



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**TESIS DOCTORAL
FACULTAD DE MEDICINA**

PROGRAMA DE DOCTORADO

ORGANOGENESIS I ANATOMÍA CLÍNICA I APLICADA

BIENIO 2002-2004

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE
miRNAs EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO
DEL COLON, EL CÁNCER COLORECTAL Y EL
LINFOMA DE HODGKIN

Directores de Tesis

Dr. Mariano Monzó Planella

Dr. Álvaro Urbano Ispizua

Alfons Navarro Ponz

Barcelona, Enero de 2008

AGRADECIMIENTOS

La realització d'aquesta tesis ha estat com una llarga aventura, però que enlloc de finalitzar, no fa més que començar. En tot el temps que ha transcorregut des de que va començar hi ha hagut molta gent que ha compartit aquesta aventura amb mi i a la que haig d'agrair que de forma directa o indirecta m'hagin ajudat:

En primer lloc vull agrair als meus pares, sense els quals res de tot això no hagués estat possible. Sobretot sense la perseverança de la meva mare per empenyem a estudiar i els ànims i recolzament del meu pare per fer-me un home de profit. Sense tot el seu esforç, que ha sigut en alguns moments tan o més gran que el meu, no hagués arribat mai a aquesta fita, la tesis.

A la Gisela li dec un agraïment molt especial, sobretot per tota la paciència que ha tingut amb mi per totes les tardes de diumenge que li he fet passar tancada a casa perquè jo tenia que estudiar i per les hores intempestives a les que he arribat a casa per la feina del laboratori. Però sobretot li vull agrair perquè ha contribuït molt especialment al meu treball i a la meua manera de ser i de fer amb aquest esperit tan crític, però constructiu que té, que a pesar de que no sempre li he fet cas, ha servit per ferme millor com a persona i com a científic. I sobretot, gràcies per trobar-te, perquè ets el millor que m'ha passat mai.

Al Dr. Marià Monzó (el papa del lab) li dec la meua formació científica i sobretot aquesta tesis. Des de que vaig arribar al laboratori i m'hi vaig quedar, no he parat d'absorbir coneixements, coneixements no sol científics sinó també de la vida de la qual en sap molt. I en moltes ocasions m'ha fet com de pare. Li dec el haver passat de ser aquell noi tan caòtic i desordenat a ser un home una mica menys desordenat, però com diuen d'on no n'hi ha no en raja. Moltes gràcies Marià, perquè m'has fet aprendre a viure i disfrutar del que faig.

A l'Àlvaro Urbano li dec una menció especial, perquè des de la seva arribada al nostre laboratori que tot va canviar. Començant per la meua primera incursió al món de la Hematologia a mans dels polimorfismes i la LAM i obrint-me les portes cap a un món

que cada vegada m'agrada més. A més, li agraeixo haver-me aportat moltíssim a nivell científic i com a persona, donant-me alas en el món de la ciència.

A la Rosa Artells amb qui he compartit tota la meva aventura del lab. Varem començar junts amb això del doctorat i hem fet tot un camí, per arribar aquí. Ajudant-nos i compartint bons i mals moments.

A tota la gent del laboratori amb qui he compartit els millors i pitjors moments d'aquesta tesis (en ordre d'arribada):

Al Miquel amb qui he compartit part del món dels polimorfismes genètics i que tanta sabiduria sap processar en els moments crítics. També per tot el que m'ha ajudat a entendre la hemato i una mica l'estadística.

A la Sonia que m'ha sapigut escoltar en molts moments i que també ha viscut el món dels SNPs.

A la Silvia que sempre ha estat en els moments durs per escoltar-me i aconsellar-me i sobretot per dedicar-me aquell somriure que et fa veure el món amb millors ulls.

A la Carme pels moments divertits que hem passat amb les seves ocurrencies.

Al Bernat amb qui he compartit xerrades que tocaven la vessant filosòfica dels microRNAs i que tan m'ha ajudat amb els conceptes estadístics i matemàtics que tan li costen al meu cap.

A l'Anna agrair-li la seva generositat per permetre'm entrar en el món del Hodgkin. I per tots els moments bons i dolents que hem passat en els congressos i tota la feina i hores dedicades en aquest treball.

A l'Aina que té aquesta vessant tan divertida i boja que et dona alegria a la feina. I que ha participat moltíssim en aquesta tesis, sobretot en la part de Hodgkin i dels miRNAs, en la que per culpa meua es casi una experta.

A la Tania per la seva gràcia i sinceritat a l'hora de dir les coses. Que encara que m'esbronca per lo despistat que sóc al lab, se que m'aprecia molt.

A la Elena perquè amb la seva alegria i passió per l'Oncologia m'ha ajudat a entrar en la part més clínica d'aquest món que tan trist potser a vegades.

I en general a tots els que han passat en un moment o altre pel laboratori.

A tots el membres del departament d'Anatomia, amb especial atenció a la Gloria Castell, la Dolors Fuster, la Begoña Torres, el Josep M^a Potau, el Marc Canals i el Xavier Martín.

Als companys de la Facultat: Hector, Vero, Merche, Maricar, Silvia, Reyes, Chemita, Ruth, Cristina, Joan, Natalia, Laura, Ana, amb els quals he compartit camí, dubtes, experiències en tota aquesta aventura del doctorat. Amb especial atenció a la Merche y la Maricar amb les quals he passat moltes tardes parlant de ciència o de que seria de nosaltres en aquest món.

Als companys del departament de Botánica de Biología: Xavier Font, Rafael Quadrada, Miquel de Caceres, David i als altres. Per aquelles tardes que vaig compartir amb ells programant pàgines web durant els primers anys d'estar al laboratori.

Al JoseTomás i al Joan (els de Bristol) amb els quals he compartit molts congressos, fent-me sentir sempre com a casa amb la seva companya.

Als meus amics de tota la vida, Borja, Manuel i Iban. Que per les voltes que dona la vida ja gairebé no ens veiem, però que sempre seran bons amics meus.

A la colla d'anglès: Jar, Rosa, Rebeca, Alex, Diana. Pels bons moments que passem junts.

A la gente del laboratorio del CIMA de Navarra. En especial y con mucho cariño a Eva Bandres, de la cual he aprendido muchas cosas, pero la más importante: que no debo creerme nada, aunque este publicado. También a Jesús G. Foncillas, que me ha abierto

de corazón las puertas de su laboratorio. I a Marisol, Inés, Natalia i Nerea que me acogieron en el.

Als d'Anatomia patològica: Antonio Martínez i Olga Balagué. Que quantes tardes he passat perseguint al Antonio. Però no hem queixaré perquè el poc temps que aconseguia enganxar-lo hem transmetia tants coneixements com tot un dia amb altres persones. Moltes gràcies per adentrar-me en el món de la patologia del Hodgkin i sobretot per la vostra paciència en fer-ho.

A la gent d'Hematologia, en especial al Dr. Emili Montserrat.

A la Silvia Marcé per la seva inestimable ajuda a l'hora d'aprendre noves tècniques i per la paciència que va tenir en fer-ho, a més d'oferir-nos la seva amistat.

A la Elisabet la neboteta dels meus ulls.

A tots el membres de la meva família que m'han acompanyat en aquest recorregut: A les meves germanes Joana i Anna, al meu nebot David, al meus tiets Jesús i Pilar, als cunyats, als cosins, al Paco, a la Nena i la yaya,...a tots gràcies.

A l'altre família: Noelia, Tere, Arcadio,...

I a tota la gent que m'ha ajudat directa o indirectament,

GRÀCIES

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
ABREVIATURAS UTILIZADAS	9
INTRODUCCIÓN	13
Los microRNAs	13
Biogénesis de los miRNAs	15
Mecanismos de acción de los miRNAs	18
RNA interferencia. Otros tipos de RNAs pequeños	22
Identificación de las dianas de los miRNAs	25
Regulación de la expresión de los miRNAs	30
Control epigenético de la expresión de miRNAs	31
Embriogénesis y miRNAs	32
miRNAs y cáncer	36
miRNAs en tumores sólidos	36
miRNAs en la hematopoyesis y en neoplasias hematológicas	39
Infecciones virales y miRNAs	43
miRNAs y terapia molecular	46
Embriogénesis y cáncer	49
Embriogénesis del colon	50
Genes implicados en el desarrollo del colon	54
Histología del colon normal	56
Cáncer colorectal	60
Epidemiología	60
Histopatología y estadio	61
Cáncer de colon hereditario	63
Cáncer de colon esporádico	65
Vías de Señalización involucradas en el desarrollo intestinal y el cáncer.....	68
Linfoma de Hodgkin	74
Epidemiología	74
Histopatología	76
Inmunofenotipo	79
Biología molecular de las células de Hodgkin y Reed-Sternberg	81
Virus de Epstein Barr y su papel en el linfoma de Hodgkin	84
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	89
MATERIAL Y METODOS	93
Muestras embrionarias humanas	93
Muestras pacientes con cáncer colorectal	93
Muestras pacientes con linfoma de Hodgkin	95
Extracción de RNA	96
Transcripción Reversa y cuantificación por PCR a tiempo real de miRNAs	96

Inmunohistoquímica	98
Análisis del VEB	98
Hibridación in situ de miRNAs	98
1. Desparafinación de la muestra	99
2. Pretratamiento con proteasa	99
3. Incubación con la sonda	99
4. Revelado	100
5. Tinción	100
Protocolo realizado en Bond Max para la hibridación in situ	100
Microscopia electrónica de rastreo	104
Microscopia electrónica de transmisión	104
Western immunoblot	104
Inhibición mediante oligonucleótidos antisense del cluster miR-17-92	105
Análisis de la proliferación celular	105
Análisis estadístico	107
<i>RESULTADOS ESTUDIO miRNAs DURANTE LA EMBRIOGENESIS HUMANA DEL COLON Y DEL CANCER COLORECTAL</i>	111
Análisis morfológico del colon embrionario humano	111
Análisis de la expresión de miRNAs durante el desarrollo del colon humano	113
Solapamiento de expresión de miRNAs entre el tejido de colon embrionario y el tejido tumoral	117
El cluster miR-17-92 modula la expresión de E2F1 y la proliferación celular en colon embrionario humano y en cáncer colorectal	121
Análisis por hibridación in situ de la expresión de miR-17-5p en tejido embrionario, tumoral y normal de colon	125
<i>RESULTADOS ESTUDIO miRNAs EN LIMFOMA DE HODGKIN</i>	130
Análisis del patrón de expresión de miRNAs en pacientes de linfoma de Hodgkin clásico y en ganglios reactivos	130
Análisis de las dianas putativas de los miRNAs	136
Hibridación in situ de miRNAs	137
Análisis de la expresión de miRNAs en líneas celulares humanas de linfoma de Hodgkin	139
Efecto de la presencia de VEB en el patrón de miRNAs en linfoma de Hodgkin clásico	142
Asociación de la expresión de miRNAs y los parámetros clínicos	143
Validación de la firma de 25 miRNAs en muestras congeladas	144
<i>DISCUSIÓN</i>	149
Discusión del papel de los miRNAs en la embriogénesis del colon y el cáncer colorectal	149
Discusión del papel de los miRNAs en el linfoma de Hodgkin	152
Discusión conjunta: análisis de la implicación de los miRNAs en dos modelos tumorales diferentes	155

CONCLUSIONES	161
BIBLIOGRAFÍA	167
ANEXO 1	189
Tablas suplementarias	191
Tablas suplementarias	192
Protocolos	201
EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL: <i>TRIPURE de Roche</i>	203
EXTRACCIÓN DE RNA DE MUESTRAS INCLUIDAS EN PARAFINA: RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation (Ambion).....	205
WESTERN BLOT	207
TAMPONES NECESARIOS PARA EL WESTERN	211
TRANSFECCIÓN Y ANÁLISIS EFICIENCIA TRANSFECCIÓN	213
MTS PROTOCOL: <i>CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay</i>	215
PROTOCOLO DE TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA.....	217
ANEXO 2	219
Trabajos realizados en el periodo de tesis	219
Publicaciones a las que ha dado lugar la tesis.....	221
Participaciones en congresos relacionadas con el tema de tesis.....	231
Otras publicaciones realizadas durante el periodo de tesis	233

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AB	Applied Biosystems
ACF	<i>Aberrant crypt focus</i>
At	<i>Arabidopsis Thaliana</i>
BCR	Receptor de célula B
BSA	Albúmina sérica bovina
Ce	<i>C. elegans</i>
CM	Celularidad mixta
CG	Centro germinal
CRC	Cáncer colorectal
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DAB	Diamino Bencidina
dsRNA	RNAs de doble cadena
DDR2	<i>Discoidin receptor family, member 2</i>
DLBCL	<i>Difuse large B cell lymphoma</i>
DL	LH depleción linfoide
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
EN	Esclerosis nodular
EPHB1	<i>Ephrin receptor EphB1</i>
HSPC	Células madre progenitoras hematopoyéticas
H/RS	Células de Hodgkin y Reed-Sternberg
HH	<i>Hedgehog</i>
HIP	<i>Hedgehog-interacting protein</i>
JPS	Síndrome juvenil de poliposis
kb	Kilobase
LH	Linfoma de Hodgkin
LHc	Linfoma de Hodgkin clásico
LLC	Leucemia linfoblástica crónica
LPA	Leucemia promielocítica aguda
LHPLN	Linfoma de Hodgkin predominio linfocítico nodular
mRNA	RNA mensajero
miRNAs	MicroRNA

miRNA*	Cadena complementaria al miRNA maduro
miRISC	Complejo RISC que actúa sobre microRNAs
NICD	<i>Notch intracellular domain</i>
NSCLC	<i>Non small cell lung cancer</i>
nt	Nucleótidos
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
pb	Pares de bases
PDGFRA	<i>Platelet derived growth factor receptor A</i>
piRNAs	<i>Piwi-interacting RNAs</i>
pri-miRNA	MicroRNA primario
PTCH	<i>Patched</i>
raasiRNAs	<i>Repeat-associated small interfering RNAs</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RL	LH rico en linfocitos
RNAi	RNA interferente
RT	Retrotranscripción
scnRNAs	Small scan RNAs
siRNA	RNAs silentes
SMO	<i>Smoothened</i>
Sp	<i>S. pombe</i>
tasiRNAs	<i>Trans-acting siRNAs</i>
tncRNAs	<i>Tiny noncoding RNAs</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRKB	<i>Tyrosine kinase receptor B</i>
TRKA	<i>Tyrosine kinase receptor A</i>
Tt	<i>T. thermophila</i>
UTR 3'	Región 3' no codificante
UTR 5'	Región 5' no codificante
VEB	Virus de Epstein Barr