



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019010209-8 A2



(22) Data do Depósito: 20/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 01/12/2020

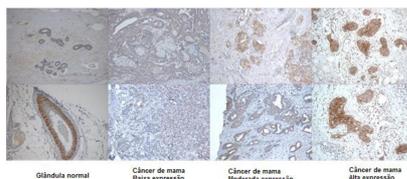
(54) **Título:** MÉTODO E KIT PARA PREDIÇÃO PROGNÓSTICO DE CÂNCER E USO DO MÉTODO EM ONCOLOGIA CLÍNICA

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/574; C07K 16/30.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

(72) **Inventor(es):** ANA LUIZA SILVA MAIA; IURI MARTIN GOEMANN.

(57) **Resumo:** A presente invenção descreve um método de predição de prognóstico de câncer, ou seja, seu risco de morrer, que pode ser utilizado em pacientes com diagnóstico estabelecido da doença. Especificamente, a presente invenção compreende a descrição de um marcador biomolecular que pode ser utilizado, o dito marcador sendo o gene/proteína DIO3, que possui padrões de expressão alterados em tumores. Tais alterações são importantes, uma vez que se correlacionam com a sobrevivência dos pacientes portadores da doença. Esse método pode ainda ser utilizado para auxílio na decisão do curso de tratamento do paciente testado. A presente invenção se situa nos campos da biologia molecular e oncologia clínica.



Glândula normal Câncer de mama Baixa expressão Câncer de mama Moderada expressão Câncer de mama Alta expressão

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MÉTODO E KIT PARA PREDIÇÃO PROGNÓSTICO DE CÂNCER E USO DO MÉTODO EM ONCOLOGIA CLÍNICA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção se situa nos campos da biologia molecular e oncologia clínica.

Antecedentes da Invenção

[0002] Os hormônios tireoidianos estão envolvidos na diferenciação e proliferação celular e participam do metabolismo de diferentes sistemas do corpo humano. A forma ativa do hormônio tireoidiano, 3, 5, 3'-triiodotironina (T3), e seu precursor inativo, tiroxina (T4), são compostos iodados que influenciam a expressão gênica e a regulação do ciclo celular. A ativação do hormônio T4 em T3, é catalisada pelas enzimas iodotironinas desiodases tipo 1 (DIO1) e tipo 2 (DIO2) via desiodação do anel externo da molécula. Em contraste, a iodotironina desiodase tipo 3 (DIO3) é responsável por catalisar a inativação do T4 e T3, transformando a molécula de T4 em T3 reverso (rT3), e a molécula de T3 em 3,5,-diiodotironina (T2), ambas formas inativas dos hormônios tireoidianos. A ação orquestrada das desiodases permite rápidas modificações no status tireoidiano intracelular de forma tecido-específica, independente dos níveis dos hormônios tireoidianos circulantes. A ativação da DIO3 foi associada com o aumento na proliferação celular, indicando um dos papéis dessa enzima na indução do ciclo celular, sugerindo que a mesma favoreça o crescimento celular.

[0003] A desiodase tipo 3 é a principal enzima inativadora dos hormônios tireoidianos. O gene/proteína *DIO3/DIO3* (indicador) está amplamente expresso em tecidos fetais, mas apresenta-se silenciado na maioria das condições em tecidos adultos. A re-expressão do DIO3 ocorre em condições patológicas, tais como hipóxia, estresse e outras condições associadas ao aumento da

proliferação celular, como nas neoplasias malignas.

[0004] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, poucos inventos foram encontrados que relacionassem a enzima ou gene DIO3 como parte da invenção. Os seguintes documentos que tratam sobre o tema foram encontrados:

[0005] O documento WO2015140792A1, intitulado “*Type-III deiodinase inhibitors and uses thereof*”, revela compostos que inibem a atividade de DIO3, em especial em métodos para tratamento e prevenção de depressão e outras doenças psiquiátricas.

[0006] O documento US8304401B2, intitulado “*Compositions and methods for decreasing type-III deiodinase activity to modulate adiposity and blood glucose levels*”, revela métodos de redução de massa adiposa e aumento do gasto energético através da manipulação da expressão ou da atividade da enzima DIO3 de forma a alterá-la com a finalidade de tratar obesidade e diabetes.

[0007] O documento WO2008140713A1, intitulado “*Methods and products for treating proliferative disorders*”, revela métodos e produtos para tratamento de doenças proliferativas, em especial câncer e lesões cancerígenas, através da regulação do nível de hormônios tireoidianos ou nível de expressão de desidases no tumor.

[0008] Em relação à avaliação prognóstica de tumores, existem inúmeras ferramentas prognósticas para os diferentes tipos de tumores. A mais clássica é o estadiamento TNM do tumor, no qual é avaliado o tamanho e a extensão do tumor (T), o comprometimento de linfonodos (N) e metástases à distância (M). Entretanto, essa metodologia clássica é limitada, visto que muitas delas não conseguem identificar pacientes com bom prognóstico ou boa resposta à terapia dentro de um mesmo estadiamento. Por isso, diferentes ferramentas têm sido criadas para prognóstico de tumores, que muitas vezes levam em conta painéis de expressão gênica utilizados para classificar o paciente de acordo com o seu risco.

[0009] Alguns exemplos dessas ferramentas são descritos a seguir:

[0010] O documento WO2006135886, intitulado “*Compositions and methods for treating and diagnosing cancer*”, inclui DIO3 entre genes com regulação alterada em câncer, porém limita a avaliação a células tronco tumorais, um método que envolve altos custos e dificuldade técnica, além de ser necessária a análise de diversos genes.

[0011] O documento US20160068912A1, intitulado “*Methods for breast cancer prognosis*”, apresenta diversos genes que, quando analisados em conjuntos, resultam em um dado prognóstico em relação à sobrevida do paciente. As limitações do método envolvem a necessidade de se analisar um perfil de diversos genes, tornando a tecnologia cara, e os pacientes não podem apresentar doença em linfonodos, além da necessidade de apresentarem doença com alta taxa proliferativa. O processo, além disso, envolve uma análise em diversos passos, tornando-o mais difícil.

[0012] O documento US8183353B2, intitulado “*Breast cancer prognostics*”, revela um método de prognóstico de pacientes com câncer de mama baseado em microarray de um grupo de 52 genes.

[0013] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0014] Dessa forma, a presente invenção resolve os problemas do estado da técnica a partir de um método para predição do prognóstico de um paciente com diagnóstico de câncer estabelecido, ou seja, seu risco de morrer, baseado no resultado do teste aqui proposto.

[0015] O método proposto é de predição de prognóstico, ou seja, tem por objetivo a predição do desfecho (chance de sobrevida) de determinado paciente com diagnóstico de câncer já estabelecido. Assim sendo, não se propõe e nem se enquadra dentro de método de diagnóstico de uma doença

nem mesmo de opção/técnica de tratamento.

[0016] A partir da aplicação do método da presente invenção, é possível determinar diversos passos subsequentes no segmento do tratamento de pacientes com diagnóstico de câncer estabelecido, por exemplo, as opções terapêuticas, custo-benefício de determinado tratamento, exames diagnósticos complementares e necessidade de acompanhamento médico.

[0017] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um método para predição do prognóstico de câncer compreendendo as etapas de:

- (a) Analisar a expressão ou atividade do gene codificante DIO3 ou seus produtos de uma amostra de tumor de um paciente; e
- (b) Classificar o paciente quanto ao risco de morte e risco de recorrência baseado nos resultados obtidos em (a).

[0018] Em um segundo objeto a presente invenção revela um Kit para predição do prognóstico de câncer, que compreende:

- a) meios para análise quantitativa da expressão de DIO3 do material genético por qPCR ou meios para análise qualitativa por imunohistoquímica em uma amostra de tumor de paciente diagnosticado com câncer;
- b) Comparar o nível de expressão de DIO3 obtido na amostra com curva de sobrevivência para o tumor em questão, normalizando o resultado pelo controle;
- c) Estabelecer risco de morte (sobrevivência) do paciente de acordo com resultado de nível de expressão.

[0019] Em um terceiro objeto, a presente invenção revela o uso do método de predição do prognóstico de câncer proposto em oncologia clínica.

[0020] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0021] São apresentadas as seguintes figuras:

[0022] A figura 1 mostra a marcação imunohistoquímica para DIO3 (em marrom), demonstrando glândula normal, baixa expressão (1+), moderada

expressão (2+) e alta expressão (3+) em amostras de tecido mamário neoplásico.

[0023] A figura 2 mostra a curva de sobrevida comparando pacientes com marcação de imunohistoquímica positiva (verde) e negativa (azul) para o indicador DIO3. Pode-se observar que, em pacientes com positividade para DIO3 na amostra de tumor primário, ao final de 120 meses, uma sobrevida de 80%, comparado a uma sobrevida de 20% em pacientes com negatividade para DIO3 em amostra de tumor primário analisada ($p=0.01$).

[0024] A figura 3 demonstra (A) a correlação significativa entre tamanho do tumor e atividade da enzima DIO3 ($p=0.003$) e (B) amostras de CPT de pacientes com metástase em linfonodos ou metástase a distância apresentam níveis mais elevados de atividade da DIO3 em comparação com pacientes com doença intratireoidiana.

Descrição Detalhada da Invenção

[0025] A presente invenção descreve um método de predição do prognóstico baseado na avaliação da expressão do gene/proteína *DIO3/DIO3* (indicador) em tecido tumoral, de forma isolada ou em combinação com outros marcadores, a partir do qual se pode predizer a sobrevida dos pacientes e/ou recorrência em pacientes diagnosticados com câncer. O método, também, apresenta potencial para utilização como ferramenta de decisão de opções de tratamento a serem oferecidas para o paciente.

[0026] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um método de predição do prognóstico de câncer compreendendo as etapas de:

- (a) Analisar a expressão ou atividade do gene codificante DIO3 ou seus produtos em uma amostra de tumor de um paciente; e
- (b) Classificar o paciente quanto ao risco de morte e risco de recorrência baseado nos resultados obtidos em (a).

[0027] Em uma concretização, a análise da expressão ou atividade de DIO3 pode ser feita de forma isolada ou em combinação com outros genes

selecionados, utilizando-se ou não, técnicas de bioinformática, análise digital e análise estatística.

[0028] Em uma segunda concretização, a amostra proveniente do paciente é selecionada do grupo compreendendo porção inteira ou parcial de DNA, RNA, mRNA, tecido fresco ou congelado (armazenamento em recipiente em nitrogênio líquido ou em freezer -80°C), tecido de biópsia ou bloco de parafina.

[0029] Em uma terceira concretização, o método de determinação da expressão ou atividade do gene codificante de DIO3 é selecionado do grupo compreendendo anticorpo, iniciador, peptídeo, siRNA, pequena molécula ou fita anti-senso direcionados contra a porção da proteína, cDNA, DNA ou mRNA do gene/transcripto/proteína identificado como DIO3 ou, ainda, avaliação de sua atividade por ensaio enzimático com substrato específico para proteína.

[0030] Em uma quarta concretização, a classificação quanto ao risco do paciente é feito depois de avaliar os níveis de indicador em uma amostra através de uma ou mais técnicas biomoleculares selecionadas do grupo compreendendo avaliação da expressão proteica através de imunohistoquímica em lâmina de tecido de tumor utilizando anticorpo primário específico com afinidade às porções da proteína DIO3 e posterior quantificação da intensidade de coloração pelo anticorpo em tecido tumoral, extração de mRNA de espécime tumoral por diferentes métodos, técnica de *microarray*, RNAseq RSEM, PCR quantitativo, RT-PCR ou técnicas similares utilizando-se iniciadores para amplificação de porção do gene.

[0031] Em um segundo objeto a presente invenção revela um Kit para predição do prognóstico de câncer, que compreende:

- a) meios para análise quantitativa da expressão de DIO3 do material genético por qPCR ou meios para análise qualitativa por imunohistoquímica em uma amostra de tumor de paciente diagnosticado com câncer;
- b) Comparar o nível de expressão de DIO3 obtido na amostra com curva de sobrevivência para o tumor em questão, normalizando o resultado pelo controle;
- c) Estabelecer risco de morte (sobrevivência) do paciente de acordo com resultado

de nível de expressão.

[0032] Em uma concretização do Kit, o kit compreende:

- meios para amplificar os segmentos de ácidos nucleicos do gene DIO3, mediante reação em cadeia da polimerase contendo por amostra:

10 ul de fluóforo SYBR Green Master Mix;

0,2 ul de solução de 1 uM de SEQ ID N°1 e 0,2 ul de solução de 1 uM SEQ ID N°2;

0,2 ul de solução de 1 uM de SEQ ID N°3; SEQ ID N° 4 como controle interno;

1 ug de cDNA do paciente (amostra)

completar com H₂O para total de 20 ul

[0033] Em uma concretização adicional do Kit, o kit compreende:

- meios para análise imunohistoquímica de uma amostra de tumor de paciente com câncer contendo:

Xilol para desparafinização das lâminas das amostras;

Álcool etílico e água destilada para reidratação;

Banho em 100 ml de tampão de citrato pH 6,0 para recuperação antigênica a em banho-maria por 20 minutos a 95°C e resfriamento por 10 min no próprio tampão;

Banho em 100 ml de solução de peróxido de hidrogênio a 5% em metanol para bloqueio da atividade de peroxidase endógena

Banho em 100 ml de leite desnatado em pó diluído a 5% em PBS para bloqueio de proteínas

Aplicação na amostra de 50 ul anticorpo primário Anti-DIO3 na diluição 1:50 para incubação das amostras em geladeira de 2 a 8°C.

Aplicação de 50 ul anticorpo secundário Goat anti-Rabbit IgG para ser aplicado após incubação em anticorpo primário, e para ser incubado novamente 1h e 30 minutos em temperatura ambiente.

[0034] Em uma concretização do kit, o kit compreende na primeira etapa, a amplificação através de PCR utilizando as sequências artificiais SEQ ID N°1,

SEQ ID N°2, SEQ ID N°3 e SEQ ID N°4.

[0035] Em um terceiro objeto, a presente invenção revela o uso do método de predição do prognóstico de câncer proposto em oncologia clínica.

[0036] Em uma concretização, o uso do método prognóstico de câncer proposto é para proporcionar auxílio na classificação diagnóstica tumoral, prognóstico, seleção de terapia e monitorização de terapia para o paciente testado.

[0037] Em uma concretização adicional, o método prognóstico de câncer pode ser aplicado em pacientes com diagnóstico estabelecido de câncer do grupo compreendendo sarcomas (fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomiocarcinoma) e carcinomas, carcinoma de cólon, câncer de pâncreas, câncer de mama com seus subtipos, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais, adenocarcinoma, carcinoma de glândula sudorípara, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma papilar, carcinoma medular, carcinoma folicular, tumor de Wilms, câncer cervical, tumor de testículo, carcinoma de pulmão, carcinoma de pequenas células, carcinoma de bexiga, glioma, glioblastoma, glioblastoma multiforme, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma renal, carcinoma de células claras e oligodendroma.

[0038] A presente invenção, portanto, apresenta a vantagem intrínseca de ser um método prognóstico de baixo custo e alto valor preditivo para o prognóstico do paciente com diagnóstico estabelecido de câncer.

Definições

[0039] O termo “tecido fresco” utilizado aqui deve ser entendido como uma amostra de tecido tumoral ou tecido normal recém obtida a partir de procedimento cirúrgico ou de biópsia que seguirá processamento para extração de DNA, parafinização ou congelamento até produto final para análise do preditor prognóstico em questão.

[0040] O termo “porção inteira” utilizado aqui deve ser entendido como uma amostra compreendendo um produto derivado da extração de DNA total, RNA total e mRNA total (através de protocolos de extração de DNA/RNA/mRNA).

[0041] O termo “porção parcial” utilizado aqui deve ser entendido como um material de análise que pode compreender apenas fragmento de DNA, RNA ou mRNA onde esteja contido o gene de interesse para a análise, sem necessidade de disponibilidade do DNA/RNA humano inteiro.

Exemplo 1 – Fundamento científico da proposta

[0042] Avaliou-se o papel da expressão da proteína DIO3 como marcador prognóstico através de estudo imunohistoquímico em amostras tumorais de câncer de mama. Analisou-se um total de 53 espécimes de tumores de mama e analisou-se de forma retrospectiva os dados dos pacientes quanto ao desfecho clínico (sobrevida global). Os espécimes fixados em formalina tamponada 10%, processados e incluídos em parafina, foram submetidos ao corte histológico em micrótomo regulado para a espessura de 4 µm. Os cortes foram posicionados em lâminas previamente silanizadas.

[0043] A expressão tecidual da DIO3 foi avaliada através de imunohistoquímica realizada em blocos de tecido embebidos em parafina e fixados em formalina, de amostras de tecido de mama normal, fibroadenoma e câncer de mama. Avaliou-se os resultados dos estudos de imunohistoquímica de duas formas:

- (a) De forma dicotômica (positivo e negativo);
- (b) Avaliação semi-quantitativa por *H-score*.

[0044] A técnica de imunohistoquímica compreende deparafinização e reidratação da amostra, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio de reações não específicas.

[0045] As lâminas para realização da técnica de imuno-histoquímica foram aquecidas em estufa a 80°C por 30 minutos, desparafinizadas em xilol, reidratadas em álcool etílico e posteriormente em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria por 20 minutos a 95°C no

tampão citrato pH 6,0 e resfriadas por 10 min no próprio tampão. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 5% em metanol por 20 minutos. O bloqueio de proteínas foi realizado com leite desnatado em pó diluído a 5% em PBS por 20 minutos. Os cortes foram posteriormente incubados, durante toda a noite (“overnight”) em geladeira de 2 a 8°C, com o anticorpo primário Anti-DIO3 (Abcam, 102926, Cambridge, UK), na diluição 1:50. Após a incubação foi aplicado o anticorpo secundário Goat anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugated, cód: AP132P, Millipore e incubado por 1h e 30 minutos em temperatura ambiente e a visualização da reação foi obtida com Liquid Dab (Dako, K3468 - Imidazol-HCl tampão, pH 7.5, contendo peróxido de hidrogênio e agente antimicrobiano) kit usado para visualização de cromógeno, conforme recomendações do fabricante. Após a visualização, as lâminas foram contra-coradas em hematoxilina de Harris por 10 segundos, e diferenciadas em água amoniacal 2% por 30 segundos os cortes desidratados em álcool absoluto e colocados em xilol para a montagem das lâminas em resina do tipo Entellan. Analisou-se as amostras utilizando-se um microscópio Olympus BX51 com uma câmera Olympus QColor-5.

[0046] A avaliação dicotômica (negativo e positivo) foi realizada por patologista, que avalia a amostra e controle visualmente e classifica a amostra como positiva (coloração imunohistoquímica presente para DIO3) ou negativa (coloração imunohistoquímica ausente para DIO3).

[0047] Para a avaliação semi-quantitativa por H-Score, o patologista avalia o percentual de células positivas (com coloração presente) e pontua esse percentual com um dos três graus de intensidade da marcação (fraco 1+. Moderado 2+ e forte 3+), O resultado do H-score é calculado utilizando-se a seguinte fórmula: $[1 \times (\% \text{ células } 1+) + 2 \times (\% \text{ células } 2+) + 3 \times (\% \text{ de células } 3+)]$ e, sendo assim, os resultados variam de 0 a 300.

[0048] Os resultados demonstraram que a expressão de DIO3 avaliada em amostras do tumor é altamente específica para diferenciação entre bom e mau prognóstico ($p=0.01$). O software QCapturePro foi utilizado para avaliação da

expressão da DIO3, atividade que foi executada por patologista experiente cegado para o perfil molecular e características clínicas dos pacientes. Controles positivos e negativos internos foram realizados. A marcação de epiderme, placenta e nevo epidérmico foram usadas como controle positivo e outras estruturas, como tecido conectivo e tecido adiposo foram utilizados como controle negativo. Níveis de marcação são representados na figura 1.

[0049] A expressão positiva de DIO3 em tumores de mama foi associada a maior sobrevida, enquanto a negatividade para esta proteína está associada a alta mortalidade, como pode-se observar na figura 2.

[0050] Em relação ao PCR, para reação de polimerase em cadeia quantitativa (qPCR), o teste foi realizado a partir de cDNAs utilizando-se reação em cadeia polimerase em tempo real (PCR) com fluoróforo SYBR Green (SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)) em termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System Thermal Cycler com o sistema 7500 FAST System Sequence Detection 1.4 Software (Life Technologies, Applied Biosystems). Os experimentos foram realizados com monitoramento em tempo real da fluorescência do marcador SYBR Green. Cada amostra foi avaliada em triplicada e controle negativo foi incluído em cada experimento. Curvas padrão foram realizadas como diluição seriada em 5 pontos. Os resultados foram normalizados para o gene de referência de controle interno (ciclofilina A). Os oligonucleotídeos utilizados foram: gene DIO3 humano: 5'-AACTCCGAGGTGGTTCTGC-3' (SEQ ID N°1) e 5'-TTGCGCGTAGTCGAGGAT-3' (SEQ ID N°2); ciclofilina A (controle interno), 5'-GCCGATGACGAGCCCTTG-3' (SEQ ID N°3) e 5'-TGCCGCCAGTGCCATTATG-3' (SEQ ID N° 4).

[0051] As quatro sequências acima apresentadas são sequências artificiais, complementares ao cDNA humano e servem de molde (template) para a amplificação do cDNA do gene de interesse do paciente do qual se deseja avaliar e quantificar a expressão.

Exemplo 2 – Câncer de tireoide

[0052] Estudos realizados pelos inventores para avaliação do papel da DIO3 em tumores tireoidianos demonstraram o aumento da atividade e expressão da DIO3 em linhagens celulares do CPT (células K1) e em amostras de tumores humanos. A indução da DIO3 ocorre a nível transcricional, provavelmente via ativação da via MAPK/ERK, já previamente implicada na indução dessas moléculas em outras condições patológicas. Níveis mais elevados de atividade da DIO3 foram observados nas amostras de PTC positivas para a mutação do BRAF V600E, potente indutor da ativação da via MAPK. De forma interessante, o aumento da atividade foi associado com o tamanho do tumor e doença avançada ao diagnóstico (figura 3), sugerindo uma correlação entre a diminuição local dos níveis de hormônios tireoidianos e aumento da agressividade tumoral.

Exemplo 3 – Câncer colorretal

[0053] O câncer colorretal é o terceiro câncer mais comum e o quarto câncer em causa de morte nos Estados Unidos. O nível de expressão foi avaliado através de imunohistoquímica em 105 amostras de câncer de cólon. O indicador DIO3 está expresso de forma significativamente mais intensa em câncer do que em tecido normal ($p=0.001$). O nível de DIO3 se correlacionou negativamente com o grau histológico das lesões e está reduzido em lesões mais agressivas (Dentice, M., 2012). Da mesma forma, outro trabalho demonstrou pior prognóstico para pacientes que apresentam redução de expressão do gene DIO3, com coeficiente de regressão de Cox de -0.32561 , $p=0.041777$ para sobrevida global e coeficiente de regressão de Cox de -0.00829 , $p=0.973719$ para tempo livre de doença (Al-Temaimi, R. A., 2016).

[0054] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir.

Reivindicações

1. Método para predição do prognóstico de câncer **caracterizado** por compreender as etapas de:

(a) Análise da expressão ou atividade do gene codificante DIO3 ou seus produtos de uma amostra de tumor de um paciente; e

(b) Classificar o paciente quanto ao risco de morte e risco de recorrência baseado nos resultados obtidos em (a).

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela análise da expressão ou atividade de DIO3 poder ser feita de forma isolada ou em combinação com outros genes selecionados.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela amostra proveniente do paciente ser selecionada do grupo compreendendo porção inteira ou parcial de DNA, RNA, mRNA, tecido fresco, tecido de biópsia ou bloco de parafina.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo método de análise da expressão ou atividade do gene codificante de DIO3 ser selecionada do grupo compreendendo anticorpo, iniciador, peptídeo, siRNA, pequena molécula ou fita anti-senso direcionados contra porção da proteína, cDNA, DNA ou mRNA do gene/transcripto/proteína identificado como DIO3 ou, ainda, avaliação de sua atividade por ensaio enzimático com substrato específico para proteína.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela classificação quanto ao risco do paciente ser feito depois de avaliar os níveis de indicador em uma amostra através de uma ou mais técnicas biomoleculares e/ou computacionais e/ou digitais selecionadas do grupo compreendendo avaliação da expressão proteica através de imunohistoquímica em lâmina de tecido de tumor utilizando anticorpo primário específico com afinidade às porções da proteína DIO3 e posterior quantificação da intensidade de coloração pelo anticorpo em tecido tumoral, extração de mRNA de espécime

tumoral por diferentes métodos, utilizando-se técnica de microarray, RNAseq RSEM, PCR quantitativo, RT-PCR ou técnicas similares utilizando-se iniciadores para amplificação de porção do gene.

6. Kit para predição do prognóstico de câncer, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 **caracterizado** por compreender:

a) meios para análise quantitativa da expressão de DIO3 do material genético por qPCR ou meios para análise qualitativa por imunohistoquímica em uma amostra de tumor de paciente diagnosticado com câncer;

b) Comparar o nível de expressão de DIO3 obtido na amostra com curva de sobrevida para o tumor em questão, normalizando o resultado pelo controle;

c) Estabelecer risco de morte (sobrevida) do paciente de acordo com resultado de nível de expressão.

7. Kit para predição do prognóstico de câncer, de acordo com a reivindicação 6 **caracterizado** por compreender:

- meios para amplificar os segmentos de ácidos nucleicos do gene DIO3, mediante reação em cadeia da polimerase contendo por amostra:

10 ul de fluóforo SYBR Green Master Mix;

0,2 ul de solução de 1 uM de SEQ ID N°1 e 0,2 uL de solução de 1 uM SEQ ID N°2;

0,2 ul de solução de 1 uM de SEQ ID N°3; SEQ ID N° 4 como controle interno;

1 ug de cDNA do paciente (amostra)

completar com H₂O para total de 20 ul.

8. Kit para predição do prognóstico de câncer, de acordo com a reivindicação 6 **caracterizado** por compreender:

- meios para análise imunohistoquímica de uma amostra de tumor de paciente com câncer contendo:

Xilol para desparafinização das lâminas das amostras;

Álcool etílico e água destilada para reidratação;

Banho em 100 ml de tampão de citrato pH 6,0 para recuperação antigênica a em banho-maria por 20 minutos a 95°C e resfriamento por 10 min no próprio tampão;

Banho em 100 ml de solução de peróxido de hidrogênio a 5% em metanol para bloqueio da atividade de peroxidase endógena por 15 minutos

Banho em 100 ml de leite desnatado em pó diluído a 5% em PBS para bloqueio de proteínas por 10 minutos

Aplicação de 50 ul anticorpo primário Anti-DIO3 na diluição 1:50 para incubação das amostras em geladeira de 2 a 8°C por 12 horas

Aplicação de 50 ul de anticorpo secundário Goat anti-Rabbit IgG para ser aplicado após incubação em anticorpo primário, e para ser incubado novamente 1h e 30 minutos em temperatura ambiente.

9. Kit, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** por compreender na primeira etapa, a amplificação através de PCR utilizando as sequências artificiais SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3 e SEQ ID N°4.

10. Uso do método, conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** por ser em oncologia clínica.

11. Uso do método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** por ser para proporcionar auxílio na classificação diagnóstica tumoral, prognóstico, seleção de terapia e monitorização de terapia para o paciente testado.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** por ser aplicado em pacientes com diagnóstico estabelecido de câncer do grupo compreendendo sarcomas (fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiocarcoma) e carcinomas, carcinoma de cólon, câncer de pâncreas, câncer de mama com seus subtipos, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais, adenocarcinoma, carcinoma de glândula sudorípara, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma papilar, carcinoma

medular, carcinoma folicular, tumor de Wilms, câncer cervical, tumor de testículo, carcinoma de pulmão, carcinoma de pequenas células, carcinoma de bexiga, glioma, glioblastoma, glioblastoma multiforme, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma renal, carcinoma de células claras e oligodendroma.

Figuras

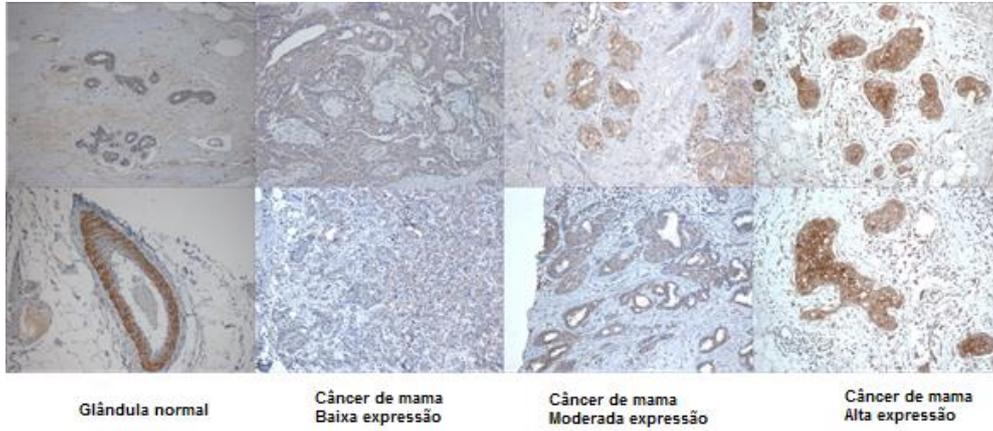


Figura 1

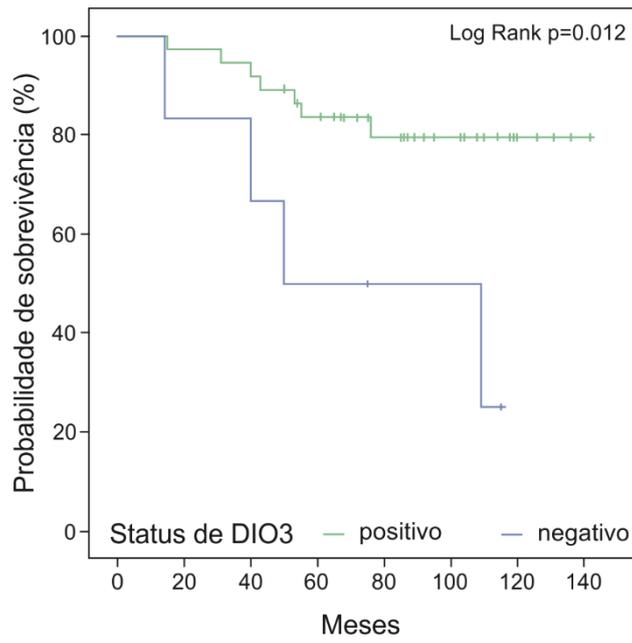


Figura 2

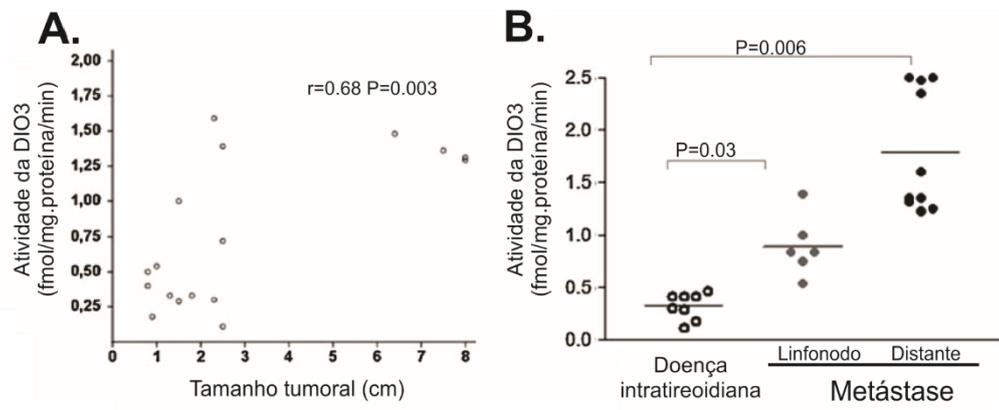


Figura 3

Resumo**MÉTODO E KIT PARA PREDIÇÃO PROGNÓSTICO DE CÂNCER E USO DO
MÉTODO EM ONCOLOGIA CLÍNICA**

A presente invenção descreve um método de predição de prognóstico de câncer, ou seja, seu risco de morrer, que pode ser utilizado em pacientes com diagnóstico estabelecido da doença. Especificamente, a presente invenção compreende a descrição de um marcador biomolecular que pode ser utilizado, o dito marcador sendo o gene/proteína DIO3, que possui padrões de expressão alterados em tumores. Tais alterações são importantes, uma vez que se correlacionam com a sobrevida dos pacientes portadores da doença. Esse método pode ainda ser utilizado para auxílio na decisão do curso de tratamento do paciente testado. A presente invenção se situa nos campos da biologia molecular e oncologia clínica.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência - método prognóstico - 10Maio2019 -
- Data de Geração do Código: 20/05/2019
- Hora de Geração do Código: 12:22:26
- Código de Controle:
 - Campo 1: F48BFBE5DA8115CF
 - Campo 2: E5CC46DF8EEAE6CC