



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

RESULTADOS

RESULTADOS ESTUDIO miRNAs DURANTE LA EMBRIOGENESIS HUMANA DEL COLON Y DEL CANCER COLORECTAL

Análisis morfológico del colon embrionario humano

El análisis morfológico del colon de embriones humanos de 7 semanas reveló la ausencia de lumen intestinal en el centro del colon y la presencia de células indiferenciadas rodeadas por mesénquima embrionario (Figura 27, 28a y 29). A las nueve semanas de desarrollo, el lumen intestinal empieza a poder observarse y las células presentan características de un epitelio columnar (Figura 28b y 29). A las 12 semanas el lumen intestinal está completamente formado y el epitelio intestinal aparece ya diferenciado, con la presencia de células caliciformes, fibroblastos maduros y tejido muscular (Figura 28c, d, e, f y 29), cosa que ya había sido observada previamente en otros estudios²⁶¹.

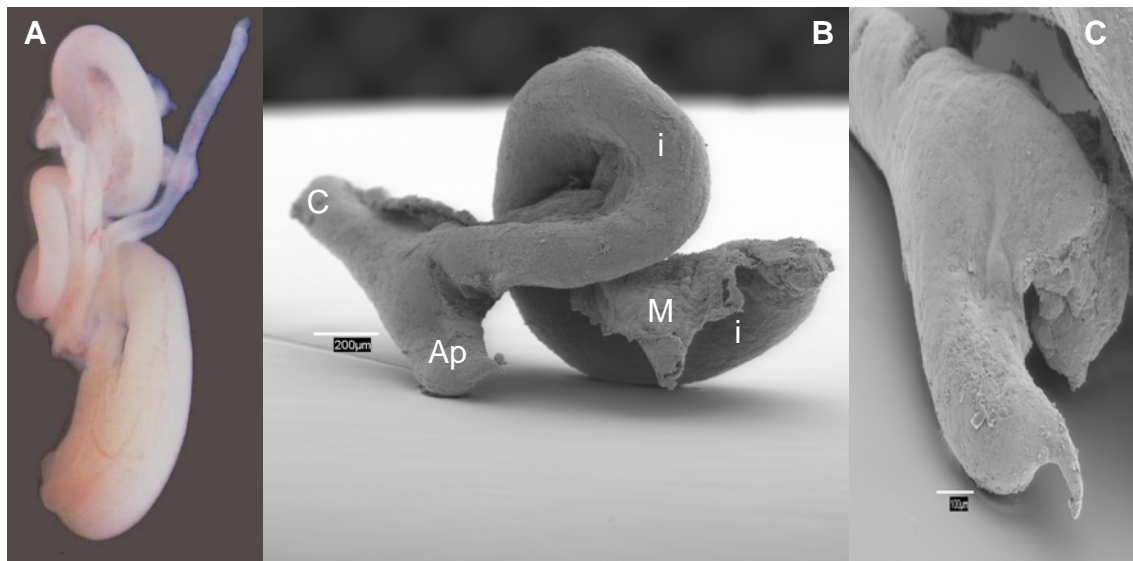


Figura 27. Sistema digestivo de un embrión de 7.5 semanas.

A) Sistema digestivo observado bajo lupa estereoscópica. B) Microscopía de rastreo(C= colon; Ap=apéndice; i=intestino delgado; M=mesenterio;) C) Microscopía de rastreo, detalle del apéndice, el cual se ha utilizado como referencia para la obtención de las muestras de colon embrionario.

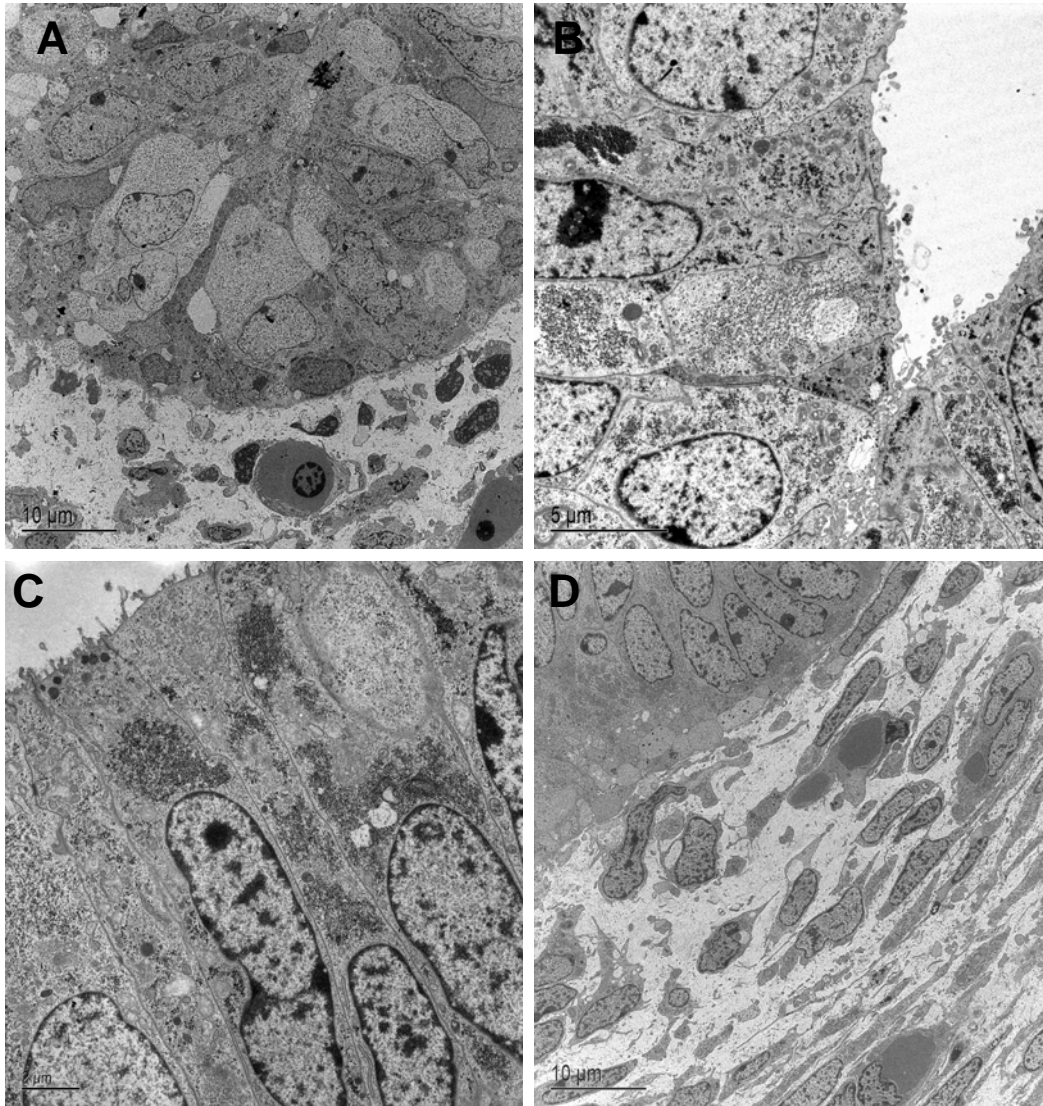


Figura 28. Imágenes de microscopía de transmisión de secciones de colon embrionario humano.

A) Sección colon de un embrión de 7 semanas, donde podemos apreciar que no se ha formado la luz intestinal. B) Colon de un embrión de 9 semanas donde se puede apreciar la luz intestinal. C) y D) Embrión de 11 semanas. Donde se puede apreciar C) el epitelio columnar totalmente formado y D) la capa submucosa.

Análisis de la expresión de miRNAs durante el desarrollo del colon humano

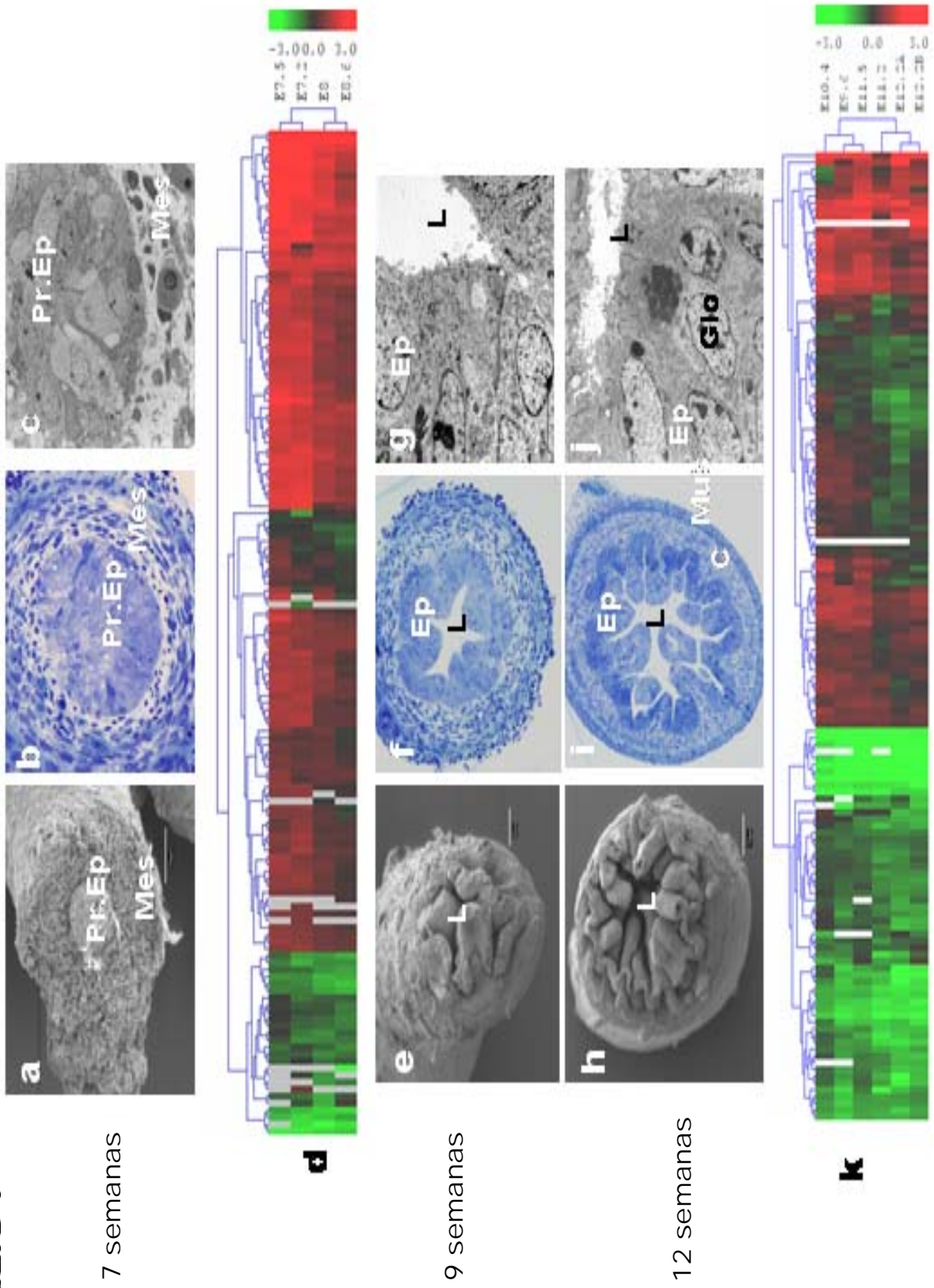
El estudio de la expresión de 156 miRNAs en el tejido embrionario mediante el análisis de *k-means*, mostró dos grupos bien diferenciados: por un lado los embriones de 7-8 semanas, y por otro lado los embriones de 9-12 semanas.

En el periodo comprendido entre las 7 y las 8 semanas, los niveles globales de expresión de miRNAs eran elevados en comparación con el tejido normal adulto (Figura 29), mientras que los niveles globales de expresión en las semanas 9-12 eran más bajos, es decir, que aparecían menor número de miRNAs sobreexpresados. Esto indica que tenemos todo un conjunto de miRNAs que sus niveles de expresión se van reduciendo a medida que avanza el desarrollo embrionario, a medida que se va diferenciando el colon. El análisis por SAM identificó un total de 67 miRNAs que estaban diferencialmente expresados en el colon de los embriones de 7-8 semanas respecto al colon de los embriones de 9-12 semanas (Tabla 14). De éstos, al realizar un análisis de los genes diana putativos sobre los que pueden actuar, vemos que 40 (el 59%) parecen tener relación con genes asociados con el desarrollo embrionario del tracto digestivo, sobretodo con genes de la familia Hox y Wnt (Tabla 14).

Figura 29 (página siguiente). Morfología y *hierarchical cluster analysis* de la expresión de miRNAs durante el desarrollo embrionario del colon humano.

Se agruparon los embriones en 2 grupos, 7-8 semanas (D) y 9-12 semanas (K), mediante análisis de *k-means*. En la figura se muestra la morfología del colon embrionario de un embrión de 7, 9 y 12 semanas por microscopía electrónica de rastreo (A, E, H), mediante cortes semifinos (B, F y I) y por microscopía electrónica de transmisión (C, G y J).

(Pr. Ep = Epitelio primitivo; Mes = mesénquima; L = lumen intestinal; Ep = epitelio embrionario; M = capa muscular; Glo = células caliciformes).



miRNA	Media Embrión 7-8 semanas	Media Embrión 9-12 semanas	Dianas putativas asociadas con el desarrollo embrionario del tracto digestivo (Sanger)
miR-10a	1.49	0.05	<i>HOXC5, HOXA1</i>
miR-15a	0.21	-0.90	
miR-15b	0.66	-0.46	
miR-16	-0.23	-1.19	<i>HOXC8, HOXA10, HOXC11, HOXB7, WNT7A, WNT16, WNT5B, WNT3A, FGF2, TGF-β1, CXCL3</i>
miR-17-3p	0.70	-0.46	
miR-17-5p	1.34	-0.33	
miR-20	0.96	-0.54	<i>HOXD3, FGF3, TGF-β1</i>
miR-25	0.92	-0.23	<i>HOXD1, Nkx2.3</i>
miR-26a	0.87	-0.04	
miR-27a	0.30	-0.68	
miR-27b	0.47	-0.40	
miR-28	0.70	-0.20	<i>HOXB3, HOXC9, HOXB4, WNT2, FGF3</i>
miR-301	1.99	0.78	<i>HOXB3, HOXD1</i>
miR-30a-3p	1.24	-0.04	
miR-30b	1.30	0.25	
miR-30c	1.47	0.35	
miR-34a	-0.28	-1.30	
miR-34c	0.79	-0.47	
miR-92	1.16	-0.15	<i>WNT4, TGF-β1, Nkx2.3</i>
miR-95	0.46	-0.50	
miR-103	1.41	0.09	<i>HOXB7, WNT7A, WNT16, FGF18, TGF-β1</i>
miR-105	1.37	0.12	<i>HOXC12, TGF-β1</i>
miR-106a	1.74	0.10	
miR-107	1.90	0.56	<i>HOXB7, WNT7A, FGF18</i>
miR-125a	1.46	0.35	
miR-126	0.78	-0.37	<i>HOXD12, WNT9A, PDGFA</i>
miR-128a	1.10	0.03	
miR-130a	1.95	0.71	
miR-130b	2.09	0.69	
miR-135a	2.59	1.42	
miR-140	1.38	0.28	<i>HOXB7, FGF17, FGF20, BMP3</i>
miR-142-3p	-0.51	-1.50	
miR-142-5p	-0.50	-1.89	
miR-146	-0.54	-1.44	<i>HOXC9, BMP7</i>
miR-148a	0.39	-0.78	

miRNA	Media Embrión 7-8 semanas	Media Embrión 9-12 semanas	Dianas putativas asociadas con el desarrollo embrionario del tracto digestivo (Sanger)
miR-149	1.93	0.90	<i>HOXB8, HOXB6, HOXC9, WNT4, FGF17, FGF22</i>
miR-151	1.22	0.08	<i>HOXD1, HOXA2, HOXB4, FGF18</i>
miR-181a	1.38	0.40	<i>HOXA11</i>
miR-181b	1.45	0.35	<i>HOXA11</i>
miR-184			<i>HOXC11, WNT10B, FGF13, PDGFA</i>
miR-186	0.54	-0.58	
miR-187	1.92	0.55	<i>HOXB7, WNT10A, WNT4, FGF10</i>
miR-190	1.52	0.48	
miR-191	0.22	-0.78	<i>HOXC8, HOXD8, HOXA2, HOXB13, HOXB2, WNT7A, PDGFB</i>
miR-193	-0.04	-1.08	<i>HOXB4, FGF17, FGF8</i>
miR-195	-0.79	-1.81	<i>HOXA10, HOXC11, HOXB7, WNT7A, WNT8A, WNT3A, FGF2</i>
miR-197	0.51	-0.47	<i>HOXD11, HOXD8, WNT7B</i>
miR-19a	0.81	-0.49	
miR-214	1.44	0.44	<i>HOXC5, HOXC6, HOXD4, WNT7A, WNT9B, FGF17, BMP4</i>
miR-218	1.82	0.68	
miR-221	1.17	0.11	<i>PDGFA, FOXL1</i>
miR-222	0.73	-0.26	<i>HOXD1, HOXC13, HOXC9, FGF4, FGF3, FGF8</i>
miR-223	-0.68	-1.83	<i>HOXC6, WNT10A, WNT3</i>
miR-296	1.15	-0.05	<i>HOXB6, HOXD3, HOXD4, FGF5, FGF11, BMP1</i>
miR-320	0.60	-0.44	<i>HOXD1, HOXA3</i>
miR-323	1.73	0.74	<i>HOXB5, HOXA1, HOXD1, WNT1</i>
miR-324-5p	1.09	0.08	
miR-325			<i>HOXD1, HOXB2, FGF17, PDGFA</i>
miR-326	1.18	0.05	<i>WNT6, FGF17, FGF17, Nkx2.3</i>
miR-328	0.88	-0.17	<i>HOXB8, HOXC6, HOXB4, WNT5B, FGF17, FGF3, FGF17</i>
miR-330	1.09	-0.10	<i>HOXD8, HOXD9, HOXB2, WNT2, WNT16, WNT11, BMP4</i>
miR-331	1.37	0.17	<i>HOXA3, FGF17, Nkx2.3</i>
miR-335	1.59	0.28	<i>HOXD8, HOXD13, HOXA2, WNT10A, BMP7</i>
miR-339	0.83	-0.31	<i>HOXC11, HOXA11, WNT5B, FGF17, FGF22</i>
miR-340	1.96	0.70	<i>HOXD4, FGF22</i>
miR-342	0.73	-0.37	<i>HOXB8, WNT10B, FGF3, PDGFA</i>
miR-374	0.63	-0.51	<i>HOXD11, HOXB7, HOXC6, HOXD4</i>

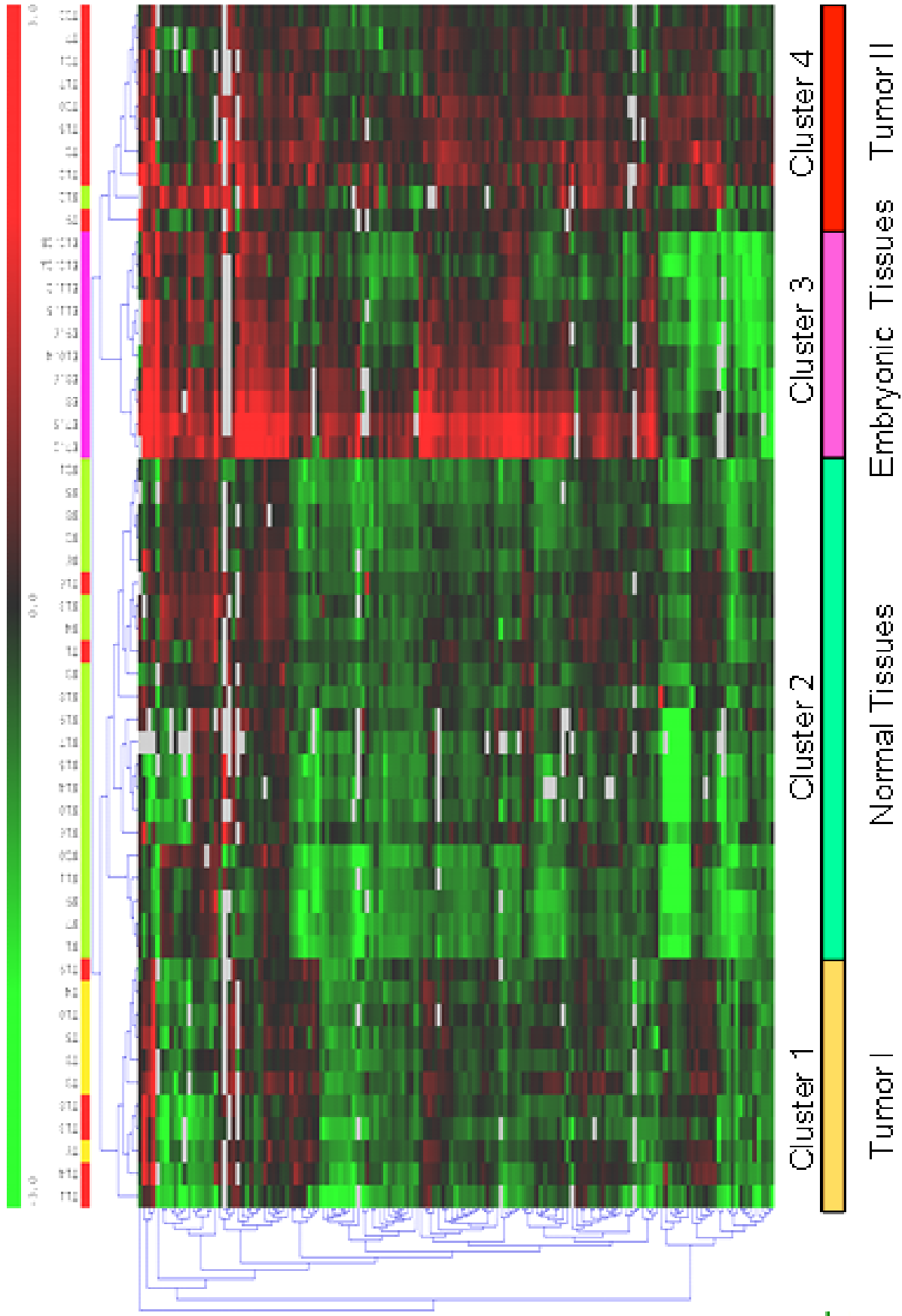
Tabla 14. Análisis por SAM de los miRNAs diferencialmente expresados en colon embrionario humano. Se muestra la expresión relativa media respecto a tejido normal adulto en embriones de 7-8 semanas y de 9-12 semanas.

Solapamiento de expresión de miRNAs entre el tejido de colon embrionario y el tejido tumoral

Uno de los principales objetivos del trabajo fue analizar que similitudes existían en el patrón de expresión de los miRNAs entre las primeras fases de la embriogénesis y los tumores de estadios iniciales, partiendo de la hipótesis de que podían estar actuando mecanismos similares en las dos fases. Para ello se analizaron mediante diferentes análisis estadísticos las posibles similitudes. Por análisis no supervisado de clusters (*Hierarchical cluster analysis*), se observó que se agrupaban las muestras en 4 grupos diferentes dependiendo de las similitudes en el patrón de expresión de miRNAs (Figura 30): cáncer colorectal de estadio I y II (cluster 1: 6 pacientes de estadio I y 5 pacientes de estadio II), mucosa normal (cluster 2), tejido embrionario (cluster 3) y cáncer colorectal estadio II (cluster 4, todos los pacientes de este cluster eran de estadio II). A modo descriptivo, se puede ver que en relación a la expresión global de miRNAs en comparación con el tejido normal adulto, los que presentan mayor número de miRNAs sobreexpresados son los tejidos embrionarios, a continuación el tejido tumoral de estadio II, el de estadio I y finalmente el tejido normal, cosa que parece indicar que a medida que va progresando el tumor, el patrón de expresión de miRNAs de las células tumorales se aproxima más al patrón embrionario. Al analizar si la pertenencia de las muestras a un cluster u otro se relacionaba con alguna característica clínica, encontramos que la única relación que aparecía era con el estadio tumoral ($p = 0.014$). Según el análisis de clusters vemos que por la expresión de miRNAs los tumores de estadio I eran más similares al tejido normal, mientras que los tumores de estadio II estaban más cercanos al tejido embrionario.

Al analizar que miRNAs presentaban diferencias de expresión entre los diferentes grupos, vimos que 13 de los 156 miRNAs analizados estaban silenciados en tejido embrionario, tejido tumoral y en tejido normal. Veintiocho miRNAs estaban

Figura 30 (página siguiente). *Hierarchical cluster analysis* de la expresión de miRNAs en las muestras tumorales, normales y embrionarias de colon analizadas.



diferencialmente expresados en los tumores de estadio I en comparación con su pareja de tejido normal, y 13 de estos 28 miRNAs (el 46%) estaban también diferencialmente expresados en los tejidos embrionarios de 7-8 semanas, en comparación con los tejidos embrionarios de 9-12 semanas. Este análisis se realizó partiendo de la hipótesis de que si el intestino en las 7-8 semanas estaba más indiferenciado que el de 9-12, los miRNAs que aparecieran diferencialmente expresados entre las fases más iniciales de la embriogénesis y la más avanzadas serían los que tendrían mayor importancia en el proceso de diferenciación del tejido, implicando su desregulación el mantenimiento de un estado indiferenciado, o el inicio de un proceso tumoral.

De esta manera, entre los miRNAs que veíamos diferencialmente expresados entre tejido tumoral y normal pudimos discriminar que subgrupo era realmente el que podía tener una implicación en el inicio del tumor, del subgrupo que cambiaba como consecuencia de los cambios que se habían producido en la célula debido a su tumoralización.

Al analizar que miRNAs estaban diferencialmente expresados entre los tumores de estadio II y su pareja de tejido normal, encontramos 64 miRNAs, de los cuales 29 (el 45%) estaban también diferencialmente expresados entre los tejidos embrionarios de 7-8 semanas y los de 9-12 semanas (Tabla 15).

Entre los miRNAs obtenidos aparecen algunos que ya se habían descrito previamente que estaban desregulados en cáncer colorectal²⁶². En este sentido, miR-17-5p, miR-191, miR-21, miR-107, miR-30c, miR-221 y miR-106a se habían encontrado previamente sobreexpresados en cáncer colorectal, mientras que miR-145 estaba infraexpresado²⁶³.

De todos los miRNAs que aparecen en la tabla 15, vemos subrayados aquellos que también aparecen diferencialmente expresados entre las primeras fases de la embriogénesis (semanas 7-8) y las avanzadas (semanas 9-12). De todos estos seleccionamos en primer lugar los que estaban tanto en estadio I como en estadio II, partiendo de la hipótesis que tienen que ser importantes para mantener el estado proliferativo tumoral: miR-103, miR-106a, miR-148a, miR-17-5p, miR-19a, miR-20, miR-339, miR-34a, miR-92, miR-95. Dentro de este grupo de miRNAs identificamos a un cluster importante, el cluster miR-17-92.

Tumor Estadio I vs Tejido Normal			Tumor Estadio II vs Tejido Normal					
	Media Tejido Normal	Media Tumor estadio I		Media Tejido Normal	Media Tumor estadio II		Media Tejido Normal	Media Tumor estadio II
<u>miR-103</u>	-0.37	0.08	<u>miR-103</u>	-0.37	-0.05	<u>miR-19a</u>	-0.93	-0.13
<u>miR-106a</u>	-0.47	0.48	<u>miR-105</u>	-0.64	-0.06	<u>miR-20</u>	-0.86	-0.20
<u>miR-107</u>	-0.21	0.48	<u>miR-106a</u>	-0.47	0.35	miR-200a	-1.87	-0.16
miR-125b	0.43	-0.32	<u>miR-10a</u>	0.07	0.37	miR-200b	-1.78	-0.05
miR-135b	-0.64	1.75	miR-122a	-0.12	0.49	miR-200c	-1.76	-0.12
miR-139	0.48	-0.48	<u>miR-128a</u>	-0.40	0.00	miR-21	-0.42	0.46
miR-145	0.34	-0.70	<u>miR-130b</u>	-0.30	0.26	miR-210	-0.88	0.24
<u>miR-148a</u>	-0.62	0.10	miR-134	0.07	0.51	miR-213	-0.38	0.28
<u>miR-149</u>	0.06	-0.39	<u>miR-135a</u>	-0.34	0.57	miR-215	-1.06	0.19
<u>miR-17-5p</u>	-0.84	-0.03	miR-141	-1.29	0.27	miR-216	0.11	1.02
miR-182	-1.43	-0.44	<u>miR-142-3p</u>	-0.91	-0.41	miR-219	-0.38	0.25
miR-182*	-1.01	0.44	<u>miR-142-5p</u>	-0.66	-0.21	<u>miR-221</u>	-0.37	0.35
miR-183	-1.19	0.26	<u>miR-146</u>	-0.46	0.36	<u>miR-222</u>	-0.44	0.25
<u>miR-195</u>	-0.42	-1.08	miR-147	-1.01	-0.33	miR-224	-0.22	0.58
miR-19a	-0.93	-0.06	<u>miR-148a</u>	-0.62	0.34	<u>miR-25</u>	-0.54	-0.10
<u>miR-20</u>	-0.86	0.00	<u>miR-151</u>	-0.14	0.27	<u>miR-27a</u>	0.04	0.49
miR-200c	-1.76	-0.24	miR-154*	-0.49	-0.01	<u>miR-29a</u>	-0.36	0.25
miR-203	-1.66	0.08	<u>miR-15a</u>	-0.83	-0.29	miR-301	-0.57	-0.16
miR-21	-0.42	0.37	<u>miR-15b</u>	-0.89	-0.57	miR-31	-0.20	1.39
miR-224	-0.22	0.89	miR-17-3p	-0.73	-0.05	miR-320	-0.65	-0.20
<u>miR-30a-3p</u>	0.28	-0.35	<u>miR-17-5p</u>	-0.84	-0.08	<u>miR-324-5p</u>	-0.51	-0.07
miR-31	-0.20	0.86	<u>miR-181a</u>	-0.51	0.03	<u>miR-330</u>	-0.41	0.04
<u>miR-339</u>	-0.74	-0.23	<u>miR-181b</u>	-0.65	0.03	miR-338	-0.79	-0.39
<u>miR-34a</u>	-0.24	0.33	miR-181c	-0.58	-0.14	miR-339	-0.74	-0.13
<u>miR-92</u>	-0.51	0.11	miR-182	-1.43	-0.50	miR-34a	-0.24	0.33
<u>miR-95</u>	-0.45	0.49	miR-182*	-1.01	0.29	miR-370	-0.58	-0.04
miR-96	-1.14	0.18	miR-183	-1.19	0.16	miR-373	-1.32	-0.44
miR-99a	0.30	-0.67	<u>miR-186</u>	-0.67	-0.25	miR-374	-0.71	-0.37
			<u>miR-191</u>	-0.77	-0.19	miR-92	-0.51	0.08
			miR-194	-1.55	-0.13	miR-95	-0.45	0.39
			<u>miR-197</u>	-0.69	-0.34	miR-96	-1.14	0.13
			Leg-7g	-0.81	-0.46	miR-98	-0.33	0.07

Tabla 15. Análisis por SAM de los miRNA que aparecían diferencialmente expresados entre tejido de cáncer colorectal de estadio I y II respecto a tejido de colon normal (respectivamente). Los miRNAs subrayados estaban también diferencialmente expresados en tejido embrionario de colon. Se muestran las medias de expresión relativas de cada uno de los grupos.

El cluster miR-17-92 modula la expresión de E2F1 y la proliferación celular en colon embrionario humano y en cáncer colorectal

Mediante análisis por SAM identificamos tres miRNAs, miR-17-5p, miR-20 y miR-106a, que estaban diferencialmente expresados entre los tumores de estadio I, los tumores de estadio II y el tejido embrionario versus el tejido de colon normal. Estos miRNAs forman parte del cluster miR-17-92, que parecía estar involucrado tanto en el desarrollo del colon embrionario como en crecimiento tumoral.

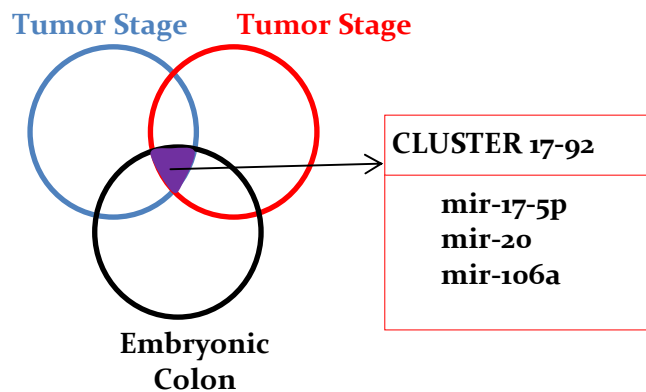


Figura 31. Diagrama de Venn mostrando la intersección de los miRNAs específicos de tumor estadio I, de tumor estadio II y colon embrionario de 7-8 semanas.

En trabajos previos se había observado que este cluster en algunos tumores podía estar actuando mediante la inhibición de la traducción de E2F1. Debido a que un miRNA puede actuar sobre múltiples dianas dependiendo del tipo de tejido o del tiempo de desarrollo, analizamos si en el desarrollo embrionario del colon y en el cáncer colorectal podía también estar involucrado mediante la actuación sobre E2F1. El análisis por western de E2F1 en colon embrionario de diferentes edades, en tejido tumoral y en tejido normal mostró que E2F1 estaba infraexpresado en los estadios tempranos de la embriogénesis del colon y en el tumor respecto a su expresión en la mucosa normal.

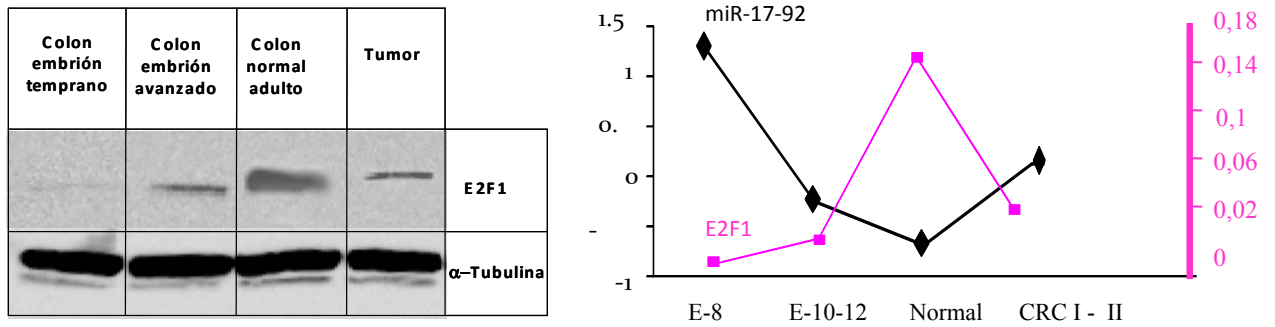


Figura 32. Western Blot de la proteína E2F1 en colon embrionario, tejido tumoral y tejido normal de colon (izquierda). Existe una correlación inversa entre la expresión de E2F1 y del cluster miR-17-92 (derecha).

Para confirmar que los cambios observados en la expresión de E2F1 eran debidos a las diferencias de expresión del cluster miR-17-92, se realizaron estudios *in vitro* de inhibición de miRNAs con anti-miR-17-5p, anti-miR-20 y con anti-miR-106a. Se realizó la transfección con los oligonucleótidos anti-miR-17-5p, anti-miR-20a y anti-miR-106a de forma individual o combinada y vimos que se modulaba la expresión de E2F1 en la línea celular de colon DLD1. Entre ellos vimos que había diferente eficiencia respecto a la actuación en E2F1, siendo miR-17-5p el miembro más importante del cluster involucrado en la regulación de la expresión de E2F1.

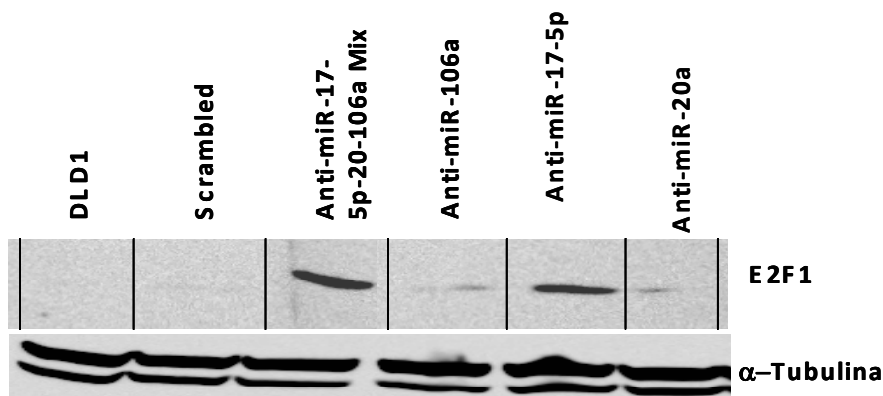


Figura 33. Western blot de la proteína E2F1 en la línea celular DLD1 sin transfectar y transfectada con oligo *scrambled*, anti-miR-17-5p, anti-miR-106a, y anti-miR-20a.

El siguiente paso fue analizar el efecto de los miembros del cluster miR-17-92 en la proliferación celular y para ello se analizó la proliferación a diferentes días en la línea celular DLD1 transfectada con anti-miR-17-5p, anti-miR-20a, anti-miR-106a y con todos a la vez, y lo comparamos con células transfectada con un oligonucleótido scrambled (control negativo). Se vio que las células transfectadas con los anti-miR del cluster 17-92 presentaban una reducción del crecimiento a los 6 días que además era dosis dependiente. El que tenía mayor efecto era el miR-17-5p, el cual a una concentración de 25nM de anti-miR-17-5p se producía una reducción del crecimiento del 25%, mientras que la reducción era de más del 50% a una concentración de 50nM.

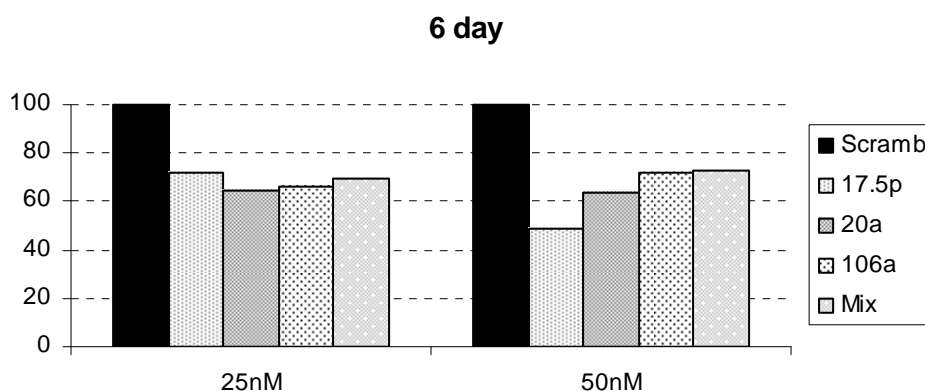


Figura 34. Cuantificación de la proliferación por MTS a los 6 días post-transfección a dos concentraciones diferentes de anti-miR: 25nM y 50nM.

El análisis por la técnica de cristal violeta del efecto en la proliferación de miR-17-5p mostró que las células en las que inhibimos el miR-17-5p formaban claramente menos colonias que los controles transfectados con el oligo scrambled cuando los plaqueamos a baja densidad (Figura 35A). Una vez los pocillos fueron fotografiados, se realizó el análisis cuantitativo de las colonias mediante la solubilización con metanol y la lectura de la densidad óptica a 570nm con *Enzyme-linked immunosorbent assay reader* de Opsys MR. Como se muestra en la figura 35B, observamos que las células transfectadas con el anti-miR-17-5p formaban claramente menos colonias que los controles transfectados con el oligonucleótido scrambled.

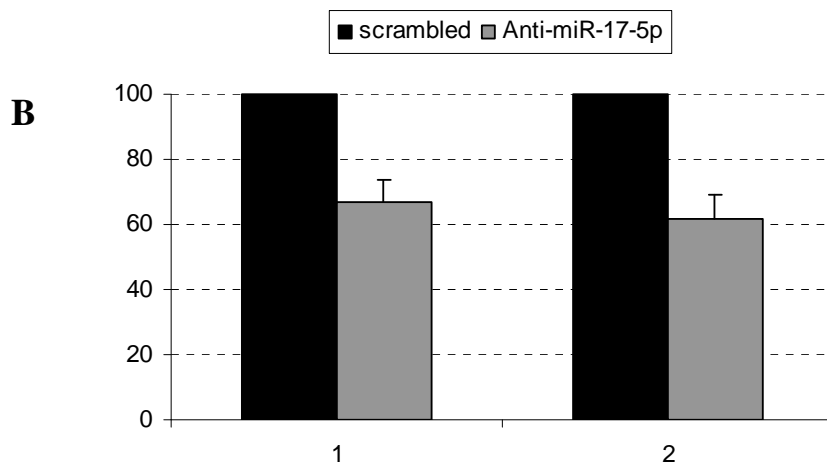
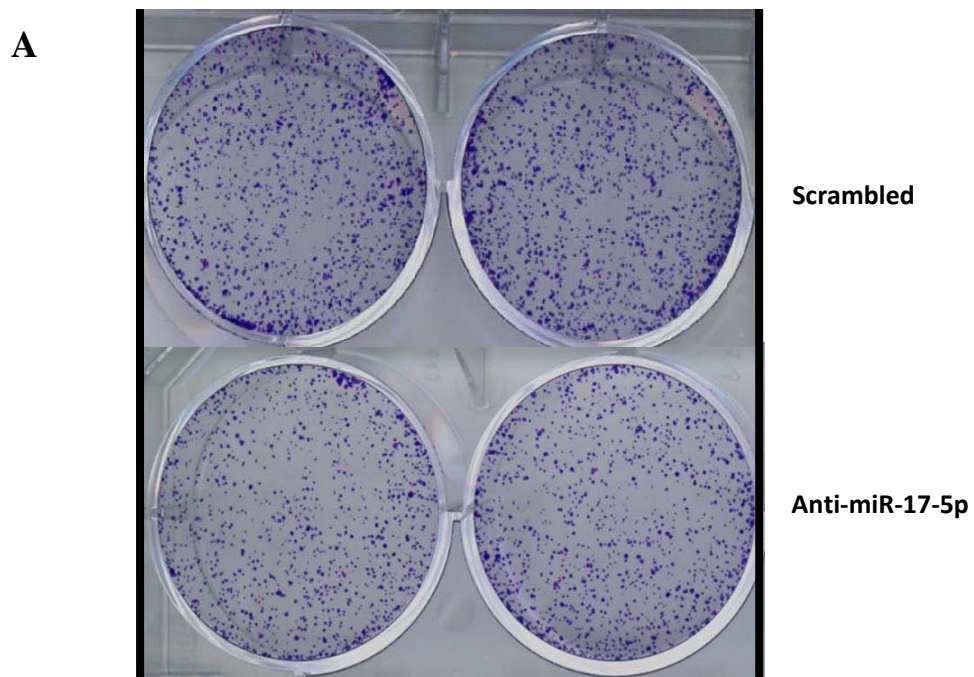
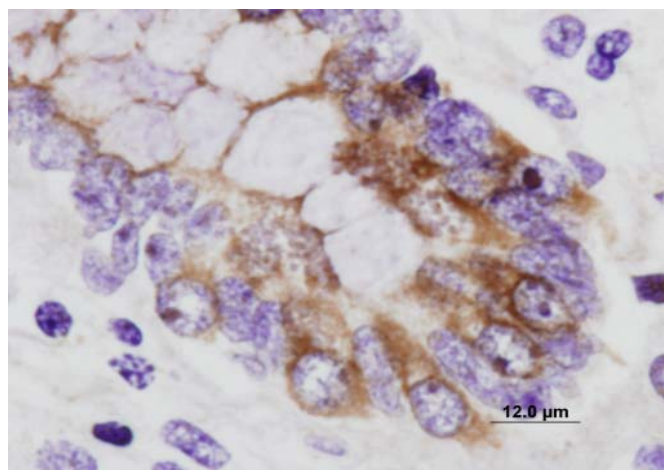
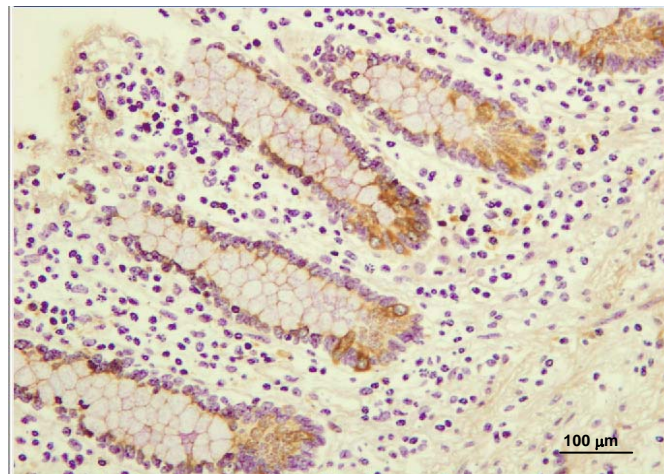


Figura 35. Análisis de proliferación celular mediante cristal violeta.

A) Análisis cualitativo y B) Análisis cuantitativo mediante la solubilización con metanol de las colonias y la posterior lectura de la densidad óptica a 570nm.

Análisis por hibridación in situ de la expresión de miR-17-5p en tejido embrionario, tumoral y normal de colon

Finalmente para verificar si la sobreexpresión de miR-17-5p podía estar asociada con los progenitores epiteliales proliferativos, realizamos una hibridación in situ cromogénica (CISH) de miR-17-5p en secciones de tejido normal de colon adulto, de tejido embrionario y de secciones de tejido tumoral. En el tejido normal adulto vimos una clara señal positiva de miR-17-5p en el compartimiento proliferativo en la base de las criptas, y esta señal iba decreciendo en gradiente a medida que ascendíamos hacia la superficie de las criptas.



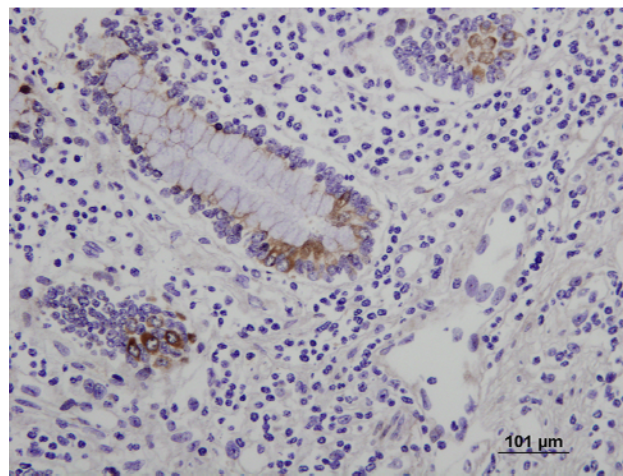
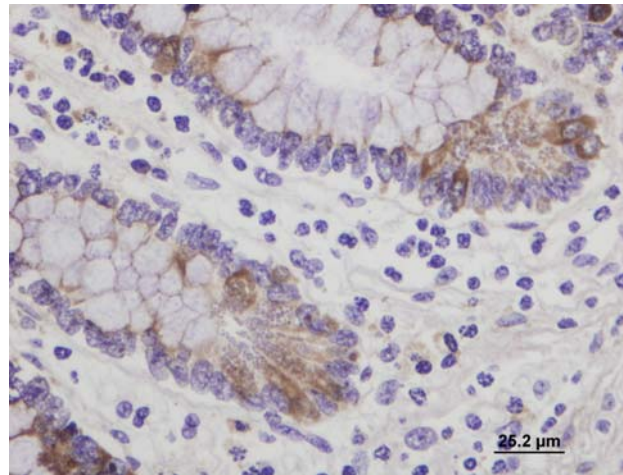
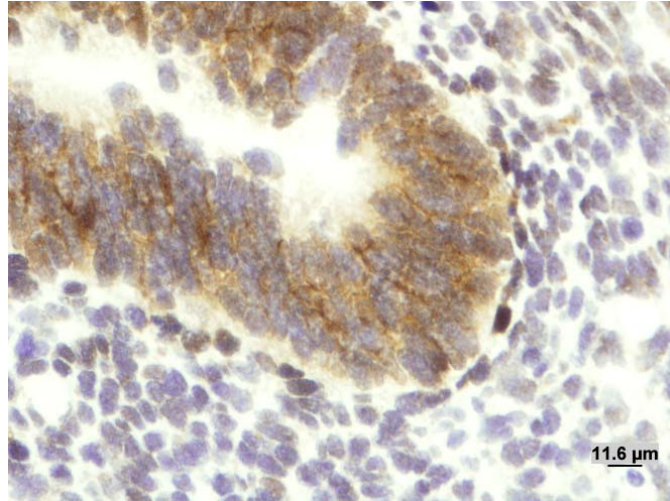


Figura 36. Secciones de colon adulto normal hibridado con la ribosonda LNA antisense para miR-17-5p marcada con fluoresceína 5' y revelada con un anticuerpo secundario antifluoresceína unido a múltiples sitios de peroxidasa. Se puede apreciar marcaje en las células del fondo de las criptas.

El análisis por hibridación in situ en el tejido embrionario mostró una expresión del miRNA específica en el epitelio en desarrollo (tejido endodérmico), mientras que no se detectó marcaje en el compartimiento estromal (tejido mesodérmico).



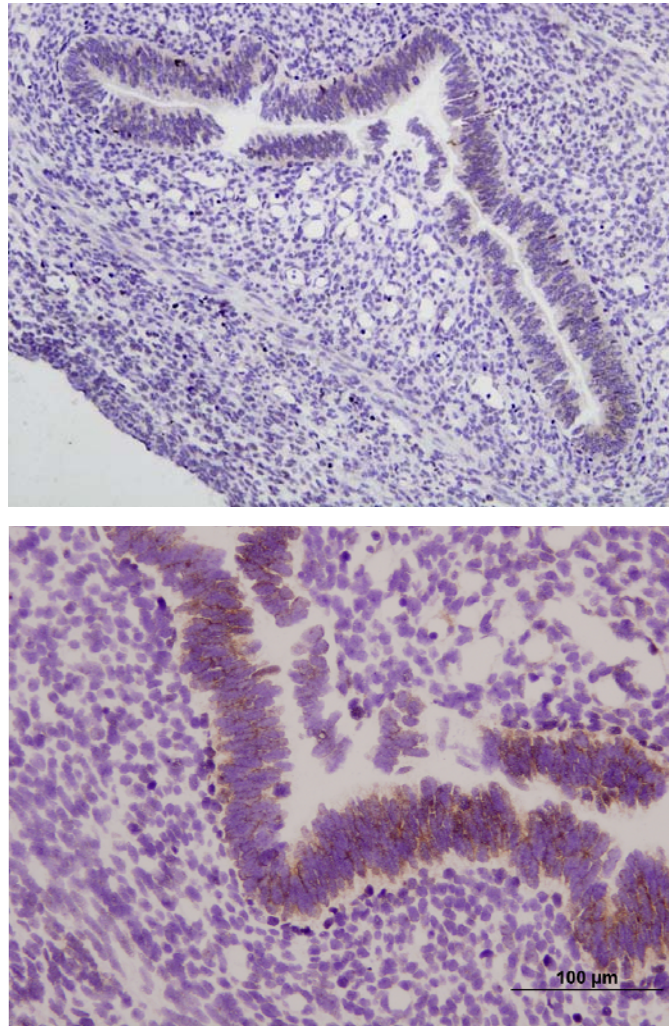


Figura 37. Secciones de colon embrionario de 10 semanas hibridado con la ribosonda LNA antisense para miR-17-5p marcada con fluoresceína 5' y revelada con un anticuerpo secundario antifluoresceína unido a múltiples sitios de peroxidasa.

En el tumor se detectó expresión de miR-17-5p en el epitelio tumoral y en áreas específicas del compartimiento estromal.

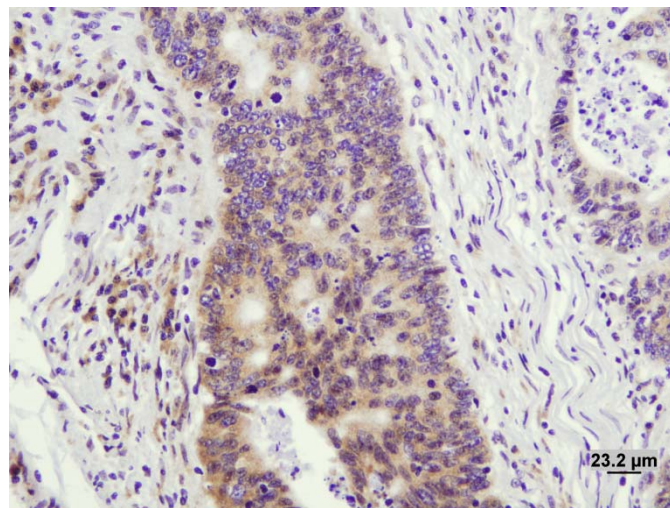
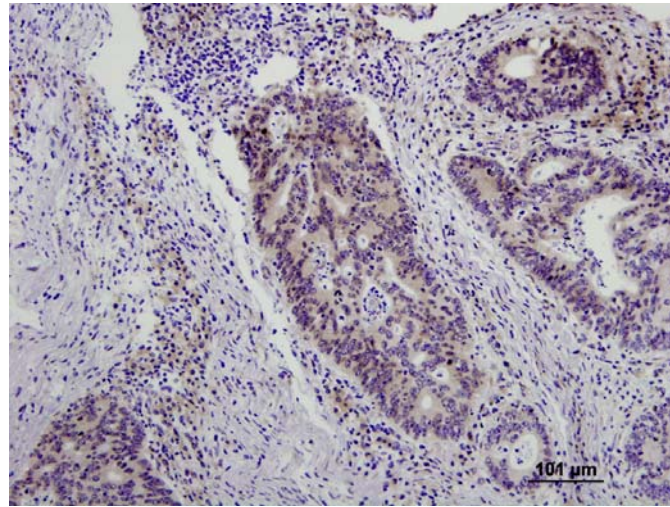


Figura 38. Secciones de colon con cáncer colorectal hibridado con la ribsonda LNA antisense para miR-17-5p marcada con fluoresceína 5' y revelada con un anticuerpo secundario antilfluoresceína unido a múltiples sitios de peroxidasa.

RESULTADOS ESTUDIO miRNAs EN LIMFOMA DE HODGKIN

Análisis del patrón de expresión de miRNAs en pacientes de linfoma de Hodgkin clásico y en ganglios reactivos

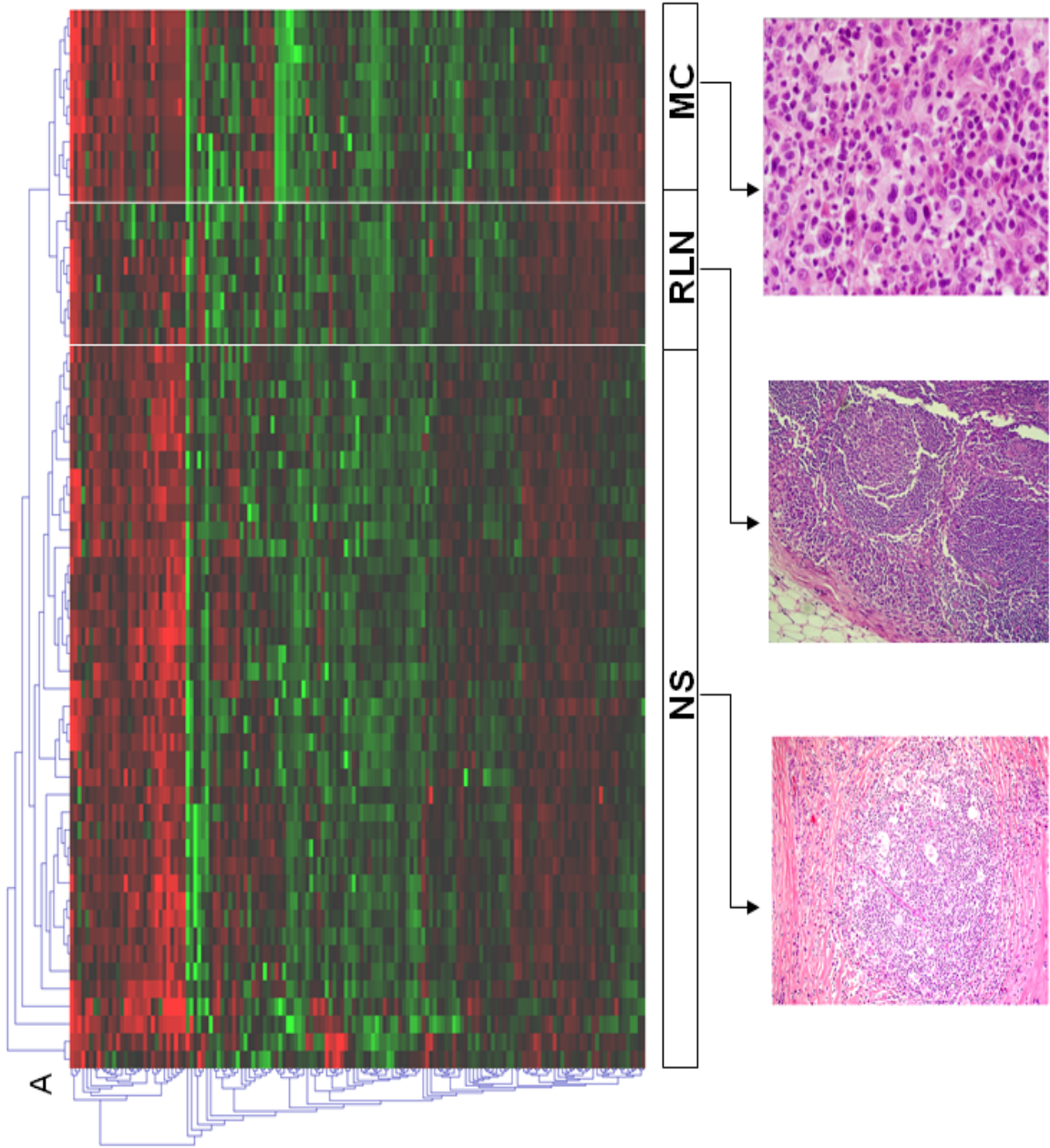
Se analizaron un total de 156 miRNAs en 49 ganglios afectados de LH y en 10 ganglios reactivos. Sobre estos datos de expresión se realizó el *hierarchical cluster analysis*, el cual categorizó tres grupos bien definidos que se correspondían por un lado con los casos de esclerosis nodular, por otro con los casos de celularidad mixta y el tercer grupo con los ganglios reactivos (Figura 39).

Realizando el análisis de SAM y de Class Comparison, encontramos un conjunto de miRNAs que estaban diferencialmente expresados entre los casos de esclerosis nodular y los ganglios reactivos, otro conjunto de miRNAs expresado diferencialmente entre los casos de celularidad mixta y los ganglios reactivos y finalmente un conjunto que nos permite diferenciar entre celularidad mixta y esclerosis nodular. Podemos observar estos miRNAs en la figura 40. Algunos de estos miRNAs aparecen sobreexpresados y otros infraexpresados. Algunos de ellos como miR-9, 19a, 20, 21, 26a, 34c, 124a y 181c, habían sido previamente identificados en otros tipos de cáncer⁸⁹.

Figura 39. *Hierarchical cluster analysis* de 156 miRNAs en LH y ganglios reactivos.

A) Agrupación jerárquica no supervisada de todas las muestras analizadas. Podemos apreciar la histología del LH esclerosis nodular, LH celularidad mixta y de un ganglio reactivo.

B) Análisis mediante PAM de los miRNAs que permiten discriminar LHc esclerosis nodular de LHc celularidad mixta y de ganglios reactivos. En azul los miRNAs necesarios para discriminar entre LHc y ganglios reactivos.



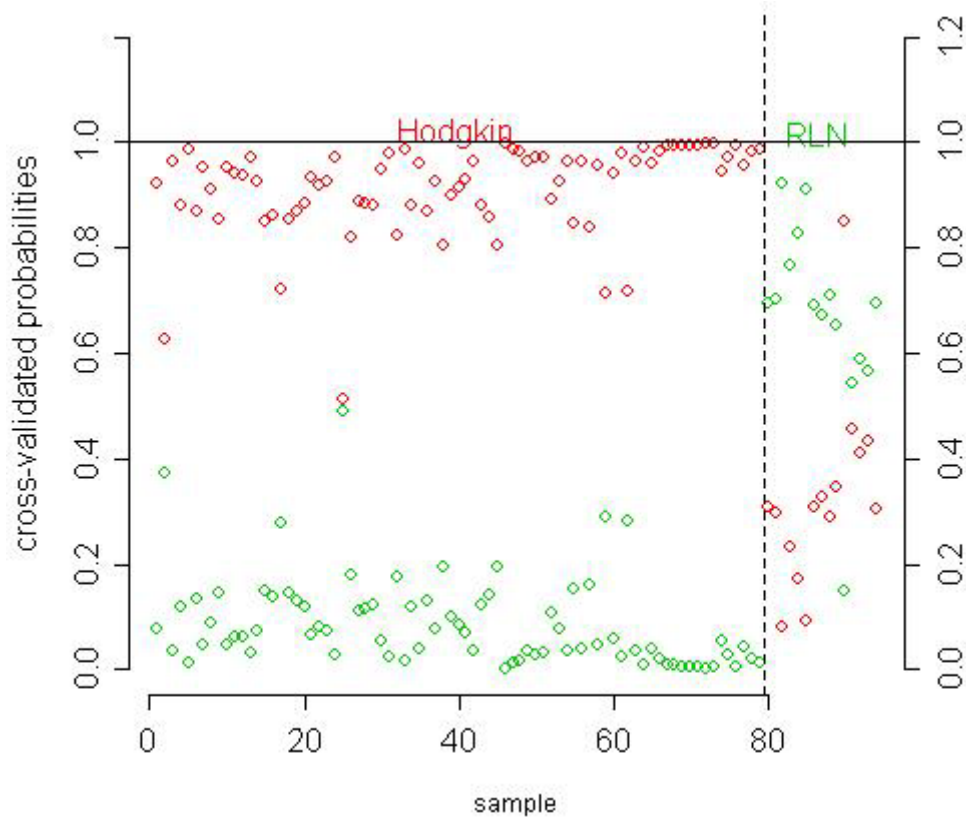
B

miR-9	miR-128a	miR-185
miR-15b	miR-128b	miR-198
miR-21	miR-129	miR-199a
miR-23b	miR-130a	miR-199b
miR-26a	miR-132	miR-200a
miR-26b	miR-134	miR-204
miR-27a	miR-135a	miR-205
miR-28	miR-135b	miR-216
miR-29b	miR-138	miR-220
miR-30b	miR-140	miR-302a
miR-30c	miR-142-3p	miR-302b*
miR-31	miR-142-5p	miR-302c
miR-34a	miR-145	miR-302d
miR-34c	miR-147	miR-323
miR-122a	miR-154	miR-325
miR-124a	miR-181a	miR-335
miR-125b	miR-182*	miR-368
miR-126	miR-183	miR-370
		miR-371

Cuando analizamos el conjunto de miRNAs que aparecían diferencialmente expresados en todos los casos de Hodgkin (esclerosis nodular y celularidad mixta) respecto a la expresión en los ganglios reactivos, encontramos un conjunto de 38 miRNAs diferencialmente expresados entre los dos grupos (Fig. 40d). Mediante análisis con PAM, con el cual obtenemos miRNAs que nos permiten clasificar muestras en un grupo u otro, encontramos un conjunto de 55 miRNAs que nos clasifican correctamente todas las muestras en uno de los tres grupos (EN o CM o Ganglio reactivo). Además, obtuvimos también un subconjunto más reducido de 25 miRNAs, de los 55, que nos permitía identificar de forma precisa si una muestra correspondía a un caso de linfoma de Hodgkin o bien a un ganglio reactivo (Figura 39b y Tabla 40). Estos 25 miRNAs conforman la firma de expresión de miRNAs de linfoma de Hodgkin clásico y fue validada con 30 casos de linfoma de Hodgkin clásico y 5 ganglios reactivos adicionales (Figura 41).

miRNA	Localización Cromosómica	Nivel de Expresión	Genes diana predichos
miR-21	17q23.2	Alto	<i>PTEN[‡], TPM1[‡], TRAIL-3</i>
miR-23b	9q22.32	Bajo	<i>NOTCH1[‡], SUMO1, PLK3, POU4F2</i>
miR-26b	2q35	Bajo	<i>MMP21, IFNG</i>
miR-27a	19p13.12	Alto	<i>CD44</i>
miR-30b	8q24.22	Bajo	<i>CCNE1, ITGB3, ITGA5, TIMP-2, TIMP-3, SERPINE1</i>
miR-31	9p21.3	Bajo	<i>CD28, CD48, EBF3, TRAF3</i>
miR-124a	8p23.1	Alto	<i>ITGB1[‡], ANGPT1[‡]</i>
miR-126	9q34.3	Bajo	<i>CD97, BAD, IKBKAP, VCAM1, TNFC, TNFS11, PIK3C</i>
miR-134	14q32.31	Alto	<i>J-CHAIN</i>
miR-135a	3p21.2	Bajo	<i>MSH2</i>
miR-138	7q32.2	Alto	<i>PU.1, TCF3, E2A, FAK, HIF-1A</i>
miR-147	9q32.2	Alto	<i>NOL3, ZAP-70</i>
miR-182*	7q32.2	Alto	
miR-183	7q32.2	Bajo	<i>ITGB1</i>
miR-185	22q11.21	Alto	<i>PBX1, CD79B</i>
miR-198	3q13.33	Alto	<i>CCND2, BCL7A</i>
miR-204	9q21.13	Bajo	<i>ATF2, BCL2, CDC25B, BCL9, BCL11A, BCL11B</i>
miR-205	1q32.2	Bajo	<i>K-RAS, SMAD4, MSH2, PTEN</i>
miR-216	2p16.1	Alto	<i>BCL11B, BCL9</i>
miR-220	Xq25	Alto	<i>IRF3</i>
miR-302a	4q25	Alto	<i>CD45, CD138, RECK, CXCR4</i>
miR-302b	4q25	Alto	<i>CD45, CD138, RECK, CXCR4</i>
miR-302c	4q25	Alto	<i>CD45, CD138, RECK, CXCR4</i>
miR-325	Xq21.1	Alto	<i>NFkB-REPRESOR FACTOR</i>
miR-335	7q32.2	Bajo	<i>ANGPT1</i>

Tabla 40. Composición de la firma de miRNAs del LH clásico.



	<i>Hodgkin</i>	<i>RLN</i>
Hodgkin	79	0
RLN	1	14

<i>Clase</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Specificidad</i>	<i>Valor positivo de predicción</i>	<i>Valor negativo de predicción</i>
Hodgkin	1	0.933	0.988	1
RLN	0.933	1	1	0.988

Figura 41. Análisis de predicción de clases (PAM) de todos los sujetos analizados.

PAM (Prediction analysis of microarray) utiliza el método *nearest shrunken centroid* para identificar aquellos genes que mejor permiten discriminar entre las muestras de LH clásico y los ganglios reactivos. La gráfica muestra las probabilidades de pertenecer a un grupo u otro de cada una de las muestras. Los círculos rojos muestran la probabilidad de que una muestra se clasifique como LH clásico y los verdes como ganglio reactivo. El error de clasificación utilizando los 25 miRNAs de la firma fue de un 1%.

Análisis de las dianas putativas de los miRNAs

Partiendo de la lista de genes diana putativos de nuestros miRNAs obtenidos de las bases de datos de Mirbase y TargetScan, seleccionamos un grupo en base a un análisis funcional mediante DAVID database y mediante un análisis de las asociaciones descritas entre genes mediante GENIG. La hipótesis de partida era que los múltiples genes sobre los que puede actuar un miRNA tienen que estar en vías metabólicas similares y/o teniendo relación entre ellos. Con estos criterios reducimos el enorme listado de genes candidatos a unos pocos con mayor probabilidad de serlo realmente en nuestro modelo tumoral.

De esta manera, al analizar los genes diana predichos de los 25 miRNAs de la firma de Hodgkin, encontramos genes relacionados con la biología de las células B como PU.1, J-chain, CD79b y CD138, otros relacionados con ciclo celular y supervivencia como PTEN y otros relacionados con apoptosis, BCL2 y FASLG (Tabla 40). Cuando analizamos los genes diana de los miRNAs relacionados con la presencia de VEB, el hecho más interesante fue la asociación de miR-96 con grupos de genes relacionados con la activación de la vía de NFkB (BIRC2, ECT2, ACT1, MAP3K3, CARD4, PIT1 y HTR2B) y otros relacionados con apoptosis (RNF34, CDKN1A, y ABL1).

Hibridación in situ de miRNAs

Para ver si la sobreexpresión de miRNAs vista en los casos de LHc, en comparación con los ganglios reactivos, era debida a las células tumorales o al microambiente reactivo, analizamos 20 casos mediante hibridación in situ cromogénica (CISH) de miRNAs. En primer lugar estudiamos la expresión de miR-155, usándolo como control positivo del CISH, ya que se había observado previamente sobreexpresado en los casos de LH¹²⁵. En éste demostramos una expresión citoplasmática en las células de Hodgkin y Reed Sternberg, así como también en algunos linfocitos reactivos y en histiocitos activados, tal como se había reportado recientemente²⁶⁴ (Figura 42A).

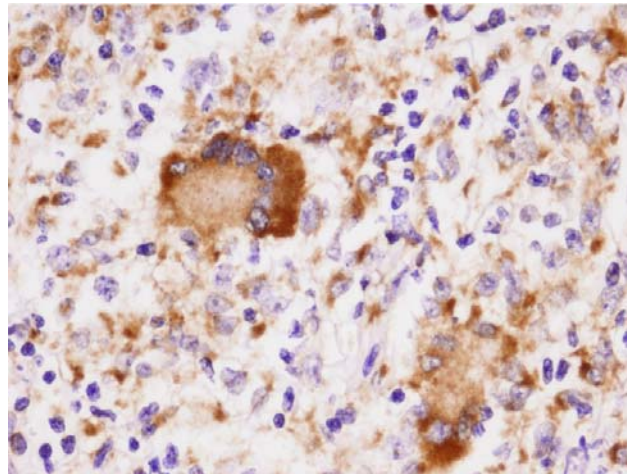


Figura 42A. Hibridación in situ de miR-155 en secciones de ganglio afecto de LH (imagen tomada con el aumento UPIanFI 40x/0,75).

De los 25 miRNAs de la firma se seleccionaron 3 sobreexpresados mediante el análisis de genes diana putativos y por la región cromosómica en la que estaban codificados. De esta manera se seleccionaron: miR-21 (PTEN, TPM1; 17q23.2), miR-134 (J-Chain; 14q32.31) y miR-138 (PU.1; 7q32.2), y se analizó su expresión por CISH. En todos los casos se demostró una señal citoplasmática en las células de Hodgkin y Reed-Sternberg. Además, se identificó una señal nuclear en los linfocitos reactivos que componen el infiltrado tumoral, para los miRNAs miR-21 y miR-138 (Figura 42).

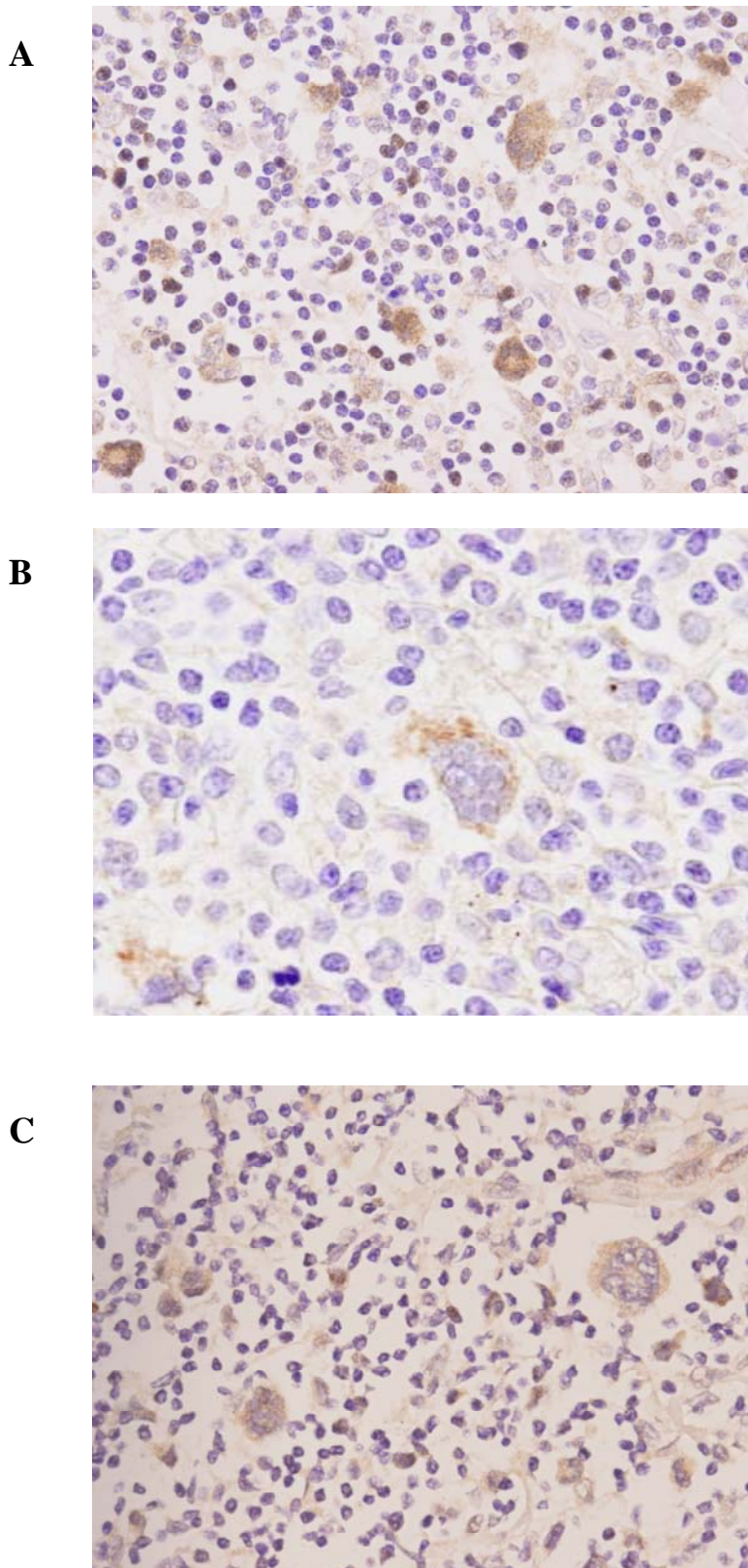


Figura 42B. Hibridación in situ de miR-21(A), miR-134(B) y miR-138(C) en secciones de ganglio afecto de linfoma de Hodgkin (imagen tomada con el aumento UPIanFI 40x/0,75).

Análisis de la expresión de miRNAs en líneas celulares humanas de linfoma de Hodgkin

Debido a que los tumores de LH están compuestos de diferentes tipos celulares reactivos y las células tumorales representan una minoría, es necesario analizar si la expresión diferencial que vemos respecto a los ganglios reactivos o entre los diferentes subtipos histológicos, es debida a diferencias en las células tumorales o si están reflejando una composición celular diferente. Para ello, a pesar de haber analizado algunos miRNAs por hibridación in situ, analizamos los miRNAs que conformaban nuestra firma de LH y aquellos que nos diferenciaban entre los subtipos histológicos esclerosis nodular y celularidad mixta en 3 líneas celulares de LH: L-1236 (celularidad mixta), L-428 y HD-MY-Z (esclerosis nodular).

Vimos que de los 25 miRNAs de nuestra firma de LH, 20 se expresaban en las líneas celulares. Los miRNAs que no se expresaban, miR-220, miR-302a, miR-302b, miR-302c y miR-325, estaban sobreexpresados en los tumores analizados, cosa que nos indica que debían estar sobreexpresados por las células reactivas del microambiente tumoral. En los miRNAs expresados podemos distinguir diferentes niveles de expresión en las células de LH en comparación con los ganglios reactivos, pero consideramos que al trabajar con un conjunto purificado de células de LH, las diferencias con el ganglio reactivo tenían que ser importantes, de forma que al menos 2 de las 3 líneas tenían que tener una diferencia de expresión mayor de 4 *Fold change*, para poder considerar que las diferencias provenían de las células tumorales y no del microambiente. En este sentido había 5 miRNAs que mostraban diferencias de al menos 4 *Fold changes* en las 3 líneas celulares: miR-126 y miR-135a (infraexpresados) y miR-21, miR-27a y miR-182 (sobreexpresados). Había 7 miRNAs que mostraban diferencias de al menos 4 *Fold changes* en 2 de las 3 líneas de LH: miR-23b, miR-138, miR-204 y miR-205 (infraexpresados) y miR-147, miR-183 y miR-216 (sobreexpresados). El resto de miRNAs mostraban una expresión menor que 4 *Fold change*. En los miRNAs miR-23b y miR-205, la línea celular L-1236 (celularidad mixta) estaba sobreexpresada, mientras que en las otras dos líneas (esclerosis nodular) estaban infraexpresadas (Figura 43).

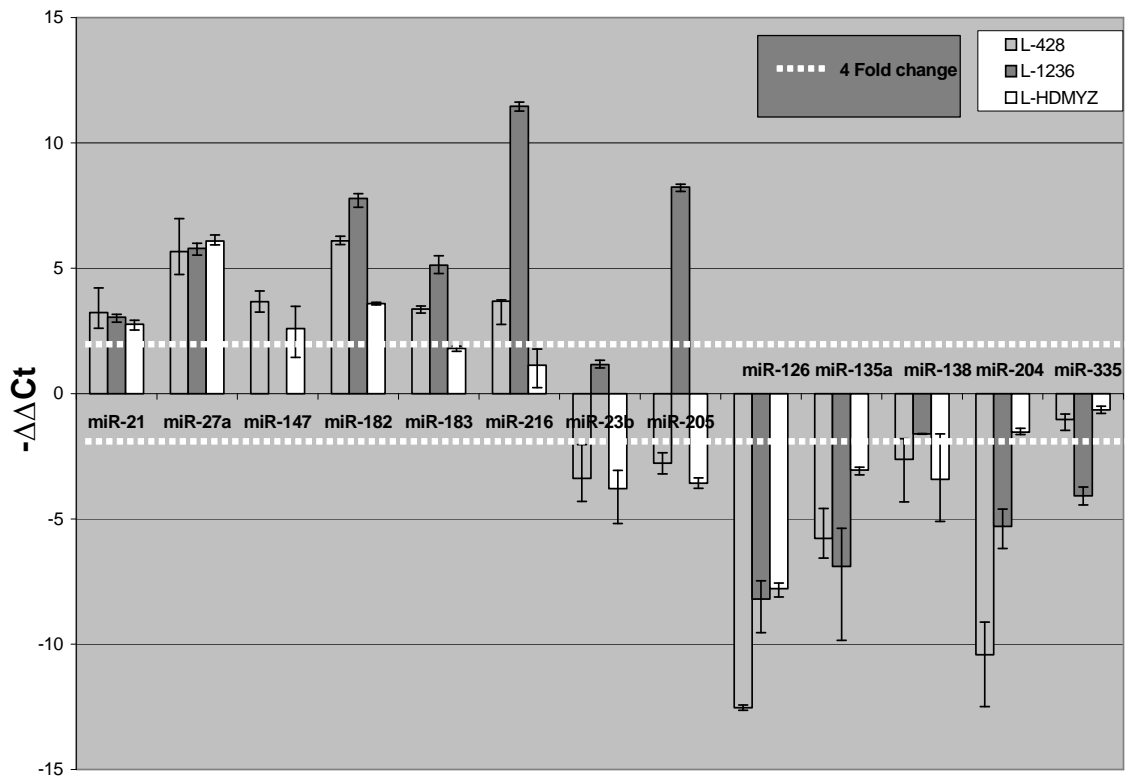


Figura 43. Análisis de la expresión ($-\Delta\Delta Ct$ respecto a la media de los ganglios reactivos) de los 25 miRNAs que discriminan entre LH y ganglios reactivos en las líneas celulares humanas de LH L-428, L-1236 y HDMYZ.

En la figura sólo se muestran aquellos miRNAs que presentan al menos 4 fold changes de diferencia entre la expresión en las líneas celulares y los ganglios reactivos.

Adicionalmente, analizamos los miRNAs que estaban diferencialmente expresados entre celularidad mixta y esclerosis nodular en las líneas celulares L-428 y HD-MY-Z (esclerosis nodular) respecto a L-1236 (celularidad mixta) (Figura 44).

De los 36 miRNAs analizados, 32 eran expresados por las 3 líneas celulares. Los 4 miRNAs que no se expresaban, miR-122a, miR-154, miR-302d y miR-371, muestran diferencias debidas al microambiente no tumoral en los tumores analizados, entre los dos subtipos histológicos. De los 32 miRNAs que se expresaban consideramos que para que la diferencia vista fuera debida a diferencias entre las células tumorales, tenían que tener al menos 2 *Fold change* de diferencia entre L-1236 y las otras dos líneas. Entre ellos miR-34a, miR-99a, miR-125b, miR-128b, miR-129, miR-130a, miR-132, miR-142-5p, miR-181a, miR-200a y miR-370 cumplían este requisito, indicándonos que

estos miRNAs tienen una expresión diferencial en los dos subtipos histológicos analizados de LH clásico.

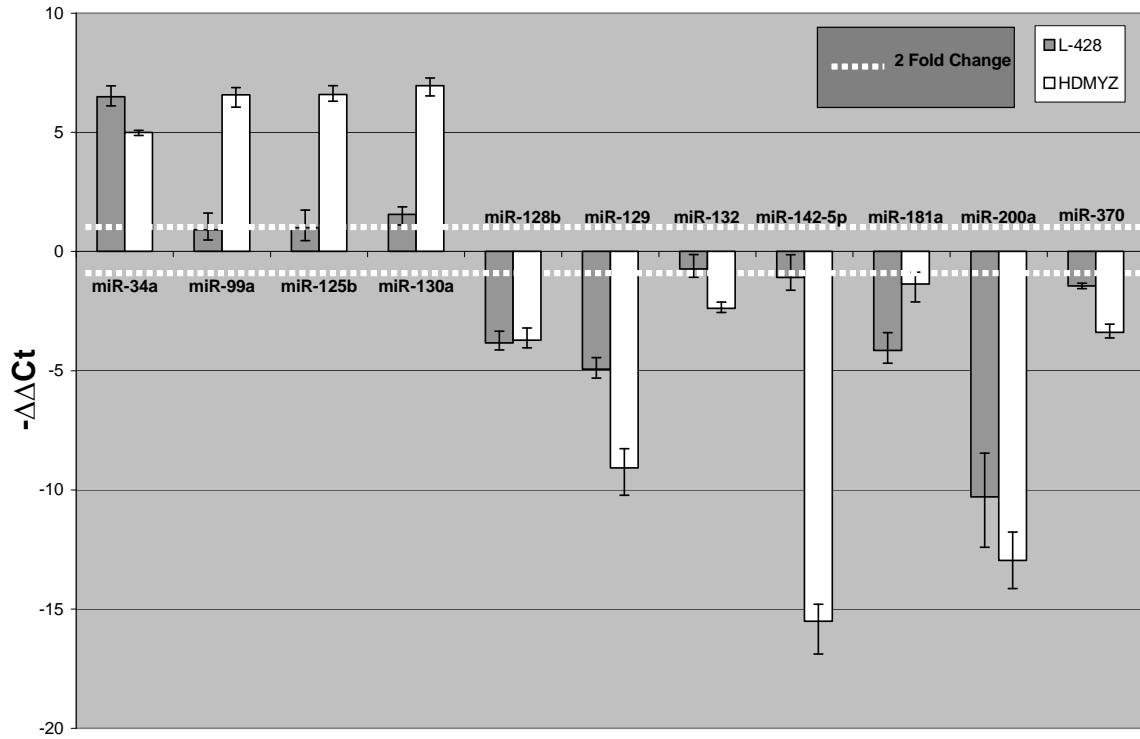


Figura 44. Análisis de la expresión ($-\Delta\Delta Ct$ respecto a la media en L-1236) de los miRNAs que estaban diferencialmente expresados entre los casos de LH esclerosis nodular y LH celularidad mixta en las líneas celulares humanas de LH L-428 y HDMYZ (esclerosis nodular) y L-1236 (celularidad mixta).

En la figura sólo se muestran aquellos miRNAs que presentan al menos 2 *Fold changes* de diferencia respecto a la línea de celularidad mixta.

Efecto de la presencia de VEB en el patrón de miRNAs en linfoma de Hodgkin clásico

Mediante análisis por SAM detectamos un conjunto de miRNAs diferencialmente expresados en los casos VEB+ respecto a los VEB- de LHc. Observamos que en los casos de LHc VEB+, miR-96, miR-128a, miR-128b, miR-129 y miR-205 estaban infraexpresados en comparación con los casos de LHc VEB-, mientras que miR-28, miR-130b, miR-132, miR-140 y miR-330 estaban sobreexpresados (Figura 45). Cuando restringimos el análisis a los pacientes con el subtipo histológico esclerosis nodular (el subtipo más frecuente), vimos que 3 miRNAs estaban significativamente infraexpresados en los casos LHc VEB+: miR-96, miR-128a y miR-128b. No analizamos los casos de celularidad mixta de forma independiente ya que la mayoría era VEB-.

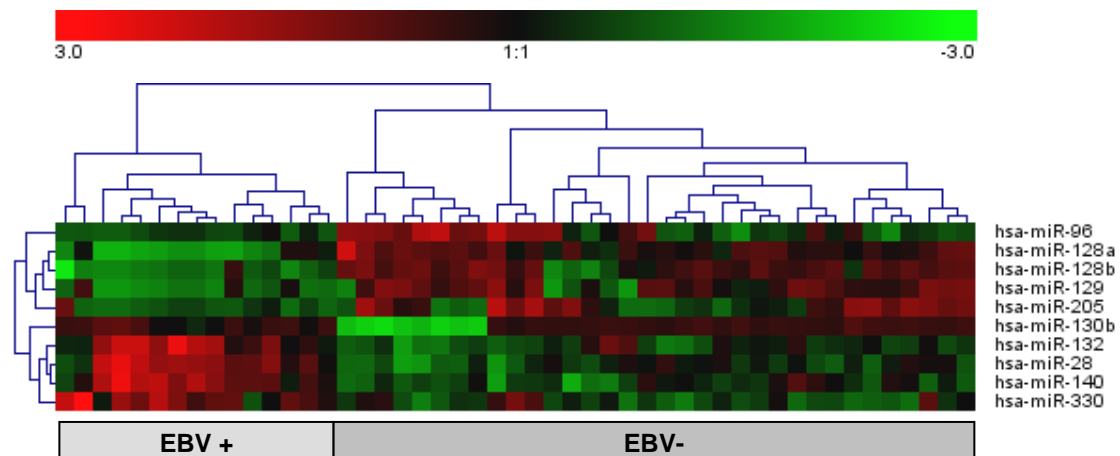


Figura 45. Análisis mediante SAM de los miRNAs diferencialmente expresados entre los casos de LH VEB+ y los casos de LH VEB-.

Asociación de la expresión de miRNAs y los parámetros clínicos

Analizamos la posible asociación del patrón de expresión de miRNAs con características clínicas y biológicas de los pacientes de LH clásico. Las características clínicas analizadas fueron la edad, el sexo, la sintomatología B, la presencia de masa Bulky, la anemia, la leucocitosis, la linfocitopenia, la hipoalbuminemia, el ESR, el LDH, la β -2-microglobulina, la presencia tumoral extranodal, el estadio, el índice de Hasenclever, la positividad para CD15, CD20 y la densidad de células tumorales y de linfocitos T en el microambiente tumoral.

Encontramos que miR-138 y miR-328 mostraban una tendencia a expresarse diferencialmente en estadios tempranos respecto a estadios avanzados. Viéndose miR-138 sobreexpresado en estadios de Ann-Arbor I-II ($p = 0.003$), mientras que miR-328 se veía sobreexpresado en estadios Ann-Arbor III-IV ($p = 0.004$). Para validar si estos dos miRNAs que nos daban una tendencia casi significativa, tenían realmente relevancia en el estadiage de la enfermedad, analizamos su expresión en los 30 casos adicionales en una serie de validación (18 de estadio I-II y 12 de estadio III-IV), de pacientes con características similares a los de la serie inicial de LH clásico. En el análisis de la expresión de miR-138 en todos los 79 pacientes se observó que miR-138 estaba sobreexpresado en los estadios iniciales I-II ($p = 0.001$) (Figura 46). En cambio al aumentar el número de casos, la asociación entre la expresión de miR-328 y los estadios avanzados se perdió.

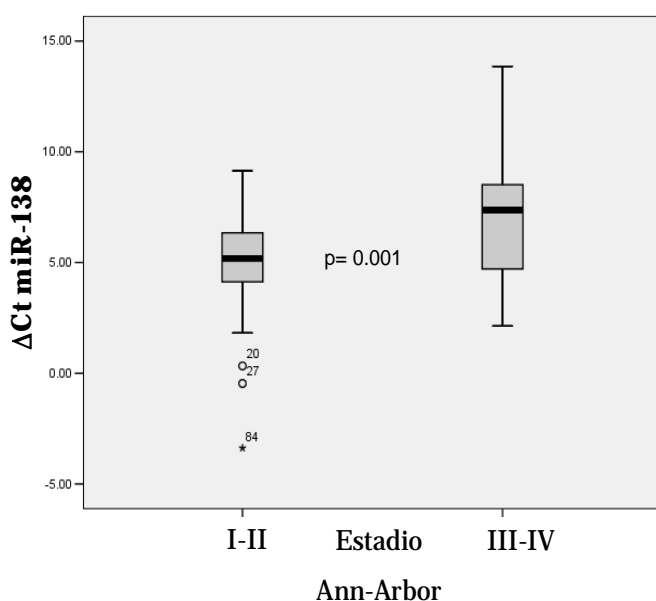


Figura 46. Diagrama de caja mostrando la expresión (Δ Ct) de miR-138 en los casos de LH estadio I-II y en los estadios III-IV.

Podemos apreciar que miR-138 está sobreexpresado en estadios iniciales de la enfermedad ($p=0.001$).

Validación de la firma de 25 miRNAs en muestras congeladas

Se seleccionaron 10 casos de los previamente estudiados de los que se dispusiera de muestra ganglionar congelada, para validar la firma obtenida en muestras incluidas en parafina, y de este modo, validar la técnica de extracción y amplificación de miRNAs en parafina.

El método de extracción de RNA utilizado fue el Trizol, y una vez obtenido el RNA total los pasos siguientes fueron los mismos que en las muestras extraídas de parafina.

El análisis comparativo nos muestra que los ciclos de amplificación en las muestras congeladas son más pequeños, la diferencia media de Ct es de 2.7 (Figura 47). El análisis de regresión mostró que existía correlación ($r = 0.7053$; Figura 48) entre las muestras de parafina y congeladas del mismo paciente, y al normalizar los datos con el control endógeno observamos que las diferencias en Ct desaparecen y en el test de comparación de medias apareado, T-Student apareada, no vemos diferencias significativas en las medias, entre congelado y parafinado una vez normalizado, en ninguno de los 25 miRNAs analizados.

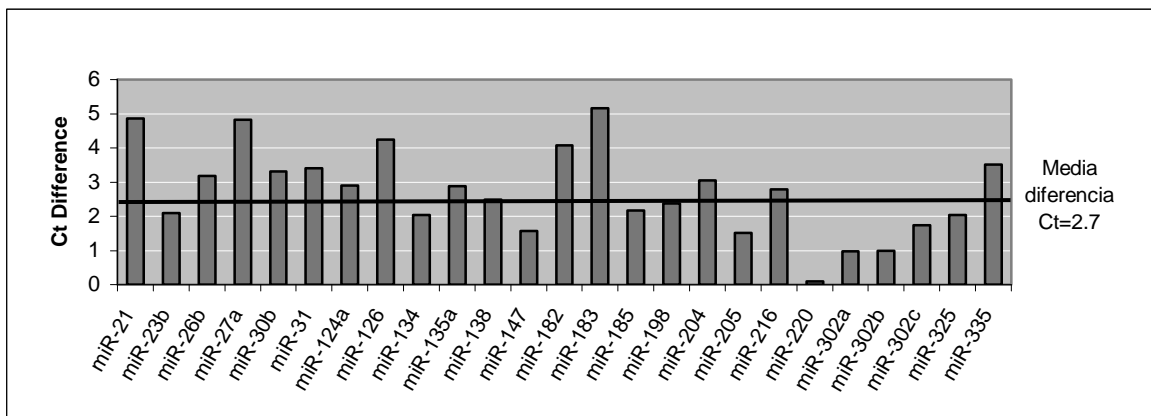


Figura 47. Diferencia de Cts entre las muestras congeladas y las parafinadas.

El valor de Ct que aparece en cada miRNA es la media del Ct de las muestras congeladas menos la media de Ct de las muestras de parafina.

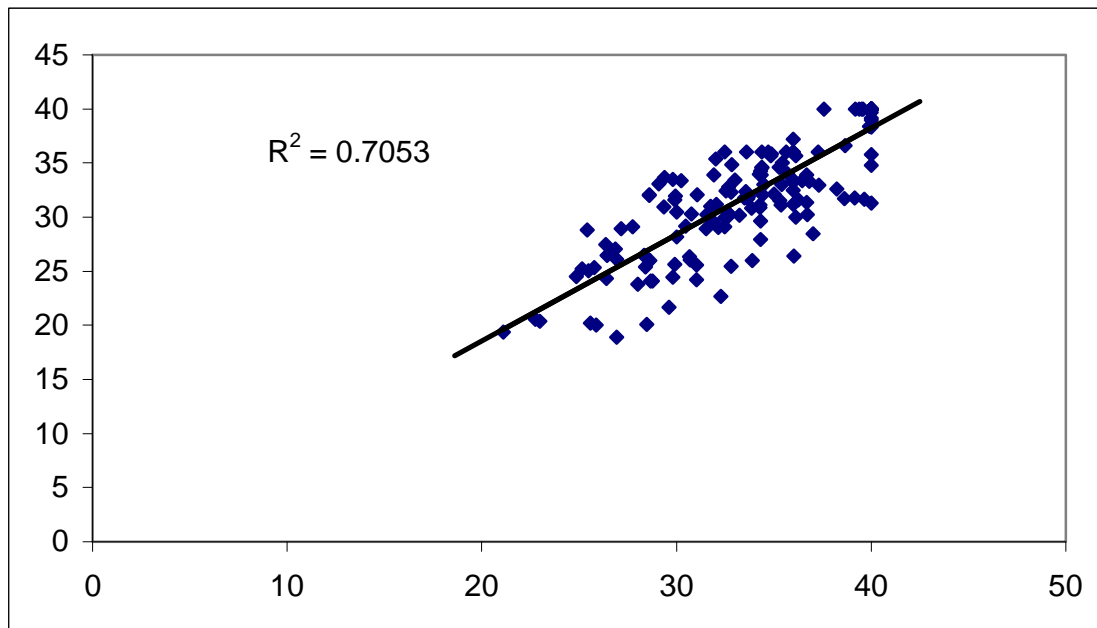


Figura 48. Recta de regresión de los Cts de expresión de los 25 miRNAs en muestras emparejadas de ganglio de linfoma de Hodgkin en parafina (x) y congelado (y).