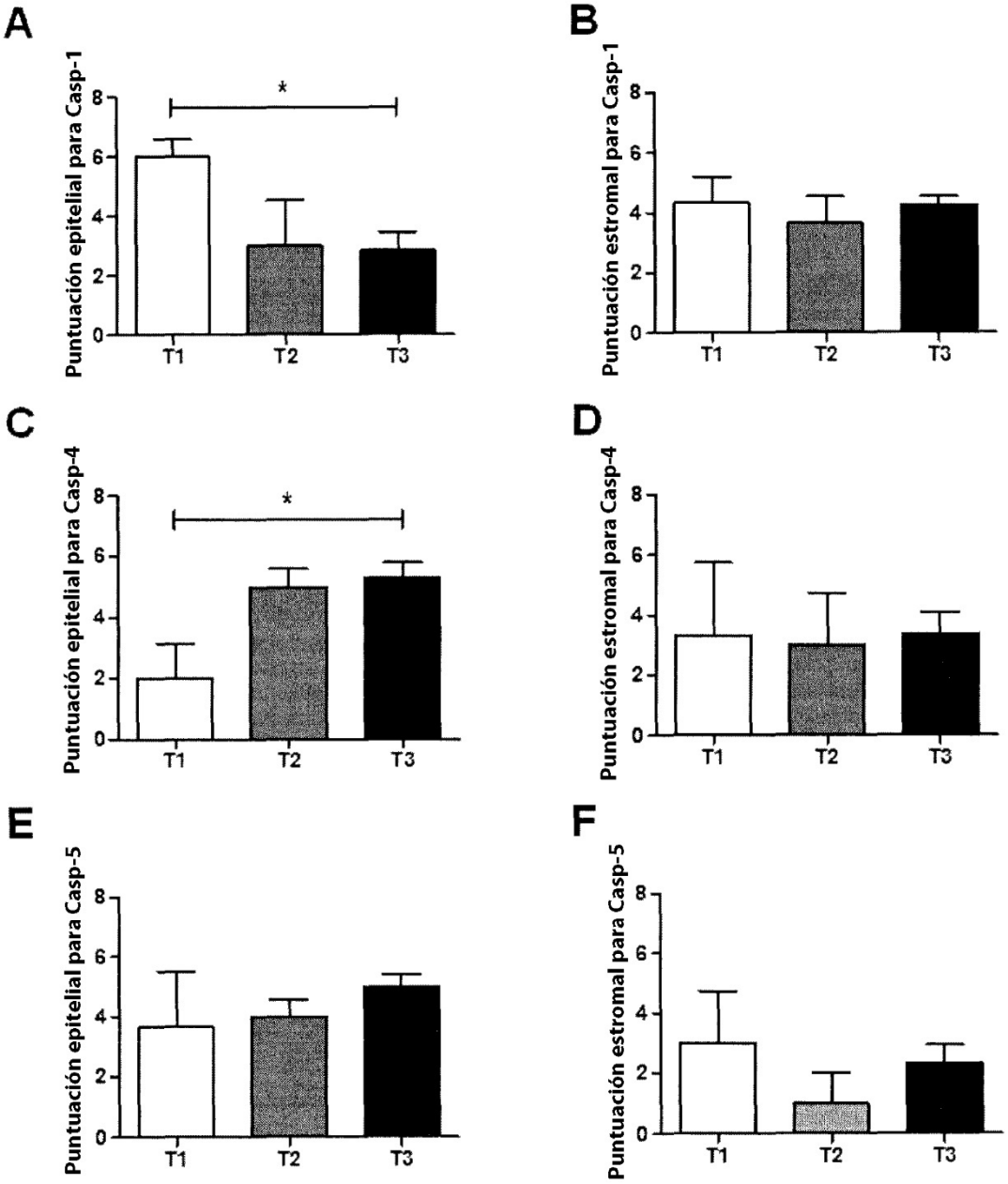

A
Puntuación epitelial para Casp-1
*
0
2
4
6
8
T1
T2
T3
B
Puntuación estromal para Casp-1
C
Puntuación epitelial para Casp-4
D
Puntuación estromal para Casp-4
E
Puntuación epitelial para Casp-5
F
Puntuación estromal para Casp-5

Figura 16

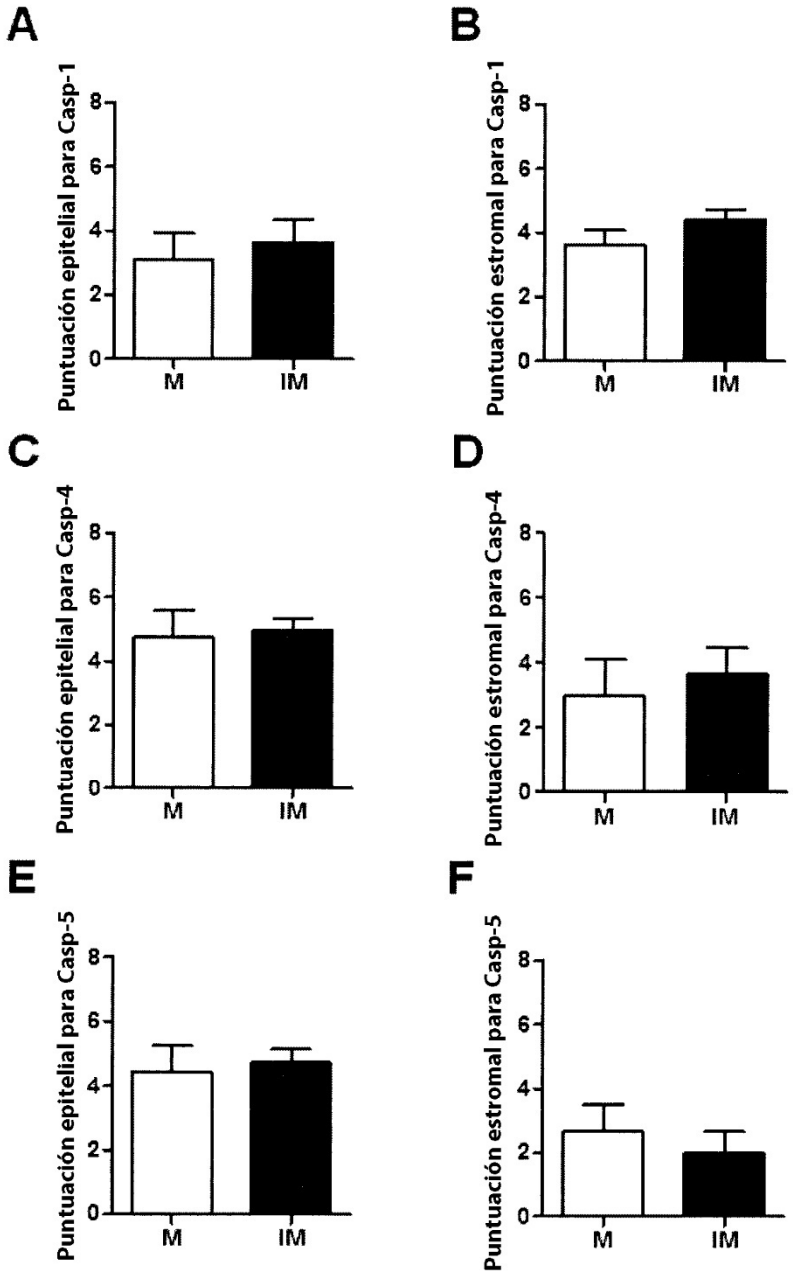

A
Puntuación epitelial para Casp-1
8
6
4
2
0
M
IM
B
Puntuación estromal para Casp-1
8
6
4
2
0
M
IM
C
Puntuación epitelial para Casp-4
8
6
4
2
0
M
IM
D
Puntuación estromal para Casp-4
8
6
4
2
0
M
IM
E
Puntuación epitelial para Casp-5
8
6
4
2
0
M
IM
F
Puntuación estromal para Casp-5
8
6
4
2
0
M
IM

Figura 17

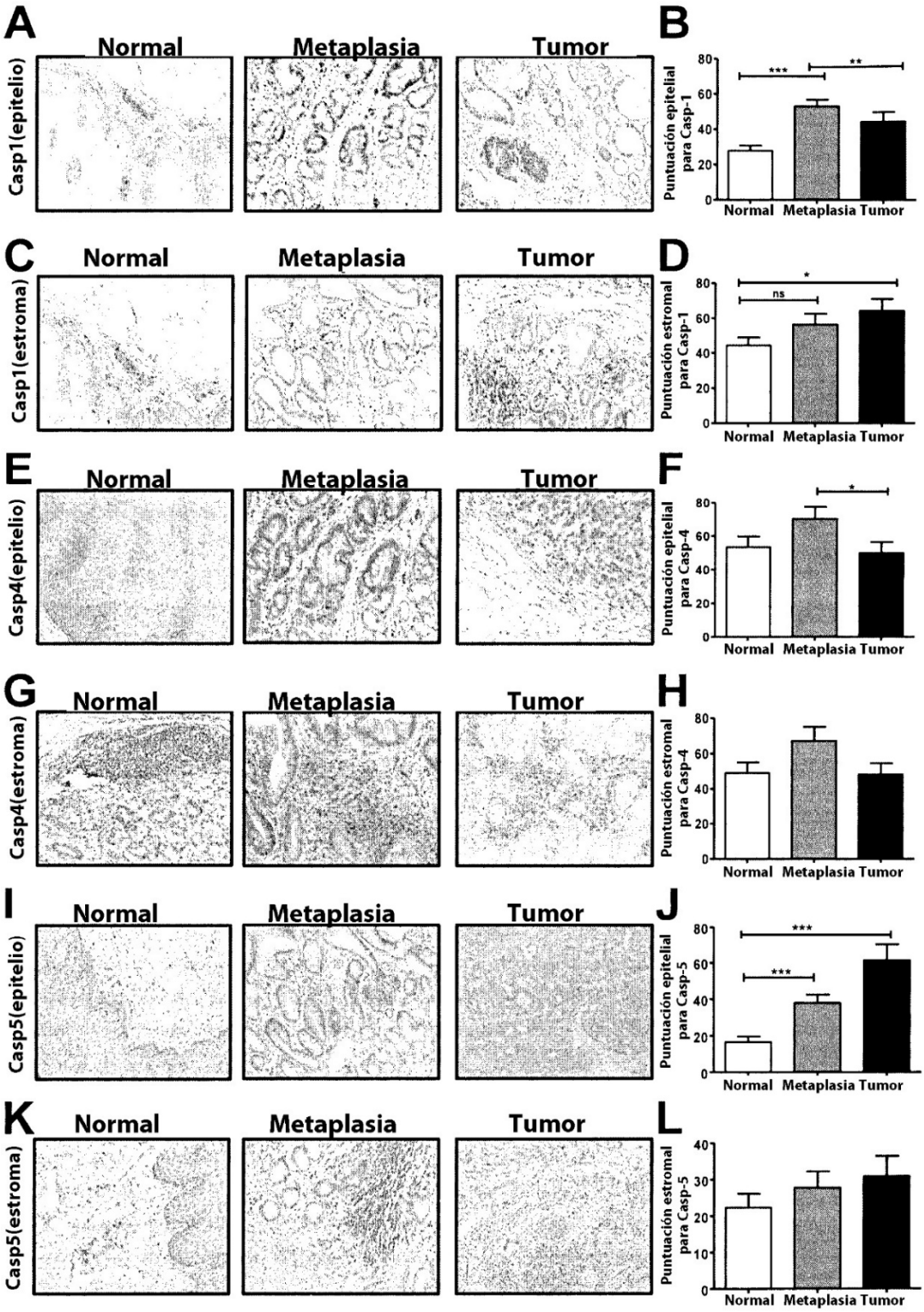

A
Normal
Metaplasia
Tumor
Casp1(epitelio)
B
Puntuación epitelial para Casp-1
***
**
Normal Metaplasia Tumor
C
Normal
Metaplasia
Tumor
Casp1(estroma)
D
Puntuación estromal para Casp-1
ns
*
Normal Metaplasia Tumor
E
Normal
Metaplasia
Tumor
Casp4(epitelio)
F
Puntuación epitelial para Casp-4
*
Normal Metaplasia Tumor
G
Normal
Metaplasia
Tumor
Casp4(estroma)
H
Puntuación estromal para Casp-4
Normal Metaplasia Tumor
I
Normal
Metaplasia
Tumor
Casp5(epitelio)
J
Puntuación epitelial para Casp-5
***
***
Normal Metaplasia Tumor
K
Normal
Metaplasia
Tumor
Casp5(estroma)
L
Puntuación estromal para Casp-5
Normal Metaplasia Tumor

Figura 18