

JAK2 en el linfoma de Hodgkin: Impacto pronóstico de la regulación mediada por miR-135a y análisis *in vitro* de Lestaurtinib

Tania Díaz Sánchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**TESIS DOCTORAL
FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO
MEDICINA**

**JAK2 EN EL LINFOMA DE HODGKIN: IMPACTO
PRONÓSTICO DE LA REGULACIÓN MEDIADA POR
miR-135a Y ANÁLISIS *IN VITRO* DE LESTAURTINIB**

Director de Tesis

Dr. Alfons Navarro Ponz

Tania Díaz Sánchez

Barcelona, Abril de 2011

A mis padres, a mi hermano y a Jose

AGRADECIMIENTOS

Tot va començar una mica per casualitat a l'estiu de 2005 quan vaig estar fent pràctiques al laboratori en el que avui treballo. Durant els pocs mesos que hi vaig estar, se'm va despertar l'interès per la oncologia i em vaig plantejar la possibilitat de fer el meu doctorat en aquell laboratori en el que es respirava tant bon ambient. Durant la realització d'aquesta tesis m'he trobat amb moltes persones, totes elles importants, que m'han ajudat al llarg d'aquest camí i, a hores d'ara, continuen estant al meu costat. Es per això que no vull deixar de mencionar a cap d'aquestes persones per mostrar el meu agraïment.

En primer lloc vull agrair al Dr. Monzó, al Marià, per la confiança que sempre ha dipositat en mi. Per donar-me la oportunitat de treballar en el seu grup i per tots els consells que sempre m'ha donat. Gràcies Marià.

A l'Alfons. Encara que, com tu dius, sempre t'esbronqui, estic molt contenta de tenir-te de director de tesis. Al teu costat he après moltes coses i sé que encara em queden moltes per aprendre. Clar que tinc una petita queixa: "el refuerzo positivo". De totes maneres, i encara que em queixi, ha estat i és un plaer treballar al teu costat. De veritat, moltíssimes gràcies per tot.

A Jose, mi marido, por su apoyo incondicional desde el día que nos conocimos; por tener siempre las palabras adecuadas en los momentos adecuados o, simplemente, por darme un abrazo cuando más lo he necesitado. Por estar siempre ahí para animarme. Por ser mi mejor amigo y regalarme todos estos años. Por todo en general, muchas gracias. Te quiero muchísimo.

Als meus pares, perquè al llarg de tota la meua vida han estat al meu costat animant-me i aconsellant-me. Perquè gràcies a ells sóc la persona que sóc. Encara que no estigui amb vosaltres tot el que voldríeu sempre us tinc presents.

Al meu germà, perquè el teu naixement va ser una de les millors sorpreses que mai he tingut. Perquè una de les coses que més greu em sap d'estar aquí treballant es no poder estar més temps amb tu, però tot i així sé que sempre estaràs quan et necessiti per donar-me una abraçada.

A la Rosa perquè tot i que hem treballat poc juntes, sempre que ho he necessitat m'has ajudat. Hem de tornar a anar a algun congrés juntes, però la pròxima vegada si pot ser que sigui en cotxe o en tren...

A la Carme per donar sempre el toc de gràcia. Per les ganes que sempre hi posa a l'hora de treballar, a vegades masses i tot; però sobretot gràcies per no donar mai un no per resposta quan de treballar es tracta.

A Gerardo, nuestro DJ favorito. Por ayudarme activamente en la realización de esta tesis y por acudir siempre que te llamamos. Ánimo valiente que a ti ya te queda poquito también. Cuando seas doctor y te vayas a las Américas te echaremos mucho de menos, pero no te mereces menos.

A la Rut perquè es un plaer treballar amb tu. La meva companya incondicional en la lluita contra els "nenes" del laboratori, no vull dir noms, ja es donaran ells per al·ludits. Hem d'anar de compres més sovint, eh?

A Víctor por ayudarme a cuidar de mis celulitas siempre que te lo he pedido.

A la Dolors perquè encara que hem treballat poc juntes, mai has tingut un no per resposta quan t'he demanat alguna cosa.

A la Glòria perquè sempre has estat allà per ajudar-nos en la mesura del possible i escoltar les nostres queixes. Mira que intentem arreglar el món, però al final no es deixa.

A l'Anna per obrir-nos les portes en el món del Hodgkin; espero que aviat tanquis el cicle, ja m'entens. Per la tranquil·litat que transmet davant qualsevol problema i, sobretot, per estar de guàrdia les 24 hores els 365 dies de l'any.

A Marina, mi murciana favorita. Por la alegría que desprendes, por saber escuchar como nadie y dar el consejo justo en cada momento. Por ayudarme a entender un poco mejor el mundo de la hematología.

A Carlos, por compartir con nosotros los momentos "Xilol" y ayudarme en esas arduas traducciones del inglés al castellano.

Al Marc y a la Elena, per deixar-me participar en els vostres projectes y per compartir amb mi la etapa “predoc”. Elenita, ya casi es nuestro.

A tots els que heu marxat, però que sempre esteu per qualsevol cosa:

A l’Aina perquè hem compartit molts bons moments, tant al laboratori com fora perquè ets una gran amiga. Em va fer molta peneta que marxessis, però et desitjo molta sort en la teva nova feina.

A la Silvia, la meva novia preferida. Perquè sempre has estat disposada a donar-me un cop de mà, per ser una gran treballadora i una millor persona.

A la Sonia, la venedora “number 1”, mai vam dubtar que això era lo teu. El meu primer dia al laboratori el vaig passar al teu costat aprenent a extreure DNA de parafines i des de llavors la teva companyia sempre ha estat gratificant; si més no, riure hem rigut.

Al Bernat, per atendre a totes les nostres trucades i resoldre tots els nostres problemes bioinformàtics. Ànim, que a tu ja et queda poquet també.

A Kate, por traducir todos mis emails e intentar enseñarnos a hablar inglés un poquito mejor. Ha sido un placer trabajar contigo; te echamos mucho de menos, a ti y a tu “Cake”.

A Renée, per la paciència que tens amb tots els teus “students” i, sobretot, perquè sense els teus “make-up” els nostres articles no serien el mateix.

Al Toni Martínez, d’Anatomia Patològica, per aconsellar-nos i donar-nos un cop de mà amb els dubtes que ens han anat sorgint al llarg de tot el projecte.

A la Bea Bellosillo, de l’Hospital del Mar, per cedir-nos els ganglis per dur a terme l’estudi.

A toda mi familia. En especial a mis abuelos, por darme siempre todo el cariño del mundo, a mi tía Nuri (o Nuria, como prefieras) y a mi primo Rubén. Enhorabuena guapetón que ya tienes la “L”.

A mi otra familia: mis suegros y mis cuñados, por abrirme sus puertas sin apenas conocerme y por hacerme sentir una más des del principio.

A mi sobrinito, Miguel, porque con uno de sus abrazos se me quitan todos los males...

A les meves nenes, Nuri i Marisa. Perquè tot i que han passat molts anys, sembla que era ahir quan ens vam conèixer i, el millor de tot, es que res ha canviat, seguiu essent les amigues de sempre. Sé que a vegades costa trobar-nos, però sóc conscient que us tinc pel que sigui, igual que vosaltres a mi.

A mis bisabuelos, por todo el cariño y ternura que me dieron. Mi infancia a su lado fue de lo más feliz. Aunque ya no estéis aquí, siempre vais conmigo porque nunca voy a olvidar lo especiales que fuisteis para mí.

A la Universitat de Barcelona i a l'AGAUR (beca FI) per les beques que m'han concedit, que han fet possible que pogués elaborar aquesta tesis.

I, en general, a tots els que d'alguna manera o altre m'han ajudat i han fet possible aquesta tesis...

GRÀCIES

CONTENIDO

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	5
ABREVIATURAS UTILIZADAS	15
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. El linfoma de Hodgkin	21
1.1.1. Descripción	21
1.1.2. Epidemiología	21
1.1.3. Histopatología	23
1.1.4. Inmunofenotipo del LHc.....	25
1.1.5. Papel del microambiente en el LHc.....	27
1.1.6. Tratamiento.....	29
1.1.7. Biología molecular de las células de Hodgkin/Reed-Sternberg	32
1.1.7.1. VEB en el linfoma de Hodgkin	37
1.2. Los microRNAs.....	38
1.2.1. Historia y características	38
1.2.2. Biogénesis.....	40
1.2.3. Mecanismos de acción	42
1.2.4. microRNAs en cáncer	47
1.2.4.1. Regulación de los miRNAs	48
1.2.4.2. miRNAs supresores de tumor	49
1.2.4.3. Oncomirs	50
1.2.4.4. miRNAs en el linfoma de Hodgkin.....	52
1.2.5. Dianas de los microRNAs.....	57
1.2.6. Aplicaciones terapéuticas.....	59
1.3. Via Jak/Stat.....	65
1.3.1. Inhibidores de Jak2.....	69
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	75
2.1. Hipótesis.....	75
2.2. Objetivos	77
3. MATERIAL Y MÉTODOS	81
3.1. Pacientes	81
3.2. Líneas celulares	82

3.3. Extracción de RNA	83
3.4. Cuantificación de microRNAs	85
3.5. Transfección	86
3.6. Tratamiento con Lestaurtinib (CEP-701)	87
3.7. Análisis de proliferación	87
3.8. Análisis de apoptosis	88
3.9. Técnica Renila/Luciferasa para validación de dianas de microRNAs	89
3.10. Western Blot	91
3.11. Análisis de los niveles de mRNA mediante RT-PCR	94
3.12. Análisis de los niveles de mRNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real.....	95
3.13. Análisis de ganglios primarios	95
3.14. Análisis estadístico	95
4. RESULTADOS	99
4.1. Resumen artículo 1.....	101
Regulación de JAK2 por miR-135a: impacto pronóstico en el linfoma de Hodgkin clásico ..	101
4.2. Resumen artículo 2.....	111
La inhibición que ejerce Lestaurtinib sobre la vía de señalización JAK/STAT provoca la inhibición de la proliferación e induce apoptosis en el linfoma de Hodgkin	111
5. DISCUSIÓN.....	123
6. CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA.....	135
ANEXOS	159
Figuras suplementarias de los artículos	159
Trabajos realizados durante el periodo de tesis	165
Participación en congresos de los trabajos presentados	165
Otras publicaciones realizadas en el periodo de tesis	167
Otros congresos durante el periodo de tesis	169

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABVD: antraciclina, bleomicina, vinblastina y dacarbacina

AEM: antígeno epitelial de membrana

AGO2: *argonaute 2*

AKT1: *v-akt murine thymoma homolog 1*

ALK: *anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*

AP1: *activator protein 1*

AREs: *AU-rich elements*

ASCT: trasplante autólogo de células madre

BCL-2: *B-cell CLL/lymphoma 2*

Bcl-xL: *BCL2-like 1*

BCMA (TNFRSF17): *tumor necrosis factor receptor superfamily member 17*

BCR: receptor de células B

BIC: *B cell integration cluster*

BSA: *bovine serum albumin*

BOB.1 (POU2AF1): *POU class 2 associating factor 1*

CCL: *chemokine (C-C motif) ligand*

CFLAR: *caspase 8 and FADD-like apoptosis regulator*

CM: celularidad mixta

c-myc: *myelocytomatosis oncogene*

CSF1: *colony stimulating factor 1*

DGCR8: *DiGeorge syndrome critical region gene 8*

DL: depleción linfocítica

E2F1: *E2F transcription factor 1*

EBNA1: *Epstein Barr virus nuclear antigen 1*

EN: esclerosis nodular

ERK: *erk-related tyrosine kinase*

FAS: *Fas (TNF receptor superfamily, member 6)*

FBS: *fetal bovine serum*

FDA: *US Food and Drug Administration*

FLT3: *fms-like tyrosine kinase 3*

FOXP3: *forkhead box P3*

FXR1: *frágil X mental retardation-related protein 1*

HDAC: histona deacetilasa

HLA: antígenos leucocitarios humanos

HMGA2: *high mobility group AT-hook 2*

hn RNP E2: *heterogeneous ribonucleoproteins E2*

HRS: Hodgkin/Reed-Sternberg

HSP90: *heat shock protein 90*

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

JAK: *Janus kinase*

kDa: kilodaltons

LDH: lactato deshidrogenasa

LH: linfoma de Hodgkin

LHc: linfoma de Hodgkin clásico

LHPLN: linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular

LLA: leucemia linfática aguda

LLC: leucemia linfática crónica

LMA: leucemia mieloide aguda

LMP1/2: *latent membrane proteins 1/2*

LNA: *locked nucleic acid*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

Mcl-1: *myeloid cell leukemia sequence*

MFP: mielofibrosis primaria

MHC: *major histocompatibility complex*

microRNPs: micro-ribonucleoproteínas

miRISC: complejo RISC en miRNAs

miRNAs: microRNAs

mRNA: RNA mensajero

mTOR: *mechanistic target of rapamycin*

NF-κB: *nuclear factor-kappa B*

NK: *natural killer*

nM: nanomolar

nt: nucleótidos

OCT-2 (POU2F2): *POU class 2 homeobox 2*

OMS: organización mundial de la salud

ORF: *open reading frame*

PACT (PRKRA): *protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator*

PAX5: *paired box 5*

PD-1 (PDCD1): *programmed cell death 1*

PDCD4: *programmed cell death 4*

PGM1: *phosphoglucomutase 1*

PI3K: *phosphoinositide-3-kinase*

PL: predominio linfocítico

poli(A): poli adenina

pre-miRNA: miRNA precursor

pri-miRNA: miRNA primario

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

PTP: proteína tirosina fosfatasa

PU.1 (SPI1): *spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1*

PV: policitemia vera

RANK (TNFRSF11A): *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFkB activator*

REL: *v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog*

RET: ret proto-oncogen

RISC: *RNA- induce silencing complex*

RL: rico en linfocitos

RNAi: RNA de interferencia

SHP (NR0B2): *nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2*

SMP: síndromes mieloproliferativos

SOCS-1: *supressor of cytokine signalling 1*

STAT: *signal transducer and activator of transcription*

stRNA: *small temporal RNA*

TACI (TNFRSF13B): *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B*

TCR: receptor de células T

TE: trombocitemia esencial

TGFβ: *transforming growth factor beta*

T_H: células T *helper*

TNFα: *tumor necrosis factor alpha*

TNFAIP3: *TNF alpha induced protein 3*

TRAIL (TNFSF10): *tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10*

TRBP: *TAR (HIV-1) RNA binding protein*

TPM1: *tropomyosin 1*

T_{reg}: células T reguladoras

TYK2: *tyrosine kinase 2*

UTR: *untranslated region*

VEB: virus Epstein-Barr

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

WBC: *White blood cells* (leucocitos)

XIAP: *x-linked inhibitor of apoptosis*

XPO5: exportina 5

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El linfoma de Hodgkin

1.1.1. Descripción

El linfoma de Hodgkin (LH) es una neoplasia linfoide que se origina, preferencialmente, en los nódulos linfáticos de la región cervical; aunque podría generarse en cualquier parte del cuerpo. Además, esta enfermedad puede propagarse a otros ganglios, a través de los vasos linfáticos, pudiendo llegar incluso al hígado y los pulmones. Esta neoplasia se caracteriza por la escasa presencia de células tumorales, células de Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS), en un microambiente no tumoral.

Esta enfermedad fue descubierta por primera vez en 1832 por el patólogo Thomas Hodgkin al describir los hallazgos *post mortem* que encontró en 7 pacientes con una enfermedad ganglionar mortal; los describió como “*One some morbid appearances of the absorbent glands and spleen*” [1]. Poco después, en 1865, Samuel Wilks confirmó estos hallazgos en 15 pacientes nuevos y propuso el nombre de “Enfermedad de Hodgkin” para esta neoplasia [2]. En la actualidad, tras conocer el origen linfoide, mayoritariamente de célula B, de las células de HRS, esta neoplasia se conoce como linfoma de Hodgkin.

1.1.2. Epidemiología

El LH supone aproximadamente el 1% de todos los cánceres y el 10% de los linfomas. En Europa, el LH presenta una incidencia de 3 casos nuevos al año cada 100.000 habitantes y, a diferencia de los linfomas no-Hodgkin, su incidencia se ha mantenido más o menos estable a lo largo del tiempo.

En referencia a la edad de diagnóstico de esta enfermedad, el LH presenta una distribución bimodal con un pico de máxima incidencia en la juventud, entre los 20 y los 35 años, y otro en edades más maduras, a partir de los 50 años. A su vez, es muy poco frecuente en menores de 10 años. La distribución por sexos presenta una relación 1,5:2,1, siendo los varones los que presentan una mayor incidencia.

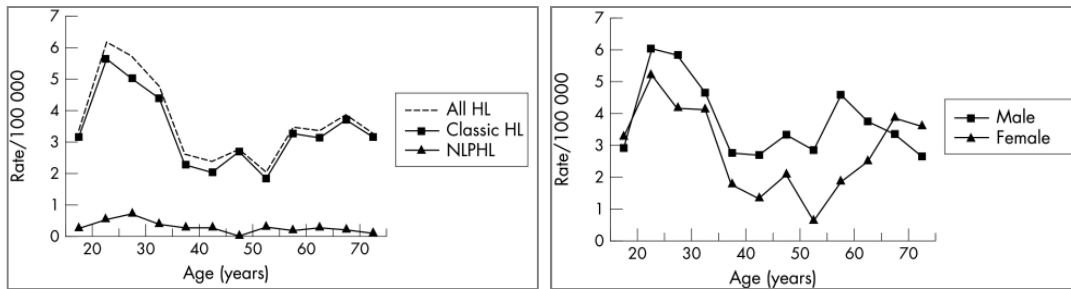


Figura 1. Tasas de incidencia por edad de LH por cada 100.000 personas/año. 1) Todos los casos de LH, LHc y LHPLN. 2) LHc por sexos (Jarrett RF et al; J Clin Pathol 2003).

LHc: LH clásico; LHPLN: LH predominio linfocítico nodular.

Entre los diferentes tipos de LH, la mayoría de los casos presentan un LH clásico (LHc), tan solo un 5% corresponde a LH de predominio linfocítico nodular (LHPLN). El predominio de los subtipos histológicos de LHc varía según la edad del paciente; en términos globales, el subtipo mayoritario es la esclerosis nodular (EN), que corresponde al 70% de los pacientes con LHc, seguido de la celularidad mixta (CM), en un 20-25% de los casos, el predominio linfocítico (PL), un 5%, y el subtipo menos incidente es la depleción linfocítica (DL), que engloba menos del 1% de los pacientes.

Hay muchos factores etiológicos involucrados en la aparición del LH. Dentro de los más destacados encontramos:

- **Susceptibilidad genética:** a pesar de que la mayoría de casos con LH no tienen una base hereditaria, se ha sugerido una transmisión hereditaria autosómica recesiva, con el 60% de casos debidos a un gen de predisposición ligado al HLA [3]. Además, se conoce que el LH es 99 veces más frecuente en un gemelo homocigótico de un paciente afectado que en la población general [4].
- **Agentes infecciosos (VEB):** los pacientes con historia de mononucleosis infecciosa, causada por el virus Epstein-Barr (VEB), tienen un riesgo de 3 a 4 veces mayor que la población normal de desarrollar un LH. Dependiendo de la edad, la región geográfica y el subtipo histológico un 20-100% de los LH aparecen asociados al VEB [5].

- **Alteraciones del sistema inmunológico (VIH):** se ha descrito un riesgo superior a padecer un LH en receptores de trasplante alogénico de médula ósea, sugiriendo una relación entre la estimulación de las células inmunes, la exposición al VEB (predominante en estos casos) y el LH [6]. Los trastornos de la inmunidad como la inmunosupresión pueden ocasionar LH, así pacientes seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y los que presentan el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) tiene un riesgo mucho más elevado de desarrollar la enfermedad. Además, los pacientes con un LH ligado al VIH presentan subtipos histológicos más agresivos, estadios de presentación más avanzado y peor curso clínico [7].

1.1.3. Histopatología

Dentro del LH, encontramos 2 tipos histológicos diferentes:

- **LHPLN:** este tipo de linfoma se forma en un ambiente folicular y, casi siempre, presenta un patrón de crecimiento folicular o nodular. En el LHPLN no encontramos células HRS, las células tumorales en este linfoma se denominaban células L-H (por la predominancia Linfocítica y Histiocítica); aunque en 2008 la organización mundial de la salud (OMS) recomendó el uso del término células PL (predominio linfocítico). Las células PL presentan un núcleo multilobulado con varios nucléolos basofílicos y pequeños, esto confiere a la célula una apariencia similar a una “palomita” [8, 9].

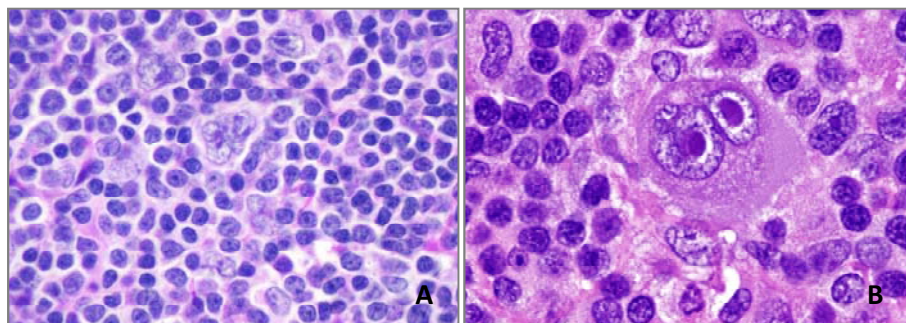


Figura 2 (página anterior). A) Célula LP (centro imagen); B) Célula HRS (centro imagen) (Mani H et al; Clin Lymphoma Myeloma 2009).

- **LHc:** este linfoma se caracteriza por la presencia de unas células tumorales conocidas como células HRS. Estas células son binucleadas y cada núcleo contiene un nucléolo prominente, eosinofílico, con un halo a su alrededor; todas estas características confieren a la célula una apariencia similar a los ojos de un búho [8, 9].

El LHc se divide en 4 subtipos diferentes teniendo en cuenta la morfología de las células HRS y la composición de las células reactivas del infiltrado. Por orden de incidencia encontramos:

- **Esclerosis nodular (EN):** los nódulos linfáticos tienen un patrón de crecimiento nodular; los nódulos, al menos uno de ellos, se encuentran rodeados por fibras de colágeno. La célula característica es la variante lacunar de las células HRS, con núcleos multilobulados y un abundante citoplasma. En tejidos fijados con formol, este citoplasma se retrae hacia la membrana plasmática y parece que los núcleos estén en una laguna. Estas células pueden formar agregados celulares que suelen ir asociados a reacciones necróticas. El componente celular no neoplásico está formado por linfocitos pequeños, eosinófilos, histiocitos y neutrófilos [10, 11].
- **Celularidad Mixta (CM):** la estructura normal del nódulo linfático se ve destruida, aunque podemos encontrar un patrón interfolicular. Puede haber una fibrosis intersticial, pero la cápsula del nódulo no es tan ancha como en el subtipo EN ni vemos bandas anchas de fibrosis. Las células HRS son de apariencia típica y el infiltrado es difuso, representado por una mezcla variable de tipos celulares (eosinófilos, neutrófilos, histiocitos y células plasmáticas); normalmente uno de ellos predomina sobre los demás. Los histiocitos pueden mostrar marcadas características epiteloides, sobre todo en los casos asociados al VEB. Este subtipo es el más comúnmente asociado al VEB [12].
- **Predominio Linfocítico (PL):** este subtipo puede ser fácilmente confundido con el LHPLN, por eso el inmunofenotipo típico de las células HRS es muy

importante para su distinción. Las células neoplásicas son del tipo HRS clásico o lacunar y en el infiltrado predominan los linfocitos pequeños. No encontramos ni neutrófilos ni eosinófilos, y en caso que existan están en zonas interfoliculares y en baja cantidad. Una pequeña porción de los casos presenta patrones nodulares.

- **Depleción linfocítica (DL):** la apariencia de este subtipo es muy variable, pero todas las variantes tienen una característica común que es una predominancia de células neoplásicas HRS en un infiltrado no neoplásico muy escaso.

1.1.4. Inmunofenotipo del LHc

La mayoría de linfomas de célula B presentan características de sus células de origen durante la transformación maligna; el origen de las células HRS no estaba tan claro al principio porque presentan un inmunofenotipo muy inusual, variable e inconstante, con la pérdida de expresión de antígenos asociados a las células B y, por el contrario, la expresión de genes característicos de diferentes tipos de células hematopoyéticas. El origen de célula B de las células HRS se puede demostrar en un 95% de los casos por la expresión de PAX5, una proteína activadora específica de células B; aunque la señal de PAX 5 en las células HRS es mucho más débil que la detectada en las células B reactivas y la mayoría de sus dianas directas no se expresan en el microambiente del LHc [9, 13].

Las células HRS en la mayoría de los casos son CD30+, CD15+ y CD45- [14]. También son negativas para la cadena J, para CD75 y para marcadores específicos de macrófagos como el epítipo PG-M1 de la molécula CD68. Únicamente un 30-40% de los casos son positivos para el marcador de célula B CD20 y con menos frecuencia en algunos casos podemos encontrar otros marcadores típicos de las células B como CD22 y CD79a [9]. Los factores de transcripción que regulan la expresión de genes típicos de células B, como OCT-2, BOB.1, están ausentes en el 90% de los casos [15, 16], y PU.1, está permanentemente ausente en las células HRS [17]. Además de la baja expresión, a veces inexistente, de las moléculas específicas de células B, las células HRS expresan marcadores de otros linajes de células hematopoyéticas. Así, en el microambiente tumoral que se forma en el LHc podemos encontrar marcadores de células T (CD3 y

CD4), moléculas citotóxicas (granzima B), marcadores de célula dendrítica (fascina y CCL17) o marcadores mieloides (CSF1 y α 1-antitripsina) [18-20].

Los casos de LHc ricos en células neoplásicas pueden confundirse con un linfoma anaplásico de célula grande, una neoplasia de célula T. En estos casos, para identificar a un LHc, es necesario demostrar qué positividad presenta para PAX5 y qué negatividad para las proteínas AEM, que son un antígeno epitelial de membrana, y ALK. Además, la detección de EBER, un RNA expresado por el VEB, o de LMP1 corrobora que nos encontramos ante un caso de LHc. Ahora bien, existe un tipo de linfoma de célula B que fácilmente se confunde con el LHc, se trata del linfoma de célula grande B con morfología anaplástica y expresión de CD30 [9].

MARCADOR	EXPRESIÓN
CD30	Positivo en casi todos los casos
CD15	Positivo en la mayoría de los casos (70-95%)
CD45	Negativo en todos los casos
CD20	Positivo en el 30-40% de los casos, en baja proporción de células
CD79a	Positivo en muy pocos casos (10-20%)
PAX5	Positivo en casi todos los casos, aunque hasta un 10% puede ser negativo
Cadena J	Negativo en todos los casos
Ig	Negativo en todos los casos
OCT-2	Negativo en la mayoría de casos, aunque aproximadamente un 10% de los casos presentan fuerte expresión para este marcador
BOB.1	Negativo en casi todos los casos; se puede detectar una positividad débil y dispersa en aproximadamente un 10% de los casos
CD3	Positivo en muy pocos casos (aprox. 1%)
CD2	Positivo en muy pocos casos (aprox. 4%)
Granzima B	Positivo en muy pocos casos (aprox. 18%)
CD43	Negativo en todos los casos
EMA	Negativo en casi todos los casos; se puede detectar positividad débil en las células tumorales en el 5% de los casos
ALK	Negativo en todos los casos
LMP1	Positivo en la mayoría de los casos positivos para VEB

Tabla 1. Inmunofenotipo del linfoma de Hodgkin clásico.

1.1.5. Papel del microambiente en el LHc

El LHc se caracteriza por la elevada infiltración de diferentes células del sistema inmunitario en el linfoma, siendo tan solo un 1% o menos la proporción de células tumorales (HRS) que encontramos en él. Dentro de este infiltrado encontramos células T, células B, células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos i células mastoides. Las células HRS atraen de forma activa a las células inmunitarias a través de la secreción de citoquinas y quimioquinas y, a su vez, se benefician de las señales paracrinas que estas células no tumorales emiten. Así, encontramos una red compleja de citoquinas y quimioquinas que proporcionan un microambiente permisivo [14, 21, 22].

Las quimioquinas no solo participan en la atracción de células del microambiente, sino que tienen efectos directos en la supervivencia y la proliferación de las células HRS. Hay muchas evidencias que indican que las células HRS dependen de las señales de supervivencia enviadas por las células del microambiente, entre ellas:

1. Es muy complicado hacer crecer células HRS en cultivo.
2. Las células HRS no sobreviven en ratones inmunodeficientes [23, 24].
3. Raramente encontramos células HRS en sangre periférica.
4. Cuando se dan metástasis en tejidos no linfáticos, las células HRS siempre van acompañadas de su microambiente.

Las células T CD4⁺ son la población predominante del infiltrado celular que encontramos en tejidos involucrados en el LHc. Estas células son atraídas por las quimioquinas CCL5 [25], CCL17 [18] y CCL22 que secretan las células HRS y por la CCL11 [26], también conocida como eotaxina, producida por los fibroblastos. Una fracción de estas células pertenece a las células T *helper* (T_H) que a menudo se encuentran adyacentes a las células HRS proporcionándoles la capacidad de supervivencia y crecimiento gracias a la expresión de CD40L que estimula la señal CD40 en las células HRS [27]. Además, en la superficie de las células HRS encontramos antígenos MHC de clase II, factores estimuladores de células T, como CD80, y moléculas de adhesión (CD54, CD58) [28]; todos ellos contribuyen en la interacción de las células HRS con las células T_H. Otras células T CD4⁺ que encontramos en el LH son las células T reguladoras (T_{reg}) CD25⁺ FOXP3⁺ [29]. La función principal de estas células

es el control de la autoinmunidad; aunque también pueden suprimir la acción de los linfocitos reactivos a antígenos tumorales, como las células T citotóxicas CD8⁺ o las células NK, mediante la inhibición de la expresión de IL2 i CD25 [30]. Las células T_{reg}, además, secretan la citoquina inmunosupresora IL10 [29].

Los diferentes subtipos de células T juegan un papel muy importante en la formación del microambiente permisivo que encontramos en el LHc. Sin embargo, son las células HRS las encargadas de promover un microambiente inmunosupresor mediante la expresión de:

1. TGFβ y Galectina-1: ambos inhibidores de la respuesta inmune. La Galectina-1 ejerce esta función induciendo la muerte de las células T_{H1}, estimulando la expansión de las células T_{reg} e inhibiendo las respuestas de células T CD8⁺ específicas para el VEB [31-33].
2. PD-1 ligando: activa al receptor PD-1 que se encuentra en las células T y hace que éstas pierdan su capacidad de respuesta inmune [34, 35].

Las células HRS son capaces de atraer diferentes células a su microambiente; además de células T, las células HRS pueden reclutar otras células como los eosinófilos o las células mastoides. Los eosinófilos son atraídos tanto por las células HRS, por la secreción de moléculas como IL5, IL9, CCL5, CCL28 y GM-CSF, como por los fibroblastos, gracias a la expresión de CCL11 [25, 36]. Los eosinófilos también contribuyen en la patogénesis del LHc mediante la secreción de TGFβ y la expresión de CD30L que estimula la señalización de CD30 en las células HRS. La secreción de CCL5 por parte de las células HRS también atrae a las células mastoides, que también expresan CD30L. Estas células contribuyen al crecimiento tumoral facilitando la angiogénesis y la remodelación tisular [25, 36].

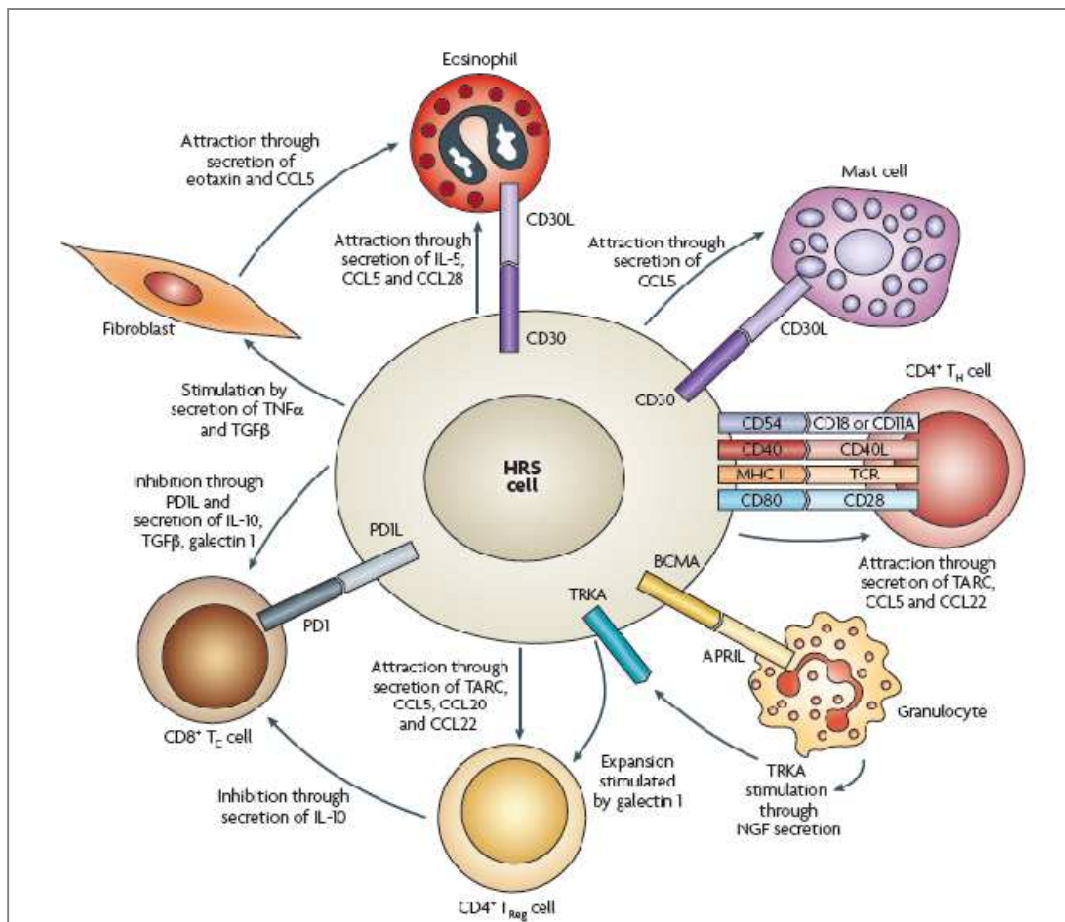


Figura 3. Interacciones celulares presentes en el microambiente del linfoma de Hodgkin (Küppers R; *Nat Rev Cancer* 2009).

1.1.6. Tratamiento

El LHC está considerado uno de los cánceres humanos con una mayor tasa de curación (80-90%) [37], sobre todo en los pacientes con enfermedad localizada. Los pacientes de LHC avanzado (que se define por la presencia de una masa de Bulky superior a 10 cm, sintomatología B y/o estadio III/IV) presentan unas tasas de recaída del 30-40% [38]. A pesar de la elevada tasa de curación, los pacientes que no responden a los tratamiento de primera o segunda línea, incluyendo a aquellos que reciben un trasplante de células madre hematopoyéticas, tienen un supervivencia media estimada menor a 3 años [39].

Debido a la baja incidencia y a la elevada tasa de curación del LHc, el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de los pacientes con LHc en recaída sigue siendo un reto. De hecho, no se han aprobado nuevos fármacos para el tratamiento de LH desde hace más de 30 años por la *US Food and Drug Administration (FDA)* [40]; hasta la fecha las mejoras en el tratamiento se han centrado en disminuir el número de ciclos de quimioterapia y las dosis de radiación. La terapia basada en antraciclina, con doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbacina (ABVD) sigue siendo la estándar para pacientes con LH. La consolidación de la quimioterapia primaria con radiación o un trasplante autólogo de células madre (ASCT) no ha supuesto una mejora en la supervivencia global [38]. Se han hecho ensayos clínicos aleatorios controlados con distintos regímenes de quimioterapia, pero por el momento ninguno de ellos ha mostrado resultados suficientemente satisfactorios como para ser aprobados en el LH. Uno de los regímenes de quimioterapia testados es el BEACOPP con escalada de dosis (escBEACOPP) [41], que presenta una toxicidad tardía y más aguda que la de ABVD; la supervivencia de los pacientes tratados con escBEACOPP aun no se ha confirmado.

A pesar de la efectividad de la terapia estándar, como hemos visto anteriormente, aproximadamente el 30-40% de los pacientes con LH en estado avanzado recaen. El ASCT se ha convertido en el tratamiento estándar para los pacientes con LH en recaída o refractario basándose en dos ensayos clínicos aleatorios [42, 43]. Aunque, la quimioterapia de rescate óptima permanece desconocida. Se han testado nuevas estrategias en las que no se realiza un ASCT, como la radioterapia de rescate o quimioterapias sin un ASCT posterior; los resultados parecen esperanzadores y podrían tener gran potencial en determinados escenarios clínicos.

Gracias a los recientes avances en nuestra comprensión sobre la biología, la inmunología y la patología del LH, se han identificado posibles dianas moleculares para tratar esta enfermedad; muchas de ellas están siendo analizadas en ensayos preclínicos y clínicos [40]. Por ejemplo, las células HRS expresan varios receptores que pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) que incluye receptores pro-supervivencia, como CD30, CD40, TACI, BCMA y RANK, y receptores pro-apoptosis, como Fas y receptores de TRAIL [44]. Los receptores pro-supervivencia comparten funciones biológicas similares, que incluyen la inducción de la secreción de

citoquinas y quimioquinas y la activación de vías de señalización como NF- κ B, ERK/MAPK y PI3-kinase/Akt/mTOR. Actualmente, se están analizando posibles estrategias contra receptores de las células HRS utilizando anticuerpos monoclonales.

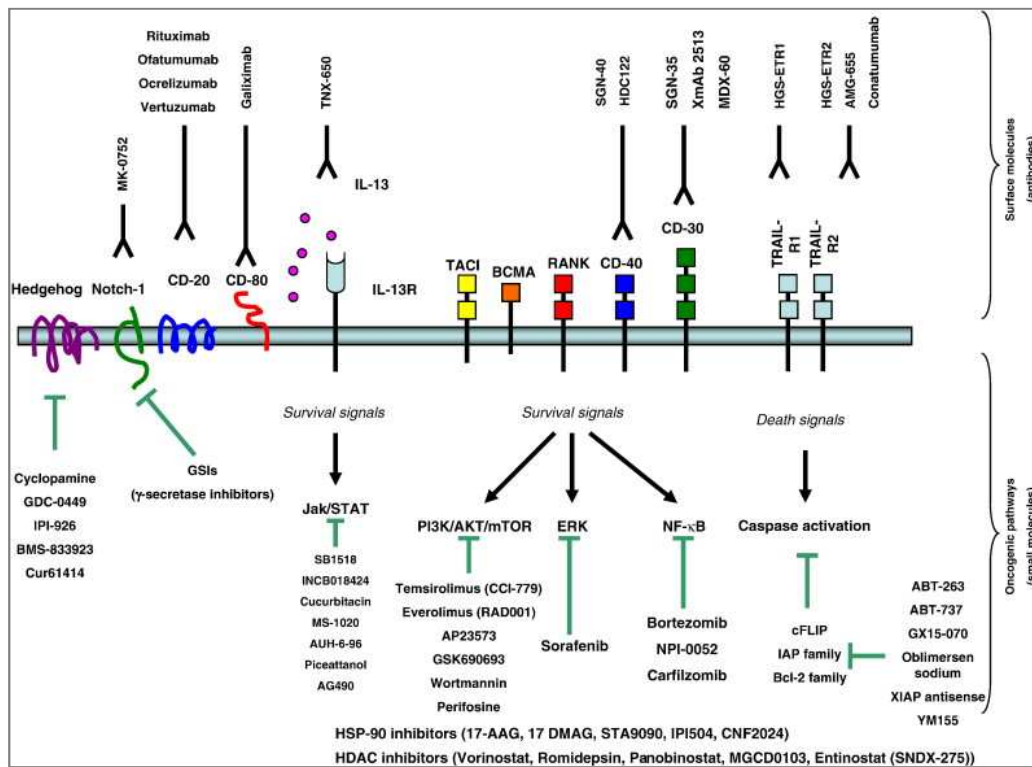


Figura 4. Terapias en desarrollo que tienen como diana receptores o vías de señalización características de las células HRS (Younes A. *et al*; Blood 2010).

Las células HRS expresan de forma aberrante una serie de proteínas pro-supervivencia, como NF- κ B, JAK/STATs, Akt/mTOR, Notch-1 y ERK; estas proteínas pueden ser diana de inhibidores selectivos (como inhibidores de JAK2, mTOR y Bcl-2) o inhibidores de amplio espectro que modulan moléculas como HDAC y HSP90. Actualmente, se están desarrollando inhibidores de HDAC, de la vía PI3K/Akt/mTOR, de NF- κ B y de HSP90.

Otra posible diana a tener en cuenta para tratar un LH son los diferentes componentes que forman el microambiente tumoral, que es esencial para la supervivencia de las células HRS. Actualmente, se están desarrollando terapias con el fin de neutralizar el papel que ejercen las células del microambiente sobre las células HRS. Un tipo de

estrategia puede ser inhibir de forma específica algún tipo celular utilizando anticuerpos monoclonales. Uno de los fármacos con esta función que está siendo testado en distintos ensayos clínicos, incluso en combinación con ABVD, es *Rituximab* [45, 46]. Se trata de un anticuerpo monoclonal anti-CD20 que tiene como diana principal las células B reactivas del microambiente, que expresan cantidades elevadas de CD20, y algunas células HRS CD20+, aunque en el caso estas células la expresión de CD20 es muy poco frecuente.

En resumen, tras casi tres décadas sin apenas desarrollar nuevas terapias en el tratamiento del LH, se han identificado varios fármacos con un papel prometedor para tratar los pacientes con LHc en recaída. Los dos más destacados por los resultados obtenidos son SGN-35 [47-49], un anticuerpo anti-CD30, y *Panobinostat* [50], que es un inhibidor de HDAC; estos dos compuestos están siendo examinados en ensayos clínicos pivote con el fin de ser aprobados por la FDA. Es importante que no se detenga la búsqueda de nuevas estrategias para el LHc en aquellos pacientes que no responden a tratamientos convencionales porque cuantos más fármacos nuevos se identifiquen, más personalizadas podrán ser las terapias aplicadas en cada paciente.

1.1.7. Biología molecular de las células de Hodgkin/Reed-Sternberg

El origen de las células HRS en el LHc fue un enigma durante décadas porque estas células muestran un inmunofenotipo distinto a cualquier otro tipo de célula del sistema hematopoyético caracterizado por la coexpresión de marcadores de distintos linajes celulares hematopoyéticos [14, 21]. Además, la baja frecuencia de estas células en el tejido tumoral dificultó los análisis que se realizaron para detectar reordenamientos en los genes de las inmunoglobulinas (Ig) o del receptor de células T (TCR). La primera evidencia que mostró el origen linfoide de las células HRS fue un análisis realizado en líneas celulares de pacientes con LH que mostró que la mayoría de estas presentaba reordenamientos en los genes de las Ig o de TCR [51, 52]. Las pruebas definitivas del origen de célula B de las células HRS fue la detección de reordenamientos clonales en los genes Ig V_H y V_L en células HRS microdisecadas a

partir de una sección de tejido, puesto que estos reordenamientos solo ocurren en células B [53-55].

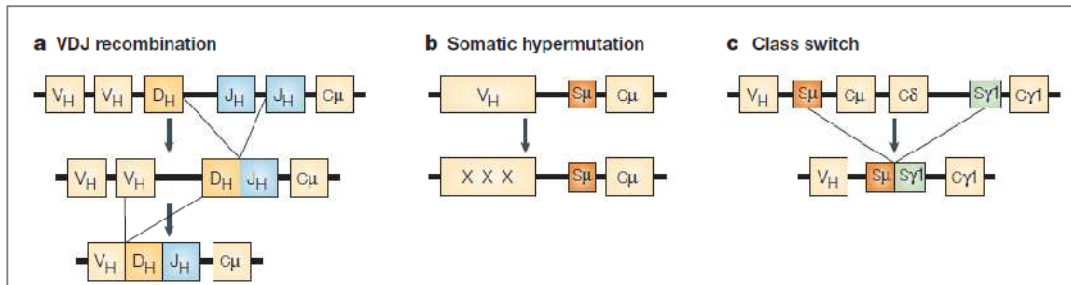


Figura 5. Proceso molecular de remodelación de los genes de las Ig (Küppers R; *Nat Rev Cancer* 2005).

Casi todos los casos con reordenamientos en los genes de las Ig de la región V, además muestran hipermutaciones somáticas [54, 55] que normalmente ocurren en las células B maduras de los centros germinales estimuladas por antígeno [56]. Aproximadamente en una cuarta parte de los reordenamientos los genes de Ig V dejan de ser funcionales debido a mutaciones “nonsense” (mutaciones puntuales que generan codones Stop) o deleciones que alteran la pauta de lectura [57]. Cuando este tipo de mutaciones tienen lugar en las células B normales de los centros germinales, las células entran en apoptosis debido a que un requisito esencial para la supervivencia de estas células son las señales producidas por el BCR y este debe ser funcional. Así, las células HRS derivan de las células B pre-apoptóticas de los centros germinales [54, 58].

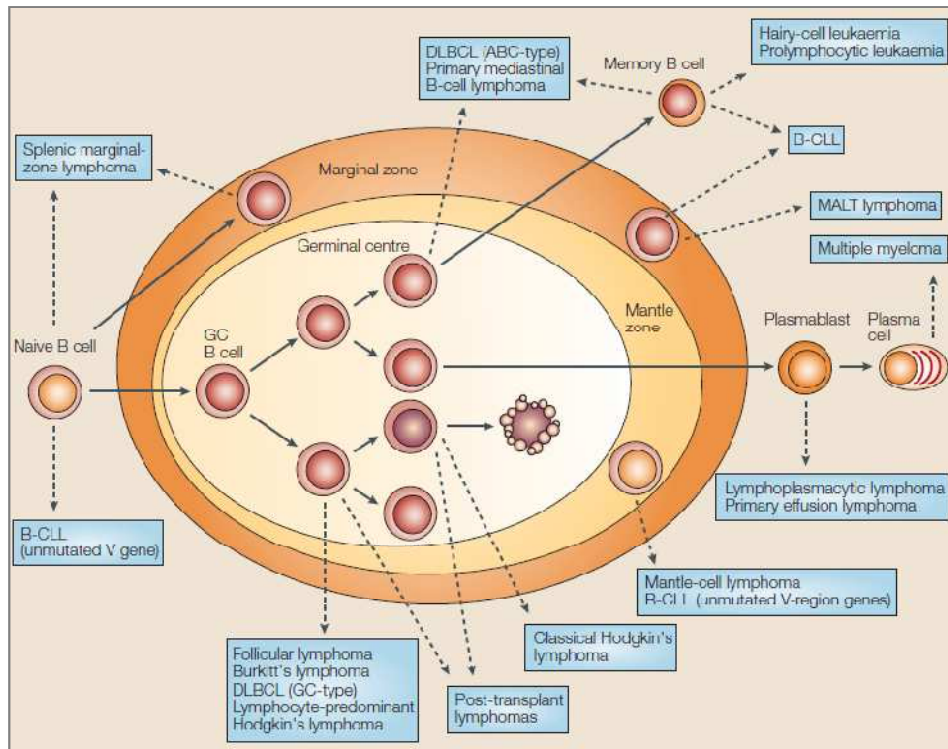


Figura 6. Origen celular de los linfomas de célula B (Küppers R; *Nat Rev Cancer* 2005).

Las células de HRS presentan alteraciones en múltiples vías de señalización que contribuyen al fenotipo característico de las células HRS. Uno de los eventos más importantes para la patogenia del LHC es el rescate de las células HRS de la apoptosis gracias a la activación de vías antiapoptóticas. Otro mecanismo para escapar de la apoptosis es la sobreexpresión de inhibidores como CFLAR, que inhibe la vía de señalización FAS, y XIAP, un inhibidor de las caspasas [59-61].

Las alteraciones genéticas más frecuentes en las células HRS implican a los miembros de dos vías de señalización: JAK/STAT y NF- κ B. En las células HRS, frecuentemente encontramos amplificaciones del gen que codifica para JAK2 [62] y uno de los reguladores negativos de la vía JAK/STAT, SOCS-1, a menudo está mutado e inactivado en el LH, tanto en LHc [63] como en LHPLN [64]. La actividad de NF- κ B puede verse afectada por distintos tipos de lesiones genéticas, las más frecuentes son las que afectan a REL y a TNFAIP3.

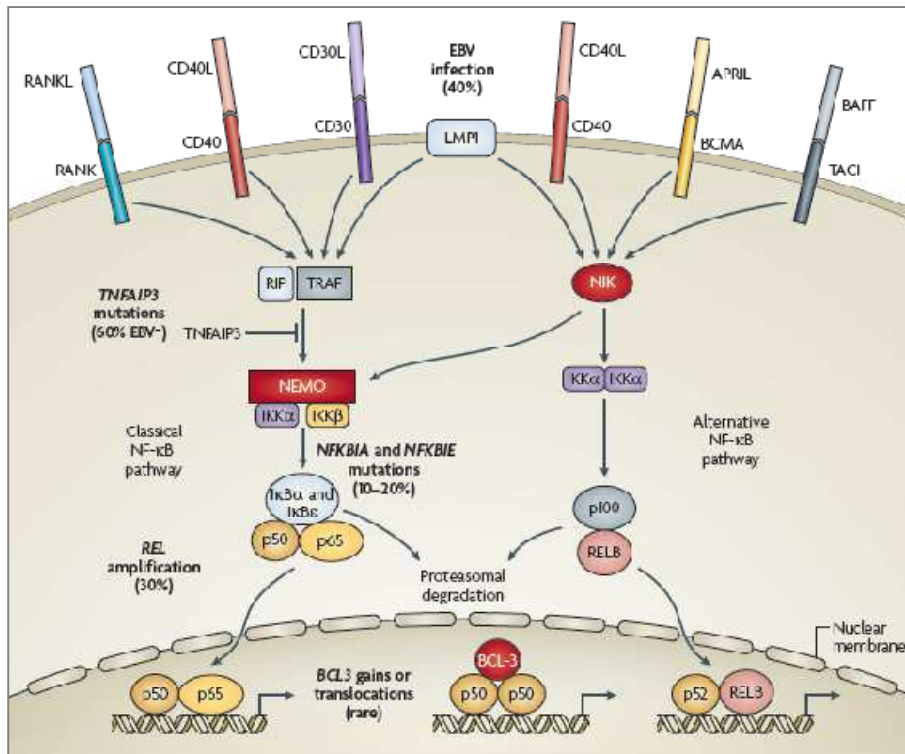


Figura 7. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) en las células HRS (Küppers R; *Nat Rev Cancer* 2009).

REL, uno de los miembros de la familia NF- κ B, presenta amplificaciones genéticas en aproximadamente la mitad de los casos de LH y éstas correlacionan con sus niveles proteicos [65]. Además, en las células de HRS se han detectado mutaciones desactivadoras en TNFAIP3, que es un regulador negativo de la actividad de NF- κ B [21]. Curiosamente, todos los casos con mutaciones desactivadoras en TNFAIP3 eran negativos para el VEB, sugiriendo que la infección por el VEB y las mutaciones de TNFAIP3 son mecanismos alternativos para la patogénesis de las células HRS [21].

GEN	TIPO DE ALTERACIÓN	VÍA	FRECUENCIA DE CASOS ALTERADOS
REL	Ganancias, amplificación	NF- <i>κ</i> B	50
NFKBIA	Mutaciones puntuales, deleciones	NF- <i>κ</i> B	20
NFKBIE	Mutaciones puntuales, deleciones	NF- <i>κ</i> B	15
TNFAIP3	Mutaciones puntuales, deleciones	NF- <i>κ</i> B	40
BCL3	Ganancias, translocaciones	NF- <i>κ</i> B	10
JAK2	Ganancias, amplificaciones	JAK/STAT	40
SOCS1	Mutaciones puntuales, deleciones	JAK/STAT	45
TP53	Mutaciones puntuales, deleciones	P53	10
MDM2	Ganancias	P53	60
CD95	Mutaciones puntuales	Apoptosis mediada por FAS	10

Tabla 2. Mecanismos patogénéticos que tienen lugar en las células HRS.

La actividad constitutiva de la vía de JAK/STAT y los factores de transcripción NF- κ B no solo es debida a lesiones genéticas, puede darse también por señales paracrinas y/o autocrinas. Un ejemplo es el caso de la activación de los STATs en las células HRS; en estas células encontramos 4 miembros de esta familia activados constitutivamente: STAT3, STAT5A, STAT5B y STAT6 [66-68]. La activación de STAT6 se da de forma autocrina gracias a la expresión de IL-13 y IL-13R por parte de las células HRS [69]. La expresión y activación de STAT5A y STAT5B incrementa por la actividad NF- κ B en las células HRS [70] y, además, la coexpresión de IL-21 y IL-21R en estas células permite la activación de STAT5A, STAT5B Y STAT3, aunque no se sabe del todo cuál de estos factores de transcripción es la principal diana de IL-21 [67, 71]. Además, los STATs pueden ser activados por receptores tirosina quinasa, la mayoría de los cuales se expresan y activan en las células HRS.

Otro mecanismo por el cual la célula de HRS puede ser rescatada de la entrada en apoptosis es mediante la infección por el VEB.

1.1.7.1. VEB en el linfoma de Hodgkin

El VEB es un tipo de herpesvirus que permanece en más del 90% de la población adulta. La infección de este virus normalmente se da de forma subclínica en la infancia temprana; generalmente, aquellos individuos que no han tenido contacto con el virus hasta la juventud desarrollan una mononucleosis infecciosa.

Las células HRS de aproximadamente un 40% de los casos de LHc están infectadas de por el VEB, que presenta un papel muy importante en la patogenia de esta enfermedad. Las células HRS que son positivas para el virus expresan tres proteínas víricas: EBNA1, LMP1 y LMP2, y dos RNAs no codificantes: BARTs y EBERs. EBNA1 es esencial para la replicación del genoma viral en las células proliferantes y puede contribuir de forma directa en la patofisiología del LHc mediando la sobreexpresión de CCL20 para atraer células T_{reg} [72] y la infraexpresión de PTP-k, que es un gen supresor tumoral [73]. A través de las proteínas de membrana LMP1 y LMP2, el VEB emite dos señales esenciales para la supervivencia de una célula B en el centro germinal. En primer lugar, LMP1 mimetiza al receptor de CD40 activo e induce la activación constitutiva de NF- κ B [74]; además, puede activar la señalización de AP1, p38, PI3K Y JAK/STAT [75]. LMP1 es la única proteína del VEB con capacidad oncogénica demostrada; una de las funciones de esta proteína como oncogén es inducir la sobreexpresión de bcl-2 y A20 y, de este modo, inhibir la apoptosis [76]. En segundo lugar, LMP2 mimetiza a BCR [77]. Así, los precursores de las células B que expresen LMP2 podrán sobrevivir sin el receptor BCR debido a que LMP2 ejerce de sustituto del receptor de células B [78]. Debido a que las señales emitidas a través de BCR y CD40 son unas de las señales más importantes para la supervivencia de las células B de los centros germinales [79], parece que el VEB haya “secuestrado” estas vías para mediar la supervivencia de las células B infectadas por el virus. Además, parece ser que las proteínas LMP1 y LMP2 contribuyen a la pérdida del fenotipo de célula B de las células HRS positivas para el VEB [80, 81].

1.2. Los microRNAs

1.2.1. Historia y características

Los microRNAs (miRNAs) son una familia de RNAs pequeños, de unos 21-25 nucleótidos (nt), que inicialmente se describieron como moléculas que inhiben la expresión génica por la unión a la región UTR3' de su gen diana, donde se encuentra la secuencia complementaria, y de este modo bloquean su traducción a proteína. Estas pequeñas moléculas de RNA no codificante juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes relacionados con diferentes procesos biológicos como el desarrollo, la diferenciación, el ciclo celular y el metabolismo; con patologías humanas como la diabetes y los síndromes inmuno y neurodegenerativos; y con el cáncer [82].

Inicialmente, los miRNAs fueron descritos como RNAs pequeños temporales (stRNAs) importantes para el desarrollo de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) [83]. El hallazgo lo hizo el grupo de Víctor Ambros en 1993 al observar que *lin-4*, un gen que participa en el control del desarrollo post-embrionario de *C. elegans*, no codificaba para proteína. Identificaron dos transcritos de *lin-4*, de 22 y 61 nt, este último con estructura en forma de *stem-loop* y vieron que estos transcritos presentaban secuencias complementarias a la región UTR3' del RNA mensajero (mRNA) de *lin-14*, sugiriendo que *lin-4* regula la traducción de *lin-14* con interacciones RNA-RNA antisentido [84]. Los dos transcritos que hallaron se corresponden al precursor de miRNA (pre-miRNA) y al miRNA maduro. En ese momento no se hallaron homólogos de *lin-4* en otras especies y se creyó que se trataba de un mecanismo de regulación exclusivo de nemátodos.

No fue hasta el año 2000 que se encontró el segundo miRNA, *let-7*, también en *C. elegans* [85]. Igual que *lin-4*, *let-7* participa en el control del desarrollo post-embrionario de *C. elegans* pero en una etapa diferente. *Lin-4* controla el desarrollo temprano de la larva, el paso del primer al segundo estadio larvario, mientras que *let-7* actúa en el desarrollo tardío, es decir, el paso de larva a forma adulta. A raíz de este descubrimiento, mediante bioinformática se encontraron homólogos de estas

moléculas en otros organismos, incluidos los mamíferos, donde también controlan el desarrollo y se expresan de forma temporal [86].

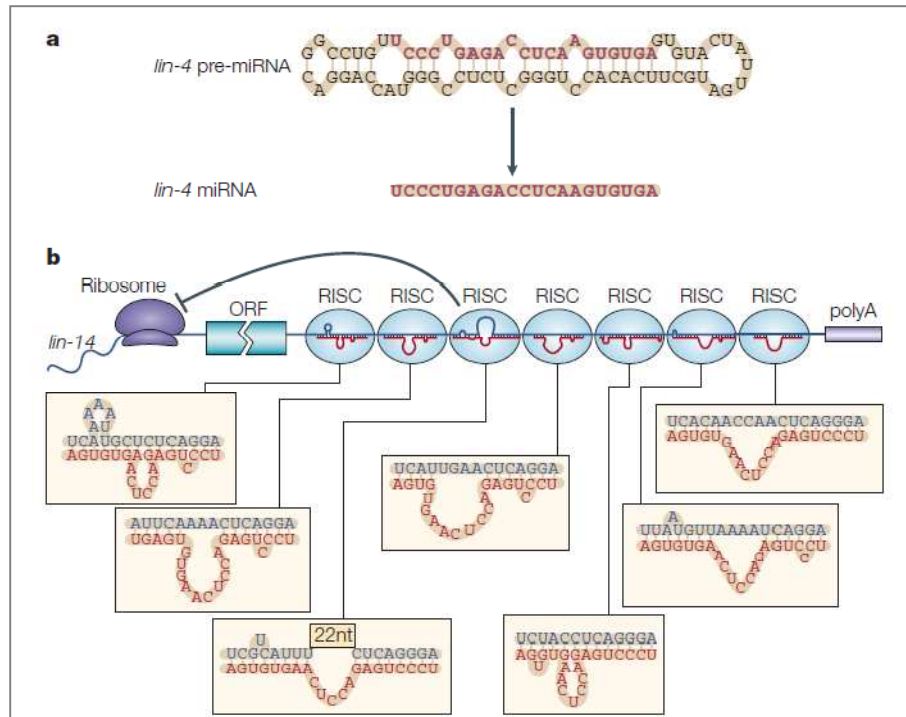


Figura 8. Características moleculares de *lin-4*: (a) Secuencias del precursor y el miRNA maduro de *lin-4*. (b) Complementariedad entre las secuencias de *lin-4* (rojo) y de la región UTR3' del mRNA de *lin-14* (azul); como vemos en la imagen, *lin-4* es parcialmente complementario a 7 regiones distintas de la región UTR3' de *lin-14* (He L *et al*; *Nat Rev Genetics* 2004).

A partir del descubrimiento de los primeros miembros de la familia de los miRNAs, el hallazgo de estas pequeñas moléculas reguladoras ha ido creciendo de forma exponencial a lo largo de los años. El último recuento de la base de datos encargada del registro de los miRNAs, miRBase (<http://www.mirbase.org>), realizado en setiembre de 2010 (versión 16), presenta 15.172 entradas correspondientes a precursores de miRNAs que dan lugar a 17.341 miRNA maduros en 142 especies. Además, debido a su papel en el desarrollo embrionario, pronto se les relacionó con la tumorigénesis y des

de su descubrimiento se han publicado cerca de 3.000 trabajos que relacionan a los miRNAs y al cáncer [87-92].

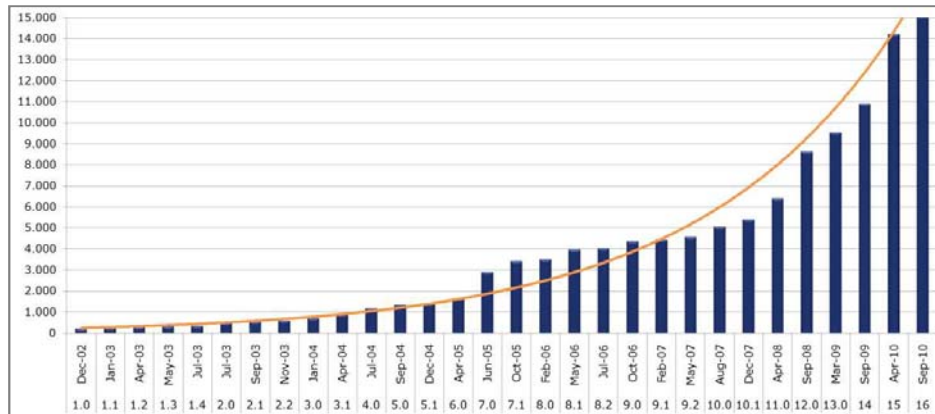


Figura 9. Evolución del descubrimiento de los miRNAs según miRBase, desde diciembre de 2002, cuando se hizo su primera actualización, hasta setiembre de 2010, la 16ª actualización.

1.2.2. Biogénesis

Aproximadamente un 1-5% de los genes que se expresan en humanos codifican para miRNAs [93]. La mayoría de los genes que codifican para los miRNAs (90%) se encuentran en regiones intrónicas de genes que codifican para proteínas; aunque también podemos localizarlos, en menor proporción, en regiones exónicas o intergénicas [94, 95]. Las secuencias de estos miRNAs están muy conservadas en las distintas especies y, a menudo, los miRNAs se organizan en clusters o en tándem [96].

La síntesis de los miRNAs tiene lugar en el núcleo celular y su maduración se da en el citoplasma, donde estas moléculas ejercen su función. Los miRNAs, igual que la mayoría de los genes, son transcritos por acción de la RNA polimerasa II [97, 98], que da lugar a una molécula compleja conocida como miRNA primario (pri-miRNA), que contiene una estructura en forma de "stem-loop"; este pri-miRNA puede contener la secuencia de uno o más miRNAs. A continuación, la endonucleasa Drosha procesa el pri-miRNA, cortando la estructura en "stem-loop", y se forma el precursor del miRNA

(pre-miRNA), una molécula de unos 70 nucleótidos (nt) [99]. Los extremos cortados, supuestamente, son eliminados en el núcleo. La proteína Drosha, para realizar este corte, necesita un cofactor que en humanos recibe el nombre de DGCR8; estas dos moléculas forman un complejo de unos 650 kDa que se conoce con el nombre de complejo microprocesador [100, 101].

El pre-miRNA necesita ser transportado al citoplasma celular para finalizar su proceso de maduración. Este transporte está mediado por la Exportina 5 (XPO5), un receptor de transporte nuclear dependiente de RAN-GTP [102, 103]. Algunos estudios han demostrado que cuando se inhibe a la XPO5, por acción de los RNA de interferencia (RNAi), disminuye la presencia de miRNAs maduros; sin embargo no vemos acumulación de pre-miRNA en el núcleo. Esto sugiere que los pre-miRNAs podrían ser moléculas inestables y su interacción con XPO5 podría estabilizarlos [104]. Una vez en el citoplasma, los pre-miRNAs son procesados por el complejo Dicer-TRBP para formar un miRNA dúplex de unos 22 nt [105, 106]. Las dos cadenas del miRNA dúplex se separan: una de ellas será el miRNA maduro y la otra será destruida. El miRNA maduro se incorpora en un complejo efector, RISC, para poder ejercer su función [107]. El complejo RISC cuando actúa sobre los miRNAs se conoce como miRISC y, en humanos, está formado por Dicer, TRBP, AGO2 y PACT. El miRNA maduro guía al complejo catalítico miRISC hacia su mRNA diana para unirse a la región UTR3' del mensajero y, en la mayoría de los casos, bloquear su traducción.

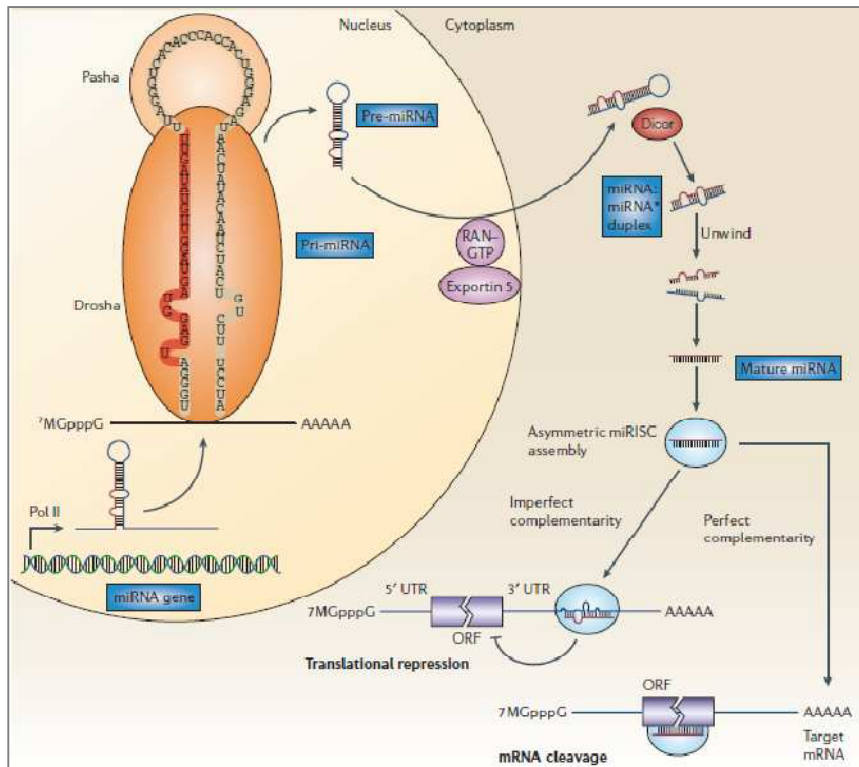


Figura 10. Biogénesis de los miRNAs (Esquela-Kerscher A. *et al*; Nat Rev Cancer 2006).

1.2.3. Mecanismos de acción

El principal papel, y quizá el más conocido, de los miRNAs es regular la traducción génica de forma negativa. Esta regulación se puede dar de dos maneras distintas: degradando el mRNA diana o inhibiendo su traducción de forma temporal. El uso de un mecanismo o del otro dependerá del grado de complementariedad del miRNA con su mRNA diana. Así, si la complementariedad es total, el miRNA llevará a cabo la degradación del mRNA; esto suele ir sujeto a que la unión se realiza concretamente en el ORF (*open reading frame*) mas que en la región UTR3'. Sin embargo, si la complementariedad es parcial se inhibirá la traducción. Independientemente del mecanismo utilizado, el resultado final será una reducción de los niveles totales de proteína [108]. Teniendo en cuenta la elevada complementariedad necesaria para la degradación del mRNA y el bajo grado de complementariedad observado en humanos, el mecanismo de represión de la traducción es el más frecuente en humanos [109]. La acción cooperante de más de un complejo RISC dirigido por la unión al miRNA maduro

con la secuencia del mRNA hace que la inhibición sea más eficiente [110]. Este hecho explica la presencia en el gen diana de múltiples zonas complementarias a un miRNA o a varios.

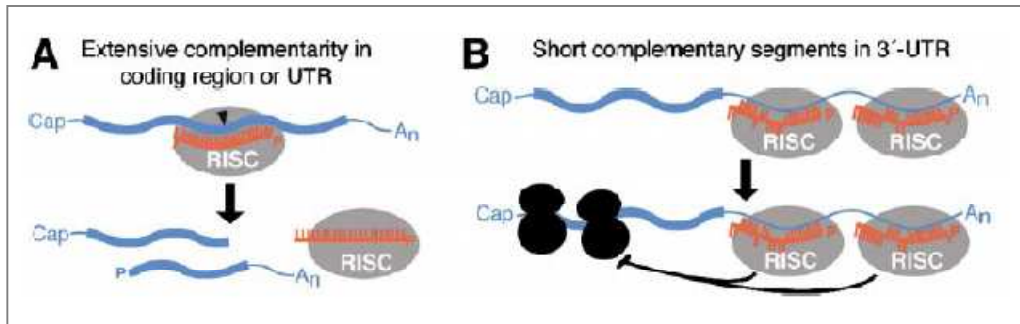


Figura 11. Inhibición de la traducción mediada por los miRNAs en diferentes mecanismos. A) Degradación del mRNA (la flecha en negro nos indica el punto de rotura). B) Inhibición temporal de la traducción del mRNA (Bartel DP. *Cell* 2004).

Generalmente, para la degradación del mRNA, la complementariedad puede darse tanto en regiones codificantes como en regiones UTR3' de el mRNA. Después de la degradación del mensajero, el miRNA permanece intacto y puede guiar al complejo RISC hacia otros mRNAs. Sin embargo, cuando el miRNA actúa inhibiendo la traducción, la complementariedad en la mayoría de los casos se da con la región UTR3' del mRNA.

Existen algunas excepciones en las que el miRNA se une a la región UTR5' del mensajero; en la mayoría de estos casos el miRNA tiene una función activadora [111, 112]. Un ejemplo de esta función activadora es el caso de miR-10a. Este miRNA se une a la región UTR5' del mRNA que codifica para la proteína ribosomal y activa su traducción [112]. Además, los miRNA también pueden ejercer esta función activadora uniéndose a la región UTR3' del mRNA; como en el caso de miR-369-3. Este miRNA activa la traducción uniéndose a los AREs, que son secuencias muy conservadas ricas en AU localizadas en la región UTR3' de los mRNAs. Las secuencias ARE, igual que los miRNAs, controlan la expresión génica post-transcripcionalmente [113]. En el

momento de la detención del ciclo celular, el ARE del mRNA de TNF α se convierte en una señal de activación de la traducción y recluta a las proteínas AGO y FXR1, que son factores asociados con las micro-ribonucleoproteínas (microRNPs). La función de miR-369-3 en este contexto es dirigir la asociación de estas proteína con los AREs para activar la traducción [113].

Como hemos visto hasta ahora la complementariedad del miRNA con el mRNA mensajero es clave para la represión de la traducción. La especificidad de la función del miRNA sobre su diana depende de la complementariedad entre las posiciones 2-8 de la región UTR5' del miRNA, conocida como "*seed sequence*" (secuencia semilla), y la región UTR3' del mRNA diana. Por esta razón, un mismo miRNA puede actuar sobre muchas zonas UTR3' diferentes. Debido a que la complementariedad de un gen diana con su miRNA es de unos pocos nucleótidos, podemos encontrar diferentes tipos de secuencias diana según las estructuras secundarias que se forman fruto de esta complementariedad parcial. Concretamente, existen tres tipos de región diana:

1. "**Canonical sites**": tienen una complementariedad casi perfecta tanto con el extremo 5' como con el 3' del miRNA; se caracterizan por la aparición de un bulto característico en el centro.
2. "**Dominant seed sites**": presentan una complementariedad perfecta con el extremo 5' del miRNA, que corresponde con la región donde se encuentra la "*seed sequence*", pero la complementariedad con la región 3' es muy pobre.
3. "**Compensatory sites**": presentan una complementariedad muy baja con la región 5' del miRNA, en la "*seed sequence*", pero este desajuste se ve compensado por una complementariedad casi perfecta en la región 3'.

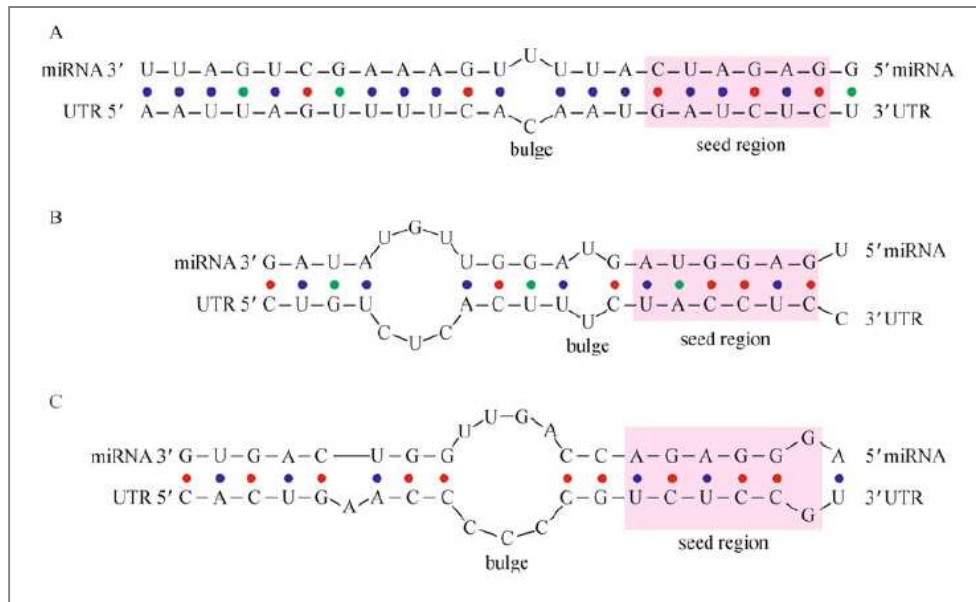


Figura 12. Esquema aproximado de las estructuras secundarias que se forman según las diferentes regiones diana que podemos encontrar; subrayadas en rosa encontramos las secuencias de los miRNAs conocidas como “*seed sequence*”. A) Canonical sites. B) Dominant seed sites. C) Compensatory sites (Huang Y. *et al*; *Protein & Cell* 2010).

Además de ser reguladores, tanto positivos como negativos, de la traducción, los miRNAs presentan otra función que consiste en unirse a proteínas, concretamente a proteínas de unión a RNA, y evitar que estas se unan a sus RNA diana. Esta función de los miRNAs se conoce con el nombre de “*Decoy activity*” y es independiente de RISC [88]. Eiring *et al* describieron esta nueva función al ver que miR-328 se unía a la ribonucleoproteína hnRNP E2 y así evitaba que este se uniera a su mRNA diana para inhibir su traducción [114].

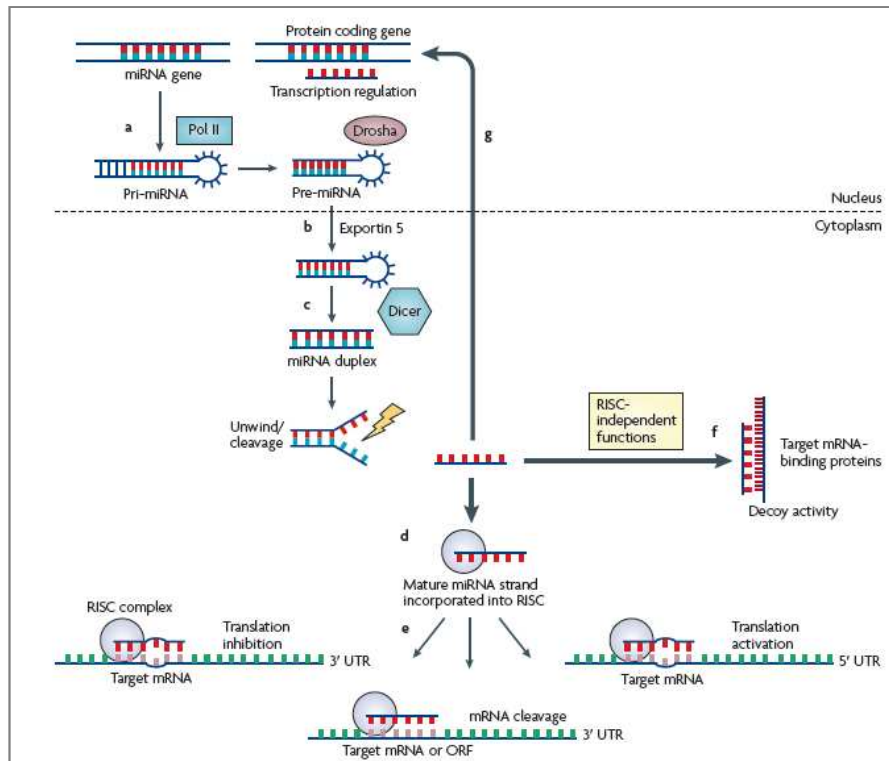


Figura 13. Biogénesis de los miRNAs y mecanismos efectores. A-D) Esquema de los principales pasos de la síntesis de los miRNA. E) Complejo miRISC en sus diferentes funciones (de izquierda a derecha): inhibición de la traducción, degradación del mRNA y, aunque menos frecuente, activación de la traducción. F) “Decoy activity”: es una función de los miRNAs independiente de RISC que inhibe la unión entre un mRNA y una proteína (Garzon R et al; Nat Rev Drug Discovery 2010).

Finalmente, algunos autores han demostrado que los miRNAs también pueden regular la expresión génica a nivel transcripcional uniéndose directamente al DNA [115-117]. Aunque existen al menos tres publicaciones que defienden esta posible función de los miRNAs, hay cierta controversia porque algunos autores piensan que no está totalmente demostrado que el miRNA tenga una implicación directa en esta función [118]. Parece ser que existen diferentes mecanismos a través de los cuales los miRNAs ejercen esta regulación a nivel transcripcional: guiando la formación de la heterocromatina en la región promotora [115] o regulando mecanismos epigenéticos de silenciamiento del DNA [116, 117].

1.2.4. microRNAs en cáncer

La expresión de los miRNA correlaciona con múltiples neoplasias; de hecho se pueden llegar a clasificar distintos tipos de cáncer según los patrones de expresión de los miRNAs [82]. Estas moléculas pueden ejercer la función de supresores de tumor o de oncogenes; a los miRNAs con actividad oncogénica, es decir, que participan en la formación tumoral se les conoce como “oncomirs” [119]. Aquellos miRNA normalmente infraexpresados en cáncer, que actúan inhibiendo oncogenes, son los miRNA supresores tumorales; mientras que los miRNA habitualmente sobreexpresados en tejido tumoral, que normalmente inhiben genes supresores de tumor, son los que tienen función oncogénica [120]. Aproximadamente un 50 % de los genes que codifican para miRNAs en humanos están localizados en áreas del genoma asociadas con el cáncer, estas zonas se denominan regiones frágiles [121]. Esto indica que los miRNAs pueden ejercer una función crucial para la progresión tumoral.

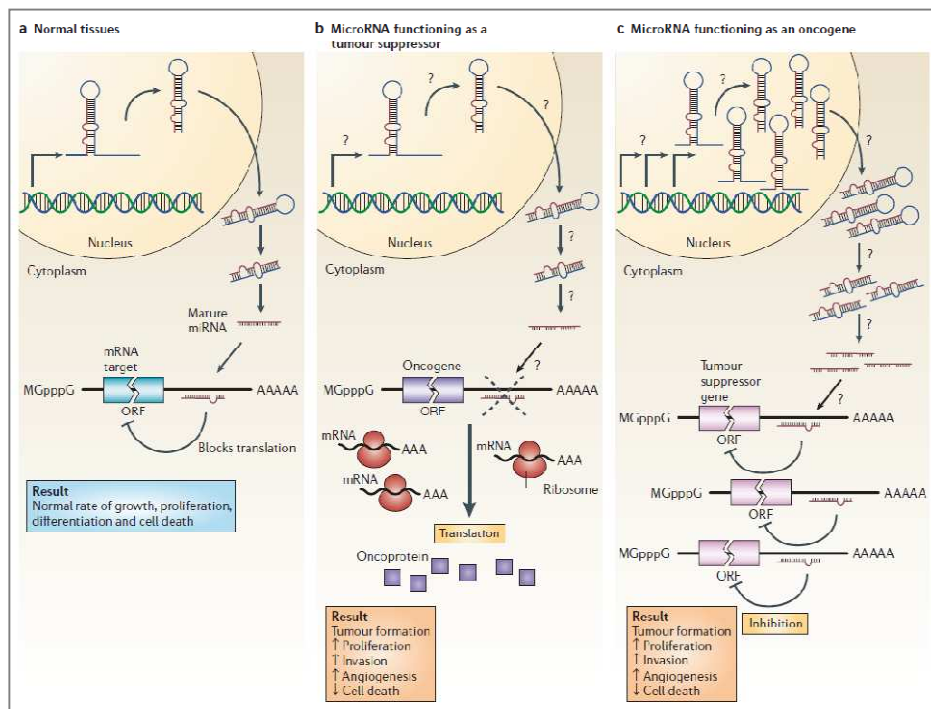


Figura 14. Los miRNAs como oncogenes o genes supresores de tumor: A) Función de los miRNA en tejido normal; B) Función de los miRNA como supresores tumorales; C) Función de los miRNAs como oncogenes (Esquela-Kerscher A. *et al*; *Nat Rev Cancer* 2006).

Dada la involucración de los miRNAs en tipos específicos de cáncer, encontramos diferentes miRNAs que están sobreexpresados o infraexpresados en distintas neoplasias humanas, tanto en tumores sólidos como en neoplasias hematológicas.

1.2.4.1. Regulación de los miRNAs

En general, todos los mecanismos que pueden alterar la expresión de un gen pueden afectar a la expresión de los miRNAs. Así, en los genes que codifican para miRNAs podemos detectar alteraciones genómicas que provoquen:

- 1. Pérdida de función del miRNA:** alteración que mayoritariamente sufren los miRNAs con actividad supresora de tumor. Esta pérdida de función puede darse por:
 - Mutaciones
 - Deleciones
 - Metilaciones en la zona promotora del gen
 - Cualquier alteración en la biogénesis del miRNA.

La pérdida de función de estos miRNAs puede dar lugar a una expresión anómala del gen diana que normalmente contribuye a la formación del tumor mediante la activación de la proliferación, la invasión y la angiogénesis y la disminución de la apoptosis.

- 2. Sobreexpresión del miRNA:** este fenómeno se da principalmente en los oncomirs. El aumento de los niveles de miRNA puede ser debido a:
 - Amplificaciones
 - Translocaciones
 - Mutaciones o polimorfismos.

La sobreexpresión de estos miRNAs provoca la disminución de los genes supresores de tumor y esto contribuye también a la formación del tumor a través de mecanismos similares a los detallados en el punto anterior.

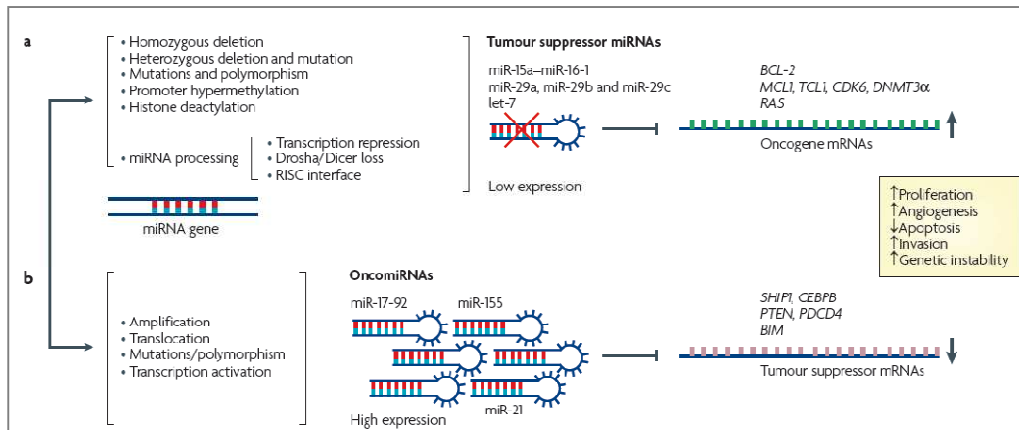


Figura 15. Regulación de los miRNAs con actividad supresora de tumor y oncogénica (Garzon R. et al; Nat Rev Drug Discovery 2010)

1.2.4.2. miRNAs supresores de tumor

La pérdida de función de los miRNAs, como hemos visto, se debe a distintos mecanismos, como por ejemplo las deleciones. En más del 50% de los casos de leucemia linfocítica crónica (LLC) encontramos una deleción en la región 13q14.3 [122], que es donde se localizan los miRNAs miR-15a y miR-16-1 [123] y, como consecuencia de la deleción, estos miRNAs están delecionados o infraexpresados en esta neoplasia. Su papel como supresores de tumor quedó evidenciado al ver que BCL-2, gen antiapoptótico que está sobreexpresado en LLC, es una de sus dianas [124]; entonces, niveles bajos o inexistentes de miR-15a y miR-16-1 permiten la expresión de BCL-2.

Otro miRNA infraexpresado en muchos tumores es let-7 debido a que el gen que codifica para este miRNA está localizado en regiones frágiles del genoma asociadas con cáncer de pulmón, mama y cervix [121]. En condiciones normales, let-7 inhibe a los oncogenes Ras [125, 126], HMGA2 [127] y c-myc [128] e induce apoptosis y bloqueo del ciclo celular cuando se sobreexpresa en líneas celulares de cáncer de pulmón, de colon y de linfoma de Burkitt [125, 127, 128].

La familia miR-29, cuyos miembros se organizan en dos clústers, uno en la región 7q32 (miR-29b-1 y miR-29a) y otro en 1q23 (miR-29b-2 y miR-29c), también presenta función supresora de tumor. La región 7q32 se encuentra frecuentemente delecionada

en mielodisplasia y leucemia mieloide aguda (LMA) asociadas a tratamiento [129]. Estos miRNAs están infraexpresados en LLC, LMA, colangiocarcinoma y cáncer de pulmón y de mama [130-134].

La disminución de la transcripción por una reducción de la actividad de los factores de transcripción es uno de los mecanismos que producen una disminución en la expresión de los miRNAs. Es el caso de la familia miR-34 (miR-34a, miR-34b y miR-34c) cuya transcripción esta directamente inducida por el supresor tumoral p53, que se encuentra infraexpresado o mutado en muchos tumores dando lugar a una infraexpresión de estos miRNAs [135, 136]. En un trabajo realizado por nuestro grupo se describió a miR-34a como marcador pronóstico de recaída en cáncer de pulmón de célula no pequeña [137].

Finalmente, otro miRNA con actividad supresora de tumor es miR-26a cuya expresión es muy baja en cáncer de hígado [138].

1.2.4.3. Oncomirs

La lista de miRNAs que funcionan como oncogenes (oncomirs) es relativamente corta, pero su papel en la oncología es más que evidente. Uno de los primeros fue miR-155 que está integrado en BIC (*B cell integration cluster*) y localizado en la región cromosómica 21q23 [139]. miR-155 se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama [132], de colon [140] y de pulmón [134], en linfomas [141, 142] y en leucemias [130, 131, 143]. Se conoce muy poco sobre la regulación de miR-155/BIC y el mecanismo por el cual este se ve sobreexpresado en cáncer. Sin embargo, si se conoce la habilidad de BIC para cooperar con c-myc en oncogénesis. En un estudio con fibroblastos de embrión de pollo se vio que la coexpresión de c-myc y BIC activaba el crecimiento celular [139].

Existen también evidencias que miR-21 actúa como un oncogén. En primer lugar porque está sobreexpresado en distintos tipos de cáncer, tanto en tumores sólidos [144-146], como en neoplasias hematológicas [130, 131, 143]. En segundo lugar porque la sobreexpresión de este miRNA en células de glioblastoma provoca un

bloqueo de la apoptosis [147]. Sin embargo, la inhibición de su expresión en células de cáncer de hígado, glioblastoma y cáncer de mama conlleva una inhibición de la proliferación y un aumento de la muerte celular [145, 147, 148], gracias a la expresión de genes supresores de tumor como PTEN [145], PDCD4 [148] y TPM1 [149].

El clúster miR-17-92, que comprende seis miRNAs (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92-1), se localiza en 13q31.3, región frecuentemente amplificada en linfoma folicular y linfoma difuso de célula B [150]. A parte de jugar un papel muy importante en el desarrollo del pulmón y en la regulación de los sistemas inmunitario y hematopoyético, los miembros de este clúster están sobreexpresados en muchos tumores sólidos y neoplasias hematológicas [146, 151-153]. Estos miRNAs activan la proliferación, inhiben la apoptosis e inducen la angiogénesis en el tumor. El clúster miR-17-92 es transactivado por el oncogén c-myc, frecuentemente activado en cáncer [154].

Finalmente, otros miRNAs con papel oncogénico son miR-372 y miR-373, que se han visto sobreexpresados en tumores testiculares de células germinales [155] y en cáncer de mama [132]. Estos miRNAs inducen proliferación y tumorigénesis en células primarias humanas.

miRNA	LOCALIZACIÓN GENÓMICA	EXPRESIÓN EN PACIENTES	FUNCIÓN	TARGETS
miR-15a miR-16-1	13q31	Baja en LLC, cáncer de próstata y adenomas de pituitaria	ST	BCL-2, MCL1
Let-7a-2	11q24	Baja en cáncer de pulmón, colon, mama, ovario y estómago	ST	KRAS, NRAS, CDK6, CDC25A, HMGA2, MYC
miR-29b-1 miR-29a miR-29b-2 miR-29c	7q32 1q30	Baja en LMA (NPM1 wt), LLC, cáncer de pulmón y mama, colangiocarcinoma, linfomas, hepatocarcinoma y rabdomiosarcoma	ST	MCL1, CDK6, TCL1, DNMT1, DNMT3 α , DNMT3 β
miR-34a miR-34b miR-34c	1p36 11q23	Baja en cáncer de colon, pulmón, mama, riñón y vejiga, neuroblastoma y líneas celulares de melanoma	ST	CDK4, CDK6, CCNE2, CCND1, MET, MYC, CREB, E2F3, BCL-2
miR-26a	3p22	Baja en cáncer de hígado	ST	CCND2, CCNE2
miR-155	21q21	Elevada en LLC de riesgo elevado, LMA, cáncer de colon, pulmón y mama y linfomas	OG	SHIP1, CEBPB
miR-17-92	13q22	Elevada en cáncer de pulmón, mama, colon y estómago, mieloma y LMA t(11q23)	OG	BIM, PTEN, CDKN1A
miR-21	17q23	Elevada en cáncer de páncreas, mama, pulmón, próstata y estomago, LLC, LMA, mieloma y glioblastoma	OG	PDCD4, PTEN, TPM1
miR-372 miR-373	19q13	Elevada en cáncer de mama y tumores testiculares de línea germinal	OG	LATS2

Tabla 3. Principales miRNAs involucrados en el cáncer. ST: supresor tumoral; OG: oncogen.

1.2.4.4. miRNAs en el linfoma de Hodgkin

El LH es una enfermedad muy poco frecuente, como hemos visto los pacientes de LH corresponden al 1% del total de pacientes afectados por cáncer. Por este motivo es una de las neoplasias en la que menos grupos de investigación trabajan; aun así, existen varios trabajos que proponen una serie de miRNAs que están relacionados con el LH [142, 156-159].

El primer trabajo que relacionó miRNAs y LH fue uno del grupo de van den Berg quemostró la sobreexpresión de miR-155 y de su pri-miRNA, BIC, en el LH, en el linfoma primario de mediastino y en el linfoma difuso de célula B [142].

El primer trabajo que describe un patrón de miRNAs característico del LH identificó una firma de 25 miRNAs que permiten diferenciar entre ganglios que provienen de pacientes con LHc y ganglios reactivos [156]. Se analizaron ganglios de 49 pacientes de LHc y 10 ganglios reactivos y, posteriormente los resultados fueron validados en una serie de 30 pacientes de LHc, 5 ganglios reactivos y 3 líneas celulares de LHc. El análisis mediante *hierarchical cluster* mostró 3 grupos muy bien definidos según la expresión de los 157 miRNAs analizados: los ganglios de pacientes del subtipo EN, los ganglios de pacientes del subtipo CM y los ganglios reactivos.

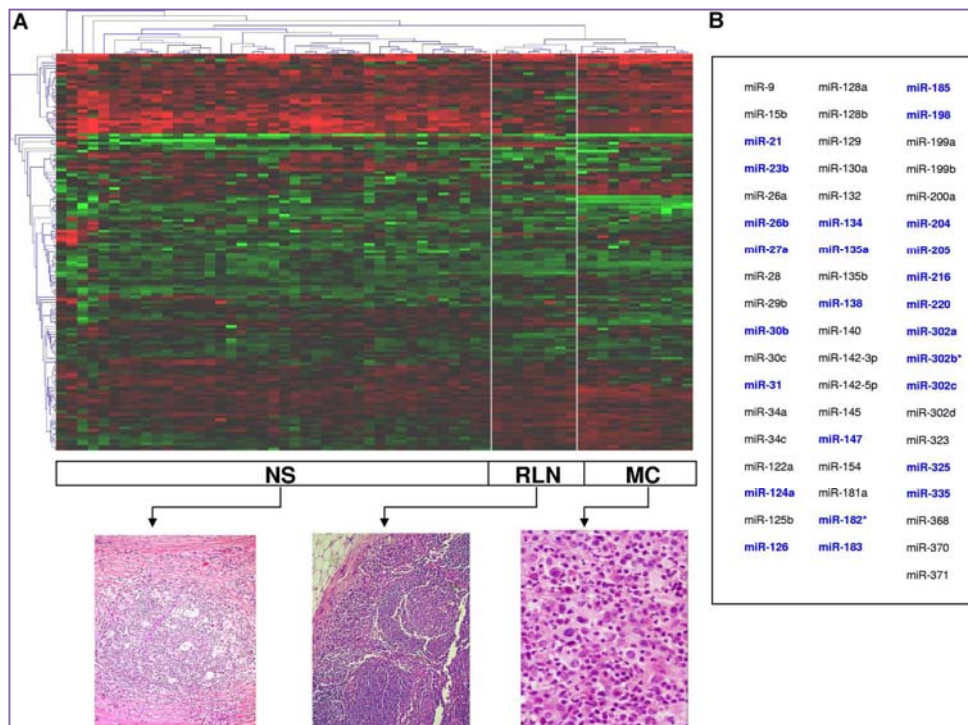


Figura 16. Patrón de expresión de miRNAs en el LHc: A) *Hierarchical cluster* que define los 3 subgrupos según la expresión de miRNAs; B) En azul, la firma de los 25 miRNAs que permiten diferenciar el LHc de los ganglios reactivos (Navarro A. *et al*; *Blood* 2008).

También se describió otra firma de 36 miRNAs diferencialmente expresados entre los dos subtipos histológicos analizados: EN y CM. Además, se encontraron cinco miRNAs infraexpresados en los casos de LHc que eran positivos para el VEB, miR-96, miR-128a,

miR-128b, miR-129 y miR-205. A su vez, también se detectó otro grupo de miRNAs que se encuentran sobreexpresados en estos casos: miR-28, miR-130b, miR-132, miR-140 y miR-330.

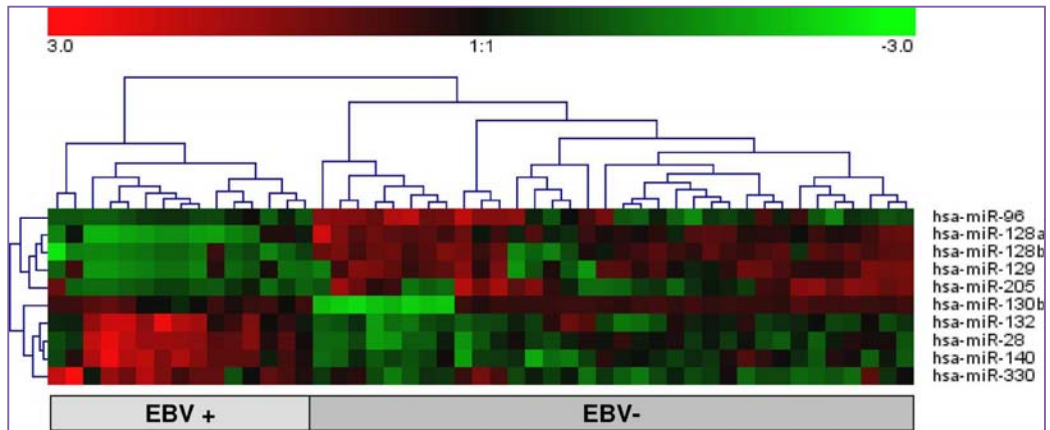


Figura 17. miRNAs diferencialmente expresados entre los casos de LHC positivos y negativos para en VEB (Navarro A. *et al*; Blood 2008).

En este mismo trabajo, se identificaron mediante hibridación in situ tres miRNAs que se encuentran sobreexpresados de forma específica en las células HRS: miR-21, miR-134 y miR-138.

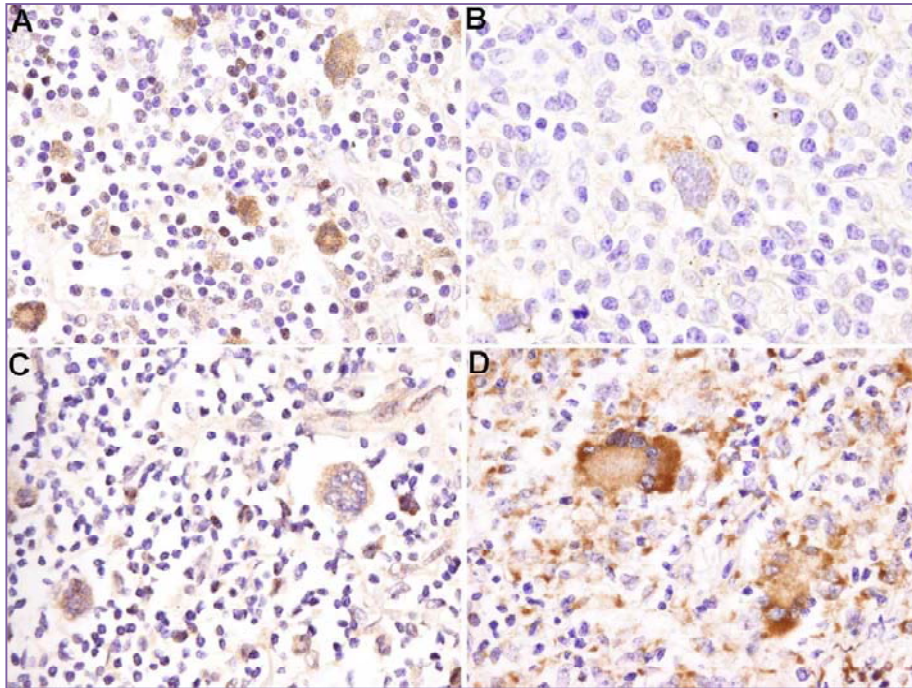


Figura 18. Hibridaciones *in situ* en ganglios de pacientes de LHc donde se puede ver la expresión de los miRNAs en el citoplasma de las células HRS. A) miR-21; B) miR-134; C) miR-138; D) miR-155, que fue usado como control positivo (Navarro A. *et al*; *Blood* 2008).

Otros grupos han descrito miRNAs relacionados con el LHc, tanto en pacientes [142, 159], como en líneas celulares [158], como en células HRS microdisecadas procedentes de pacientes con LHc [157]. A continuación se encuentra una tabla resumen de los miRNAs relacionados con la enfermedad según algunos de estos trabajos.

miRNA	RELACIÓN	REFERENCIA	AÑO
hsa-let-7a	Causal	MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas.	2008
hsa-miR-135a	Causal	Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classical Hodgkin lymphoma.	2009
hsa-miR-140	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-155	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-155	Indeterminada	BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas.	2005
hsa-miR-16	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-186	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-18a	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-196a	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-200a	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-20a	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-21	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma.	2009 2008

hsa-miR-30a-5p	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-30b	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-374	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-520a	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-614	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-9	Indeterminada	Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77 B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.	2009
hsa-miR-9	Causal	MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas.	2008
hsa-miR-134	Indeterminada	MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma	2008
hsa-miR-138	Indeterminada	MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma	2008

Tabla 4. miRNAs con expresión alterada en el linfoma de Hodgkin clásico (obtenido de www.mir2disease.org con pequeñas modificaciones).

1.2.5. Dianas de los microRNAs

El desarrollo de métodos para identificar y validar las dianas de los miRNAs puede ser de gran importancia para el estudio de las funciones de los miRNAs y los distintos procesos biológicos en los que están implicados. Actualmente, se han desarrollado varios algoritmos bioinformáticos efectivos para la predicción de dianas de los miRNAs. La predicción de dianas es un proceso complejo debido a que la complementariedad

de la mayoría de los miRNAs con su secuencia diana es parcial; solo un pequeño grupo presenta una complementariedad perfecta.

Existen diferentes criterios a tener en cuenta para predecir las dianas de los miRNAs:

1. La secuencia del miRNA es complementaria a la región UTR3' del mRNA diana putativo. La fuerte unión que existe entre los ocho primeros pares de bases de la región 5' del miRNA maduro (*seed sequence*) y la secuencia UTR3' del mRNA es muy importante para la predicción; mientras que las uniones G:U reducen la eficacia de silenciamiento que el miRNA ejerce sobre el mRNA diana [160]. A parte de la región UTR3', existen algunos casos de complementariedad en la región UTR5' o en regiones codificantes [161-163].
2. Las propiedades termodinámicas del dúplex miRNA-mRNA se valoran calculando la energía libre (ΔG) de la unión. Cuanto más baja sea la energía libre de las dos cadenas de RNA unidas, más energía será necesaria para separar al dúplex. Así, un dúplex de RNA es más estable cuando la energía libre es baja, que se traduce en una unión fuerte entre el miRNA y el mRNA [164].
3. Las secuencias diana de los miRNAs están muy conservadas entre las distintas especies [165]. La predicción de zonas de unión conservadas en varias especies reduce, en cierto modo, el número de falsos positivos.

Se han desarrollado varios métodos para la predicción computacional de dianas, que utilizan aproximaciones y utensilios distintos para realizar la predicción. Los programas más usados están resumidos en la tabla siguiente.

PROGRAMA	ORGANISMO	PÁGINA WEB	REFERENCIA
miRanda	Mosca, humano	www.microrna.org/	Enright et al., 2003
TargetScan	Vertebrados	genes.mit.edu/targetscan/	Lewis et al., 2003
DIANA-microT	Vertebrados	diana.pcbi.upenn.edu/DIANA-microT/	Kiriakidou et al., 2004
RNAhybrid	Mosca	bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/google/	Gerlach et al., 2006
RNA22	Nematodos, moscas y vertebrados	cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html	Miranda et al., 2006
TargetBoost	Nematodos y moscas	demo1.interagon.com/demo/	Saetrom et al., 2006
PicTar	Nematodos, moscas y vertebrados	htpictar.bio.nyu.edu/	Grun et al., 2005; Krek et al., 2005; Lall et al., 2006
MicroInspector	Cualquiera	imbb.forth.gr/microinspector/	Rusinov et al., 2005
EIMMo	Mosca	mirz.unibas.ch/EIMMo3/	Gaidatzis et al., 2007
EMBL	Humano, ratón, mosca, gusano, pez zebra	russell.emblheidelberg.de/miRNAs	Stark et al., 2005
PITA	Humano, ratón, mosca, gusano	genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/	Kertesz et al., 2007
GenMiR++	Relación entre miRNA y perfiles de expresión de mRNA	www.psi.toronto.edu/genmir	Huang et al., 2007
MiTarget	Cualquiera	/cbit.snu.ac.kr/~miTarget/	Kim et al., 2006
MirWIP	Gusano	mirtargets.org	Hammell et al., 2008

Tabla 5. Algoritmos computacionales para la predicción de dianas de los miRNAs.

1.2.6. Aplicaciones terapéuticas

Existen distintas razones por las que sería muy interesante poder aplicar terapias basadas en los miRNA, pero podemos resumirlas en dos hechos principales:

- La expresión de los miRNA se ve alterada en el cáncer.
- El fenotipo canceroso puede cambiar si modificamos la expresión de determinados miRNAs.

Una de las propiedades que hacen atractivos a los miRNAs para ser utilizados como agentes terapéuticos es su capacidad para regular a más de un gen diana, puesto que esta propiedad nos permitiría regular diferentes procesos biológicos a la vez modulando únicamente la expresión de un miRNA. Además, como hemos visto anteriormente, los miRNAs pueden comportarse como oncogenes o genes supresores de tumores. Por esta razón, es importante advertir que según las condiciones en las que se encuentre un mismo miRNA puede tener una función oncogénica o bien la contraria; es el caso por ejemplo del clúster miR-17-92 [154, 166]. Este clúster se encuentra a menudo sobreexpresado en cáncer y en un modelo murino de célula B se demostró que los miRNAs que forman este clúster en cooperación con c-myc aceleran el desarrollo tumoral; además los tumores derivados de células madre hematopoyéticas que expresan el clúster miR-17-92 y c-myc se distinguen por la ausencia de apoptosis [166]. Teniendo en cuenta estos hechos, estos miRNAs presentan actividad oncogénica. Por otro lado, c-myc activa al factor de transcripción E2F1 para promover la progresión del ciclo celular y, a su vez, este factor de transcripción está regulado de forma negativa por dos miRNAs del clúster miR-17-92, miR-17-5p y miR-20a; en este caso el clúster tiene actividad supresora de tumor [154].

Existen, principalmente, dos posibles tipos de estrategias dirigidas a los miRNA en cáncer:

1. Estrategias directas: implican el uso de oligonucleótidos o construcciones víricas para bloquear la expresión de un miRNA oncogénico o para sustituir la pérdida de expresión de un miRNA supresor de tumor.
2. Estrategias indirectas: implican el uso de fármacos para modular la expresión de los miRNAs afectando a su transcripción o procesamiento.

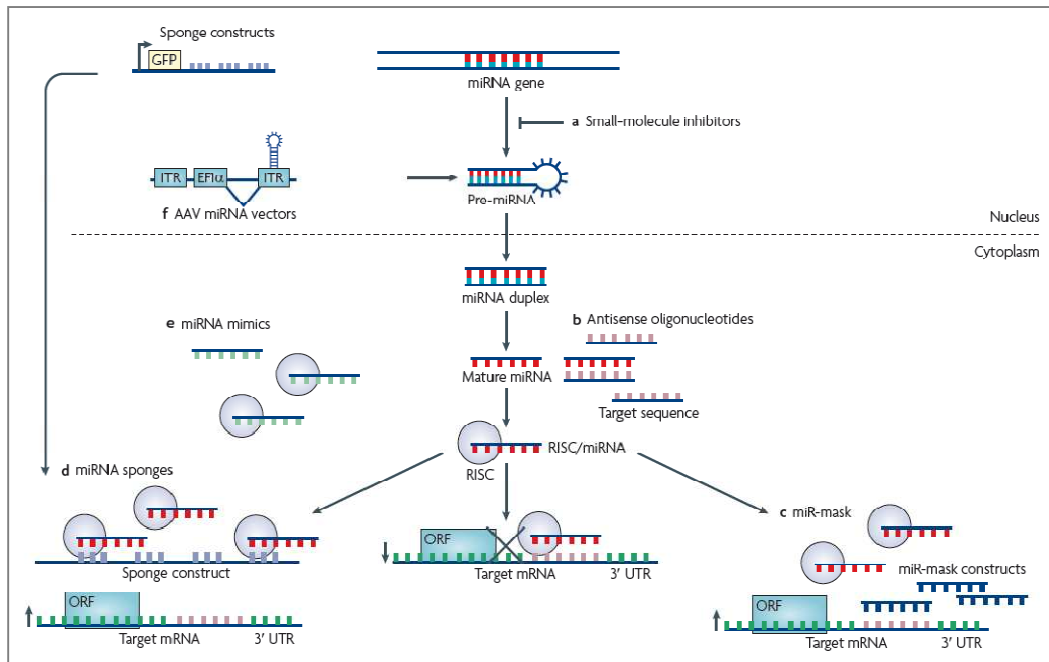


Figura 19. Esquema de las posibles estrategias para desarrollar terapias basadas en los miRNAs: A) Inhibidores que regulan la expresión de los miRNAs a nivel transcripcional; B) Oligonucleótidos antisentido que se unen al miRNA provocando su degradación o la formación de un dúplex; C) “miRNA-mask”: Competidores de miRNA endógenos; D) “miRNA sponge”: absorben a los miRNA endógenos; E) miRNA sintéticos; F) Inserción de genes que codifican para miRNAs usando vectores asociados a adenovirus (Garzon R. et al; Nat Rev Drug Discovery 2010).

En primer lugar, tenemos las estrategias, tanto directas como indirectas, para bloquear a los miRNAs oncogénicos o evitar su expresión; éstas se pueden desarrollar con el uso de:

- a) **Pequeñas moléculas inhibidoras:** fármacos dirigidos a inhibir vías de señalización que activan factores de transcripción que regulan los genes que codifican para miRNA y así modular la expresión de los miRNAs a nivel transcripcional. Estos fármacos inhibidores también pueden focalizarse en modular la maquinaria que regula la maduración y la degradación de los miRNA [167].
- b) **Oligonucleótidos antisentido:** pueden unirse a sus miRNA diana según las normas de complementariedad de Watson y Crick y bloquearlos [168]. Se han

desarrollado distintas construcciones de oligonucleótidos antisentido, entre ellos encontramos:

- a. **Antagomirs**: se pueden sintetizar conjugados con colesterol para inhibir miRNAs endógenos [169]; aunque son muy efectivos según estudios realizados *in vivo* en ratones, pueden resultar tóxicos para los humanos.
- b. **LNA anti-miRs**: son análogos sintéticos de nucleótidos bicíclicos que aumentan significativamente la especificidad hacia el miRNA diana aumentando la temperatura de fusión de los híbridos con los miRNAs [138, 170].
- c) **miRNA-mask**: son oligonucleótidos sintéticos complementarios a la región UTR3' del mRNA diana que compiten con el miRNA endógeno por la diana [171, 172]. Así, el *miR-mask* cubre la zona de unión del miRNA y evita la inhibición del mRNA, de forma que este podrá llevar a cabo la traducción a proteína.
- d) **miRNA sponges**: son también oligonucleótidos sintéticos que presentan múltiples zonas de unión en tándem complementarias al miRNA diana. De modo que cuando se introducen en la célula, estos *miRNA sponges* absorben a los miRNAs diana endógenos reduciendo así sus niveles en la célula [173, 174].

En segundo lugar, tenemos aquellas estrategias cuyo objetivo es restaurar los bajos niveles de expresión del miRNA; esto se puede conseguir con la administración de:

- a) **miRNA mimics**: son oligonucleótidos sintéticos con secuencias idénticas al miRNA que se desee restaurar.
- b) **AAV miRNA vectors**: consiste en insertar el gen que codifica para el miRNA infraexpresado en vectores asociados a adenovirus (AAV). Estos vectores no se integran en el genoma y son eliminados muy eficientemente sin apenas causar toxicidad.

Todas estas estrategias se encuentran aun en fases muy preliminares y, a pesar de las ventajas que ofrecen algunas de ellas, aun tienen grandes limitaciones que solucionar antes de ser aplicadas a los pacientes. En la tabla que hay a continuación encontramos un resumen del estado en el que se encuentran algunas de estas estrategias terapéuticas.

ESTRATEGIA	LIMITACIONES	VENTAJAS	ENSAYOS	SOLUCIONES Y DIRECCIONES FUTURAS
Oligont 2'-O-metil fosforotiolato	Administración; vida media corta en plasma; Respuesta celular pobre; efectos secundarios; efectos biológicos limitados	Seguros; estabilidad mejorada; resistencia a nucleasa; afinidad aumentada	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> ; modelo animal; ensayos clínicos de fase I, II y III	Mejorar la administración
Oligont con esqueleto de colesterol 2'-O-metil fosforotiolato	Toxicidad; necesita dosis elevadas	Buena biodisponibilidad	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (animales)	Mejorar los perfiles de seguridad
LNA (<i>locked nucleic acid</i>)	Efectos secundarios; toxicidad	Seguro; buena biodistribución; efectivo	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (ratones y chimpancés); ensayos en humanos en curso	Estudios detallados en humanos de farmacocinética, farmacodinámica y toxicidad; desarrollar administraciones específicas de tejido
Complejos liposoma-oligonucleotido	Toxicidad; hipersensibilidad; toxicidad	Estabilidad y administración mejoradas	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (animales)	Desarrollar mejores formulaciones
Complejos nanopartícula-oligonucleotido	Efectos secundarios; toxicidad	Estabilidad y administración mejoradas; toxicidad mínima	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (animales)	Desarrollar administraciones específicas de tejido
miR-mask	Alcance limitado (1 diana); administración	Efectos específicos del gen	Ensayos <i>in vitro</i>	Conseguir liberar <i>in vivo</i> ; testar su actividad <i>in vivo</i>
miR sponges	Administración, efectos secundarios	Aptos para silenciar una familia entera de miRNAs	Ensayos <i>in vitro</i>	Conseguir liberar <i>in vivo</i> ; testar su actividad <i>in vivo</i>
AAV que codifican para miRNAs	toxicidad; efectos secundarios	Transducción segura y eficiente; expresión a largo terminio	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (animales); ensayos en humanos para iRNA; ensayos de fase I, II y III	Aumentar experimentación animal (en otros tumores)

Tabla 6. Limitaciones y ventajas de las distintas estrategias directas aplicadas en terapias basadas en los miRNAs.

Otra posibilidad es combinar estrategias para inhibir los miRNAs oncogénicos o restaurar los supresores de tumores con quimioterapia. Existen algunos estudios de combinación de ambas terapias y los resultados, aunque preliminares, son interesantes: la sobreexpresión de miR-21 mejora la respuesta a gemcitabina en células de colangiocarcinoma (cáncer de la vía biliar) [175], mientras que el silenciamiento de miR-98 revierte la resistencia a doxorubicina en tumores hipóxicos refractarios [176].

Finalmente, otra aplicación terapéutica interesante es la administración fármacos que afecten a la expresión de los miRNAs. Un ejemplo es el tratamiento con agentes desmetilantes del DNA (5-aza-2'-deoxicitidina, *Decitabine*) y inhibidores de la histona deacetilasa (ácido 4-fenilbutírico) que provoca la re-expresión de miR-127 de forma específica, normalmente silenciado en células tumorales. Después de la re-activación, miR-127 ejerce su papel como supresor tumoral inhibiendo al oncogén BCL6 [177].

En resumen, los miRNAs tienen un papel prometedor como agentes terapéuticos, ya sea como dianas terapéuticas o bien como propios fármacos, aunque su utilización podría tener implicaciones graves sobre todo en aquellos miRNAs que pueden actuar tanto como oncogenes como genes supresores tumorales. El crecimiento exponencial del número de publicaciones relacionadas con los miRNAs refleja el esfuerzo por aclarar el papel de los miRNAs en el cáncer, y en otras patologías humanas, y justifica el interés en el posible desarrollo de terapias basadas en los miRNAs.

1.3. Via JaK/Stat

La familia de quinasas *Janus kinase* (JAK) se compone de las isoformas JAK1, JAK2, JAK3 y la tirosina quinasa 2 (TYK2). Estas quinasas citoplasmáticas se caracterizan por contener un dominio quinasa y otro pseudoquinasa. La existencia de estos dos dominios en tándem es bastante singular, ya que el dominio pseudoquinasa aunque carece de actividad quinasa, regula la actividad catalítica de autofosforilación. El dominio quinasa comparte las características de otras tirosina quinasas, así la zona catalítica se localiza en una región central y está rodeado por los lados por dos hojas β . Estas fosfotirosina quinasas se expresan en todas las células, excepto JAK3 cuya expresión está restringida a las células hematopoyéticas. Las proteínas JAK median la señalización de citoquinas, hormonas y receptores de factores de crecimiento y la activación de esta vía de señalización es esencial para la supervivencia, la proliferación y la apoptosis mediadas por citoquinas, que tan importantes son en el marco del microambiente característico del LHc.

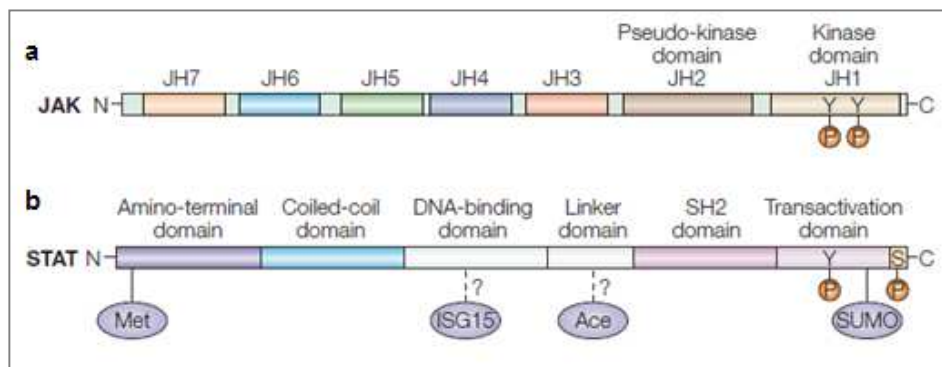


Figura 20. a) Estructura de los dominios de JAK: JH1 es el dominio quinasa que contiene dos tirosinas que pueden ser fosforiladas después de la estimulación del ligando, JH2 es el dominio de la pseudo-quinasa y los dominios JH6 y JH7 median la unión de JAK a los receptores. b) Estructura de los dominios de STAT: su actividad puede ser regulada por modificaciones de la propia proteína como fosforilación de tirosinas o serinas, metilación (Met), sumoilación (SUMO), ISGilación (ISG15) y acetilación (Ace). Las regiones de ISGilación y acetilación aun no se han identificado con exactitud (Shuai K. *et al*; *Nat Rev Immunology* 2003).

Normalmente, existe un solapamiento de las funciones de las distintas proteínas JAK debido a que muchas vías de señalización envuelven a más de un miembro de esta familia, con excepción de algunos factores de crecimiento como la eritropoyetina y la trombopoyetina que únicamente utilizan a JAK2. Así, JAK2 juega su papel principal en vías de señalización de receptores de factores de crecimiento hematopoyéticos que, aparte de la eritropoyetina y la trombopoyetina, incluyen al factor estimulador de colonias de macrófagos, a las interleuquinas IL-3 y IL-5 y a la hormona de crecimiento [178]. Además de participar en la transducción de la señal, JAK2 activa la expresión de receptores de superficie para eritropoyetina [179] y trombopoyetina [180].

JAK1 media la señalización de diferentes citoquinas proinflamatorias, normalmente en asociación con otros miembros de la familia *Janus kinase*.

JAK3, principalmente, actúa en la función inmunitaria transmitiendo la señal generada por la IL-2.

Y, finalmente, Tyk2 parece funcionar siempre asociada con JAK2 y JAK3 para transducir la señal generada por interleuquinas, como IL-12 y IL-23.

En cualquier caso, tras la unión del ligando (citoquina) al receptor, se produce una fosforilación cruzada de moléculas JAK y la consiguiente activación del receptor por fosforilación de tirosina. Estos residuos fosforilados constituyen sitios de unión para unas moléculas transductoras de señal y activadoras de transcripción conocidas como STATs. Las proteínas STAT, que están unidas al receptor, son fosforiladas por las proteínas JAK provocando su dimerización. El dímero formado por las moléculas STAT transloca al núcleo para regular la expresión de sus genes diana.

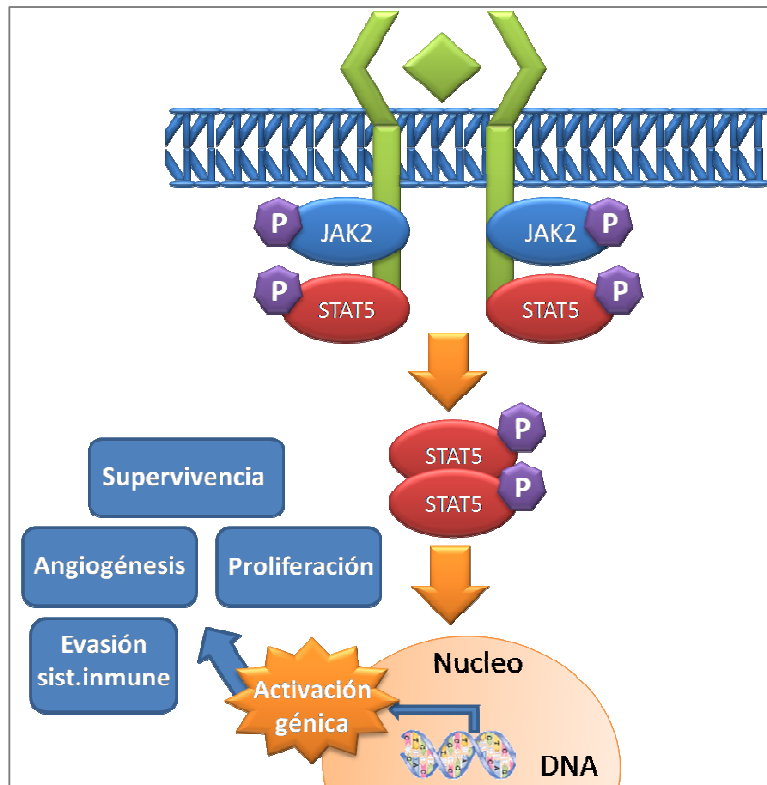


Figura 21. Esquema de la vía de señalización JAK/STAT.

Las alteraciones en las vías de transducción de señal de tirosina quinasas pueden estar asociadas con enfermedades hematológicas; diferentes estudios demuestran que la vía de señalización JAK/STAT se encuentra alterada en distintos tipos de neoplasias hematológicas y esto contribuye a la patogenia de la enfermedad [181-184]. La alteración de la vía de JAK/STAT normalmente representa una activación constitutiva que conlleva:

- Un aumento de la transcripción de genes que afectan al crecimiento, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de células malignas, como c-Myc, ciclina D, Mcl-1 y Bcl-xL.
- Niveles bajos de reguladores negativos de la vía, como SOCS y PTPs.
- Niveles elevados de citoquinas y factores de crecimiento que señalizan a través de la vía.

Se han descrito mutaciones activadoras en diferentes isoformas de la familia JAK en las neoplasias hematológicas; por ejemplo se ha identificado una mutación activadora

en JAK1 en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Los pacientes afectados de LLA con JAK1 mutado presentan una supervivencia libre de enfermedad y una supervivencia global menor que la que presentan los pacientes sin esta mutación [185].

Una de las mutaciones activadoras más relevantes encontradas en la isoforma JAK2 es la mutación JAK2V617F descrita en síndromes mieloproliferativos (SMP), concretamente en mielofibrosis primaria (MFP), policitemia vera (PV) o trombocitemia esencial (TE). Esta mutación se localiza en el dominio pseudoquinasa de la proteína JAK2 y provoca una alteración en la regulación negativa que este dominio ejerce sobre el dominio quinasa de la misma molécula, dando lugar a una activación descontrolada de JAK2. Casi todos los pacientes con PV y más de la mitad de aquellos con TE o MFP presentan la mutación JAK2V617F, aunque la carga alélica es distinta en todos los casos. Esta mutación es la más comúnmente asociada con las SMP, pero no es la única. En la porción de pacientes con SMP que no presentan la mutación JAK2V617F, se han descrito otras mutaciones que también activan de forma anormal a JAK2, como la mutación MPLW515L/Kin en el receptor de MPL o mutaciones en el exón 12 del gen JAK2. Independientemente de la mutación ante la cual nos encontremos, el resultado es una hipersensibilidad a citoquinas hematopoyéticas que provoca alteraciones en la proliferación y la supervivencia de las células afectadas por la mutación.

La frecuente activación constitutiva de la vía JAK/STAT juega un papel muy importante en la proliferación y la patogénesis del LH. Sin embargo, a pesar de las diferentes mutaciones activadoras que se han descrito en el gen JAK2 en la mayoría de SMPs, parece ser que la activación de la vía JAK/STAT en el LH no es debida a mutaciones en el gen JAK2. En estos casos, su expresión constitutiva suele estar asociada a alteraciones citogenéticas [186, 187] o a mutaciones en moléculas reguladoras como SOCS-1.

1.3.1. Inhibidores de Jak2

El descubrimiento de la mutación de JAK2, JAK2V617F, en neoplasias mieloproliferativas despertó el interés en el desarrollo y uso terapéutico de compuestos inhibidores de JAK2. En estos momentos existen varios fármacos con función inhibidora de JAK2 en desarrollo clínico para tratar diferentes SMP [188].

Encontramos dos tipos de inhibidores de JAK2: los de clase I y los de clase II [189].

1. **Inhibidores de clase I:** han sido diseñados basándose en la estructura molecular de JAK2. Este tipo de compuestos inhiben tanto la forma normal como la mutada de esta molécula y, consecuentemente, puede suprimir la hematopoyesis normal, debido a la importancia de JAK2 en este proceso. Para resolver este punto, los esfuerzos se han centrado en encontrar inhibidores alelo específicos de JAK2V617F.
2. **Inhibidores de clase II:** se desarrollaron, inicialmente, para otras indicaciones y la inhibición de JAK2 ha sido un efecto inesperado (*off-target effect*).

Los beneficios clínicos obtenidos hasta la fecha han sido reducción de esplenomegalia, mejorías en la sintomatología constitucional y control de la leucocitosis. Sin embargo, los efectos del fármaco sobre la fibrosis de la médula ósea o la carga alélica de JAK2V617F han sido muy modestos. Aun así los resultados obtenidos sobre el efecto de estos fármacos inhibidores de JAK2 no deben pasar desapercibidos y, al ser resultados aun bastante preliminares, no se debe generalizar ni tomar conclusiones respecto la actividad del fármaco ni la toxicidad que este produce.

COMPUESTO (COMPAÑÍA)	ESTADIO DE DESARROLLO	IC ₅₀ (nM)	NEOPLASIA	BENEFICIOS CLÍNICOS	TOXICIDADES
INCB0184424 (Incyte)	III	4.5	MF (primaria y secundaria), TE y PV	Esplenomegalia, síntomas constitucionales, prurito, caquexia, eritrocitosis (PV)	Trombocitopenia (TDL), anemia, fenómeno de administración de citoquinas
TG101348 (TargetGen)	II	3	MF (primaria y secundaria)	Esplenomegalia, síntomas constitucionales, prurito, leucocitosis, trombocitosis, carga alélica de JAK2V617F	Aumento de amilasa/lipasa (TDL), aumento de transaminasas, diarrea, náuseas/vómito, trombocitopenia, anemia
XL019 (Exelixis)	I (desarrollo detenido)	2	MF (primaria y secundaria)	Esplenomegalia, síntomas constitucionales, leucocitosis	Neuropatía (TDL)
CEP-701 (Cephalon)	I/II	1	MF (primaria y secundaria), TE y PV	Esplenomegalia, anemia, prurito	Diarreas, náuseas/vómito, anemia (MF), trombocitopenia (MF), trombosis (PV/TE), leucocitosis (PV/TE), trombocitosis (PV/TE)
SB1518 (S*Bio)	II	260	MF (primaria y secundaria)	Esplenomegalia	Síntomas gastrointestinales (TDL), diarrea, náuseas, trombocitopenia
Cyt387 (Cytobia)	I/II	18	MF (primaria y secundaria)	En proceso	En proceso

Tabla 7. Inhibidores de JAK2 en desarrollo.

Uno de los inhibidores de JAK2 que se encuentran en desarrollo es Lestaurtinib (CEP-701), un inhibidor de tirosina quinasa con múltiples dianas, que inicialmente se descubrió como un inhibidor de FLT3. En estudios preclínicos, se observó que Lestaurtinib podía inhibir a FLT3 a concentraciones nanomolares; esto permitió el desarrollo del fármaco como tratamiento potencial para la leucemia mieloide aguda

(LMA) [190]. Estudios recientes, han demostrado que la actividad inhibitoria de Lestaurtinib en las SMPs no se limita a FLT3, sino que puede inhibir la señalización de la vía JAK2/STAT5 a través de la inhibición específica de JAK2 [191]. Hexner *et al.* mostraron que Lestaurtinib inhibía la proliferación celular y la señalización de la vía JAK2/STAT5 en células de pacientes de SMPs. Además, observaron que Lestaurtinib podía afectar tanto a la proteína JAK2 normal como a la forma mutada al ver que inhibía la proliferación de la línea celular HEL92.1.7, cuya proliferación depende de la actividad de la proteína JAK2 mutada [191]. Lestaurtinib tiene otras moléculas diana a parte de FLT-3 y JAK2, por ejemplo RET [192].

Casi todos los inhibidores de JAK2 que se han desarrollado hasta el momento se han testado en SMP, como vemos en la tabla superior. Únicamente uno de ellos ha sido testado en el LH, SB1518 (S*Bio), con el que se han hecho ensayos clínicos de fase I en el que se incluyeron pacientes afectados de un linfoma, tanto Hodgkin como no Hodgkin, en recaída. Tras la administración del fármaco estos pacientes presentaban una reducción de los niveles de citoquinas inflamatorias y una inhibición de la vía JAK/STAT. Con la obtención de estos resultados, se iniciaron los ensayos clínicos de fase II y sus resultados aún están por conocer [193, 194].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El linfoma de Hodgkin es una neoplasia de células B caracterizada por la escasa presencia de células tumorales, células de Hodgkin/Reed-Sternberg, localizadas en un microambiente no tumoral. El comportamiento del LH se determina por las características intrínsecas de las células HRS y por las características de las células inflamatorias no neoplásicas del microambiente. Por eso, el análisis del papel pronóstico que juegan los miRNAs en el ganglio completo y no únicamente en las células tumorales adquiere un gran significado.

La vía JAK/STAT es una vía de señalización utilizada por muchas citoquinas. La activación constitutiva de esta vía resulta de gran importancia en la patogénesis del LH. Se han descrito mutaciones puntuales en el gen JAK2 en síndromes mieloproliferativos; sin embargo, estas mutaciones son escasas en el LH, donde el aumento de la proteína JAK2 se asocia a amplificaciones del gen JAK2, mutaciones en genes reguladores como SOCS-1 o a una activación constitutiva de las proteínas STAT. Otro posible mecanismo que podría intervenir en la sobreexpresión de las proteínas JAK2 es la desregulación de miRNAs cuya función sea controlar la traducción de JAK2.

La terapia estándar en LH es a base de antraciclina, con doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbacina (ABVD). A pesar de que el LH está considerado uno de los cánceres humanos más curable, con tasas de curación del 80-90%, el tratamiento de pacientes recaídos o con enfermedad refractaria, especialmente aquellos que recaen después de un autotrasplante de células madre, sigue siendo un reto. La FDA (US Food and Drug Administration) no ha aprobado nuevos tratamientos para el LH en los últimos 30 años. Por consiguiente, se necesitan nuevos fármacos, así como nuevas estrategias de tratamiento basadas en el conocimiento de la biología del LH y las vías de señalización implicadas, para mejorar el pronóstico de los pacientes.

Lestaurtinib (CEP-701) es un inhibidor de tirosina quinasas con múltiples dianas. En estudios pre-clínicos, se ha demostrado que Lestaurtinib inhibe potentemente a FLT3 en concentraciones nanomolares. Por otra parte, estudios recientes han demostrado

que la actividad inhibitoria de Lestaurtinib no se limita a FLT3 y puede suprimir la señalización de JAK2/STAT5 mediante la inhibición específica de JAK2 en SMP; sin embargo la eficiencia de Lestaurtinib en el LH permanece desconocida, aunque podría ser un fármaco de interés debido a las vías moleculares que inhibe, como la vía de JAK2/SAT5 que tan importante es en el LH.

2.2. Objetivos

Basándonos en estas hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar si el patrón de expresión de microRNAs en ganglios linfáticos de pacientes afectados de LH tiene implicaciones pronósticas.
2. Determinar las vías a través de las cuales los miRNAs que actúan como marcadores pronósticos en LH están teniendo un papel clave. De forma específica:
 - a. Determinar si JAK2 es un gen diana de miR-135a.
 - b. Analizar si miR-135a está jugando un papel como gen supresor de tumor en el LH.
3. Analizar posibles acciones terapéuticas basadas en inhibidores de la vía de JAK2 en el LH. Específicamente:
 - a. Evaluar la eficacia *in vitro* de Lestaurtinib (CEP701), un inhibidor de JAK2, en el LH.
 - b. Evaluar la eficacia de Lestaurtinib en células primarias de ganglios de pacientes afectados de LH.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Pacientes

Se han analizado de forma retrospectiva 89 pacientes diagnosticados de LHc entre 1995 y 2005 en el Hospital Clínic Provincial de Barcelona. Las características más relevantes de estos pacientes están detalladas en la tabla contigua:

CARACTERÍSTICAS	N=89	%
Edad media en años (rango)	29 (13-89)	
≥ 45	15	17
Sexo (H/M)	42/47	47/53
Histología		
Esclerosis nodular	70	79
Celularidad mixta	19	21
VEB+	25	28
VIH+	7	8
Sintomatología B	36	40
Masa de Bulky	21	24
Anemia (Hb<10 ⁵ g/L)	16	18
Leucocitosis (≥15x10 ⁹ /L)	12	13
Linfocitopenia (<0.6x10 ⁹ /L o <8% WBC)	10	11
Hipoalbuminemia (<40 g/L)	24	29
LDH elevado (>450 UI/L)	29	33
β-2-microglobulina elevada (>2.5 mg/dL)	15	17
Estadio		
I-II	54	61
III-IV	35	39
Índice Hasenclever ≥ 3*	16	27

* Calculado únicamente en 59 pacientes con enfermedad avanzada (estadios III-IV, sintomatología B o masa de Bulky)

Tabla 8. Características clínicas principales de los pacientes

Además se utilizaron ganglios primarios criopreservados de 4 pacientes de LHc diagnosticados en el Hospital del Mar de Barcelona. Las características más relevantes de dichos ganglios están resumidas en la siguiente tabla:

CARACTERÍSTICA	P1	P2	P3	P4
Edad	24	30	28	43
Sexo	Mujer	Hombre	Hombre	Mujer
Histología	LHc, EN	LHc*	LHc, PL	LHc, EN
EBV	-	-	-	-
CD30	+	+	+	+
CD15	+	+	+	+
CD20	-	-	-	-
Estadio	IIA	IIIA	IIIA	IIA

*En el P2 no se pudo determinar el subtipo histológico debido al bajo grado de infiltración.

Tabla 9. Características clínicas principales de los ganglios.

3.2. Líneas celulares

Hemos trabajado con distintas líneas celulares de LHc pertenecientes a los dos subtipos celulares más frecuentes, todas ellas negativas para el VEB:

- L-428: subtipo esclerosis nodular.
- L-1236: subtipo celularidad mixta.
- HD-MY-Z: subtipo esclerosis nodular.
- L-540: subtipo esclerosis nodular.
- HDLM-2: subtipo esclerosis nodular.

Todas las líneas fueron cultivadas en RPMI 1640 (Invitrogen) con antibiótico (penicilina y estreptomina) y con suero fetal bovino (Invitrogen) al 10%, las líneas L-428, L-1236 y HD-MY-Z, y al 20%, las líneas L-540 y HDLM-2.

3.3. Extracción de RNA

La extracción de RNA de las muestras de parafina de los pacientes se realizó mediante el kit *Recover All Total Nucleic Acid Isolation* (Applied Biosystems-Ambion) siguiendo el protocolo siguiente:

DESPARAFINACIÓN

1. Añadir 1 ml de xilol y vortear.
2. Incubar 3min a 50°C.
3. Centrifugar 2min a máxima velocidad (si no hay pellet centrifugar 2min más).
4. Eliminar el sobrenadante.
5. Lavar el pellet con 1 ml de etanol 100% y vortear.
6. Centrifugar a 14.000rpm 2'.
7. Eliminar el sobrenadante.
8. Incubar durante 10-15min con el tubo abierto.

} x2

DIGESTIÓN CON PROTEASA

9. Añadir 400µl de Digestión Buffer.
10. Añadir 4µl de proteasa y vortear.
11. Incubar durante 3 horas en el baño a 50°C.

AI SLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

12. Pasarlo a un tubo de 2ml.
13. Añadir 480µl de *Isolation Additive* y vortear.
14. Añadir 1.1 ml de etanol 100% y pipetear cuidadosamente.
15. Poner 700µl de la muestra en una columna.
16. Centrifugar a 10.000rpm durante 30-60 segundos.
17. Descartar el líquido del tubo colector.
18. Lavado con 700µl de *Wash 1*.
19. Centrifugar a 10.000rpm durante 30 segundos.
20. Descartar el líquido del tubo colector.
21. Lavar con 500µl de *Wash 2/3*.
22. Centrifugar a 10.000rpm durante 30 segundos.
23. Descartar el líquido del tubo colector.
24. Centrifugar la columna vacía a 10.000rpm durante 30 segundos.
25. Pasar la columna a un tubo nuevo.

} Hasta finalizar la muestra

DIGESTIÓN CON LA NUCLEASA Y PURIFICACIÓN

26. Preparar mezcla para tantas muestras como haya:

- 6µl 10X *Dnasa Buffer*
- 4µl *Dnasa*
- 50µl *Nucleasa-free water*

27. Añadir 60µl de la mezcla a la columna.

28. Dejar incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

29. Añadir 700µl de *Wash 1*.

30. Incubar 30-60s a temperatura ambiente.

31. Centrifugar 30s a 10.000rpm.

32. Descartar el líquido del tubo colector.

33. Lavar con 500µl de *Wash 2/3*.

34. Centrifugar 30s a 10.000rpm

35. Descartar el líquido del tubo colector.

} x2

36. Volver a centrifugar 1min a 10.000rpm.

37. Pasar la columna a un *eppendorf* de 1,5ml

38. Añadir 30µl de *Elution Solution* (precalentada a 95°C)

39. Dejar un minuto a temperatura ambiente.

40. Centrifugar un minuto a máxima velocidad.

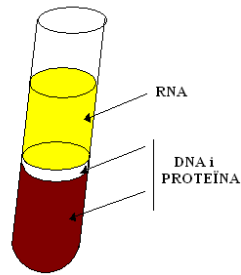
41. Repetir esta elución otra vez.

42. Descartar la columna.

43. Volumen final de 60µl.

El RNA de las líneas celulares se obtuvo con la técnica del Trizol (Invitrogen) según el siguiente protocolo:

1. Añadir 1ml de Trizol a cada muestra.
2. Homogeneizar la suspensión con una jeringuilla (unas 20 resuspensiones).
3. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
5. Añadir 0,2ml de cloroformo.
6. Agitar fuerte durante 15s.
7. Incubar el tubo 15min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 12.000g 15min a 4°C para separar las tres fases.



9. Aislar la fase incolora (amarillenta), fase del RNA, en un *ependorf* nuevo de 1,5ml.
10. Precipitar el RNA: añadir 0,5ml de isopropanol.
11. Invertir el tubo varias veces para mezclar bien.
12. Incubar la muestra 1-2h a 4°C.
13. Centrifugar la muestra a 12.000g 10min a 4°C.
14. Descartar el sobrenadante.
15. Añadir 1ml de Etanol 75% y vortear.
16. Centrifugar la muestra a 7500g 5min a 4°C.
17. Descartar el sobrenadante.
18. Dejar secar el exceso de etanol.
19. Resuspender el pellet de RNA en unos 50µl de agua DEPC.
20. Incubar 10min a 55°C.

3.4. Cuantificación de microRNAs

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total utilizando primers específicos para los miRNAs con el kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems). Para esta reacción se utilizaron 10ng de RNA total, 50nM de los primers de RT en stem-loop, 1X RT Buffer, 0.25mM de dNTPs, 3.33U/µl de transcriptasa reversa MultiScribe y 0.25U/µl de RNasa Inhibitor. Las reacciones se incubaron en el termociclador AB 9500 a 16° durante 30min, 42° durante 5min y 85° durante 5min.

Posteriormente, se realizó una PCR a tiempo real en el equipo Applied Biosystems 7500 Real Sequence Detection, donde se incubaron 10µl que incluían 0.7µl de producto de RT, 1X TaqMan Universal PCR master mix y 1µl de mezcla de primers y sonda del kit TaqMan MicroRNA Assay protocol. Las reacciones se incubaron en una placa óptica de 96 pocillos a 95° durante 10min, seguidos de 40 ciclos de 95° durante 15s y 60° durante 1min. Se utilizó el miRNA RNU6B como control endógeno.

3.5. Transfección

Las líneas celulares L-428 y L-1236 fueron transfectadas con 50nM y 100nM de pre-miR-135a y pre-miR control negativo (Applied Biosystems/Ambion) mediante nucleofección (Amaxa Biosystems) utilizando la solución L y el programa X-001, en el caso de L-428, y la solución V y el programa T-001, para L-1236, siguiendo el protocolo siguiente:

1. Precalentar a 37°C una alícuota de medio de cultivo (500 µl/muestra).
2. Precalentar las soluciones V y/o L a temperatura ambiente.
3. En una placa de 12 pocillos: añadir 1ml de medio a tantos pocillos como muestras tengamos y preincubar la placa a 37°C.
4. Contar las células y separar 1×10^6 células/experimento.
5. Centrifugar las células 10min a 90g.
6. Descartar completamente el sobrenadante.
7. Preparar una mezcla con la solución V o L y el *Supplement*. Por experimento:
 - 16,362 µl de *Supplement*
 - 73,638 µl de Solución V o L } 90 µl/experimento
8. A cada tubo, añadir el pre-miR-135a o el pre-miR control negativo.
9. Resuspender el pellet de células con la preparación anterior (mezcla + pre-miRNA).
10. Pasar la muestra a una cubeta de AMAXA vigilando que no salgan burbujas.
11. Poner la cubeta en el equipo (AMAXA) y seleccionar el programa adecuado:
 - Solución L: programa X-01
 - Solución V: programa T-01
12. Añadir 500 µl de medio precalentado a cada muestra. Entre los puntos 9 y 12 el tiempo máximo que puede transcurrir son 15min.
13. Pasar la muestra a la placa de 12 pocillos previamente preparada.
14. Incubar las células a 37°C i 5% de CO₂.

La línea celular HD-MY-Z fue transfectada con Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo los siguientes pasos:

1. Cultivar las células en medio sin antibiótico (RPMI, 10% FBS) en una placa de 12 pocillos y dejar toda la noche. Las células tienen que estar en una confluencia del 50% en el momento de la transfección.
2. Para cada muestra/experimento preparar los reactivos de la siguiente manera:
 - Diluir el pre-miRNA en 50µl de Opti-MEM.

- Mezclar 1µl de *Lipofectamine 2000* y 50µl de Opti-MEM e incubar la mezcla durante 5min a temperatura ambiente.
 - Tras la incubación, mezclar las dos composiciones e incubar 20min a temperatura ambiente.
3. Añadir la mezcla anterior a los pocillos que contienen las células e incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 24-96horas.
 4. A las 4-6horas de la transfección, cambiar el medio por uno con antibiótico.

3.6. Tratamiento con Lestaurtinib (CEP-701)

Las 5 líneas celulares fueron tratadas con Lestaurtinib (CEP-701, Sigma-Aldrich) o DMSO (Sigma-Aldrich), como control negativo. Para los análisis de proliferación y apoptosis se plaquearon, en una placa de 96 pocillos, 1×10^5 células/pocillo y fueron cultivadas en medio que contenía Lestaurtinib o DMSO a 30, 50, 70, 100, 150, 200 o 300 nM, haciendo tres réplicas de cada concentración. Para los análisis de proteína (Western Blot) se plaquearon $1,5 \times 10^6$ células/pocillo en una placa de 12 pocillos y se cultivaron en medio con 30, 100 o 300 nM de Lestaurtinib o 300nM de DMSO.

3.7. Análisis de proliferación

El crecimiento celular se determinó por dos métodos diferentes. En primer lugar, se realizó un conteo celular en una cámara de *Neubauer* a las 72 horas de la transfección con los pre-miRNAs.

En segundo lugar, la proliferación se determinó de forma indirecta con el kit *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS) (Promega), que es un método colorimétrico para determinar el número de células viables. El MTS es bio-reducido por las células a un componente de color, el formazán, que es soluble en el medio de cultivo. Esta conversión la realiza los NADPH o NADH producidos por las enzimas deshidrogenasas de las células metabólicamente activas.

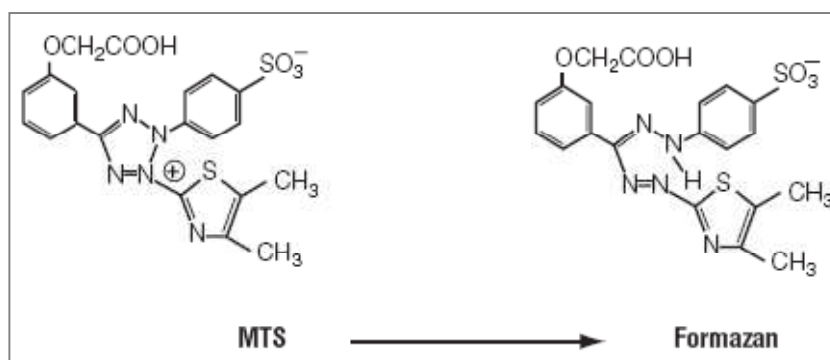


Figura 22. Estructuras moleculares del MTS y de su producto, el formazán.

Esta técnica se realizó de la siguiente manera:

1. Descongelar el reactivo durante 10min en un baño con agua a 37°C.
2. Dispensar 20µl del reactivo por cada 100µl de medio de cultivo.
3. Incubar la placa en un incubador a 37°C y 5% CO₂ durante 30-60min, vigilando que el reactivo no llegue a la saturación.
4. Transcurrido el tiempo necesario para cada línea celular, leer la absorbancia a 490nm en un espectrofotómetro.

La cantidad de Formazán producido, que es lo que se mide con la absorbancia a 490nm, es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas, es decir, vivas en cultivo.

3.8. Análisis de apoptosis

Los análisis de apoptosis se realizaron con el kit *CaspaseGlo 3/7 Assay* (Promega). Se trata de un ensayo luminiscente que mide la actividad de las caspasas 3 y 7, que son proteínas efectoras con un papel clave en la apoptosis.

Al añadir el reactivo *Caspasa-Glo 3/7* a las células, se provoca una lisis celular que conlleva a la unión de las caspasas al sustrato añadido generando una señal luminiscente producida por la luciferasa.

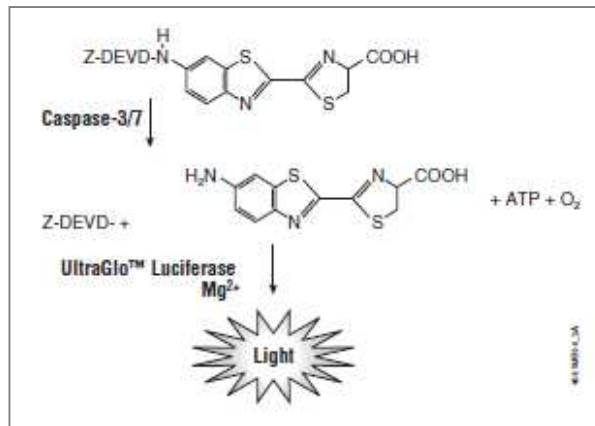


Figura 23. Unión de caspasa 3/7 al sustrato luminiscente que contiene una secuencia DEVD.

Esta técnica se realiza siguiendo el protocolo adjunto:

1. Preparar el reactivo mezclando el buffer con el sustrato de caspasa liofilizado, ambos proporcionados por el kit.
2. Añadir 100µl del reactivo por cada 100µl de medio de cultivo.
3. Mezclar bien en un agitador durante 30 segundos.
4. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 1h, protegida de la luz.
5. Medir la luminiscencia en un luminómetro.

La cantidad de luminiscencia producida por las células es proporcional a la actividad caspasa que presentan las células dándonos una medida aproximada de la apoptosis.

3.9. Técnica Renila/Luciferasa para validación de dianas de microRNAs

Dos oligonucleótidos sintéticos de 48 pb, que contienen de 5' a 3': el extremo cohesivo de XhoI (5 pb), un fragmento de la UTR3' del gen JAK2 que contiene la secuencia diana para la unión de miR-135 (35 pb), la zona de restricción BglII (6 pb) y el extremo cohesivo de NotI (2 pb), se clonaron en el vector psiCheck2 (Promega) a UTR3' del gen de la Renila luciferasa.

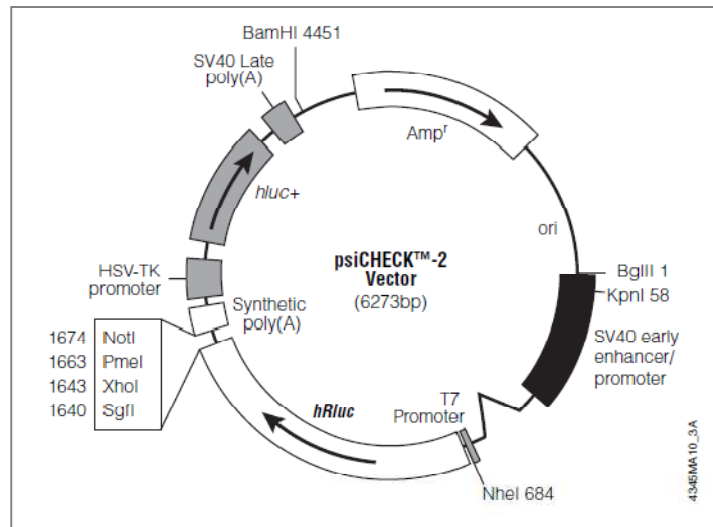


Figura 24. Mapa del vector psiCheck 2.

Los dos oligonucleótidos (*sense*: 5'-TCG AG TC ATG AAC TAA ATT TAA GCT TAA GCC ATA AAA TAG AGA TCT GC-3 'y *antisense*: 5'-GGC CGCAGA TCT CTA TTT TAT GGC TTA AGC TTA AAT TTA GTT CAT GA C-3 ') fueron incubados con el tampón Tris (100 mM Tris HCl, pH 7,5, NaCl 1 M, 10 mM EDTA) a 95 ° C durante 5 minutos, seguido de una reducción gradual de la temperatura hasta llegar a temperatura ambiente. El vector psiCheck2 fue linealizado mediante la digestión con NotI y XhoI (New England Biolab) y purificado a partir de un gel de agarosa. Los oligonucleótidos se ligaron, utilizando la T4 ADN ligasa (New England Biolab), al vector por las regiones de clonación NotI y XhoI situadas en *downstream* del gen *reporter* Renilla luciferasa. El vector obtenido se transformó en las células competentes TOP10F' de Escherichia coli (Invitrogen). Los clones positivos fueron seleccionados mediante la digestión con BglII y se confirmaron por secuenciación.

Las líneas celulares, L-428, L-1236 y HD-MY-Z, fueron transfectadas con 0,2 μ g del vector psiCheck2 modificado, que contiene el inserto, y con 500 nM de pre-miR-135 o de pre-miR control negativo. La actividad relincha luciferasa y Firefly luciferase se midió a las 48 horas después de la transfección con el sistema *Promega Dual luciferase reporter assay* (Promega) en un luminómetro. Se utilizó como control negativo un vector psiCheck2 vacío y la eficiencia de transfección se normalizó con el gen Firefly luciferasa.

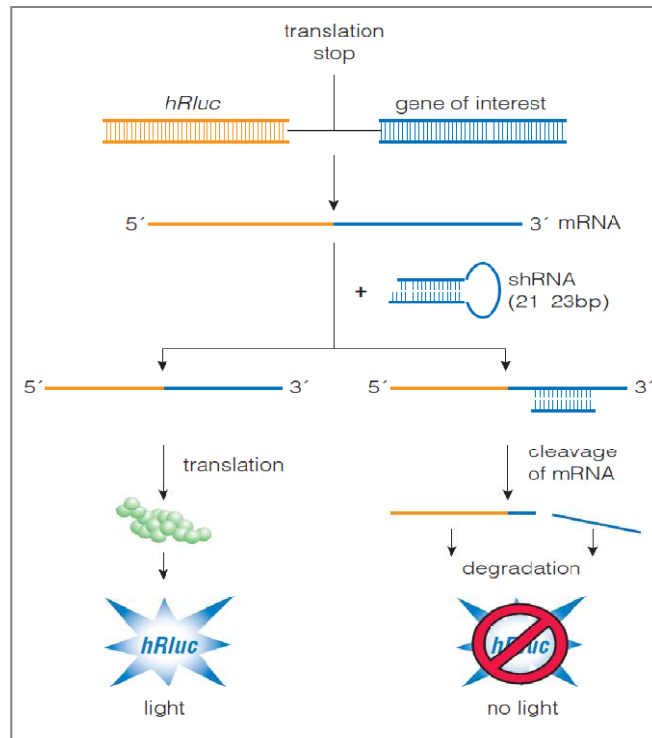


Figura 25. Mecanismo de acción de los vectores siCheck.

3.10. Western Blot

La proteína total fue aislada de las células utilizando el kit *Qiagen Qproteome mammalian Protein prep* (Qiagen) según el protocolo que se detalla a continuación. Cantidades iguales de proteínas (50 µg) fueron separadas por electroforesis en geles SDS-poliacrilamida al 10% Tris-HCl y transferidas a membranas de nitrocelulosa (BioRad). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos contra JAK3 (Abcam), JAK2 (Upstate), JAK2-P (Tyr1007/1008), STAT5-P (Tyr694) y STAT3-P (Tyr705) (Cell signalling), STAT5, STAT3 y Bcl-xL (Santa Cruz Biotechnology) y α -tubulina (Sigma) como control. Para el revelado de las membranas, la quimioluminiscencia fue detectada utilizando *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce Biotechnology) y leída en *Chemidoc System* (Bio-Rad). La densidad de las bandas de proteína se cuantificó utilizando el programa Quantity One v 4.2.6, y la cuantificación relativa se calculó en referencia a la señal de α -tubulina. A continuación encontramos el protocolo con más detalle:

EXTRACCIÓN PROTEÍNA TEJIDO

1. Triturar muy bien el tejido con el tampón de lisis (80-100 μ l)
2. Dejar en hielo 30min, como mínimo, vorteando cada 5min.
3. Centrifugar a 14.000rpm a 4°C durante 15min.
4. Recoger el sobrenadante.

CUANTIFICACIÓN

5. Hacer recta Standard con BSA 1mg/ml:

0 μ l + 800 μ l H₂O

1 μ l + 799 μ l H₂O

2,5 μ l + 797,5 μ l H₂O

5 μ l + 795 μ l H₂O

7,5 μ l + 792,5 μ l H₂O

10 μ l + 790 μ l H₂O

15 μ l + 785 μ l H₂O

20 μ l + 780 μ l H₂O

6. Añadimos 798 μ l H₂O + 2 μ l de cada muestra en sus respectivos tubos por duplicado.
7. Preparar un "blanco" con tampón de extracción + H₂O. Para eliminar el fondo inespecífico
8. Añadimos a todos los tubitos 200 μ l de Bradford.
9. Vortear.
10. Dejar 20-30 min a temperatura ambiente tapado con papel de plata.
11. Leer en espectrofotómetro a 595nm.
12. Calcular la concentración usando la recta estándar.

CARGAR GEL

13. Tenemos que cargar unos 50 μ g de muestra.
14. En el momento de preparar las muestras se ha de añadir al tampón de carga DTT en una proporción DTT 1:4 SB5X.
15. Antes de cargar las muestras desnaturalizar 5 min a 96-100°C
16. Cargamos 8 μ l del marcador de peso molecular y todo el volumen que tenemos de las muestras.

ELECTROFORESIS

17. La electroforesis se pondrá a 40mA en el caso que trabajemos con dos geles o a 20mA, si únicamente tenemos uno.
18. Preparar tampón de transferencia y ponerlo en hielo (ha de estar en frío, nevera).
19. Al terminar la carrera poner rápidamente el gel en tampón de transferencia para evitar que difundan las proteínas.

TRANSFERENCIA

20. Hidratar membrana con H₂O.
21. Poner la membrana en tampón de transferencia.
22. Remojarlo todo con tampón de transferencia antes de montar.
23. Hacer el montaje siguiente:
24. Hacer la transferencia en frío a 300mA, en agitación, durante 3 horas.

BLOQUEO

24. Bloquear las membranas con leche en polvo desnatada disuelta en TBS-T al 5% (5g en 100ml) y poner a agitar en el agitador durante 1h mínimo.

INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO

25. Diluir el anticuerpo, normalmente, en leche en polvo + TBS-T (5%); en algunos casos la dilución se debe hacer con BSA. el factor de dilución dependerá de cada anticuerpo.
26. Incubar el anticuerpo en agitación durante toda la noche, si es necesario a 4°C
27. Hacer 3 lavados, en agitación, de 10min a las membranas con TBS-T.

INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO

28. Diluir el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa alcalina en leche en polvo + TBS-T (5%).
29. Incubar el anticuerpo en agitación durante toda la noche, si es necesario a 4°C
30. Hacer 3 lavados, en agitación, de 10min a las membranas con TBS-T.
31. Incubar en agitación unas 2 horas.
32. Lavar las membranas 2 veces durante 10min con TBS-T.
33. Hacer un último lavado de 10min con TBS.

REVELADO

34. Incubar las membranas con el reactivo de revelado de 1-5min.
35. Secar el exceso de líquido de las membranas con papel de filtro.
36. Realizar la lectura

TAMPONES NECESARIOS PARA EL WESTERN

1-TAMPÓN DE CÀRGA SB5X (Vf=10ml):

- Sacarosa (50%)----- 5g
- Tris Base(50mM) ----- 60mg
- EDTA (5mM) ----- 0.1mL (500mM)
- SDS 5% -----2.5mL (20%)
- Azul de Bromofenol 0.005% ----500µg

2-TAMPÓN DE LISIS (Tampón TRIS-TRITÁ):

- TRIS HCl pH 7.5 (20mM) -----0.1ml
- NaCl (150mM)-----0.15ml
- TRITÓ 1%-----0.05ml
- Inhibidor de Proteasas ----- 0.05ml (No poner hasta el momento de uso)

3-TAMPÓN DE ELECTROFORESIS (Vf=1l):

- TRIS BASE (25mM)-----3.03g
- Glicina (192mM)-----14.4g
- SDS 0.1%-----5ml (20%)

Añadir H2O bidestilada hasta 1 litro.

4-TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 10X (Vf=1l):

- TRIS BASE (250Mm)-----30.285gr
- Glicina (1.92M) -----144.134gr

Añadir H2O bidestilada hasta 1 litro.

5-TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 1X (Vf=1l):

- Tampón de transferencia 10X (Biorad)-----100ml
- Metanol -----200ml

Añadir H2O bidestilada hasta 1 litro.

6-TBS (Vf=1l):

- TRIS HCl pH 7.5 (1M) -----20ml
- NaCl (5M) -----30ml

Añadir H2O bidestilada hasta 1 litro.

7-TBST

- TBS + 0.05% Tween-20

3.11. Análisis de los niveles de mRNA mediante RT-PCR

El cDNA total se sintetizó a partir del RNA extraído utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit* (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo del fabricante. La reacción de la polimerasa se llevó a cabo utilizando los siguientes primers para Bcl-xL: 5'-ATGTCTCAGAGCAACCGGGAG-3' y 5'-TTCCGACTGAAGAGTGAGC-3'.

3.12. Análisis de los niveles de mRNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real

El cDNA total se sintetizó a partir del RNA extraído utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit* (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo del fabricante. La reacción PCR a tiempo real se realizó mediante el kit *TaqMan Gene Expression assays* (Applied Biosystems) para Bcl-xL (Hs99999146_m1) y GUSB (Hs99999908_m1); este último fue usado como control endógeno.

3.13. Análisis de ganglios primarios

Setecientas cincuenta mil células procedentes de muestras criopreservadas de ganglios primarios de pacientes afectados de LHC se cultivaron durante 24h con medio que contenía Lestaurtinib a 300 nM o DMSO. En el momento de descongelación, la viabilidad celular en todos los casos era superior al 85% según el análisis realizado mediante la tinción con TripanBlue (Invitrogen). Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron teñidas con CD40-PE-Cy5, CD95-Pacific Blue, CD30-PE, CD3-APC-Cy7 y FITC *Annexin V* (BD Bioscience y Biolegend). Con el fin de obtener un conteo más preciso, se añadió el mismo número de *CountBright absolute counting beads* (Invitrogen) a cada muestra. El recuento de células viables de HRS se realizó por citometría de flujo en el equipo FACS CANTO II (BD); en el que se adquirieron 200.000 eventos. Finalmente, los resultados se analizaron con el software FACS Diva (BD) donde las células de HRS se identificaron por la expresión de CD30, CD-40 y CD-95 y la ausencia de CD3.

3.14. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando *BRB Array Tools*, SPSS 14.0 (Chicago, IL) y el software de R v.2.6.0. El método *Class Comparison* y la *t* de Student (con random variance model) fueron utilizadas para analizar las diferencias entre los grupos. Las tasas de recaída y de supervivencia libre de enfermedad se analizaron utilizando la

herramienta de Análisis de Supervivencia de *BRB Array Tools*. La expresión de miR-135a fue dicotomizada utilizando el paquete de R, *maxstat*, y se realizaron las curvas de supervivencia con el método de Kaplan-Meier. El sexo, la edad (≥ 45 Años vs <45 Años), la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, la extensión de la enfermedad (limitada vs avanzada) y los niveles de expresión de miR-135a (bajo vs elevado) se incluyeron en el análisis multivariado de regresión de Cox de la supervivencia libre de enfermedad. Los gráficos de proliferación y apoptosis se realizaron en el programa *GraphPad Prism 5* y se muestran como media \pm SEM de tres réplicas independientes.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma

Alfons Navarro, **Tania Díaz**, Antonio Martinez, Anna Gaya, Aina
Pons, Bernat Gel, Carles Codony, Gerardo Ferrer, Carmen
Martinez, Emili Montserrat, Mariano Monzo

Blood, 2009

4.1. Resumen artículo 1

Regulación de JAK2 por miR-135a: impacto pronóstico en el linfoma de Hodgkin clásico

El comportamiento del LHc está determinado por las características intrínsecas de las células tumorales y por las características del infiltrado celular que forma el microambiente tumoral; por eso es de gran importancia analizar el ganglio al completo para llegar a entender esta enfermedad.

En un trabajo anterior publicado por nuestro grupo [156], se encontró una firma de 25 miRNAs que caracterizaba al LHc, permitiendo diferenciarlo de los ganglios reactivos. Posteriormente, analizamos la posible influencia de este patrón de miRNAs sobre las características clínicas de 89 pacientes afectados de un LHc, tratados de forma homogénea y con una media de seguimiento de 80 meses. Únicamente uno de los 25 miRNAs de la firma presentó una correlación con la clínica de los pacientes, el miRNA miR-135a. Aquellos pacientes con bajos niveles de expresión de miR-135a presentaban una mayor probabilidad de recaída ($p=0.04$) y una supervivencia libre de enfermedad más corta ($p=0.02$).

Los estudios funcionales realizados en la línea celular de LHc, L-428, mostraron que los niveles de miR-135a maduro aumentaban tras transfectar las células con un pre-miR-135a, dando lugar a la activación de la apoptosis de las células y a una disminución de la proliferación celular.

A continuación se realizó un análisis de posibles dianas de este miRNA, con el objetivo de identificar el mecanismo de acción que se traducía en un efecto pronóstico. Estos análisis mostraron una regulación directa de miR-135a sobre JAK2, una tirosina quinasa citoplasmática involucrada en vías de señalización activadas por receptores de varias citoquinas. Asimismo, la inhibición de JAK2 mediada por miR-135a provocaba una disminución de los niveles de fosforilación de su molécula “*downstream*” en la vía, STAT5, provocando una disminución de los niveles de expresión del gen antiapoptótico Bcl-xL, cuya transcripción se activa mediante la unión al DNA del dímero STAT5-P. Estos resultados sugieren que la apoptosis observada en las células de la línea de LHc, L-428,

se debe a la regulación que ejerce sobre JAK2 el miR-135a. Estos resultados, fueron confirmados en otras dos líneas celulares de LHC: L-1236 y HD-MY-Z. Además, la inhibición de miR-135a sobre JAK2 se da de forma específica, ya que los niveles de JAK3, otro miembro de la familia JAK, también fueron analizados y no presentaban diferencias significativas entre las células transfectadas con el pre-miR-135a y las células control, transfectadas con un pre-miR control negativo.

Estos resultados confirman el papel clave que tiene miR-135a en la supervivencia de las células de LHC y en el pronóstico de los pacientes sugiriendo que las terapias dirigidas a aumentar los niveles de miR-135a podrían beneficiar a los pacientes de LHC que no responden a los tratamientos convencionales.

Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma

Alfons Navarro,¹ Tania Diaz,¹ Antonio Martinez,² Anna Gaya,³ Aina Pons,¹ Bernat Gel,⁴ Carles Codony,³ Gerardo Ferrer,⁵ Carmen Martinez,³ Emili Montserrat,³ and Mariano Monzo¹

¹Human Anatomy Unit, Molecular Oncology and Embryology Laboratory, University of Barcelona Medical School, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona; ²Hematopathology Section, Laboratory of Pathology and ³Institute of Hematology and Oncology, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona; ⁴Software Department, Universitat Politecnica de Catalunya, Barcelona; and ⁵Institute of Hematology and Oncology, Laboratory of Translational Hematology, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

The behavior of classic Hodgkin lymphoma (cHL) is determined by both the intrinsic features of the tumor cells and the characteristics of the microenvironment, making the analysis of entire lymph nodes an effective approach to understanding the disease. We examined the influence of our previously reported 25-microRNA signature for cHL on clinical outcome in 89 homogeneously treated cHL patients with a median follow-up of

80 months. Patients with low miR-135a expression had a higher probability of relapse ($P .04$) and a shorter disease-free survival ($P .02$). Functional analysis of cHL cell lines showed that mature miR-135a levels increased after pre-miR-135a transfection, causing apoptosis and decreased cell growth. Target analysis showed a direct regulation by miR-135a of JAK2, a cytoplasmic tyrosine kinase involved in a specific subset of cytokine

receptor signaling pathways. miR-135a-mediated JAK2 down-regulation led to decreased mRNA and protein levels of the antiapoptotic gene *Bcl-xL*, suggesting a role for *Bcl-xL* in miR-135a/JAK2-mediated apoptosis. Our findings confirm the critical role of miR-135a in the survival of cHL cells and in the prognosis of cHL patients, indicating that novel treatment approaches targeting miR-135a may potentially benefit these patients. (Blood. 2009;114:2945-2951)

Introduction

Classic Hodgkin lymphoma (cHL) is a B-cell neoplasm characterized by the presence of relatively few tumor cells (Hodgkin/Reed-Sternberg cells) in a nonneoplastic microenvironment. The behavior of cHL is determined by the intrinsic features of the Hodgkin/Reed-Sternberg cells and by the characteristics of the nonneoplastic inflammatory cell infiltrate.¹ The cells from the inflammatory infiltrate form a complex network of cytokines and chemokines that provide a permissive microenvironment. Some of the cytokines and chemokines secreted by the Hodgkin/Reed-Sternberg cells may act as autocrine growth factors for the Hodgkin/Reed-Sternberg cells,^{2,3} whereas others appear to modulate the immune microenvironment.⁴⁻⁶

The Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathway is a common signaling pathway used by many cytokines. The JAK family has 4 members,⁷ but JAK2 is the predominant JAK activated in response to type I cytokine ligands (erythropoietin, granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, thrombopoietin, growth hormone, prolactin, interleukin-3, and interleukin-5).^{8,9} When a cytokine binds to its cell-surface receptor, it activates the dimerization of the receptor, which has constitutively associated JAK tyrosine kinases. The 2 JAK proteins then phosphorylate each other and act as activated tyrosine kinases that phosphorylate the receptor, allowing the binding and phosphorylation of cytoplasmic STAT proteins. There are 7 STATs, all with a DNA-binding domain. STAT3 and STAT5 are the preferred down-

stream targets of phosphorylated JAK2.¹⁰ The phosphorylated STATs form dimers, leave the receptor, and translocate to the nucleus, where they act as transcription factors that regulate target gene expression related to cell survival, proliferation, angiogenesis, and immune evasion.¹¹⁻¹⁴ *Bcl-xL* is an antiapoptotic gene whose expression is induced by STAT5 DNA binding, and activation of the JAK2/STAT5 pathway can modulate apoptosis and survival through *Bcl-xL* expression.¹⁵

JAK/STAT signaling is regulated at many steps through distinct mechanisms, and deregulation of this pathway is associated with several immune diseases and neoplasms. At the posttranslational level, key regulators include the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins and the inhibitors of activated STAT.¹⁶ Mutations and amplification have been detected at different levels of this pathway in *JAK2*,¹⁷⁻¹⁹ *STATs*, and *SOCS*.²⁰ However, although activating mutations have been found in *JAK2* in myeloid neoplasms, the expression of *JAK2* in primary mediastinal large B-cell lymphomas and cHL is not the result of mutations,²¹ although constitutive activation of *STATs* has been found.²²

At the pretranslational level, microRNAs (miRNAs) play an important role in the regulation of protein levels. miRNAs are small endogenous RNAs that regulate gene expression by binding to the downstream (3'-untranslated region [UTR]) of target mRNAs and inhibiting their translation to protein.^{23,24} miRNAs play a role in tumor pathogenesis by regulating the expression of oncogenes

Submitted February 19, 2009; accepted July 4, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, August 7, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-02-204842.

The online version of this article contains a data supplement.

Presented in part as an oral presentation at the 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, CA, December 2008.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2009 by The American Society of Hematology

Table 1. Main clinical characteristics and outcomes of cHL patients (N 89)

Characteristic	No. (%)
Median age, y (range)	29 (13-89)
45 or older	15 (17)
Sex, male/female	42/47 (47/53)
Histology	
Nodular sclerosis	70 (79)
Mixed cellularity	19 (21) 25 (28)
EBV	7 (8)
HIV	36 (40) 21 (24)
B symptoms	
Bulky mass	
Anemia (Hb 10 ⁵ g/L)	16 (18)
Leukocytosis, 15 10 ⁹ /L	12 (13)
Lymphocytopenia, 0.6 10 ⁹ /L or 8% of WBCs	10 (11)
Hypoalbuminemia, 40 g/L	24 (29)
High LDH, 450 U/L	29 (33)
High 2-microglobulin, 2.5 mg/dL	15 (17)
Stage	
II	54 (61)
III-IV	35 (39)
Hasenclever index 3*	16 (27)

*Calculated only in 59 patients with advanced disease (stages III-IV, B symptoms, or bulky mass).

and tumor suppressor genes in a sequence-complementary manner.^{25,26} Several studies in cell lines have identified miRNAs that are characteristic of cHL,²⁷⁻²⁹ and we have previously identified a 25-miRNA signature in cHL patient lymph nodes.³⁰

The analysis of both tumor cells and the microenvironment can be an effective approach to understanding the behavior of cHL. To identify biologic prognostic markers that could add value to standard clinical factors,¹ we examined the influence of our 25-miRNA signature for cHL³⁰ on outcome in 89 homogeneously treated cHL patients with a median follow-up of 80 months.

Methods

Patients

Eighty-nine adult patients diagnosed with cHL at a single institution between September 1995 and June 2005 were included in the analysis. We had previously examined miRNA expression in tumor samples from these patients³⁰; in the present study, we have correlated miRNA expression with clinical outcome. Median age was 29 years, and 47% were male. Seven patients (8%) were HIV; 79% had nodular sclerosis and 21% had mixed cellularity histology. Using criteria previously described,³⁰ Epstein-Barr virus was present in 28% of the samples. First-line treatment consisted of adriamycin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine or equivalent schedules in 97% of patients. Of 89 patients, 76 (85%) achieved complete remission, 5 (6%) had partial remission, and 8 (9%) were chemoresistant. After a median follow-up of 80 months (range, 7-180 months), overall survival was 84% and disease-free survival was 80% (Table 1). Approval for this study was obtained from the Institutional Review Board of Hospital Clinic, Barcelona. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Cell culture and transfection

The cHL cell lines L-428, L-1236, and HDMYZ were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum (Invitrogen). Transfection of 50 nM and 100 nM of pre-miR-135 and pre-miRNA precursor Negative Control (Applied Biosystems/Ambion) in L-428 and L-1236 were performed by nucleofection (Amaxa Biosystems) using solution L and program X-001

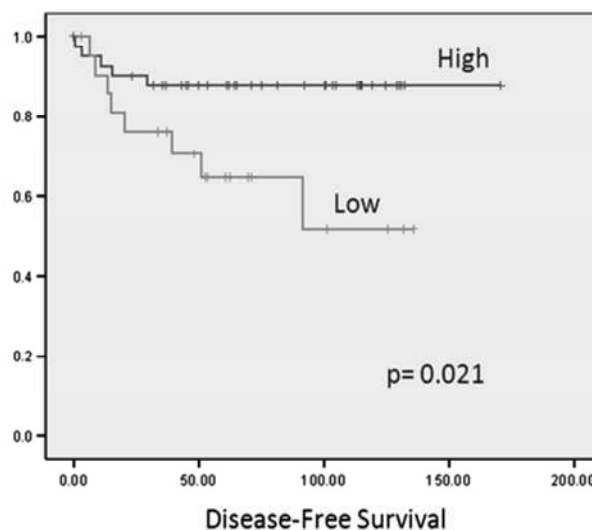


Figure 1. Disease-free survival according to miR-135a expression levels.

and solution V and program T-001, respectively, as recommended by the manufacturer. HDMYZ was transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as per the manufacturer's protocol. The expression levels of miR-135a considerably increased 24 hours after pre-miR-135a transfection in all 3 cell lines (supplemental Figure 1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

Apoptosis and proliferation assays

Caspase 3 and 7 activities in L-428 cells transfected with pre-miR-135 or with pre-miRNA precursor Negative Control were directly measured at 24 and 48 hours after transfection using a CaspaseGlo 3/7 kit (Promega) as per the manufacturer's protocol. On coated 96-well plates, 10 000 cells/well were plated and CaspaseGlo reagent was added and incubated for 1 hour at room temperature in the dark. Relative light intensity was measured in each well using a Veritas microplate luminometer (Turner Biosystems).

On coated 12-well plates, 100 000 cells/well were plated 24 hours after transfection. The numbers of cells were counted in a Neubauer chamber at 72 hours.

Western immunoblotting

Total protein from all 3 cell lines was isolated using QIAGEN Qproteome Mammalian Protein Prep Kit according to the manufacturer's protocol. Equal amounts of protein (50 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis in 7.5% Tris-HCl polyacrylamide gels and transferred to pure nitrocellulose membranes (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad). Membranes were incubated with mouse monoclonal antibodies against JAK2 (Abcam), JAK3 (Abcam), phospho-STAT5 (Tyr694; Cell Signaling Technology) Bcl-xL (Santa Cruz Biotechnology), and -tubulin (Sigma-Aldrich). Antibody binding was revealed by incubation with antimouse IgG peroxidase conjugate secondary antibodies (Sigma-Aldrich). Chemiluminescence was detected using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology) and read in Chemidoc System (Bio-Rad). The protein density of the bands was quantified using Quantity One software, Version 4.2.6, and relative quantification was calculated with reference to the -tubulin signal.

RNA extraction and miRNA quantification

RNA was extracted from the cell lines using Trizol total RNA isolation reagent (Invitrogen) as per the manufacturer's protocol. TaqMan quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction miRNA assay of miR-135a was used to quantify miR-135a expression levels, as previously described,³⁰ using an Applied Biosystems 7500 Sequence Detection System and RNU6B as endogenous control.

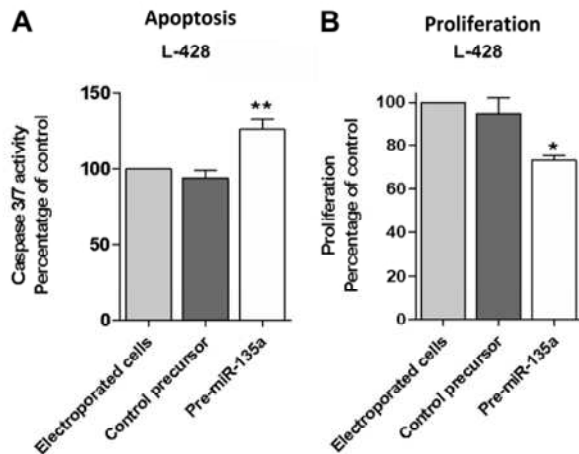


Figure 2. Apoptosis and proliferation analysis after pre-miR-135 transfection in the L-428 cell line. (A) Analysis at 48 hours after transfection showed that caspase 3/caspase 7 activity was 36% higher than in control cells, transfected with pre-miR-negative control (***P* .01). (B) The proliferation assay at 72 hours showed that pre-miR-135-transfected cells grew less than control cells transfected with pre-miRNA precursor-negative control (**P* .05).

BCL-xL mRNA analysis

Total cDNA was synthesized from total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) as per the manufacturer's protocol. Polymerase chain reaction was performed using the following primers for BCL-xL: 5'-ATGTCTCAGAGCAACCCGGGAG-3' and 5'-TTCCGACTGAAGAGTGAGC-3'.

Renilla luciferase reporter vector

Two 48-bp synthetic oligonucleotides, containing from 5 to 3: *Xho*I sticky end (5 bp), a fragment from the 3' UTR of *Jak2* gene containing the miR-135a target sequence (35 bp), *Bgl*III restriction site (6 bp), and *Not*I sticky end (2 bp), were cloned in the psiCheck2 vector (Promega) in the 3' UTR of *Renilla* luciferase gene. The 2 oligonucleotides sense (5'-TCG AG TC ATG AAC TAA ATT TAA GCT TAA GCC ATA AAA TAG AGA TCT GC-3') and antisense (5'-GGC CGCAGA TCT CTA TTT TAT GGC TTA AGC TTA AAT TTA GTT CAT GA C-3') were first annealed with a Tris buffer (100 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid) in a heating block at 95°C for 5 minutes, followed by a gradual reduction of temperature until room temperature. The psiCheck2 vector was linearized by digestion with *Not*I and *Xho*I (New England Biolabs) and purified from an agarose gel. The annealed oligonucleotides were ligated in the linearized psiCheck2 vector into the *Not*I and *Xho*I cloning sites located in the downstream of the *Renilla* luciferase reporter gene with T4 DNA ligase (New England Biolabs). The ligation reaction was transformed in TOP10F *Escherichia coli* competent cells (Invitrogen).

Positive clones were selected by restriction digestion with *Bgl*III and reconfirmed by sequencing.

The 3 cell lines were transfected with 0.2 μg of the modified psiCheck2 vector containing the insert with 500 nM of pre-miR-135 or pre-Mir Negative Control. The *Renilla* luciferase and Firefly luciferase activity was measured at 48 hours after transfection with the Promega Dual luciferase reporter assay system (Promega) in a Veritas microplate luminometer. The empty psiCheck2 vector was used as negative control, and the transfection efficiency was normalized with the Firefly luciferase gene.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with BRB Array Tools (Biometric Research Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health; <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>), SPSS 14.0, and R software (Version 2.6.0). Class comparison and Student *t* test were used to analyze differences between groups. The clinical outcomes of relapse rate and disease-free survival, as defined by Cheson et al,³¹ were analyzed using the Survival Analysis tool (Find genes correlated with survival) from BRB Array Tools. miR-135a expression was dichotomized using maxstat package of R,³² and survival curves were drawn using the Kaplan-Meier method. Sex, age (45 years vs 45 years), World Health Organization classification, extent of disease (limited vs advanced), and miR-135a expression level (low vs high) were included in the Cox multivariate regression analysis of disease-free survival.

Results

Clinical outcome and miR-135a expression

As previously reported,³⁰ miR-135a was down-regulated in the cHL samples compared with the reactive lymph nodes (*P* .001). When we analyzed the correlation between clinical outcome and the expression of the 25 miRNAs included in the cHL signature in the primary tumors of 89 cHL patients, only miR-135a expression correlated with disease-free survival. Using the cutoff selected by maxstat, we divided the 64 patients who had attained complete response into 2 groups according to their miR-135a expression levels. Forty-two patients with high miR-135a expression had a longer disease-free survival (151 months; 95% confidence interval, 135-167 months) than the 22 with low miR-135a expression (90 months; 95% confidence interval, 66-115 months; *P* .02; Figure 1). Thirty-six percent of patients with low miR-135a levels relapsed, compared with only 12% of those with high levels (*P* .046). No significant association was observed between miR-135a expression and overall survival. In the multivariate analysis, only miR-135a expression emerged as a prognostic factor for disease-free survival (relative risk 3.41, *P* .034).

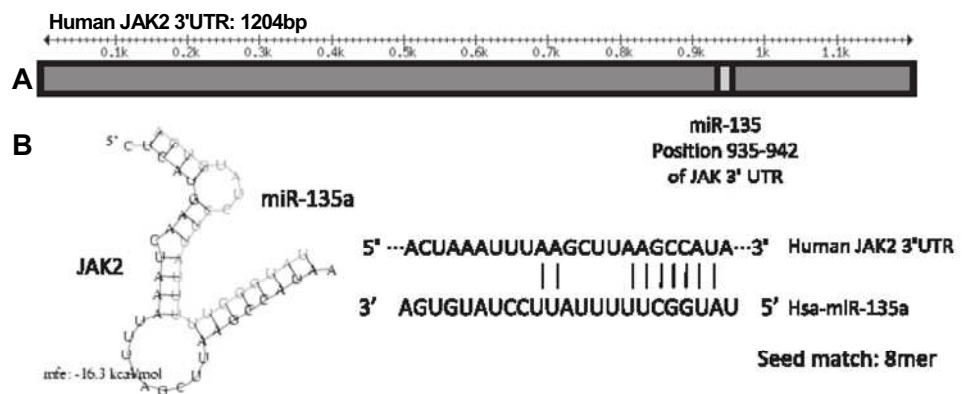
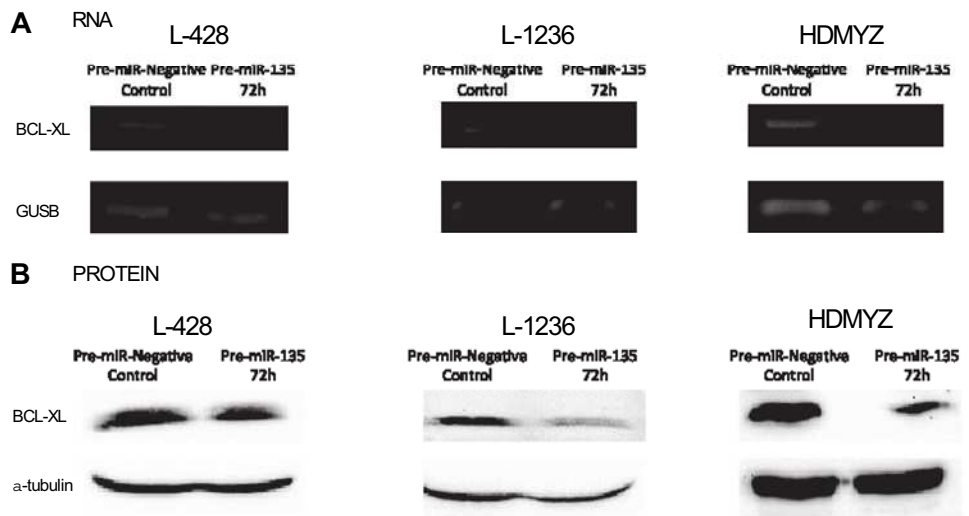


Figure 3. Schematic representation of the *JAK2* 3'UTR region and miR-135a binding. (A) miR-135a is predicted by TargetScan to target *JAK2* mRNA in the position 935 to 942 of its 3' UTR region. (B) On the left, the predicted hybridization of miR-135a and *JAK2* mRNA by the PicTar data-base. The minimum free energy required (mfe) for RNA hybridization is shown. On the right, the predicted hybridization of miR-135a and *JAK2* mRNA by miRbase (seed sequence, 8mer).

Figure 6. Bcl-xL expression analysis. (A) Reverse-transcribed polymerase chain reaction of Bcl-xL at 72 hours after transfection with 100 nM of pre-miR-135a. A reduction in Bcl-xL mRNA levels can be observed in the pre-miR-135-transfected cells versus the control cells. No change was observed in the -glucuronidase (GUSB) mRNA levels, used as control. (B) Western blot analysis of Bcl-xL at 72 hours after transfection showed a correlation between Bcl-xL mRNA and protein levels.



Discussion

JAK2 mutations are present in a variety of myeloproliferative disorders, resulting in tyrosine kinase activation, phosphorylation of STAT5, and expression of target genes, including *Bcl-xL*. To date, however, these mutations have not been observed in cHL patients.²¹ Recent studies have shown that JAK/STAT signaling is regulated at various steps, allowing control of signaling strength, duration, and specificity, and that deregulation of this pathway plays an important role in tumor pathogenesis.¹⁶

Genetic lesions are frequently found in cHL cells, including *JAK2* gain³⁶ and amplification¹⁷ and inactivating mutations in *SOCS1*,³⁷ a negative regulator of JAK/STAT signaling. An activated JAK/STAT signaling pathway is a characteristic feature of cHL cells, conferring proliferation signals and protection against apoptosis.³⁴ Our study provides strong evidence that miRNAs, specifically miR-135a, help to control the JAK/STAT signaling pathway and that miR-135a may function as a potential tumor suppressor through its target *JAK2*.

miR-135a is encoded in 2 genes: *MIRN135A1* and *MIRN135A2*, located at 3p21.1 and 12q23.1, respectively. Although cytogenetic analysis of Hodgkin lymphoma is technically difficult, breakpoints

in 3p21 and 12q23 can be found in cHL,³⁸ which may explain the relatively low expression levels of miR-135a in cHL and interindividual differences in expression levels.

One of the major obstacles in cHL research is the small proportion of neoplastic cells in the tumor (2% of the total cellularity). We chose to examine miRNA expression of the entire cHL lymph node because of the proven importance of the microenvironment in this disease.^{1,5,39} Moreover, the constitutive activity of the JAK2/STAT pathway is caused not only by genetic lesions but also by cytokines, such as interleukin-13,² produced by the Hodgkin/Reed-Sternberg cells and the microenvironment cells.⁶ For this reason, the analysis of miRNAs in the whole lymph node may be more appropriate than in selected Hodgkin/Reed-Sternberg cells, especially when correlating results with clinical outcome. With this approach, we have found that the differential miR-135a expression levels detected in the whole sample may be a clinical predictor of relapse, as patients with low miR-135a expression had a higher probability of relapse.

Notably, when examining miR-135a expression in the cHL cell lines, we observed that increased expression levels of miR-135a led to a decrease in *JAK2* protein levels and, as a result, higher apoptosis rates and lower proliferation levels through the regulation of *Bcl-xL* expression (Figure 7 and supplemental Figure 3).

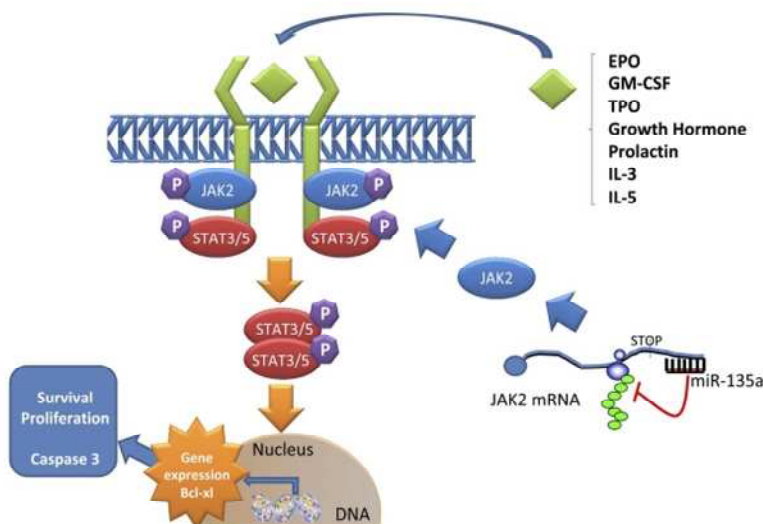


Figure 7. Model of JAK2/miR-135a-mediated survival signaling in L-428 cHL cells. The JAK/STAT pathway is used by many cytokines. When a ligand binds a receptor, a conformational change in the receptor allows 2 JAK2 proteins to phosphorylate each other and activate phosphorylation events that allow STAT proteins to form dimers. These dimers then translocate to the nucleus and activate specific transcription of specific genes, such as *Bcl-xL*, related to survival and proliferation. miR-135a plays a role in this pathway by regulating the translation of *JAK2* protein.

The mRNA expression of *Bcl-xL*, a downstream protein in the JAK2/STAT5 pathway, is induced by phosphorylated STAT5 DNA binding. *Bcl-xL* is a prosurvival protein that appears up-regulated in some hematologic malignancies.⁴⁰ Like *BCR-ABL* mutations, *JAK2* mutations impair apoptotic response to DNA damage by altering the *Bcl-xL* deamidation pathway.^{41,42} The prevention of DNA damage-induced apoptosis by the inappropriate up-regulation of survival pathways is one of the hallmarks of cellular transforma-

tion and chemotherapy failure.⁴³ These findings could explain the association between miR-135a expression levels and interindividual differences in relapse and disease-free survival observed in the cHL patients.

The JAK2/STAT signaling pathway has been a major focus of new drug development targeting *JAK2* because it is mutated in a significant number of myeloproliferative disorders.⁴⁴ Novel *JAK2* inhibitors have been developed and tested, and some of them are now being studied in phase 1/2 clinical trials.^{45,46} The approach of using miRNAs as therapeutic tools to modulate *JAK2* levels could be a useful approach, either alone or in combination with these new *JAK2* inhibitors or with less specific tyrosine kinase inhibitors, such as imatinib or dasatinib.

In conclusion, we have identified miR-135a as a novel prognostic marker of relapse in cHL and shown that miR-135a modulates apoptosis and survival in L-428 cHL cells by targeting *JAK2*, which in turn affects *Bcl-xL* expression levels. Although our findings require validation in an independent patient cohort before definite conclusions can be drawn, they suggest that cHL may be amenable to new therapeutic approaches based on miR-135a expression.

References

- Hsi ED. Biologic features of Hodgkin lymphoma and the development of biologic prognostic factors in Hodgkin lymphoma: tumor and microenvironment. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(9):1668-1680.
- Skinnider BF, Kapp U, Mak TW. The role of interleukin 13 in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(6):1203-1210.
- Chiu A, Xu W, He B, et al. Hodgkin lymphoma cells express TAC1 and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood*. 2007;109(2):729-739.
- Hanamoto H, Nakayama T, Miyazato H, et al. Expression of CCL28 by Reed-Sternberg cells defines a major subtype of classical Hodgkin's disease with frequent infiltration of eosinophils and/or plasma cells. *Am J Pathol*. 2004;164(3):997-1006.
- Schreck S, Friebe D, Buettner M, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*. 2009;27(1):31-39.
- Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99(12):4283-4297.
- Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*. 2000;95(1):19-29.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*. 1998;93(3):385-395.
- Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Cleveland JL, Yi T, Ihle JN. Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(18):8429-8433.
- Ihle JN, Gilliland DG. Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(1):8-14.
- Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 2002;296(5573):1653-1655.
- Damell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994;264(5164):1415-1421.
- Damell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science*. 1997;277(5332):1630-1635.
- Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(9):651-662.
- Gozgit JM, Beberitz G, Patil P, et al. Effects of the JAK2 inhibitor, AZ960, on Pim/BAD/BCL-xL survival signaling in the human JAK2 V617F cell line SET-2. *J Biol Chem*. 2008;283(47):32334-32343.
- Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signaling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):900-911.
- Joos S, Kupper M, Ohl S, et al. Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30 Hodgkin cells. *Cancer Res*. 2000;60(3):549-552.
- Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, et al. Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer*. 2003;103(4):489-495.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-1790.
- Weniger MA, Melzner I, Menz CK, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. 2006;25(18):2679-2684.
- Melzner I, Weniger MA, Menz CK, Moller P. Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2006;20(1):157-158.
- Kube D, Holtick U, Vockerodt M, et al. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*. 2001;98(3):762-770.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522-531.
- Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. 2006;25(46):6188-6196.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs: microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259-269.
- Gibcus JH, Tan LP, Harms G, et al. Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile. *Neoplasia*. 2009;11(2):167-176.
- Nie K, Gomez M, Landgraf P, et al. MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM14/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas. *Am J Pathol*. 2008;173(1):242-252.
- Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*. 2005;207(2):243-249.
- Navarro A, Gaya A, Martinez A, et al. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111(5):2825-2832.

Acknowledgments

The authors thank Dr Kate Hodgson for her comments on previous versions of the manuscript.

This work was supported in part by the Spanish Ministry of Public Health (FISS-PI060087 and PI080095), the Servei de Donacio de Cossos I Sala de Disseccio (SDCSD) of the School of

Medicine of the University of Barcelona, and the Farreras-Valenti Foundation. T.D. is an FI fellow supported by Agencia de Gestio ' D'Ajuts Universitaris I de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya, and Fondo Social Europeo.

Authorship

Contribution: A.N. designed and performed the research, analyzed the data, and wrote the manuscript; T.D., A.P., C.C., and G.F. performed the research; A.M. designed the research; A.G. selected cases and analyzed the clinical data; B.G. performed statistical analysis; C.M. selected patients; E.M. wrote the paper; M.M. designed and supervised the research and wrote the paper; and all authors have seen and approved this final version of the manuscript and agree with the decision to submit.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Mariano Monzo, Human Anatomy Unit, Molecular Oncology and Embryology Laboratory, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain; e-mail: mmonzo@ub.edu.

31. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25(5):579-586.
32. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput Stat Data Anal*. 2003;43:121-137.
33. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007;129(7):1401-1414.
34. Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(6):713-721.
35. Kuppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):15-27.
36. Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, et al. Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer*. 2003;103(4):489-495.
37. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. 2006;25(18):2679-2684.
38. Schouten HC, Sanger WG, Duggan M, Weisenburger DD, MacLennan KA, Armitage JO. Chromosomal abnormalities in Hodgkin's disease. *Blood*. 1989;73(8):2149-2154.
39. Alvaro T, Lejeune M, Garcia JF, et al. Tumor-infiltrated immune response correlates with alterations in the apoptotic and cell cycle pathways in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14(3):685-691.
40. Marante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, Green DR. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*. 1998;16(11):1383-1390.
41. Zhao R, Follows GA, Beer PA, et al. Inhibition of the Bcl-xL deamidation pathway in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2008;359(26):2778-2789.
42. Zhao R, Yang FT, Alexander DR. An oncogenic tyrosine kinase inhibits DNA repair and DNA-damage-induced Bcl-xL deamidation in T cell transformation. *Cancer Cell*. 2004;5(1):37-49.
43. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
44. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(9):673-683.
45. Ferrajoli A, Faderl S, Ravandi F, Estrov Z. The JAK-STAT pathway: a therapeutic target in hematological malignancies. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006;6(8):671-679.
46. Pesu M, Laurence A, Kishore N, Zwillich SH, Chan G, O'Shea JJ. Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunol Rev*. 2008;223:132-142.

Lestaurtinib inhibition of the JAK/STAT signaling pathway in Hodgkin lymphoma inhibits proliferation and induces apoptosis

Tania Díaz, Alfons Navarro, Gerardo Ferrer, Bernat Gel, Anna Gaya, Rosa Artells, Beatriz Bellosillo, Mar Garcia-Garcia, Sergi Serrano, Antonio Martínez, Mariano Monzó

[PlosOne, 2011](#)

4.2. Resumen artículo 2

La inhibición que ejerce Lestaurtinib sobre la vía de señalización JAK/STAT provoca la inhibición de la proliferación e induce apoptosis en el linfoma de Hodgkin

El tratamiento estándar aplicado a los pacientes de LHc apenas ha cambiado en los últimos 30 años, aun así el LHc sigue siendo uno de los cánceres con tasas más elevadas de curación. Sin embargo, el tratamiento adecuado para aquellos pacientes que recaen o presentan enfermedad refractaria permanece incierto. Actualmente, existen diferentes agentes terapéuticos en desarrollo para intentar solventar este problema.

La activación constitutiva de la vía JAK/STAT representa un punto clave en la patogénesis del LHc; esto convierte a JAK2, normalmente sobreexpresado en el LHc, en una diana terapéutica a tener en cuenta para tratar esta enfermedad. Lestaurtinib es un inhibidor de tirosina quinasas con múltiples dianas. Inicialmente se describió como un inhibidor de FLT3 en los síndromes mieloproliferativos, aunque más tarde se le reconocieron más dianas, entre ellas JAK2. Sin embargo, su eficacia en el LHc permanece desconocida. Por esta razón, analizamos la eficacia *in vitro* de este fármaco en cinco líneas celulares de LHc procedentes de pacientes con enfermedad refractaria: L-428, L-1236, L-540, HDML-2 y HD-MY-Z. Para llevar a cabo el análisis tratamos a las células con el fármaco (Lestaurtinib) o con DMSO, utilizado como control, a diferentes concentraciones. A las 48 horas del tratamiento, observamos una inhibición del crecimiento celular en todas las líneas celulares; en las células tratadas con el fármaco a 300 nM la disminución fue del 42% (23-66%). A su vez, en estas mismas células la apoptosis aumentó en un 44,6% (10-64%). En ambos casos los resultados fueron dependientes de la dosis administrada.

Otro de los objetivos del estudio fue ver de qué manera Lestaurtinib afecta a la vía de señalización JAK2/STAT5 para conocer el mecanismo por el cual el fármaco regula la proliferación celular y la apoptosis. A la hora del tratamiento de estas células con el fármaco, observamos que Lestaurtinib inhibe la fosforilación de JAK2 y de su molécula

“*downstream*” en la vía de señalización, STAT5, y esto provoca la reducción de los niveles del mRNA de Bcl-xL, que es una proteína antiapoptótica diana de STAT5-P.

En segundo lugar, analizamos el efecto del Lestaurtinib en nódulos linfáticos de cuatro pacientes afectados de un LHc. Las células fueron cultivadas y tratadas con el fármaco a 300nM durante 24 horas; a diferencia de la primera parte del estudio en la que únicamente trabajamos con células tumorales, en este caso se cultivaron las células de todo el ganglio, tanto las tumorales como las del microambiente. Para evaluar el efecto de Lestaurtinib sobre la viabilidad celular, seleccionamos una subpoblación de células, correspondiente al 0,3% del total celular, que era negativa para anexina y CD3 y positiva para CD30, CD40 y CD95. A las 24 horas del tratamiento, observamos una disminución de la viabilidad celular en tres de los cuatro pacientes analizados (la media de disminución fue del 27%). Al paciente que no presentó respuesta al fármaco le incrementamos la dosis a 1 μ M y obtuvimos una modesta disminución de la viabilidad celular, aproximadamente del 12%. Finalmente, para intentar establecer la toxicidad del Lestaurtinib analizamos la viabilidad de las células CD3+ y del total de células tratadas con el fármaco. En este caso, la viabilidad no disminuyó.

Estos resultados muestran, por primera vez, la eficacia de un inhibidor de JAK2, concretamente Lestaurtinib, en el LHc, sugiriendo que puede ser una nueva herramienta terapéutica a tener en cuenta para el tratamiento de pacientes con esta enfermedad.

Lestaurtinib Inhibition of the JAK/STAT Signaling Pathway in Hodgkin Lymphoma Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis

Tania Diaz¹, Alfons Navarro^{1*}, Gerardo Ferrer², Bernat Gel³, Anna Gaya², Rosa Artells¹, Beatriz Bellosillo⁴, Mar Garcia-Garcia⁴, Sergi Serrano⁴, Antonio Martínez⁵, Mariano Monzo¹

1 Human Anatomy Unit, Molecular Oncology and Embryology Laboratory, University of Barcelona Medical School, IDIBAPS, Barcelona, Spain, **2** Institute of Hematology and Oncology, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain, **3** Software Department, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, Spain, **4** Pathology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, **5** Hematopathology Section, Laboratory of Pathology, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

Abstract

Standard cytotoxic chemotherapy for Hodgkin Lymphoma (HL) has changed little in 30 years; the treatment for patients with relapsed or refractory disease remains challenging and novel agents are under development. JAK/STAT constitutive activation plays an important role in the pathogenesis of HL. Lestaurtinib is an orally bioavailable multikinase inhibitor that has recently been shown to inhibit JAK2 in myeloproliferative disorders. The potential role of Lestaurtinib in HL therapy is unknown. We have analyzed the effect of Lestaurtinib treatment in five HL cell lines from refractory patients, L-428, L-1236, L-540, HDML-2 and HD-MY-Z. At 48 h, a dose-dependent cell growth inhibition (23%-66% at 300 nM) and apoptotic increment (10%-64% at 300 nM) were observed. Moreover, Lestaurtinib inhibited JAK2, STAT5 and STAT3 phosphorylation and reduced the mRNA expression of its downstream antiapoptotic target Bcl-xL. In addition, we have analyzed the effect of Lestaurtinib treatment in lymph nodes from four classic HL patients. We observed a decrease in cell viability at 24 hours of treatment in three patients (mean decrease of 27% at 300 nM). Our findings provide, for the first time, a molecular rationale for testing JAK2 inhibitors, specifically Lestaurtinib, in HL patients.

Citation: Diaz T, Navarro A, Ferrer G, Gel B, Gaya A, et al. (2011) Lestaurtinib Inhibition of the JAK/STAT Signaling Pathway in Hodgkin Lymphoma Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis. PLoS ONE 6(4): e18856. doi:10.1371/journal.pone.0018856

Editor: Gisela Nogales-Gadea, University Hospital Vall d'Hebron, Spain

Received September 20, 2010; Accepted March 22, 2011; Published April 20, 2011

Copyright: © 2011 Diaz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by FIS-PI0900547 and by FIS-PI080095 from the Spanish Ministry of Public Health, by the SDCSD of the School of Medicine of the University of Barcelona, by Instituto de Salud Carlos III FEDER (RD09/0076/00036) and by the Xarxa de Bancs de Tumors sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC). Tania Diaz and Bernat Gel are FI fellows supported by AGAUR, Generalitat de Catalunya and Fondo Social Europeo. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding received for this study.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: anavarroponz@ub.edu

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Hodgkin lymphoma (HL) is characterized by the presence of a small proportion of tumor cells, the Hodgkin/Reed Sternberg (HRS) cells, surrounded by a specific non-tumor microenvironment. HRS cells usually account for only 1% of cells in the tumor tissue, and few cell lines have been established from HL patients. To date, the most frequent genetic alterations in HRS cells involve members of two main signaling pathways: nuclear factor-kappaB (NF- κ B) and Janus kinase-Signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) [1].

The JAK2/STAT5 pathway is a common signaling pathway used by many cytokines that regulate target gene expression related to cell survival, proliferation, angiogenesis, and immune evasion [2]. Bcl-xL is an antiapoptotic gene whose expression is induced by STAT5 DNA binding, and activation of the JAK2/STAT5 pathway can modulate apoptosis and survival through Bcl-xL expression [3]. The JAK2/STAT5 pathway plays an active role in HL, where genomic gains of JAK2 are frequently observed [4], and where the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1), a negative regulator of JAK/STAT signaling, appears mutated and

inactivated [5]. While activating mutations in JAK2 have been found in myeloproliferative disorders (MPD) [6], the expression of JAK2 in primary mediastinal large B-cell lymphomas and HL is not the result of mutations [7], although constitutive activation of STATs has been observed [8]. Recently, our group has observed a postranscriptional regulation of JAK2 mediated by a microRNA (miRNA), miR-135a, whose expression was downregulated in HL patients [9].

Although HL is considered one of the most curable human cancers (cure rates of 80-90%) [10], the treatment of patients with relapsed and refractory disease, especially those who relapse after autologous stem cell transplantation, remains challenging. The gold-standard therapy in HL is anthracycline-based, with doxorubicin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine (ABVD) [11]. HL patients whose disease relapses after stem cell transplantation are rarely cured with current treatment modalities. Moreover, no new drugs have been approved for HL by the US Food and Drug Administration (FDA) in more than 30 years [12]. Thus, new drugs and novel treatment strategies based on our understanding of HL biology and signaling pathways are needed to improve outcome for these patients. Several therapeutic targets,



including JAK2, have been identified and continue to be studied [4,13]. Novel JAK2 inhibitors have been developed and tested [14], some of which are now being studied in phase I clinical trials in HL [15].

Lestaurtinib (formerly known as CEP-701) is a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor which has been shown to potently inhibit FLT3 at nanomolar concentrations in preclinical studies, leading to its rapid development as a potential targeted agent in acute myeloid leukemia [16]. Moreover, recent studies have further shown that Lestaurtinib inhibitory activity is not limited to FLT3 and can suppress JAK2/STAT5 signaling through specific JAK2 inhibition [17]. In order to elucidate the potential role of

Lestaurtinib in HL, we have analyzed the in vitro effectiveness of Lestaurtinib in five HL cell lines from refractory patients and its role in the JAK2/STAT5 signaling pathway. In addition, we have analyzed for the first time the effect of Lestaurtinib in lymph nodes from classic HL patients by flow cytometry.

Materials and Methods

Cell culture and treatment

Five HL cell lines, L-428, L-1236, L-540, HDLM-2 and HD-MY-Z (DSMZ - the German Resource Centre for Biological Material) were assayed for proliferation and apoptosis after treatment with Lestaurtinib (CEP-701 hydrate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or DMSO (Sigma-Aldrich). L-428, L-1236 and HDMYZ cell lines, were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum (Invitrogen, Paisley, UK); the L-540 and HDLM2 cell lines were cultured in RPMI 1640 containing 20% fetal calf serum (Invitrogen). For proliferation and apoptosis analyses, cells (1.6×10^5 cells/well) were plated in a 96-well plate in culture medium in the presence of 30, 50, 70, 100, 150, 200 or 300 nM Lestaurtinib or no drug/DMSO vehicle control. In addition, in order to compare the effect of Lestaurtinib with doxorubicin, a component of standard HL therapy, we performed a proliferation analysis in cells treated with 300 nM of doxorubicin. For protein analysis, cells (1.5×10^6 cells/well) were plated in a 12-well plate and treated with 30, 100 or 300 nM Lestaurtinib or 300 nM DMSO. All cells were treated with a unique dose at the start of the experiment, after which the medium was not modified or replaced.

Proliferation and apoptosis assays

Cell growth was determined by the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, Madison, WI). At 48 h after treatment with Lestaurtinib or DMSO, MTS reagent was added and cells were incubated for 30-60 mins at 37°C. Cell proliferation was measured by OD 490 nm using a VersaMax microplate reader (Molecular Devices, Silicon Valley, CA).

Caspase 3/7 activity was directly measured at 48 h after treatment using a CaspaseGlo 3/7 kit (Promega) as per the manufacturer's protocol. At 48 h after treatment with Lestaurtinib or DMSO, CaspaseGlo reagent was added and cells were incubated for 1 hour at room temperature in the dark. Relative light intensity was measured in each well using an Orion II Microplate luminometer (Berthold Detection Systems, Black Forest, Germany).

Western Blot analysis

Total protein was isolated using Qiagen Qproteome Mammalian Protein Prep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Equal amounts of proteins (50 mg) were separated by SDS-polyacrylamide electrophoresis in 10%

Tris-HCl polyacrylamide gels and transferred to pure nitrocellulose membranes (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad,

Hercules, CA). Membranes were incubated with antibodies against JAK2 (Upstate, Millipore, Billerica, MA), phospho-JAK2 (Tyr1007/1008), phospho-STAT5 (Tyr694) and phospho-STAT3 (Tyr705) (Cell Signaling, Danvers, MA), STAT5 and STAT3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and α -tubulin (Sigma) as control. Antibody binding was revealed by incubation with anti-mouse (Sigma) or anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology) IgG peroxidase conjugate secondary antibodies. Chemiluminescence was detected using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) and read in Chemidoc System (Bio-Rad). The protein density of the bands was quantified using Quantity One software v 4.2.6, and relative quantification was calculated with reference to the α -tubulin signal.

Bcl-xL mRNA analysis

RNA was extracted from the cell lines using Trizol total RNA isolation reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) as per the manufacturer's protocol. Total cDNA was synthesized from total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) as per the manufacturer's protocol. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems) for BCL-xL (Hs99999146_m1) and GUSB (Hs99999908_m1), used as endogenous control.

Patient lymph node analysis

A cell suspension was made from cryopreserved (freezing medium based on RPMI 30%, FBS 60% and DMSO 10%), newly diagnosed lymph node samples from four classic HL patients diagnosed at the Hematology Department of the University Hospital del Mar, Barcelona, Spain (Table 1). The study was approved by the local Ethics Committee and informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki.

The viability of the lymph node cells was at least 87% at the initiation of cell culture, as assessed by Tripzan Blue (Invitrogen). We performed a cell viability analysis of lymph node cells and found that viability was 59.9% at baseline, 41.8% at 24 h, and 30.6% at 48 h (Figure S3). Based on these results, we evaluated by flow cytometry 750,000 cells cultured for 24 hours with 300 nM of Lestaurtinib or DMSO. HRS cells were gated by the expression of CD40-PE-Cy5, CD95-Pacific Blue and CD30-PE, and the absence of CD3-APC-Cy7. Antibodies and control isotypes were

Table 1. Clinical and biological characteristics of HL patients.

Characteristic	P1	P2	P3	P4
Age	24	30	28	43
Sex	Female	Male	Male	Female
Histology	Classic HL, Nodular sclerosis	Classic HL*	Classic HL, Lymphocyte-rich	Classic HL, Nodular sclerosis
EBV	2	2	2	2
CD30	+	+	+	+
CD15	+	+	+	+
CD20	2	2	2	2
Stage	IIA	IIIA	IIIA	IIA

*Unknown histologic subtype.

doi:10.1371/journal.pone.0018856.t001

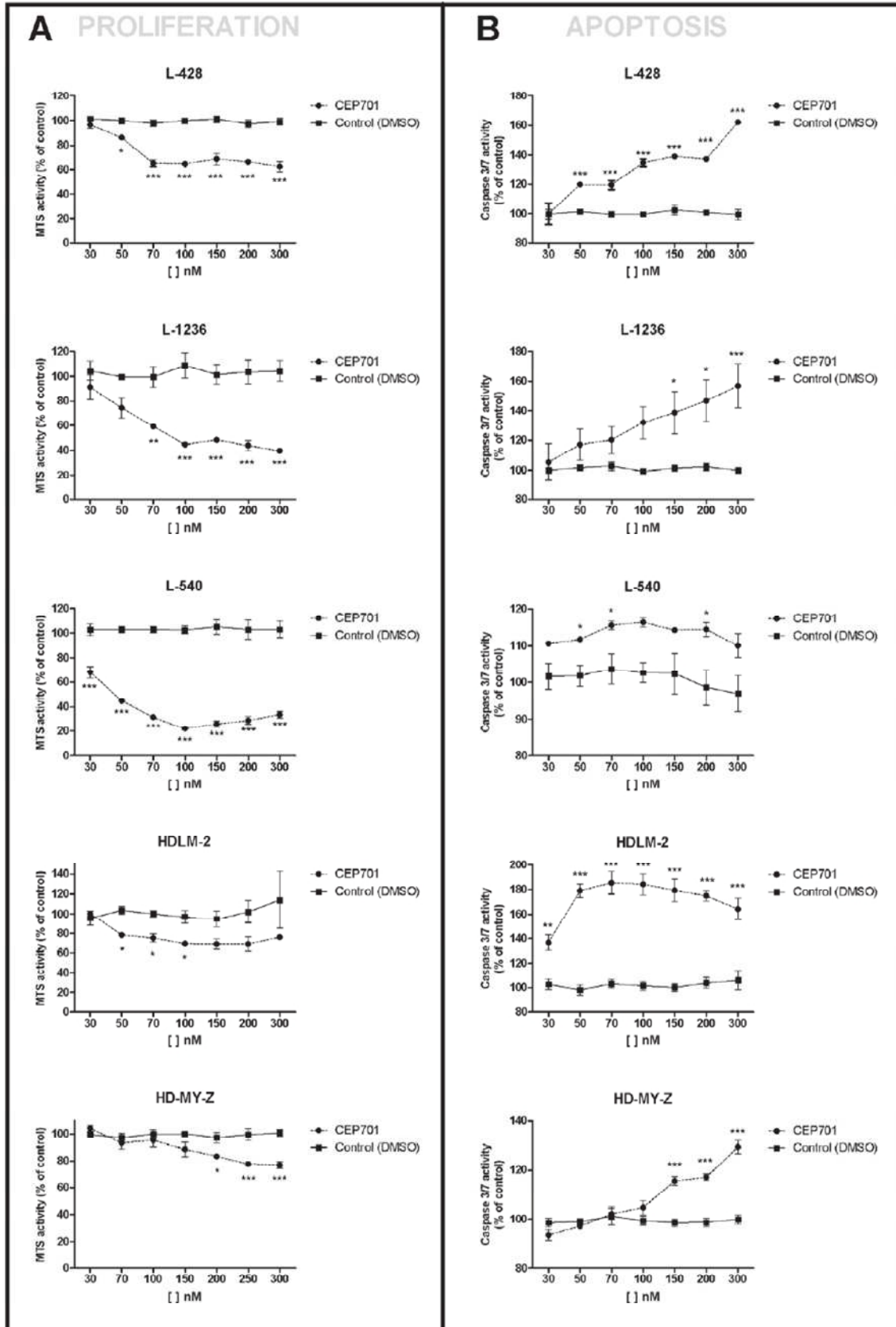


Figure 1. Proliferation (A) and apoptosis (B) analysis after 48 h of Lestaurtinib treatment in L-428, L-1236, L-540, HDLM-2 and HD-MY-Z cell lines. The data are shown as mean \pm SEM of three independent replicates. *p,0.05; **p,0.01; ***p,0.001. doi:10.1371/journal.pone.0018856.g001

obtained from BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ) and Biologend (San Diego, CA) [18,19]. Viability was analyzed by the presence of the membrane phospholipid phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma membrane, using FITC Annexin V (BD Bioscience). In order to obtain an accurate count, we added the same number of CountBright™ absolute counting beads (Invitrogen) to each sample. Samples were analyzed on a FACS CANTO II (Becton Dickinson) and 200,000 events were collected.

Statistical analysis

Means were compared between 2 groups using a 2-sided Student t-test, using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). The proliferation and apoptosis data were shown as mean \pm SEM of three independent replicates.

Results and Discussion

Although HL is a highly curable disease, advanced HL has typically been associated with high failure rates [20] and relapsed or refractory HL constitutes a common problem [21,22]; new drugs are thus needed for these groups of patients. In the present study, we analyzed the in vitro activity of Lestaurtinib, which has recently been shown to be a multikinase inhibitor that targets both wild-type and mutated JAK2 in MPD [16].

Proliferation and apoptosis in response to Lestaurtinib of cultured HL cells was evaluated in all HL cell lines after 48 h of treatment and compared to cells treated with DMSO vehicle control (normalized to 100%). Reduction of proliferation of HL cells reached the lowest level at 100 nM of Lestaurtinib and remained constant thereafter (Figure 1A). At 300 nM of

Lestaurtinib, a 38% reduction in proliferation was observed in L-428, 60% in L-1236, 66% in L-540, 23% in HDLM-2 and 23% in HD-MY-Z cell lines. At 300 nM of doxorubicin, the reduction in proliferation was 20.3% in L-428, 18.7% in L-1236, 54% in L-540, 34.5% in HDLM-2, and 19% in HD-MY-Z cell lines. At 300 nM, apoptosis increased 62% in L-428, 57% in L-1236, 10% in L-540, 64% in HDLM-2 and 30% in HD-MY-Z (Figure 1B). In order to determine whether Lestaurtinib inhibition had a transient or a long-lasting effect on cell growth, we then looked at the effect at different incubation times (24, 48, 72 and 96 h). We observed no significant differences between 48, 72 or 96 hours (Figure S1).

Proliferation and apoptosis were both Lestaurtinib dose-dependent. Since DMSO is toxic at doses of 5 mM, it was impossible to determine the dose at which 100% of the cells were killed. However, 50% of the cells had died at 1 mM in L-428 and at 300 nM in L-1236 and L-540, while, in HDLM-2 and HD-MY-Z, about 45% and 42% of cells, respectively, had died at 4 mM (Figure S2).

The JAK/STAT pathway is one of the most frequently altered pathways in HL. In addition to genomic gains of JAK2 [4], particularly due to 9p24 gains [23], SOCS1, a negative regulator of JAK/STAT signaling, is often somatically mutated and inactivated [5]. Moreover, constitutive activation of STAT3 has been reported in HL cell lines [8]. In order to investigate the effect of Lestaurtinib treatment on the JAK2 pathway, we assessed the levels and the phosphorylation state of JAK2 and its downstream target molecules following Lestaurtinib treatment. After 1 h, phospho-JAK2 levels had decreased in all the HL cell lines by 46-94% at 300 nM, although no significant changes were observed in JAK2 total protein expression (Figure 2). To assess

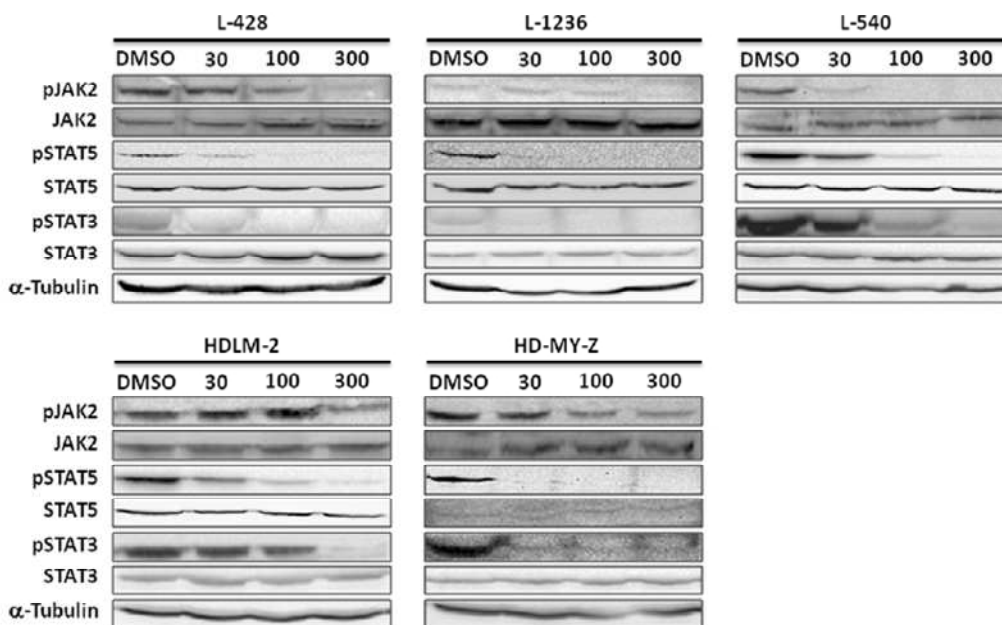


Figure 2. Western blot analysis of JAK2/STAT5 pathway protein levels in L-428, L-1236, L-540, HDLM-2 and HD-MY-Z cells after 1 h of Lestaurtinib treatment at different doses: 30, 100 and 300 nM. doi:10.1371/journal.pone.0018856.g002

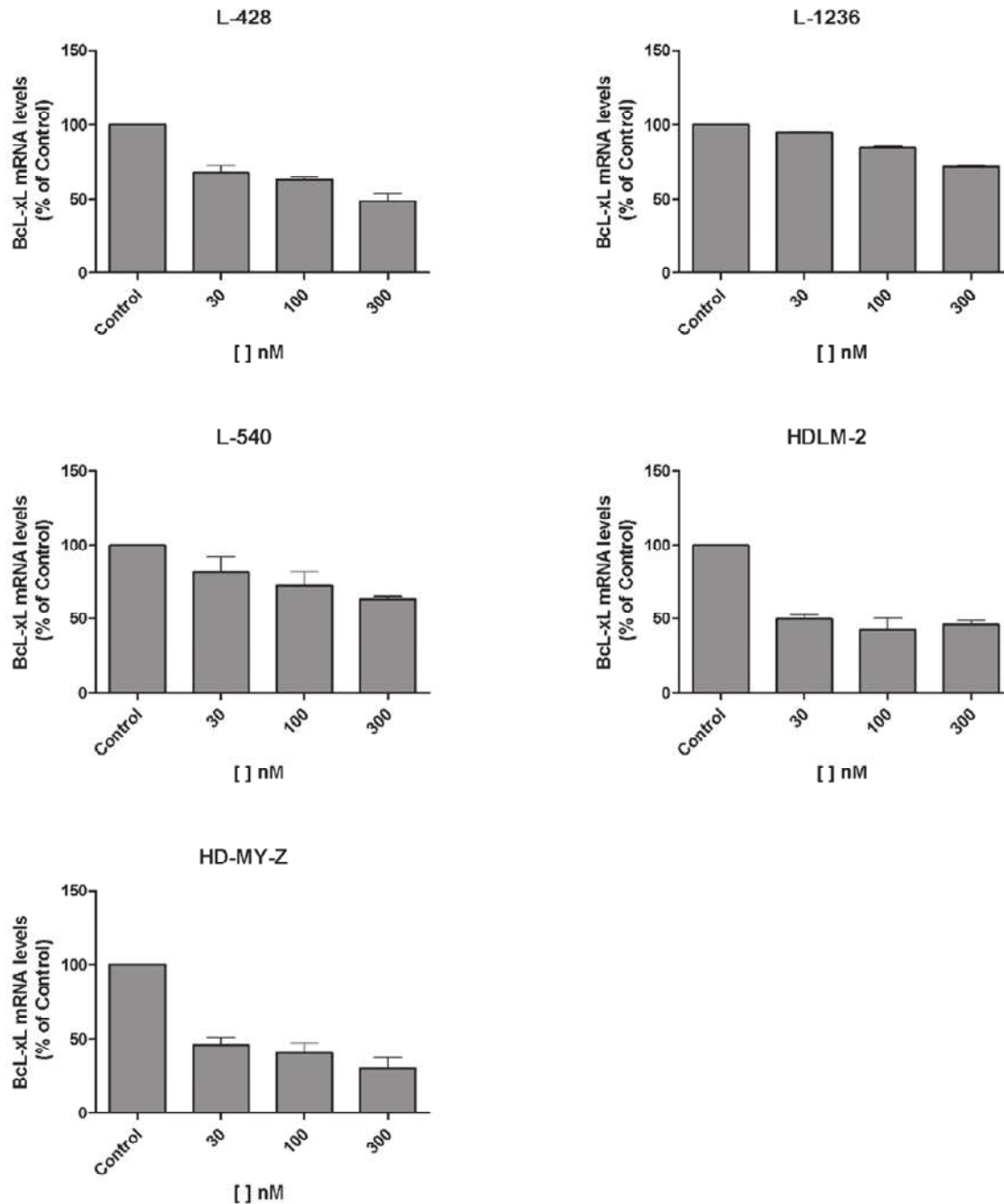


Figure 3. Bcl-xL mRNA analysis after 1 h of Lestaurtinib treatment in L-428, L-1236, L-540, HDLM-2 and HD-MY-Z cell lines.
doi:10.1371/journal.pone.0018856.g003

in greater detail the effects of Lestaurtinib-mediated JAK2 on the JAK2/STAT5 signaling pathway, protein levels STAT5, phospho-STAT5, STAT3 and phospho-STAT3 were analyzed (Figure 2). Lestaurtinib significantly inhibited phosphorylation of STAT5 and STAT3, but with no significant changes in STAT5 and STAT3 total protein. Following 1 hour of Lestaurtinib treatment, phospho-STAT5 and phospho-STAT3 levels decreased by 88-100% and by 97-100%, respectively (Figure 2).

Bcl-xL is a prosurvival protein induced by phosphorylated inhibition STAT5 DNA binding. It appears upregulated in some hematologic malignancies [24] and in primary HL samples [25] and is then involved in apoptotic resistance in HRS cells [25]. Decreased phosphorylation of STAT5 resulted in decreased mRNA expression of its downstream antiapoptotic effector Bcl-xL. After 1 h of 300 nM of Lestaurtinib treatment, Bcl-xL mRNA expression STAT3 levels had decreased by 52% in L-428, 28% in L-1236, 37% in L-540, 55% in HDLM-2 and 71% in HD-MY-Z (Figure 3). This

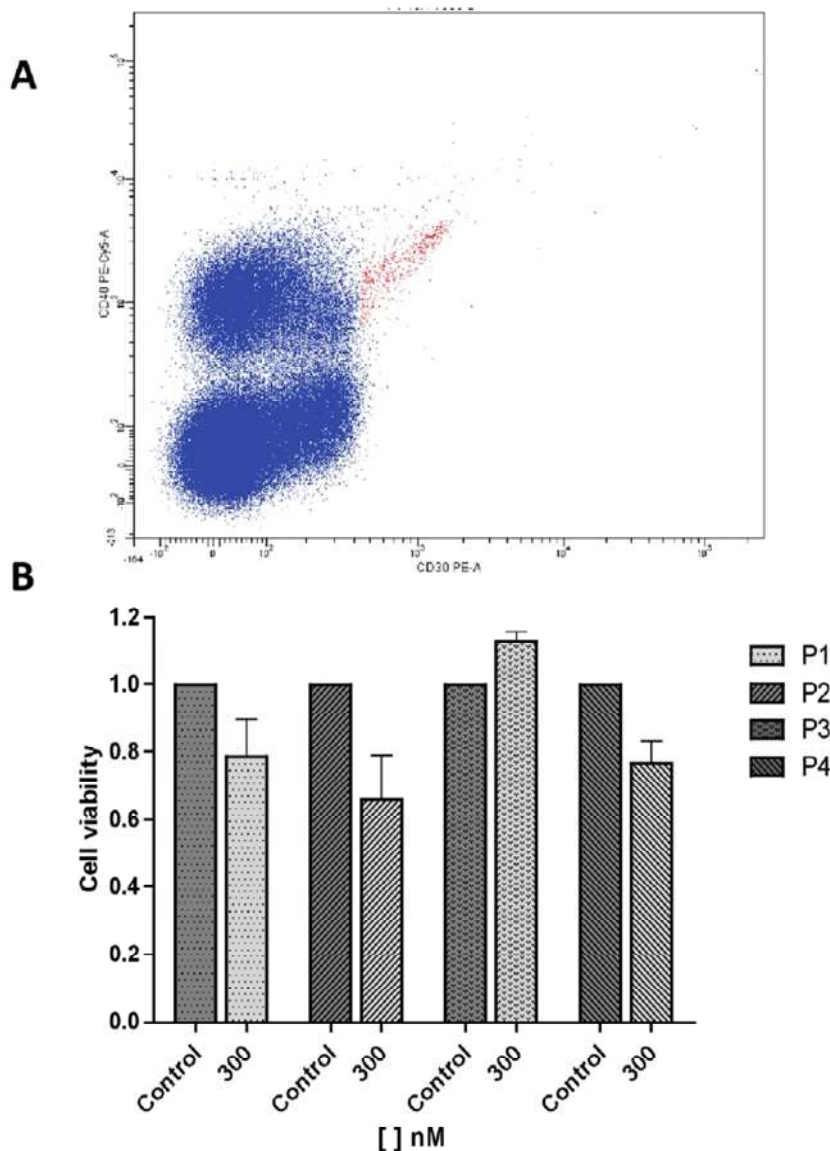


Figure 4. Analysis of cell viability after 24 h of Lestaurtinib treatment in four lymph nodes from classic HL patients. A: representative example of population selected for analysis (anexin-negative, CD32, CD40+, CD30+ and CD95+). B: cell viability after treatment compared to DMSO control. The data are shown as mean \pm SEM of two independent replicates. SEM was calculated on the proportion (treated/untreated cells). doi:10.1371/journal.pone.0018856.g004

downregulation of Bcl-xL could explain the proapoptotic effect of Lestaurtinib [26].

Additionally, we have analyzed the effect of Lestaurtinib in lymph nodes from four classic HL patients. Fromm et al. demonstrated that HL cells from a lymph node can be detected [19] and sorted by flow cytometry [18]. In the present study, we have evaluated the effect of treatment with 300 nM of Lestaurtinib subpopulation of lymph node cells CD30+, CD40+, CD95+ CD3-, which contain HL cells [18,19] (Figure 4A).

After 24 h, cell viability had decreased in three of the four cases by 22%, 35% and 24% versus control cells (DMSO) (Figure 4B). In the patient 3 (non-responder), we increased the treatment dose to 1 mM and then we observed a reduction in cell by 12% (SEM \pm 2,3%). This patient has a different histological subtype (lymphocyte-rich) than cell lines (nodular

sclerosis and mixed cellularity), and this could explain the different treatment response. In order to shed light on the potential toxicity of Lestaurtinib, we have also analyzed cell viability in lymph node CD3+ cells after treatment with 300 nM of Lestaurtinib and observed no decrease of viability (mean versus control = 100.5%; range: 90%-119%).

The present study is the first of its kind to analyze treatment of in the HL in patient lymph nodes by flow cytometry. Although our and results cannot be conclusive due to our small sample size, they provide the first hints that Lestaurtinib induces growth inhibition and apoptosis activation in HL cells through dysregulation of the JAK2/STAT5 signaling pathway. If our findings are confirmed in a larger patient population, they could provide a molecular viability rationale for considering treatment with Lestaurtinib for HL patients with relapsed/refractory disease.

Supporting Information

Figure S1 Proliferation analysis after 24 h, 48 h, 72 h and 96 h of Lestaurtinib treatment in L-428, L-1236, L-540, HDLM-2 and HD-MY-Z cell lines. The data are shown as mean \pm SEM of three independent replicates.

(TIF)

Figure S2 Proliferation analysis after 48 h of Lestaurtinib treatment at increasing doses up to 4 mM in L-428, L-1236, L-540, HDLM-2 and HD-MY-Z cell lines. The data are shown as mean \pm SEM of three independent replicates.

(TIF)

References

- Kuppers R (2009) The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nature reviews Cancer* 9: 15-27.
- Darnell J, Kerr I, Stark G (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-1421.
- Gozgit JM, Beberntz G, Patil P, Ye M, Parmentier J, et al. (2008) Effects of the JAK2 inhibitor, AZ960, on Pim/BAD/BCL-xL survival signaling in the human JAK2 V617F cell line SET-2. *The Journal of biological chemistry* 283: 32334-32343.
- Joos S, Kupper M, Ohl S, von Bonin F, Mechtersheimer G, et al. (2000) Genomic Imbalances Including Amplification of the Tyrosine Kinase Gene JAK2 in CD30+ Hodgkin Cells. *Cancer Res* 60: 549-552.
- Weniger MA, Melzner I, Menz CK, Wegener S, Bucur AJ, et al. (2006) Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* 25: 2679-2684.
- Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG (2007) Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature reviews Cancer* 7: 673-683.
- Melzner I, Weniger MA, Menz CK, Moller P (2006) Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK 20: 157-158.
- Kube D, Holtick U, Vockerodt M, Ahmadi T, Haier B, et al. (2001) STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood* 98: 762-770.
- Navarro A, Diaz T, Martinez A, Gaya A, Pons A, et al. (2009) Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 114: 2945-2951.
- Evens AM, Hutchings M, Diehl V (2008) Treatment of Hodgkin lymphoma: the past, present, and future. *Nature clinical practice Oncology* 5: 543-556.
- Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, Nissen N, Cooper MR, et al. (1992) Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *The New England journal of medicine* 327: 1478-1484.
- Buglio D, Georgakis G, Younes A (2007) Novel small-molecule therapy of Hodgkin lymphoma. *Expert review of anticancer therapy* 7: 735-740.
- Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, Siebert R, Harder L, et al. (2003) Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *International Journal of Cancer* 103: 489-495.
- Pardanani A (2008) JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. *Leukemia* 22: 23-30.
- Anas Younes MF, PeterMcLaughlin, Amanda RCopeland, Silvanedo Castro Faria, JeanetteWood, KantharajEthirajulu, Huan JZhu (2009) Phase-I Study of the Novel Oral JAK-2 Inhibitor SB1518 in Patients with Relapsed Lymphoma: Evidence of Clinical and Biologic Activity. *Blood* 114: 588.
- Shabbir M, Stuart R (2010) Lestaurtinib, a multitargeted tyrosinase kinase inhibitor: from bench to bedside. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 19: 427-436.
- Hexner EO, Serdikoff C, Jan M, Swider CR, Robinson C, et al. (2008) Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 111: 5663-5671.
- Fromm JR, Kussick SJ, Wood BL (2006) Identification and purification of classical Hodgkin cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *Am J Clin Pathol* 126: 764-780.
- Fromm JR, Thomas A, Wood BL (2009) Flow cytometry can diagnose classical Hodgkin lymphoma in lymph nodes with high sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol* 131: 322-332.
- Jemal A, Center MM, Ward E, Thun MJ (2009) Cancer occurrence. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 471: 3-29.
- Horning MF S, DeVos S, Borchmann P, Illidge T, Engert A, Arai AY S (2008) Defining a population of Hodgkin lymphoma patients for novel therapeutics: an international effort. *Ann Oncol* 19: 120-121.
- Horning SJ (2007) Risk, cure and complications in advanced Hodgkin disease. *Hematology* 1: 197-203.
- Meier C, Hoeller S, Bourgau C, Hirschmann P, Schwaller J, et al. (2009) Recurrent numerical aberrations of JAK2 and deregulation of the JAK2-STAT cascade in lymphomas. *Modern pathology* : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 22: 476-487.
- Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, et al. (1998) Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene* 16: 1383-1390.
- Chu WS, Aguilera NS, Wei MQ, Abbondanzo SL (1999) Antiapoptotic marker Bcl-X(L), expression on Reed-Stenberg cells of Hodgkin's disease using a novel monoclonal marker, YTH-2H12. *Hum Pathol* 30: 1065-1070.
- Bai M, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, Grepic C, Agnantis NJ, et al. (2007) Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 38: 103-113.

Figure S3 Cell viability analysis (negative Annexin V) of lymph node cells cultured up to 48 h with growth media (RPMI1640 with 10% FBS). (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AN AM. Performed the experiments: TD GF RA. Analyzed the data: AN TD BG GF AG. Contributed reagents/materials/analysis tools: BB MGG SS. Wrote the paper: AN TD AM MM.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Uno de los rasgos característicos de las células de LHc es la activación constitutiva de la vía JAK/STAT que confiere a las células señales de proliferación y de protección contra la apoptosis [195]. Estudios recientes han mostrado que la vía JAK/STAT está regulada a distintos niveles, permitiendo el control de la intensidad, la duración y la especificidad de la señal; además, la desregulación de esta vía tiene una implicación crucial en la patogénesis tumoral [196]. Se han descrito mutaciones del gen JAK2 en diferentes enfermedades hematológicas, como en los SMPs. Estas mutaciones provocan la activación constitutiva de la vía, activando la expresión de genes diana como Bcl-xL. Hasta la fecha, ninguna de estas mutaciones ha sido descrita en los pacientes de LHc [197]. En cambio, las células de LHc a menudo presentan lesiones genéticas como amplificaciones [187] y ganancias [186] de JAK2 o mutaciones que inactivan a SOCS1 [63], que es un regulador negativo de la vía de señalización JAK/STAT. A pesar de que los miRNAs juegan un papel clave como reguladores precisos del proceso de traducción, su implicación en la regulación de la vía de JAK2 no había sido demostrada hasta el momento. Los presentes resultados proporcionan una evidencia sólida de que los miRNAs, específicamente miR-135a, ayudan a modular la señalización de la vía JAK2/STAT5 y, a su vez, miR-135a puede funcionar como un supresor tumoral a través de su diana, JAK2.

miR-135a está codificado en dos genes: MIRN135A1 y MIRN135A2, que se encuentran en las regiones 3p21.1 y 12q23.1, respectivamente. Los análisis citogenéticos en el linfoma de Hodgkin son complicados; aun así, se han podido encontrar “*breakpoints*” (puntos de rotura) en 3p21 y 12q23 en pacientes afectados de LHc [198]. Esto podría explicar en parte el hecho que miR-135a presente niveles de expresión tan bajos en esta neoplasia y las diferencias interindividuales de expresión.

Uno de los principales obstáculos en la investigación del LHc es la pequeña proporción de células neoplásicas que hay en el tumor, que corresponden aproximadamente al 1% del total de células localizadas en el tumor. Dada la importancia demostrada que tiene el microambiente en esta enfermedad, se decidió analizar la expresión de los miRNAs en el ganglio completo [199-201]. Además, la constante activación de la vía

JAK2/STAT5 no se da únicamente por las lesiones genéticas, también está causada por las citoquinas que se unen al receptor de la vía, para iniciar así la cascada de señalización. Una de estas citoquinas es la interleuquina-3 (IL-3) [202], que está producida tanto por las células HRS como por las células que forman el microambiente tumoral [22]. Por este motivo, consideramos que el análisis de miRNAs en el ganglio linfático completo es más apropiado que si nos centramos únicamente en una selección de células HRS, especialmente al correlacionar los resultados con las variables clínicas. Siguiendo esta premisa, observamos que los niveles de expresión de miR-135a eran significativamente más bajos en los ganglios de pacientes con LHc que en ganglios reactivos controles. El análisis de este miRNA en diferentes líneas celulares de LHc, donde solo encontramos células tumorales, también mostró que este miRNA estaba infraexpresado, sobre todo si comparamos su expresión con oncomiRs como miR-155, miR-21 o miR-9. Por otro lado, encontramos que los niveles diferenciales de expresión de miR-135a detectados en la muestra al completo, donde se encuentran tanto las células HRS como las células del microambiente tumoral, puede ser un marcador de recaída, siendo los pacientes con bajos niveles del miRNA los que presentan una mayor probabilidad de recaída.

Al provocar la re-expresión de miR-135a en las líneas celulares de LHc analizadas, se observó que los niveles aumentados de miR-135a dan lugar a una disminución en los niveles de la proteína JAK2 y, como consecuencia, una mayor tasa de apoptosis y una reducción de los niveles de proliferación debido a la regulación de la expresión de Bcl-xL, que es un gen antiapoptótico activado por esta vía. La expresión del mRNA de Bcl-xL es inducida por la fosforilación de la proteína de unión al DNA STAT5. Bcl-xL es una proteína pro-supervivencia que aparece sobreexpresada en varias neoplasias hematológicas [203]. Igual que en el caso de las mutaciones de BCR-ABL, las mutaciones en JAK2 alteran la respuesta apoptótica frente a los daños del DNA a través de la alteración de la vía de desamidación de Bcl-xL [204, 205]. La inhibición de la apoptosis inducida por un daño en el DNA provocada por la sobreexpresión de las vías de supervivencia es una de las características de la transformación celular y de la baja o inexistente respuesta a la quimioterapia [206]. Estos hallazgos podrían explicar la asociación entre los niveles de expresión de miR-135a y las diferencias

interindividuales en la recaída y la supervivencia libre de enfermedad observada en los pacientes de LHc.

Debido a que la modulación de la vía JAK2/STAT5 por diferentes mecanismos presenta una importancia clave tanto en el desarrollo como en la evolución del LHc, esta vía de señalización emerge como un foco importante en el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a dianas moleculares. En este sentido, existen inhibidores de JAK2, que actualmente se están testando en otras enfermedades hematológicas como los SMP, donde JAK2 se encuentra mutado en gran parte de los casos [182], la mayoría de los cuales se encuentran ahora en ensayos clínicos de fase I-III [183, 207]. Entre estos inhibidores de JAK2 se encuentra el fármaco Lestaurtinib, conocido como CEP-701, que inhibe tanto la forma normal como la mutada de JAK2 [190]. A pesar de ser una enfermedad altamente curable, el LHc en estado avanzado está asociado con altas tasas de fracaso en el tratamiento [208] y, aquellos pacientes en recaída o refractarios son el mayor problema; nuevas terapias moleculares, como los inhibidores de JAK2, podrían ser de gran utilidad para estos grupos de pacientes [39, 209].

Gracias a la inhibición que ejerce sobre la molécula JAK2 y, en consecuencia, sobre la posterior señalización desencadenada a través de ella, Lestaurtinib provoca la disminución de la proliferación y un aumento en la apoptosis en las 5 líneas celulares analizadas de LHc de forma dosis dependiente. Concretamente, Lestaurtinib inhibe la fosforilación de la proteína JAK2, evitando así la fosforilación de las proteínas STAT3 y STAT5 y, en consecuencia, los niveles de mRNA de Bcl-xL también se encuentran disminuidos. Esta regulación indirecta que Lestaurtinib ejerce sobre Bcl-xL, que es una proteína pro-supervivencia, podría explicar el efecto pro-apoptótico observado [210]. Sin embargo, la reducción observada en la fosforilación de STAT3 y STAT5 es mucho mayor que la que observamos a nivel de JAK2. Esto sugiere que probablemente el efecto final en la reducción de la proliferación y el aumento de la apoptosis mediado por STAT3/STAT5 viene activado no sólo por la inhibición de JAK2, sino también por la afectación de otras tirosina quinasa, ya que se ha demostrado que Lestaurtinib es un inhibidor multi-tirosina-quinasa.

Un grupo de la universidad de Washington en Seattle describió por primera vez la posibilidad de identificar y purificar células de LHc mediante la citometría de flujo [211, 212]. Basándonos en estos trabajos, analizamos el efecto de Lestaurtinib en ganglios linfáticos de pacientes de LHc usando esta técnica. Todas las células del ganglio fueron tratadas con el fármaco y, posteriormente, mediante citometría de flujo se analizó únicamente la población celular correspondiente a las células tumorales. Teniendo en cuenta el inmunofenotipo de este tipo de célula tumoral [9], se consideraron células HRS a la subpoblación celular CD30⁺, CD40⁺, CD95⁺ y CD3⁻. Lestaurtinib provocó una reducción de la viabilidad celular en esta subpoblación celular en tres de los cuatro ganglios de pacientes de LHc analizados. Curiosamente, el paciente que no responde al tratamiento pertenece a un subtipo histológico diferente al que pertenecen las líneas celulares con las que hemos trabajado; esta podría ser una posible explicación a que sus células tumorales no presenten cambios en la viabilidad celular a la dosis de 300nM. Aún así se observó una reducción en la viabilidad al aumentar la dosis a 1μM. Analizamos también la viabilidad celular de las células CD3⁺ como análisis indirecto de la toxicidad del fármaco y no mostraron, en ningún caso, reducción de la viabilidad indicando que las dosis a las que trabajamos no son tóxicas para las células del microambiente y que afectan de forma específica a las células tumorales.

El presente trabajo ha sido el primero en analizar cómo afecta el tratamiento con un fármaco a las distintas poblaciones celulares que forman el ganglio linfático de pacientes de linfoma de Hodgkin mediante citometría de flujo. Aunque los presentes resultados son preliminares debido al bajo número de muestras, proporcionan la primera evidencia que Lestaurtinib induce la inhibición del crecimiento celular y la activación de la apoptosis en células de LHc inhibiendo la señalización de la vía JAK2/STAT5. La confirmación de estos resultados en una población de pacientes más grande, podría proporcionar un fundamento molecular para considerar el tratamiento con Lestaurtinib en los pacientes con LHc en recaída o refractario.

Con perspectivas futuras, otra posibilidad terapéutica a tener en cuenta son los miRNAs. Hemos visto que la infraexpresión miR-135a tiene mal pronóstico en el LHc y, además, que este papel pronóstico podría ser debido a la regulación que miR-135a ejerce sobre la vía JAK2/STAT5. En este sentido se propondría el aumento de los

niveles del miRNA para potenciar su efecto de gen supresor de tumor. Entre las terapias que actualmente se están desarrollando con el fin de regular los miRNAs encontramos dos en concreto que podría ser de gran utilidad en estos casos: los *miRNA mimics* y los *AAV miRNA vectors*. Con ambas estrategias lo que se consigue es aumentar los niveles del miRNA diana. Además, otra posibilidad que se nos plantea es el uso de terapias que combinen estrategias para aumentar los niveles de los miRNAs con los nuevos fármacos inhibidores de JAK2 o con inhibidores de tirosina quinasa menos específicos como imatinib o dasatinib. La finalidad de esta combinación sería conseguir una inhibición mucho más fuerte de la vía de señalización JAK2/STAT5.

En resumen, la vía JAK2/STAT5 es una de las vías más frecuentemente alteradas en el LHc y participa de forma activa en la patogénesis del LHc. Esto convierte a la proteína JAK2, una de las moléculas claves de esta vía, en una importante diana terapéutica a tener en cuenta para tratar esta enfermedad. En nuestros trabajos hemos demostrado que tanto el microRNA miR-135a como el fármaco Lestaurtinib inhiben la señalización a través de esta vía consiguiendo disminuir la proliferación y aumentar la apoptosis de las células tumorales del LHc. Así, proporcionamos una evidencia molecular para tener en cuenta a estos dos agentes en el pronóstico o el tratamiento respectivamente de los pacientes de LHc en recaída o refractarios.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El análisis de la expresión de microRNAs en ganglio linfático tiene implicaciones pronósticas en el linfoma de Hodgkin clásico.
2. La reducción de la expresión de miR-135a es un marcador de mal pronóstico para recaída y supervivencia libre de enfermedad en LHc.
3. miR-135a actúa como gen supresor de tumor reduciendo la proliferación y activando la apoptosis.
4. La baja expresión de miR-135a contribuye a la tumorigénesis del LH permitiendo la acumulación anormal de JAK2.
5. Lestaurtinib impide las señales de supervivencia que emite la vía JAK2/STAT5 mediante la inhibición de la fosforilación de la proteína JAK2.
6. La citometría de flujo es una herramienta útil en el análisis de las diferentes poblaciones celulares procedentes del ganglio linfático en el LHc permitiendo la realización de estudios de respuesta a fármacos.
7. Lestaurtinib reduce la viabilidad de las células HRS procedentes de pacientes, sin reducir la viabilidad de los linfocitos T acompañantes.
8. Las alteraciones en la regulación de la vía de JAK2 son críticas para la evolución clínica de los pacientes de LHc convirtiendo a esta vía en una diana terapéutica a tener en cuenta para el tratamiento de aquellos pacientes refractarios a terapias convencionales.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Hodgkin T: **On some morbid experiences of the absorbent glands and spleen.** *Medico-Chirurgical Transactions* 1832, **17**:68-97.
2. Wilks S: **Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or, Hodgkin's disease) with remarks.** *Guy's Hospital Reports (3rd series)* 1865, **11**:56-67.
3. Chakravarti A, Halloran SL, Bale SJ, Tucker MA: **Etiological heterogeneity in Hodgkin's disease: HLA linked and unlinked determinants of susceptibility independent of histological concordance.** *Genet Epidemiol* 1986, **3**(6):407-415.
4. Mark DB, Hlatky MA, Califf RM, Naylor CD, Lee KL, Armstrong PW, Barbash G, White H, Simoons ML, Nelson CL: **Cost effectiveness of thrombolytic therapy with tissue plasminogen activator as compared with streptokinase for acute myocardial infarction.** *N Engl J Med* 1995, **332**(21):1418-1424.
5. Cartwright RA, Watkins G: **Epidemiology of Hodgkin's disease: a review.** *Hematol Oncol* 2004, **22**(1):11-26.
6. Rowlings PA, Curtis RE, Passweg JR, Deeg HJ, Socie G, Travis LB, Kingma DW, Jaffe ES, Sobocinski KA, Horowitz MM: **Increased incidence of Hodgkin's disease after allogeneic bone marrow transplantation.** *J Clin Oncol* 1999, **17**(10):3122-3127.
7. Dolcetti R, Boiocchi M, Gloghini A, Carbone A: **Pathogenetic and histogenetic features of HIV-associated Hodgkin's disease.** *Eur J Cancer* 2001, **37**(10):1276-1287.
8. Mani H, Jaffe ES: **Hodgkin lymphoma: an update on its biology with new insights into classification.** *Clinical Lymphoma & Myeloma* 2009, **9**(3):206-216.
9. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J: **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** Lyon: IARC; 2008.
10. Hess JL, Bodis S, Pinkus G, Silver B, Mauch P: **Histopathologic grading of nodular sclerosis Hodgkin's disease. Lack of prognostic significance in 254 surgically staged patients.** *Cancer* 1994, **74**(2):708-714.
11. van Spronsen DJ, Vrints LW, Hofstra G, Crommelin MA, Coebergh JW, Breed WP: **Disappearance of prognostic significance of histopathological grading of nodular**

- sclerosing Hodgkin's disease for unselected patients, 1972-92. *Br J Haematol* 1997, **96**(2):322-327.
12. Gulley ML, Eagan PA, Quintanilla-Martinez L, Picado AL, Smir BN, Childs C, Dunn CD, Craig FE, Williams JW, Jr., Banks PM: **Epstein-Barr virus DNA is abundant and monoclonal in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: association with mixed cellularity subtype and Hispanic American ethnicity.** *Blood* 1994, **83**(6):1595-1602.
 13. Thomas-Tikhonenko A, Cozma D: **PAX5 and B-cell neoplasms: transformation through presentation.** *Future Oncol* 2008, **4**(1):5-9.
 14. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann M-L, Küppers R: **Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma.** *Annual Review of Pathology* 2009, **4**:151-174.
 15. Re D, Muschen M, Ahmadi T, Wickenhauser C, Staratschek-Jox A, Holtick U, Diehl V, Wolf J: **Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells.** *Cancer Res* 2001, **61**(5):2080-2084.
 16. Stein H, Marafioti T, Foss HD, Laumen H, Hummel M, Anagnostopoulos I, Wirth T, Demel G, Falini B: **Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription.** *Blood* 2001, **97**(2):496-501.
 17. Torlakovic E, Tierens A, Dang HD, Delabie J: **The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease.** *Am J Pathol* 2001, **159**(5):1807-1814.
 18. van den Berg A VL, Poppema S.: **High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma.** *Am J Pathol* 1999, **154**(6):1685-1691.
 19. Oudejans JJ, Kummer JA, Jiwa M, van der Valk P, Ossenkoppele GJ, Kluin PM, Kluin-Nelemans JC, Meijer CJ: **Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease.** *Am J Pathol* 1996, **148**(1):233-240.

20. Takahashi H, Hideshima K, Kawazoe K, Tsuda N, Fujita S, Shibata Y, Okabe H, Yamabe S: **Immunophenotypes of Reed-Sternberg cells and their variants: a study of 68 cases of Hodgkin's disease.** *Tohoku J Exp Med* 1995, **177**(3):193-211.
21. Küppers R: **The biology of Hodgkin's lymphoma.** *Nature Reviews Cancer* 2009, **9**(1):15-27.
22. Skinnider BF, Mak TW: **The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2002, **99**(12):4283-4297.
23. Kapp U, Wolf J, Hummel M, Pawlita M, von Kalle C, Dallenbach F, Schwonzen M, Krueger GR, Muller-Lantzsch N, Fonatsch C *et al*: **Hodgkin's lymphoma-derived tissue serially transplanted into severe combined immunodeficient mice.** *Blood* 1993, **82**(4):1247-1256.
24. Kapp U, Dux A, Schell-Frederick E, Banik N, Hummel M, Mucke S, Fonatsch C, Bullerdiek J, Gottstein C, Engert A *et al*: **Disseminated growth of Hodgkin's-derived cell lines L540 and L540cy in immune-deficient SCID mice.** *Ann Oncol* 1994, **5 Suppl 1**:121-126.
25. Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, Pinto A, Gloghini A, Carbone A, Colombatti A: **Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions.** *Int J Cancer* 2008, **122**(4):769-776.
26. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Emmerich F, Muller G, Foss HD, Royer HD, Stein H, Dorken B: **Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils.** *Blood* 1999, **94**(6):2065-2071.
27. Carbone A, Gloghini A, Gruss HJ, Pinto A: **CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease.** *Am J Pathol* 1995, **147**(4):912-922.
28. Sanders ME, Makgoba MW, Sussman EH, Luce GE, Cossman J, Shaw S: **Molecular pathways of adhesion in spontaneous rosetting of T-lymphocytes to the Hodgkin's cell line L428.** *Cancer Res* 1988, **48**(1):37-40.

29. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA: **Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2004, **103**(5):1755-1762.
30. Piccirillo CA, Shevach EM: **Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells.** *J Immunol* 2001, **167**(3):1137-1140.
31. Gandhi MK, Moll G, Smith C, Dua U, Lambley E, Ramuz O, Gill D, Marlton P, Seymour JF, Khanna R: **Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2007, **110**(4):1326-1329.
32. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, Rodig SJ, Takeyama K, Abramson J, Chen W, Kutok JL, Rabinovich GA, Shipp MA: **The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(32):13134-13139.
33. Newcom SR, Gu L: **Transforming growth factor beta 1 messenger RNA in Reed-Sternberg cells in nodular sclerosing Hodgkin's disease.** *J Clin Pathol* 1995, **48**(2):160-163.
34. Chemnitz JM, Eggle D, Driesen J, Classen S, Riley JL, Debey-Pascher S, Beyer M, Popov A, Zander T, Schultze JL: **RNA fingerprints provide direct evidence for the inhibitory role of TGFbeta and PD-1 on CD4+ T cells in Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2007, **110**(9):3226-3233.
35. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, Sakai T, Hishizawa M, Tashima M, Kondo T, Ohmori K, Kurata M, Hayashi T *et al*: **PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2008, **111**(6):3220-3224.
36. Enblad G, Molin D, Glimelius I, Fischer M, Nilsson G: **The potential role of innate immunity in the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma.** *Hematol Oncol Clin North Am* 2007, **21**(5):805-823.
37. Evens AM, Hutchings M, Diehl V: **Treatment of Hodgkin lymphoma: the past, present, and future.** *Nat Clin Pract Oncol* 2008, **5**(9):543-556.

38. Kuruvilla J: **Standard therapy of advanced Hodgkin lymphoma.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:497-506.
39. Horning S, Fanale M, de Vos S, Borchmann P, Illidge T, Engert A, Arai S, Younes A: **Defining a population of Hodgkin lymphoma patients for novel therapeutics: an international effort.** *Ann Oncol* 2008, **19**:120-121.
40. Buglio D, Georgakis G, Younes A: **Novel small-molecule therapy of Hodgkin lymphoma.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2007, **7**(5):735-740.
41. Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Hasenclever D, Tesch H, Herrmann R, Dorken B, Muller-Hermelink HK *et al*: **Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease.** *N Engl J Med* 2003, **348**(24):2386-2395.
42. Linch DC, Winfield D, Goldstone AH, Moir D, Hancock B, McMillan A, Chopra R, Milligan D, Hudson GV: **Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: results of a BNLI randomised trial.** *Lancet* 1993, **341**(8852):1051-1054.
43. Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, Sieber M, Carella AM, Haenel M, Boissevain F, Zschaber R, Muller P, Kirchner H *et al*: **Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial.** *Lancet* 2002, **359**(9323):2065-2071.
44. Clodi K, Younes A: **Reed-Sternberg cells and the TNF family of receptors/ligands.** *Leuk Lymphoma* 1997, **27**(3-4):195-205.
45. Wedgwood A, Fanale M, Fayad L, McLaughlin P, Hagemeister F, Pro B, Romaguera J, Rodriguez M, Samaniego F, Younes A: **Rituximab + ABVD improves event-free survival (EFS) in patients with classical Hodgkin lymphoma in all International Prognostic Score (IPS) groups and in patients who have PET positive disease after 2-3 cycles of therapy.** *Blood* 2007, **110**:215.
46. Younes A, Romaguera J, Hagemeister F, McLaughlin P, Rodriguez MA, Fiumara P, Goy A, Jeha S, Manning JT, Jr., Jones D *et al*: **A pilot study of rituximab in patients with recurrent, classic Hodgkin disease.** *Cancer* 2003, **98**(2):310-314.

47. Oflazoglu E, Kissler KM, Sievers EL, Grewal IS, Gerber HP: **Combination of the anti-CD30-auristatin-E antibody-drug conjugate (SGN-35) with chemotherapy improves antitumour activity in Hodgkin lymphoma.** *Br J Haematol* 2008, **142**(1):69-73.
48. Younes A, Forero-Torres A, Bartlett N, Leonard J, Lynch C, Kennedy D, Sievers E: **Multiple complete responses in a phase I dose-escalation study of the antibody-drug conjugate SGN-35 in patients with relapsed or refractory CD30-positive lymphomas.** *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts 2008)*, **112**:1006.
49. Bartlett N, Forero-Torres A, Rosenblatt J, Fanale M, Horning S, thompson S, Sievers E, Kennedy D: **Complete remissions with weekly dosing of SGN-35, a novel antibody-drug conjugate (ADC) targeting CD30, in a phase I dose-escalation study in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma (HL) or systemic anaplastic large cell lymphoma (sALCL).** *J Clin Oncol (suppl; abstr 8500)* 2009, **27**:15s.
50. Dickinson M, Ritchie D, DeAngelo DJ, Spencer A, Ottmann OG, Fischer T, Bhalla KN, Liu A, Parker K, Scott JW *et al*: **Preliminary evidence of disease response to the pan deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in refractory Hodgkin Lymphoma.** *Br J Haematol* 2009, **147**(1):97-101.
51. Drexler HG: **Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines.** *Leuk Lymphoma* 1993, **9**(1-2):1-25.
52. Kanzler H, Hansmann ML, Kapp U, Wolf J, Diehl V, Rajewsky K, Kuppers R: **Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient.** *Blood* 1996, **87**(8):3429-3436.
53. Brauninger A, Wacker HH, Rajewsky K, Kuppers R, Hansmann ML: **Typing the histogenetic origin of the tumor cells of lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma in relation to tumor cells of classical and lymphocyte-predominance Hodgkin's lymphoma.** *Cancer Res* 2003, **63**(7):1644-1651.
54. Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K: **Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells.** *J Exp Med* 1996, **184**(4):1495-1505.

55. Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML: **Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(23):10962-10966.
56. Kuppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K: **Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections.** *EMBO J* 1993, **12**(13):4955-4967.
57. Kuppers R: **Molecular biology of Hodgkin's lymphoma.** *Adv Cancer Res* 2002, **84**:277-312.
58. Kuppers R, Rajewsky K: **The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease.** *Annu Rev Immunol* 1998, **16**:471-493.
59. Dutton A, O'Neil JD, Milner AE, Reynolds GM, Starczynski J, Crocker J, Young LS, Murray PG: **Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(17):6611-6616.
60. Kashkar H, Haefs C, Shin H, Hamilton-Dutoit SJ, Salvesen GS, Kronke M, Jurgensmeier JM: **XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells.** *J Exp Med* 2003, **198**(2):341-347.
61. Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, Hummel F, Wiesner B, Janz M, Jundt F, Hirsch B, Johrens-Leder K, Vornlocher HP *et al*: **c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis.** *J Exp Med* 2004, **199**(8):1041-1052.
62. Joos S, Küpper M, Ohl S, von Bonin F, Mechttersheimer G, Bentz M, Marynen P, Möller P, Pfreundschuh M, Trümper L *et al*: **Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells.** *Cancer Research* 2000, **60**(3):549-552
63. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, Wegener S, Bucur AJ, Dorsch K, Mattfeldt T, Barth TFE, Möller P: **Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin**

- lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation.** *Oncogene* 2006, **25**(18):2679-2684.
64. Mottok A, Renne C, Willenbrock K, Hansmann ML, Brauninger A: **Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6.** *Blood* 2007, **110**(9):3387-3390.
65. Barth TF, Martin-Subero JI, Joos S, Menz CK, Hasel C, Mechttersheimer G, Parwaresch RM, Lichter P, Siebert R, Moeller P: **Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2003, **101**(9):3681-3686.
66. Kube D, Holtick U, Vockerodt M, Ahmadi T, Haier B, Behrmann I, Heinrich PC, Diehl V, Tesch H: **STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines.** *Blood* 2001, **98**(3):762-770.
67. Scheeren FA, Diehl SA, Smit LA, Beaumont T, Naspetti M, Bende RJ, Blom B, Karube K, Ohshima K, van Noesel CJ *et al*: **IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis.** *Blood* 2008, **111**(9):4706-4715.
68. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Patterson B, Trumper L, Kapp U, Mak TW: **Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2002, **99**(2):618-626.
69. Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Kagi D, Ho A, Hessel A, Tipsword M, Williams A, Mirtsos C *et al*: **Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells.** *J Exp Med* 1999, **189**(12):1939-1946.
70. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dorken B, Zenke M, Stein H, Scheidereit C: **Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity.** *J Exp Med* 2002, **196**(5):605-617.
71. Lamprecht B, Kreher S, Anagnostopoulos I, Johrens K, Monteleone G, Jundt F, Stein H, Janz M, Dorken B, Mathas S: **Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin**

- lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha.** *Blood* 2008, **112**(8):3339-3347.
72. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, Wei W, Kapatai G, Flavell JR, Kalk E, Piper K, Lee S, Machado L *et al*: **Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells.** *Am J Pathol* 2008, **173**(1):195-204.
73. Flavell JR, Baumforth KR, Wood VH, Davies GL, Wei W, Reynolds GM, Morgan S, Boyce A, Kelly GL, Young LS *et al*: **Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells.** *Blood* 2008, **111**(1):292-301.
74. Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W: **Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor.** *EMBO J* 1998, **17**(6):1700-1709.
75. Young LS, Murray PG: **Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours.** *Oncogene* 2003, **22**(33):5108-5121.
76. Kawanishi M: **[Regulation of apoptosis by the latent infection membrane protein 1 of Epstein-Barr virus].** *Nippon Rinsho* 1997, **55**(2):305-310.
77. Mancao C, Hammerschmidt W: **Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival.** *Blood* 2007, **110**(10):3715-3721.
78. Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, Longnecker R: **Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals.** *Immunity* 1998, **9**(3):405-411.
79. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC: **Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres.** *Nature* 1989, **342**(6252):929-931.
80. Portis T, Dyck P, Longnecker R: **Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2003, **102**(12):4166-4178.
81. Vockerodt M, Morgan SL, Kuo M, Wei W, Chukwuma MB, Arrand JR, Kube D, Gordon J, Young LS, Woodman CB *et al*: **The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane**

- protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. *J Pathol* 2008, **216**(1):83-92.**
82. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA *et al*: **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** *Nature* 2005, **435**(7043):834-838.
 83. Pasquinelli AE, Ruvkun G: **Control of developmental timing by micrornas and their targets.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002, **18**:495-513.
 84. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** *Cell* 1993, **75**(5):843-854.
 85. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans.** *Nature* 2000, **403**(6772):901-906.
 86. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T: **Identification of tissue-specific microRNAs from mouse.** *Curr Biol* 2002, **12**(9):735-739.
 87. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: **Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.** *Nature Reviews Cancer* 2006, **6**(4):259-269
 88. Garzon R, Marcucci G, Croce CM: **Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2010, **9**(10):775-789
 89. Gregory RI, Shiekhattar R: **MicroRNA biogenesis and cancer.** *Cancer Research* 2005, **65**(9):3509-3512.
 90. Kent OA, Mendell JT: **A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes.** *Oncogene* 2006, **25**(46):6188-6196
 91. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y: **The microRNA pathway and cancer.** *Cancer Science* 2010, **101**(11):2309-2315
 92. Zimmerman AL, Wu S: **MicroRNAs, cancer and cancer stem cells.** *Cancer Letters* 2011, **300**(1):10-19.

93. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E: **Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes.** *Cell* 2005, **120**(1):21-24.
94. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A: **Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units.** *Genome Res* 2004, **14**(10A):1902-1910.
95. Zeng Y: **Principles of micro-RNA production and maturation.** *Oncogene* 2006, **25**(46):6156-6162.
96. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP: **An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*.** *Science (New York, NY)* 2001, **294**(5543):858-862.
97. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *EMBO J* 2004, **23**(20):4051-4060.
98. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR: **Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs.** *RNA* 2004, **10**(12):1957-1966.
99. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S *et al*: **The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.** *Nature* 2003, **425**(6956):415-419.
100. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ: **Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.** *Nature* 2004, **432**(7014):231-235.
101. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T: **The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis.** *Curr Biol* 2004, **14**(23):2162-2167.
102. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D: **Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs.** *RNA* 2004, **10**(2):185-191.
103. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U: **Nuclear export of microRNA precursors.** *Science* 2004, **303**(5654):95-98.

104. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR: **Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs.** *Genes Dev* 2003, **17**(24):3011-3016.
105. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ: **Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.** *Nature* 2001, **409**(6818):363-366.
106. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD: **A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.** *Science* 2001, **293**(5531):834-838.
107. Tang G: **siRNA and miRNA: an insight into RISCs.** *Trends Biochem Sci* 2005, **30**(2):106-114.
108. Bartel DP: **MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.** *Cell* 2009, **136**(2):215-233.
109. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.
110. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA: **siRNAs can function as miRNAs.** *Genes Dev* 2003, **17**(4):438-442.
111. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P: **Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA.** *Science* 2005, **309**(5740):1577-1581.
112. Orom UA, Nielsen FC, Lund AH: **MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation.** *Mol Cell* 2008, **30**(4):460-471.
113. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA: **Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation.** *Science* 2007, **318**(5858):1931-1934.
114. Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, Liu S, Schwind S, Santhanam R, Hickey CJ *et al*: **miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts.** *Cell* 2010, **140**(5):652-665.
115. Gonzalez S, Pisano DG, Serrano M: **Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs.** *Cell Cycle* 2008, **7**(16):2601-2608.

116. Khraiwesh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R, Frank W: **Transcriptional control of gene expression by microRNAs.** *Cell* 2010, **140**(1):111-122.
117. Kim DH, Saetrom P, Snove O, Jr., Rossi JJ: **MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(42):16230-16235.
118. Kozak M: **Faulty old ideas about translational regulation paved the way for current confusion about how microRNAs function.** *Gene* 2008, **423**(2):108-115.
119. Cho WC: **OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers.** *Mol Cancer* 2007, **6**:60.
120. Calin GA, Croce CM: **MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale.** *Cancer Res* 2006, **66**(15):7390-7394.
121. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M *et al*: **Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(9):2999-3004.
122. Bullrich F, Fujii H, Calin G, Mabuchi H, Negrini M, Pekarsky Y, Rassenti L, Alder H, Reed JC, Keating MJ *et al*: **Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene.** *Cancer Res* 2001, **61**(18):6640-6648.
123. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K *et al*: **Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(24):15524-15529.
124. Cimmino A, Calin G, Fabbri M, Iorio M, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik S, Ageilan R, Zupo S, Dono N *et al*: **miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL-2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(39):13944-13949.
125. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T: **let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells.** *Biol Pharm Bull* 2006, **29**(5):903-906.

126. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ: **RAS is regulated by the let-7 microRNA family.** *Cell* 2005, **120**(5):635-647.
127. Lee YS, Dutta A: **The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene.** *Genes Dev* 2007, **21**(9):1025-1030.
128. Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ: **MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells.** *Cancer Res* 2007, **67**(20):9762-9770.
129. Pedersen-Bjergaard J, Pedersen M, Roulston D, Philip P: **Different genetic pathways in leukemogenesis for patients presenting with therapy-related myelodysplasia and therapy-related acute myeloid leukemia.** *Blood* 1995, **86**(9):3542-3552.
130. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M *et al*: **A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia.** *N Engl J Med* 2005, **353**(17):1793-1801.
131. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T *et al*: **MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia.** *Blood* 2008, **111**(6):3183-3189.
132. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M *et al*: **MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer.** *Cancer Res* 2005, **65**(16):7065-7070.
133. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ: **mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis.** *Oncogene* 2007, **26**(42):6133-6140.
134. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T *et al*: **Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis.** *Cancer Cell* 2006, **9**(3):189-198.
135. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ *et al*: **Transactivation of miR-34a by p53**

- broadly influences gene expression and promotes apoptosis.** *Mol Cell* 2007, **26**(5):745-752.
136. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D *et al*: **A microRNA component of the p53 tumour suppressor network.** *Nature* 2007, **447**(7148):1130-1134.
137. Gallardo E NA, Viñolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M: **miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer.** *Carcinogenesis* 2009, **30**(11):1903-1909.
138. Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjarn M, Hansen HF, Berger U *et al*: **LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates.** *Nature* 2008, **452**(7189):896-899.
139. Tam W, Hughes SH, Hayward WS, Besmer P: **Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukosis virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis.** *J Virol* 2002, **76**(9):4275-4286.
140. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK *et al*: **MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma.** *JAMA* 2008, **299**(4):425-436.
141. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A: **High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma.** *Genes Chromosomes Cancer* 2004, **39**(2):167-169.
142. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen BJ, van den Berg A: **BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas.** *J Pathol* 2005, **207**(2):243-249.
143. Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Liu CG, Schnittger S, Haferlach T *et al*: **Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(10):3945-3950.

144. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG: **Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **334**(4):1351-1358.
145. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T: **MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.** *Gastroenterology* 2007, **133**(2):647-658.
146. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M *et al*: **A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(7):2257-2261.
147. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS: **MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells.** *Cancer Res* 2005, **65**(14):6029-6033.
148. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH: **Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells.** *J Biol Chem* 2008, **283**(2):1026-1033.
149. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY: **MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1).** *J Biol Chem* 2007, **282**(19):14328-14336.
150. Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M: **Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma.** *Cancer Res* 2004, **64**(9):3087-3095.
151. Mendell JT: **miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease.** *Cell* 2008, **133**(2):217-222.
152. Venturini L, Battmer K, Castoldi M, Schultheis B, Hochhaus A, Muckenthaler MU, Ganser A, Eder M, Scherr M: **Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells.** *Blood* 2007, **109**(10):4399-4405.
153. Navarro A, Marrades R, Viñolas N, Quera A, Agustí C, Huerta A, Ramirez J, Torres A, Monzo M: **MicroRNAs expressed during lung cancer development are expressed in human pseudoglandular lung embryogenesis.** *Oncology* 2009, **76**:162-169.
154. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT: **c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression.** *Nature* 2005, **435**(7043):839-843.

155. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A *et al*: **A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors.** *Adv Exp Med Biol* 2007, **604**:17-46.
156. Navarro A, Gaya A, Martinez A, Urbano-Ispizua A, Pons A, Balague O, Gel B, Abrisqueta P, Lopez-Guillermo A, Artells R *et al*: **MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2008, **111**(5):2825-2832.
157. Van Vlierberghe P, De Weer A, Mestdagh P, Feys T, De Preter K, De Paepe P, Lambein K, Vandesompele J, Van Roy N, Verhasselt B *et al*: **Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77+ B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs.** *British Journal of Haematology* 2009, **147**(5):686-690.
158. Gibcus J, Tan L, Harms G, Schakel R, Jong D, Blokzijl T, Möller P, Poppema S, Kroesen BJ, Van den Berg A: **Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile.** *Neoplasia* 2009, **11**(2):167-176.
159. Nie K, Gomez M, Garcia J, Liu Y, Tan L, Chadburn A, Tuschl T, Knowles D, Tam W: **MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas.** *Am J Pathol* 2008, **173**(1):242-252.
160. Brodersen P, Voinnet O: **Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(2):141-148.
161. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM, Athey BD: **New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites.** *Genome Res* 2009, **19**(7):1175-1183.
162. Pillai RS: **MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?** *RNA* 2005, **11**(12):1753-1761.
163. Tsai NP, Lin YL, Wei LN: **MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression.** *Biochem J* 2009, **424**(3):411-418.

164. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: **Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.** *Cell* 2005, **120**(1):15-20.
165. Watanabe Y, Tomita M, Kanai A: **Computational methods for microRNA target prediction.** *Methods Enzymol* 2007, **427**:65-86.
166. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ *et al*: **A microRNA polycistron as a potential human oncogene.** *Nature* 2005, **435**(7043):828-833.
167. Gumireddy K, Young DD, Xiong X, Hogenesch JB, Huang Q, Deiters A: **Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2008, **47**(39):7482-7484.
168. Zhao X, Pan F, Holt CM, Lewis AL, Lu JR: **Controlled delivery of antisense oligonucleotides: a brief review of current strategies.** *Expert Opin Drug Deliv* 2009, **6**(7):673-686.
169. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M: **Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'.** *Nature* 2005, **438**(7068):685-689.
170. Orom UA, Kauppinen S, Lund AH: **LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function.** *Gene* 2006, **372**:137-141.
171. Choi WY, Giraldez AJ, Schier AF: **Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430.** *Science* 2007, **318**(5848):271-274.
172. Xiao J, Yang B, Lin H, Lu Y, Luo X, Wang Z: **Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4.** *J Cell Physiol* 2007, **212**(2):285-292.
173. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA: **MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells.** *Nat Methods* 2007, **4**(9):721-726.
174. Loya CM, Lu CS, Van Vactor D, Fulga TA: **Transgenic microRNA inhibition with spatiotemporal specificity in intact organisms.** *Nat Methods* 2009, **6**(12):897-903.

175. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T: **Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines.** *Gastroenterology* 2006, **130**(7):2113-2129.
176. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ: **High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma.** *Mol Cancer* 2007, **6**:5.
177. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA: **Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells.** *Cancer Cell* 2006, **9**(6):435-443.
178. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O: **Signaling through the hematopoietic cytokine receptors.** *Annu Rev Immunol* 1995, **13**:369-398.
179. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF: **The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor.** *Mol Cell* 2001, **8**(6):1327-1338.
180. Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN: **Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability.** *J Biol Chem* 2005, **280**(29):27251-27261.
181. Constantinescu SN, Girardot M, Pecquet C: **Mining for JAK-STAT mutations in cancer.** *Trends Biochem Sci* 2008, **33**(3):122-131.
182. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG: **Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(9):673-683.
183. Pesu M, Laurence A, Kishore N, Zwillich SH, Chan G, O'Shea JJ: **Therapeutic targeting of Janus kinases.** *Immunol Rev* 2008, **223**:132-142.
184. Vainchenker W, Dusa A, Constantinescu SN: **JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies.** *Semin Cell Dev Biol* 2008, **19**(4):385-393.
185. Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, Ariola C, Fodale V, Clappier E, Paoloni F *et al*: **Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia.** *J Exp Med* 2008, **205**(4):751-758.

186. Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, Siebert R, Harder L, Martin-Subero JI, Wolf J, Adamowicz M, Barth TF, Lichter P *et al*: **Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2.** *Int J Cancer* 2003, **103**(4):489-495.
187. Joos S, Kupper M, Ohl S, von Bonin F, Mechttersheimer G, Bentz M, Marynen P, Moller P, Pfreundschuh M, Trumper L *et al*: **Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells.** *Cancer Res* 2000, **60**(3):549-552.
188. Pardanani A: **JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials.** *Leukemia* 2008, **22**(1):23-30.
189. Wadleigh M, Tefferi A: **Preclinical and clinical activity of ATP mimetic JAK2 inhibitors.** *Clin Adv Hematol Oncol* 2010, **8**(8):557-563.
190. Shabbir M, Stuart R: **Lestaurtinib, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor: from bench to bedside.** *Expert Opin Investig Drugs* 2010, **19**(3):427-436.
191. Hexner EO, Serdikoff C, Jan M, Swider CR, Robinson C, Yang S, Angeles T, Emerson SG, Carroll M, Ruggeri B *et al*: **Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders.** *Blood* 2008, **111**(12):5663-5671.
192. Strock C, Park J, Rosen M, Dionne C, Ruggeri B, Jones-Bolin S, Denmeade S, Ball D, Nelkin B: **CEP-701 and CEP-751 inhibit constitutively activated RET tyrosine kinase activity and block medullary thyroid carcinoma cell growth.** *Cancer Res* 2003, **63**(17):5559-5563.
193. Younes A, Fanale M, McLaughlin P, Copeland A, Zhu J, Faria S: **Phase I Study of a Novel Oral JAK-2 Inhibitor SB1518 In Patients with Relapsed Lymphoma: Evidence of Clinical and Biologic Activity In Multiple Lymphoma Subtypes.** *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2010, **116**:2830.
194. Younes A, Fanale M, McLaughlin P, Copeland A, Faria S, Wood J, Ethirajulu K, Zhu J: **Phase-I Study of the Novel Oral JAK-2 Inhibitor SB1518 in Patients with Relapsed Lymphoma: Evidence of Clinical and Biologic Activity.** *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2009, **114**:588.

195. Valentino L, Pierre J: **JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies.** *Biochemical Pharmacology* 2006, **71**(6):713-721
196. Shuai K, Liu B: **Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system.** *Nature Reviews Immunology* 2003, **3**(11):900-911
197. Melzner I, Weniger MA, Menz CK, Moller P: **Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin Lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma.** *Leukemia* 2006, **20**(1):157-158.
198. Schouten H, Sanger WG, Duggan M, Weisenburger DD, MacLennan K, Armitage JO: **Chromosomal abnormalities in Hodgkin's disease.** *Blood* 1989, **73**(8):2149-2154.
199. Hsi ED: **Biologic features of Hodgkin lymphoma and the development of biologic prognostic factors in Hodgkin lymphoma: tumor and microenvironment.** *Leukemia & Lymphoma* 2008, **49**(9):1668-1680
200. Schreck S, Friebel D, Buettner M, Distel L, Grabenbauer G, Young L, Niedobitek G: **Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma.** *Hematol Oncol* 2009, **27**(1):31-39.
201. Alvaro T, Lejeune M, Garcia J, Salvadó M, López C, Bosch R, Jaén J, Escrivá P, Pons L: **Tumor-infiltrated immune response correlates with alterations in the apoptotic and cell cycle pathways in Hodgkin and Reed-Sternberg cell.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(3):685-691.
202. Skinnider BF, Kapp U, Mak TW: **The role of interleukin 13 in classical Hodgkin lymphoma.** *Leuk Lymphoma* 2002, **43**(6):1203-1210.
203. Marante-Mendes G, McGahon A, Nishioka W, Afar D, Witte O, Green D: **Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL.** *Oncogene* 1998, **16**(11):1383-1390.
204. Zhao R, Follows G, Beer P, Scott L, Huntly B, Green A, Alexander D: **Inhibition of the Bcl-xL deamidation pathway in myeloproliferative disorders.** *N Engl J Med* 2008, **359**(26):2778-2789.

205. Zhao R, Yang F, Alexander D: **An oncogenic tyrosine kinase inhibits DNA repair and DNA-damage-induced Bcl-xL deamidation in T cell transformation.** *Cancer Cell* 2004, **5**(1):37-49.
206. Hanahan D, Weinberg R: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
207. Ferrajoli A, Faderl S, Ravandi F, Estrov Z: **The JAK-STAT pathway: a therapeutic target in hematological malignances.** *Curr Cancer Drug Targets* 2006, **6**(8):671-679.
208. Jemal A, Center M, Ward E, Thun M: **Cancer Occurrence.** *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2009, **471**:3-29.
209. Horning S: **Risk, cure and complications in advanced Hodgkin disease.** *Hematology* 2007, **1**:197-203.
210. Bai M, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, Grepì C, Agnantis N, Kanavaros P: **Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin's lymphomas**
Hum Pathol 2007, **38**:103-113.
211. Fromm J, Kussick S, Wood B: **Identification and purification of classical Hodgkin cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting.** *Am J Clin Pathol* 2006 **126**:764-780.
212. Fromm J, Thomas A, Wood B: **Flow cytometry can diagnose classical Hodgkin lymphoma in lymph nodes with high sensitivity and specificity.** *Am J Clin Pathol* 2009, **131**:322-332.

ANEXOS

ANEXOS

Figuras suplementarias de los artículos

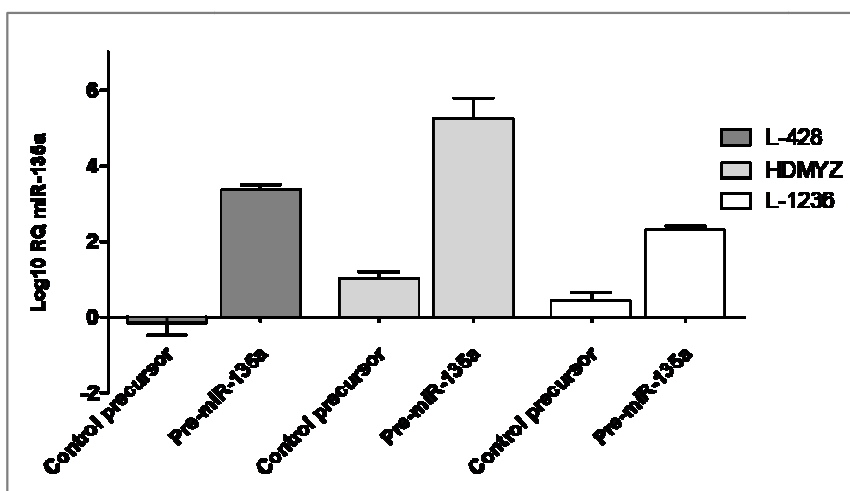
ARTÍCULO 1:

Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma

Alfons Navarro, Tania Díaz, Antonio Martinez, Anna Gaya, Aina Pons, Bernat Gel, Carles Codony, Gerardo Ferrer, Carmen Martinez, Emili Montserrat, Mariano Monzo

A. Figura suplementaria 1

Análisis de la expresión de miR-135a en las 3 líneas de LHC analizadas tras 24 horas de la transfección con pre-miR-135a o un control negativo. Los niveles de expresión están normalizados con RNU6B. Los resultados se muestran en Log10 de la expresión relativa a las células no transfectadas y los valores representados son la media (\pm SD) de tres réplicas independientes.

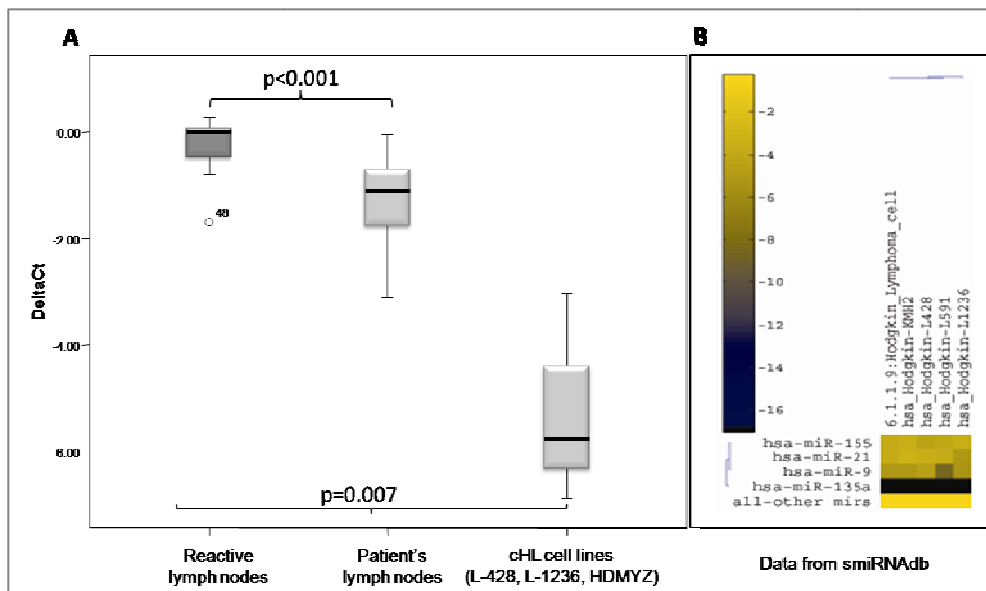


B. Figura suplementaria 2

Análisis de la expresión de miR-135:

(A) Cuantificación de la expresión del miRNA en ganglios reactivos, ganglios de pacientes de LHC y las líneas celulares de LHC: L-428, L-1236 y HD-MY-Z.

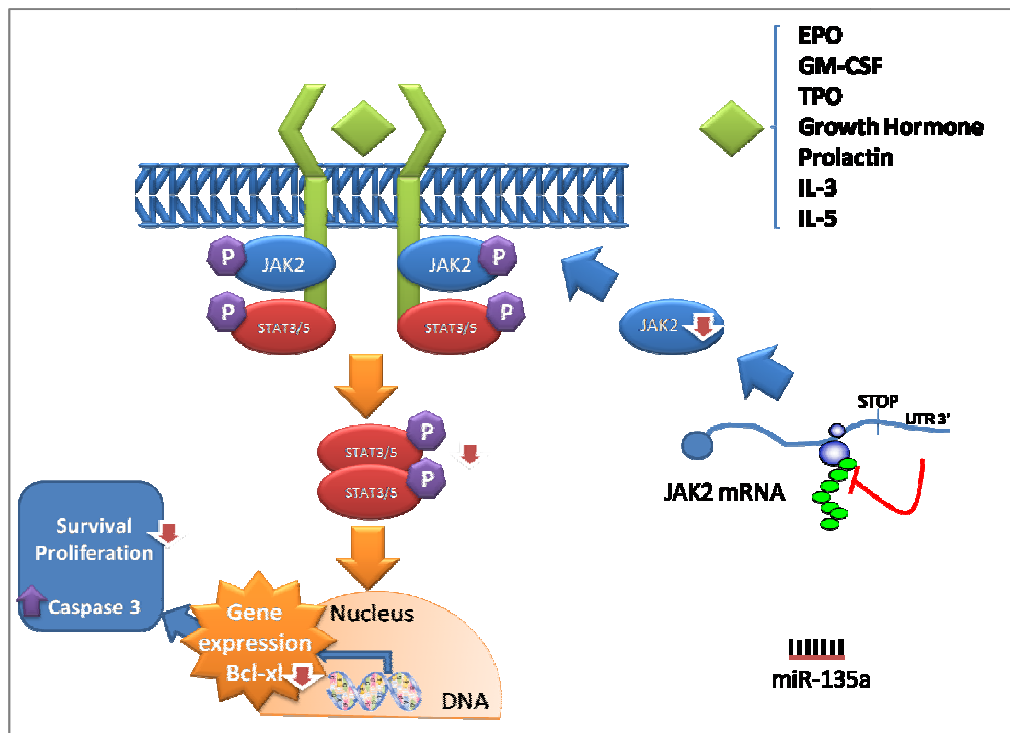
(B) Perfil de expresión de smiRNadb (<http://www.mirz.unibas.ch/smiRNadb>) que muestra la expresión de miR-135a comparada con otros miRNAs sobreexpresados en el LHC: miR-155, miR-21 y miR-9. Los miRNAs fueron clonados en las líneas celulares de LHC KMH-2, L-428, L-591 y L-1236.



C. Figura Suplementaria 3

Esquema de la señal de supervivencia mediada por JAK2/miR-135a en las células de LHC (L-428). La vía JAK/STAT es usada por varias citoquinas. Cuando un ligando se une al receptor, éste sufre un cambio conformacional que permite a las dos proteínas JAK2 fosforilarse la una a la otra (fosforilación cruzada) y activar la fosforilación de las proteínas STAT para que formen dímeros. Estos dímeros traslocan al núcleo y activa,

de forma específica, la transcripción de genes como Bcl-xL relacionados con supervivencia y proliferación. miR-135a regula esta vía inhibiendo la traducción de la proteína JAK2.



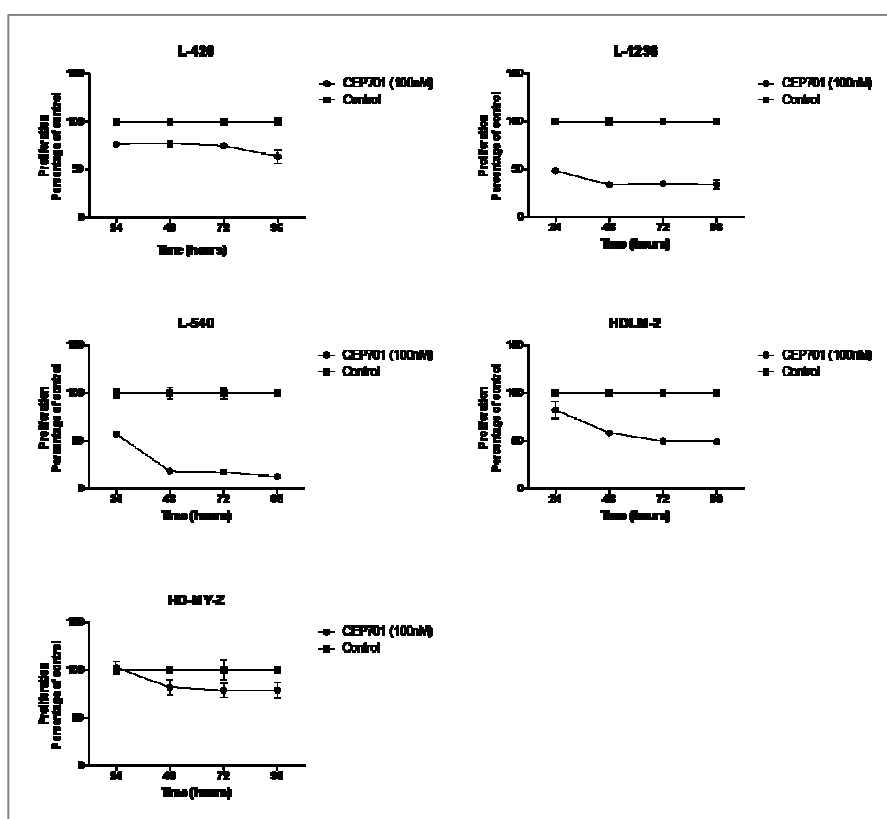
ARTÍCULO 2

Lestaurtinib inhibition of the JAK/STAT signaling pathway in Hodgkin lymphoma cells inhibits proliferation and induces apoptosis

Tania Díaz, Alfons Navarro, Gerardo Ferrer, Bernat Gel, Anna Gaya, Rosa Artells, Beatriz Bellosillo, Mar Garcia-Garcia, Sergi Serrano, Antonio Martínez, Mariano Monzo

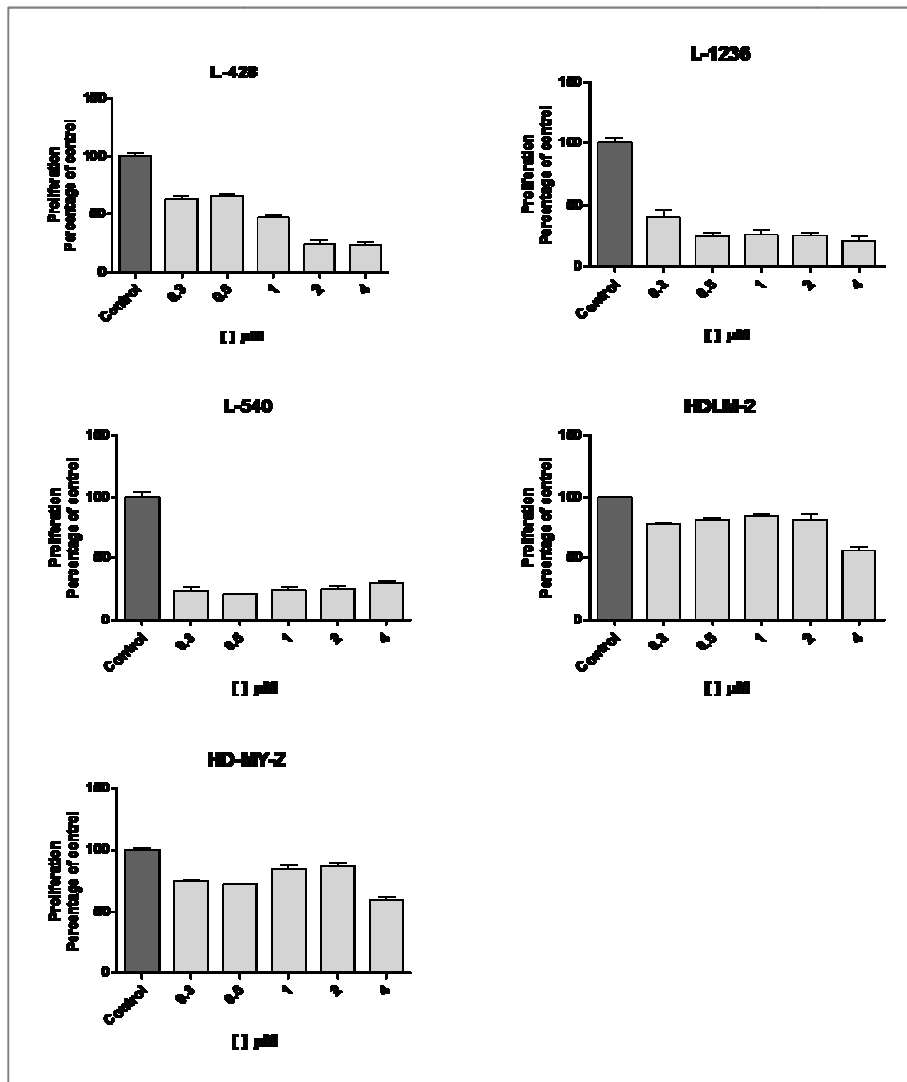
A. Figura suplementaria 1

Análisis de proliferación transcurridas 24, 48, 72 y 96 horas del tratamiento de las líneas celulares de LHc (L-428, L-1236, L-540, HDLM-2 and HD-MY-Z) con Lestaurtinib a una concentración de 100 nM. Los datos mostrados se corresponden a la media \pm SEM de tres réplicas independientes.



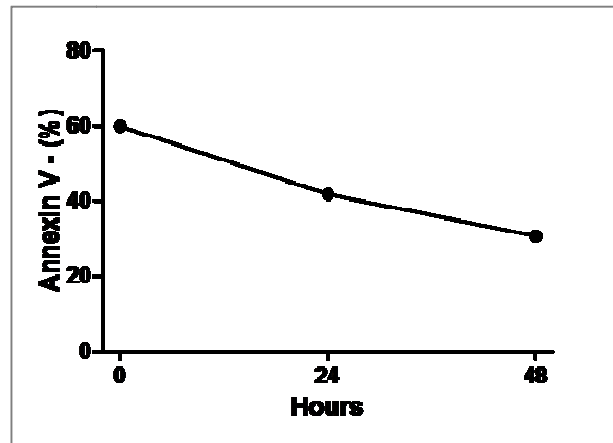
B. Figura suplementaria 2

Análisis de proliferación celular de las líneas celulares de LHc (L-428, L-1236, L-540, HDLM-2 and HD-MY-Z) tras 48 horas del tratamiento con Lestauritinib a diferentes dosis (300 nM, 500 nM, 1 μ M, 2 μ M y 4 μ M). Los datos mostrados se corresponden a la media \pm SEM de tres réplicas independientes.



C. Figura suplementaria 3

Análisis de la viabilidad celular (negativo para Anexina V) de los ganglios de los pacientes de LHc cultivados con RPMI1640 con FBS al 10% durante 48 horas.



Trabajos realizados durante el periodo de tesis

Participación en congresos de los trabajos presentados

Autores: Díaz T, Navarro A, Ferrer G, Gel B, Gaya A, Artells R, Bellosillo B, Garcia-Garcia M, Serrano S, Martínez A, Monzó M

Título: Lestaurtinib inhibition of the Jak/Stat signaling pathway in classic Hodgkin lymphoma cells and in patients lymphnodes inhibits proliferation and induces apoptosis

Tipo de participación: Comunicación Oral

Congreso: 16th Congres of EHA

Lugar de celebración: Londres

Fecha: 9-12 de Junio de 2011

Autores: Navarro A, Díaz T, Martínez A, Gaya A, Monzó M

Título: Lestaurtinib (CEP701) inhibits proliferation and activates apoptosis in Hodgkin lymphoma cells through inhibition of the JAK/STAT signalling pathway

Tipo de participación: Póster

Congreso: 52th ASH Annual Meeting and exposition

Lugar de celebración: Orlando

Fecha: 4-7 de Diciembre de 2010

Autores: Díaz T, Navarro A, Martínez A, Gaya A, Monzó M

Título: Eficacia in vitro del inhibidor de JAK2 Lestaurtinib (CEP-701) en el linfoma de Hodgkin

Tipo de participación: Póster

Congreso: LII Reunión Nacional de la SEHH y XXVI Congreso Nacional de la SETH

Lugar de celebración: Las Palmas de Gran Canaria

Fecha: 28-30 de Octubre de 2010

Autores: Díaz T, Navarro A, Martínez A, Gaya A, Gel B, Pons A, Codony C, Ferrer G, Montserrat E, Monzó M

Título: Implicaciones de la regulación de JAK2 por miR-135a en el linfoma de Hodgkin clásico

Tipo de participación: Comunicación Oral (CO-027)

Congreso: LI Reunión Nacional de la AEHH y 25 Congreso Nacional de la SETH

Lugar de celebración: Barcelona

Fecha: 12-14 de Noviembre de 2009

Autores: Navarro A, Díaz T, Martínez A, Gaya A, Pons A, Martínez C, Montserrat E, Monzó M

Título: Regulation of JAK2 kinasa gene by the miR-135 family in classical Hodgkin Lymphoma

Tipo de participación: Comunicación Oral

Congreso: 2008 Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH)

Lugar de celebración: San Francisco

Fecha: 6-8 de Diciembre de 2008

Otras publicaciones realizadas en el periodo de tesis

Autores: Cibeira MT, Fernández de Larrea C, Navarro A, **Díaz T**, Fuster D, Tovar N, Rosiñol L, Monzó M and Bladé J

Título: Impact on response and survival of DNA repair single nucleotide polymorphisms in relapsed or refractory multiple myeloma patients treated with thalidomide

Revista: Leukemia Research

Año: 2011

Volumen: Número: Páginas:

Autores: Campayo M, Viñolas N, Navarro A, Carcereny E, Casas F, Gel B, **Díaz T**, Gimferrer JM, Marrades RM, Ramirez J and Monzó M

Título: Single Nucleotide Polymorphisms in Tobacco Metabolism and DNA Repair Genes and Prognosis in resected Non-Small-Cell Lung Cancer

Revista: Journal of Surgical Research

Año: 2011

Volumen: Número: Páginas:

Autores: Artells R, Navarro A, **Díaz T** and Monzó M

Título: Ultrastructural and immunohistochemical analysis of intestinal myofibroblasts during the early organogenesis of the humans small intestine

Revista: The Anatomical Record

Año: 2010

Volumen: Número: Páginas:

Autores: Navarro A, **Díaz T**, Gallardo E, Viñolas N, Marrades RM, Gel B, Campayo M, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramírez J and Monzo M

Título: Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer

Revista: Journal of Surgical Oncology

Año: 2010

Volumen: Número: Páginas:

Autores: Artells R, Moreno I, **Díaz T**, Martínez F, Gel B, Navarro A, Ibeas R, Moreno J, Monzó M

Título: Tumour CD133 mRNA expression and clinical outcome in surgically resected colorectal cancer patients

Revista: European Journal of Cancer

Año: 2010

Volumen: 46 **Número:** 3 **Páginas:** 642-649

Autores: Gallardo E, Navarro A, Viñolas N, Marrades RM, **Díaz T**, Gel B, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramírez J and Monzo M

Título: miR-34a as a pronostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer

Revista: Carcinogenesis

Año: 2009

Volumen: 30 **Número:** 11 **Páginas:** 1903-1909

Autores: Pons A, Nomdedeu B, Navarro A, Gaya A, Gel B, **Díaz T**, Valera S, Rozman M, Belkaid M, Montserrat E and Monzo M

Título: Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic síndromes

Revista: Leukemia and Lymphoma

Año: 2009

Volumen: 50 **Número:** 11 **Páginas:** 1854-1859

Autores: Monzo M, Navarro A, Bandres E, Artells R, Moreno I, Gel B, Moreno J, Martínez F, **Díaz T**, Martínez A, Balague O, García-Foncillas J

Título: Overlapping expression of microRNAs among human embryonic colon and colorectal cancer

Revista: Cell Research

Año: 2008

Volumen: 18 **Número:** 8 **Páginas:** 823-33

Otros congresos durante el periodo de tesis

Autores: Díaz M, Navarro A, **Díaz T**, Pratcorona M, Rozman M, Monzó M, Esteve J

Título: The expression pattern of microRNAs (miRNA) might add relevant prognostic information to molecular categorization of intermediate risk cytogenetic acute myeloid leukemia

Tipo de participación: Póster

Congreso: 16th Congress of EHA

Lugar de celebración: Londres

Fecha: 9-12 de Junio de 2011

Autores: Campayo M, Navarro A, Viñolas N, Tejero R, Muñoz C, **Díaz T**, Marrades RM, Cabanas ML, Gimferrer JM, Ramirez J, Gascon P, Monzó M

Título: A single nucleotide polymorphism (SNP) in a microRNA (miRNA)-binding site of KRT81 and time to recurrence (TTR) in patients (p) with surgically resected non-small cell lung cancers (NSCLC)

Tipo de participación: Póster

Congreso: ASCO Annual Meeting

Lugar de celebración: Chicago

Fecha: 3-7 de Junio de 2011

Autores: Navarro A, Campayo M, Viñolas N, Ciria V, **Díaz T**, Marrades RM, Molins L, Ramirez J, Monzó M

Título: SOX2-related microRNAs, miR-145 and miR-367, as prognostic markers of time to recurrence (TTR) in surgically resected non-small cell lung cancers (NSCLC) patients

Tipo de participación: Póster

Congreso: ASCO Annual Meeting

Lugar de celebración: Chicago

Fecha: 3-7 de Junio de 2011

Autores: Díaz M, Navarro A, **Díaz T**, Gel B, Camós M, Pratcorona M, Torrebadell M, Rozman M, Maffioli M, Monzó M, Esteve J

Título: A distinctive microRNAs signature characterizes acute myeloid leukemia with translocation (8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement

Tipo de participación: Comunicación Oral

Congreso: 52th ASH Annual Meeting and exposition

Lugar de celebración: Orlando

Fecha: 4-7 de Diciembre de 2010

Autores: Fernández de Larrea C, Cibeira MT, Navarro A, **Díaz T**, Fuster D, Rosiñol L, Bladé J, Monzó M

Título: Impact on response and survival of DNA repair single nucleotide polymorphisms in relapsed multiple myeloma patients treated with talidomide

Tipo de participación: Póster

Congreso: 52th ASH Annual Meeting and exposition

Lugar de celebración: Orlando

Fecha: 4-7 de Diciembre de 2010

Autores: **Díaz T**, Artells R, Navarro A, Muñoz C, Fuster D, Monzó M

Título: Morphological analysis of intestinal myofibroblasts (IMFs) during the early organogenesis of the human small intestine

Tipo de participación: Póster

Congreso: Joint Meeting of the Portuguese and Spanish Developmental Biology Societies

Lugar de celebración: Badajoz

Fecha: 10-12 de Noviembre de 2010

Autores: Artells R, Navarro A, **Díaz T**, Muñoz C, Fuster D, Monzo M

Título: Expression of the miR-200 family, SNAIL, ZEB1, ZEB2 and E-cadherin during the early organogenesis of human small intestine

Tipo de participación: Oral

Congreso: Joint Meeting of the Portuguese and Spanish Developmental Biology Societies

Lugar de celebración: Badajoz

Fecha: 10-12 de Noviembre de 2010

Autores: Navarro A, **Díaz T**, Diaz M, Ferrer G, Hodgson K, Gel B, Martínez A, Ciria V, Gaya A, Monzo M

Título: Regulación epigenética de la expresión de microRNAs en el linfoma de Hodgkin

Tipo de participación: Oral

Congreso: LII Reunión Nacional de la SEHH y XXVI Congreso Nacional de la SETH

Lugar de celebración: Las Palmas de Gran Canaria

Fecha: 28-30 de Octubre de 2010

Autores: Díaz M, Navarro A, Rozman M, Pratcorona M, Aguilar JL, **Díaz T**, Calvo X, Tovar N, Esteve J

Título: Valor pronóstico y patrón de microRNA asociado a la displasia multilínea en leucemia aguda mieloblástica de riesgo citogenético intermedio

Tipo de participación: Oral

Congreso: LII Reunión Nacional de la SEHH y XXVI Congreso Nacional de la SETH

Lugar de celebración: Las Palmas de Gran Canaria

Fecha: 28-30 de Octubre de 2010

Autores: Ramirez J, Navarro A, Quera A, **Díaz T**, Huerta A, Vinñolas N, Monzo M, Marrades R

Título: Evaluation of miRNAs Levels of p53 Pathways in Non Small Cell Lung Cancer

Tipo de participación: Póster

Congreso: 99th annual Meeting of the United-States-and-Canadian-Academy-of-Pathology

Lugar de celebración: Washington, DC

Fecha: 20-26 de Marzo de 2010

Autores: Navarro A, **Díaz T**, Monzó M

Título: MicroRNA y tumores hematológicos

Tipo de participación: Simposio

Congreso: LI Reunión Nacional de la AEHH y 25 Congreso Nacional de la SETH

Lugar de celebración: Barcelona

Fecha: 12-14 de Noviembre de 2009

Autores: Pons A, Granell M, Urbano-Ispizua A, Arostegui JI, Gaya A, Navarro A, Jansa S, Artells R, **Díaz T**, Fernández-Avilés F, Martínez C, Rovira M, Carreras E, Monzó M, Yagüe J, Montserrat E.

Título: Influència de variants genètiques del inflamósoma en la evolució clínica de pacients sometidos a ALO-TPH

Tipo de participación: Comunicación Oral

Congreso: AEHH

Lugar de celebración: Pamplona

Fecha: 25-27 de Octubre de 2007

Autores: Artells R, **Díaz T**, Moreno I, Jansà S, Pons A, Gel B, Fuster D, Pairet S, Engelmeer A, Martínez F, Monzo M

Título: Morphological and molecular analysis by Real- Time Quantitative PCR of Sonic Hedgehog (Shh) expression during human colon development and in colorectal cancer patients

Tipo de participación: Póster

Congreso: ASEICA

Lugar de celebración: Las Palmas de Gran Canaria

Fecha: 10-12 de Mayo del 2007

Autores: Jansà S, Carles J, Artells R, Pons A, Navarro A, **Díaz T**, Gel B, Pairet S, Fuster D, Egelmeer A, Monzo M

Título: Single- Nucleotide Polymorphisms in DNA repair genes as markers for response to radiotherapy in patients with stage I to II Head-and-Neck Cancer.

Tipo de participación: Póster

Congreso: ASEICA

Lugar de celebración: Las Palmas de Gran Canaria

Fecha: 10-12 de Mayo de 2007

Autores: Pons A, Gaya A, Navarro A, Jansà S, Artells R, **Díaz T**, Gel B, Pairet S, Fuster D, Egelmeer A, Granell M, Monzo M

Título: Effect of germline single nucleotide polymorphisms (SNPs) on clinical outcome in Hodgkin's lymphoma (HL)

Tipo de participación: Póster

Congreso: ASEICA

Lugar de celebración: Las Palmas de Gran Canaria

Fecha: 10-12 de Mayo de 2007

Autores: Navarro A, Pons A, Urbano-Ispuzua A, Gaya A, Artells R, Gel B, Jansà S, **Díaz T**, Granell M, Pairet S, Fuster D, Egelmeer A, Monzo M

Título: Analysis of MicroRNA (miRNA) expression pattern in Classical Hodgkin Lymphoma (cHL)

Tipo de participación: Póster

Congreso: ASEICA

Lugar de celebración: Las Palmas de Gran Canaria

Fecha: 10-12 de Mayo de 2007