



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**TESIS DOCTORAL  
FACULTAD DE MEDICINA**

PROGRAMA DE DOCTORADO

ORGANOGENESIS I ANATOMÍA CLÍNICA I APLICADA

BIENIO 2002-2004

---

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

---

**Directores de Tesis**

**Dr. Mariano Monzó Planella**

**Dr. Álvaro Urbano Ispizua**

**Alfons Navarro Ponz**

**Barcelona, Enero de 2008**

# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

### ***Discusión del papel de los miRNAs en la embriogénesis del colon y el cáncer colorectal***

Recientemente se ha observado que miRNAs específicos juegan un papel importante en el proceso de carcinogénesis y algunos tienen un impacto en el pronóstico, pero la relación entre el papel de los miRNAs en la embriogénesis humana y en el cáncer sigue siendo una cuestión pendiente de esclarecer.

El elevado índice de proliferación y la falta de diferenciación que caracteriza a las células tumorales, es una característica presente en otros procesos biológicos como la embriogénesis. En este sentido, se ha mostrado en este estudio que miRNAs que están activos en el desarrollo temprano, semanas 7-8 del colon humano, son también importantes en el desarrollo inicial del cáncer colorectal. Los resultados obtenidos en el análisis de los miRNAs en la embriogénesis apoyan la hipótesis de que los miRNAs están muy expresados en células indiferenciadas y su expresión va disminuyendo durante el proceso de diferenciación<sup>75</sup>. Observamos que durante las fases más indiferenciadas que pudimos analizar, semanas 7-8 de la organogénesis humana del colon, la expresión de miRNAs es elevada, pero cuando se empieza a producir la diferenciación del epitelio, semanas 9-12, la expresión de miRNAs decrece. Además, los resultados del análisis de la expresión de los tumores de estadio I eran más similares al tejido normal, mientras que los resultados del análisis de los tumores de estadio II se aproximaban más al patrón de expresión que se veía en el tejido embrionario. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que los tumores de estadio I se corresponden con una fase más temprana de carcinogénesis, con menor número de alteraciones genéticas y una morfología más diferenciada, mientras que los tumores de estadio II presentan un fenotipo más agresivo, con una mayor capacidad de proliferación similar a la que se puede observar en los tejidos embrionarios.

Se pudo observar un solapamiento en la expresión de miRNAs entre la embriogénesis y el proceso de carcinogénesis. De los miRNAs que se vieron en común, el cluster miR-17-92 se vio que jugaba un papel importante en la carcinogénesis y en la embriogénesis mediante la regulación del proceso de proliferación. De los diferentes componentes del cluster se observó que el más importante fue el miRNA miR-17-5p que parecía ejercer

su efecto a través de su diana E2F1<sup>94</sup>. La sobreexpresión del cluster miR-17-92 había sido observada en linfomas de célula B y en cáncer de pulmón entre otros<sup>127</sup> y la inhibición de miR-17-5p de forma selectiva, inducía apoptosis en cáncer de pulmón<sup>265</sup>. Previamente se había observado que el cluster miR-17-92 actúa en tejido adulto inhibiendo la traducción de E2F1<sup>94</sup>, pero permanecía sin esclarecer si este cluster modulaba la traducción de este mismo gen diana durante el desarrollo embrionario<sup>45</sup>. En este sentido, nuestros resultados muestran que el análisis de la proteína E2F1 en colon embrionario humano y en tejido tumoral y normal de colon, mostraba un patrón de expresión inverso al patrón de expresión del cluster miR-17-92. La regulación negativa de la expresión de E2F1 por el cluster miR-17-92 durante el desarrollo del colon humano puede ser parte del proceso normal de embriogénesis y promover la proliferación celular. En el proceso tumoral, la reducción de la expresión de E2F1 debida a la sobreexpresión del cluster miR-17-92 dirige hacia un incremento de la capacidad proliferativa, probablemente provocada por una protección de las células tumorales en frente a la apoptosis. Al contrario, en el tejido de colon normal adulto, los bajos niveles de miR-17-92 permiten la expresión de E2F1 y así el mantenimiento de un equilibrio entre proliferación y diferenciación, en las criptas del colon. Estas criptas ofrecen un modelo muy atractivo en el cual poder estudiar las células madre progenitoras, ya que éstas ocupan una posición concreta en la base, donde dan lugar a unas poblaciones celulares indiferenciadas transitorias que proliferan vigorosamente a medida que van migrando hacia el lumen intestinal<sup>266</sup>, diferenciándose en célula epitelial intestinal. En este modelo, analizamos mediante hibridación in situ de miRNAs la expresión de miR-17-5p, que se expresaba en el compartimiento proliferativo y en gradiente decreciente a medida que se avanzaba hacia las partes altas de las criptas. Esto sugería un papel de este miRNA en la autorenovación de la mucosa del colon, mostrando el papel potencial de miR-17-5p en el control de la diferenciación y la proliferación celular del intestino grueso.

Nuestros hallazgos demuestran que los miRNAs juegan un papel muy importante en la organogénesis del colon, donde el alto índice de proliferación parece estar controlado por estos miRNAs. Asimismo, en el tejido de colon adulto estos miRNAs, tal como hemos podido observar, están sobreexpresados solamente en el compartimiento proliferativo, pero en el tumor su expresión incrementa a toda la zona proliferativa.

Todos estos datos, apoyan la hipótesis de la existencia de la relación entre el proceso de carcinogénesis y la embriogénesis<sup>267</sup>. En este sentido la sobreexpresión del cluster 17-

92 en las células adultas del colon, cuando había sido silenciado al final de la organogénesis, podría actuar rompiendo el control de la proliferación celular y provocando así la aparición del tumor.

## ***Discusión del papel de los miRNAs en el linfoma de Hodgkin***

Estudios previos han mostrado que un pequeño conjunto de miRNAs puede definir a diferentes entidades tumorales mejor que un microarray de expresión que analice cientos de RNAs mensajeros<sup>89</sup>. En el análisis de los miRNAs en el linfoma de Hodgkin, hemos caracterizado por primera vez una firma de expresión de 25 miRNAs que son capaces de diferenciar entre linfoma de Hodgkin clásico y ganglios reactivos. Además hemos mostrado un pequeño grupo de miRNAs que estaban diferencialmente expresados entre los subtipos de celularidad mixta y esclerosis nodular. Y finalmente mostramos un miRNA (miR-138) que estaba relacionado con el estadio de Ann Arbor I-II de linfoma de Hodgkin clásico. Este miRNA está sobreexpresado en otros tumores<sup>268</sup> y parece estar asociado con un estado más indiferenciado<sup>269</sup>.

La expresión diferencial de miRNAs observada entre LHc y los ganglios reactivos se puede explicar en algunos casos por cambios citogenéticos en las células de Hodgkin y de Reed-Sternberg. La región 17q está asociada con frecuentes ganancias en linfoma de Hodgkin clásico<sup>270</sup>, y miR-21 está codificado en esta región cromosómica (Tabla 40). Otras ganancias cromosómicas que han sido descritas en el linfoma de Hodgkin clásico<sup>270</sup> incluyen 2p, donde está codificado miR-216, 22q, donde está codificado miR-185, y 14q, donde encontramos a miR-134. Una de las pérdidas más frecuentes incluye 4q, donde están codificados miR-302a, miR-302b, y miR-302c<sup>270, 271</sup>, y 3p, donde está codificado miR-135a<sup>272</sup>.

El análisis de los casos por hibridación *in situ* mostró una expresión preferencial de miR-21, miR-134 y miR-138 en el citoplasma de las células de Hodgkin y de Reed-Sternberg. Esto sugiere, que el silenciamiento de miRNAs puede ser biológicamente relevante en las células tumorales en el LH clásico. Observamos también cierta señal en linfocitos acompañantes, cosa que indica que la expresión en el microambiente tumoral es importante en la biología de algunos tipos de linfoma y en su progresión clínica<sup>273-275</sup>. En el linfoma de Hodgkin clásico el microambiente tumoral difiere entre los diferentes subtipos histológicos, y en este estudio hemos encontrado un patrón de expresión de miRNAs diferente en el subtipo celularidad mixta y esclerosis nodular. El análisis en las líneas celulares mostró que algunos de los miRNAs diferencialmente expresados en los dos subtipos estaban también diferencialmente expresados en las diferentes líneas celulares, provenientes de esclerosis nodular o celularidad mixta.

Los miRNAs que se expresan diferencialmente en los casos de LH clásico, tienen como dianas putativas genes envueltos en supervivencia, apoptosis y genes relacionados con las funciones de las células B entre otros. En este sentido nuestra aportación puede proveer de una base para comprender mejor el complejo mecanismo de transformaciones que sufre una célula B normal hacia una célula tumoral. Una de las características más importantes de las células tumorales del LH es la adquisición de ventajas de supervivencia, a la vez que se pierde la expresión de la mayoría de genes asociados a células B<sup>276, 277</sup>, en este sentido miR-21 que aparece sobreexpresado tanto en los ganglios de Hodgkin como en las líneas celulares humanas de LH, había sido previamente descrito como activador de la supervivencia celular vía la regulación positiva indirecta de genes antiapoptóticos<sup>98, 101</sup>.

El linfoma de Hodgkin clásico es una neoplasia de células B caracterizada por un fenotipo de célula B incompleto, debido a la regulación negativa de algunos factores de transcripción cruciales para el desarrollo completo del programa de célula B madura<sup>276</sup>. Los mecanismos que causan la regulación negativa del programa transcripcional en las células de LH no es del todo comprendido, pero se cree que los eventos epigenéticos juegan un papel muy importante en el silenciamiento de genes de célula B<sup>278</sup>. Esto indica que los miRNAs pueden ser un nuevo evento epigenético de regulación, con un importante papel en la regulación traduccional de un número elevado de genes diferentes en la complicada red reguladora que dirige una célula B del centro germinal<sup>128</sup> hacia un fenotipo de célula de Hodgkin y Reed Sternberg.

La expresión diferencial en el LH clásico puede ser explicada en algunos casos por recurrentes inestabilidades cromosómicas, como las frecuentes ganancias cromosómicas en miR-21, miR-134, miR-185 y las pérdidas como en miR-135a, miR-302a, miR-302b y miR-302c<sup>102, 270, 272</sup>.

Nosotros también analizamos el efecto de la presencia del virus de Epstein Barr en la expresión de miRNAs en el linfoma de Hodgkin. Trabajos previos habían sugerido que los miRNAs del virus pueden jugar un papel importante en las redes de interacción entre huésped y patógeno. Además, los virus podrían provocar cambios en los patrones de expresión de miRNAs, y de esta forma favorecer el desarrollo del cáncer<sup>279-281</sup>. En este estudio se identificaron un conjunto de 10 miRNAs del huésped, de los cuales se veía la expresión influida por la presencia o ausencia del VEB. Uno de ellos, miR-96, tiene dianas predichas involucradas en la activación de la vía de NFκB, y en la inhibición de vías de apoptosis. El efecto del VEB en los miRNAs del huésped podría



explicar la asociación vista entre el VEB y el curso clínico de los pacientes con linfoma de Hodgkin clásico<sup>282</sup>. De forma interesante, sólo uno de los miRNAs que estaban diferencialmente expresados entre los casos VEB+ y los VEB- estaba incluido en la firma de 25 miRNAs, que diferenciaba LHc de los ganglios reactivos. Este hecho nos lleva a especular que el VEB no es un elemento de transformación primario en el linfoma de Hodgkin clásico, concepto que está también apoyado por el hecho de que la mayoría de los casos de LH clásico son EBV-<sup>282</sup>.

Estudios previos habían mostrado que miR-155, el cual tiene a PU.1 como diana génica predicha, está sobreexpresado en linfoma de Hodgkin<sup>125</sup>. A pesar de que la firma de miRNAs de LH que hemos encontrado, no incluye a miR-155, la hibridación in situ mostró que miR-155 está sobreexpresado en las células atípicas, así como en los linfocitos reactivos y los macrófagos activados<sup>125, 264</sup>. La razón por la que miR-155 no aparece en nuestra firma es que no presenta una expresión diferencial con los ganglios reactivos analizados, debida en parte a que no se sobreexpresa en todos los casos de linfoma de Hodgkin analizados y a su sobreexpresión también en el microambiente reactivo tumoral.

Encontramos un patrón de expresión de miRNAs compartido tanto por los casos de esclerosis nodular, como por los casos de celularidad mixta, cosa que podría sugerir que ambos subtipos histológicos pueden representar diferentes aspectos de la evolución de la misma enfermedad.

En resumen, el linfoma de Hodgkin expresa un patrón de miRNAs característico diferente de los ganglios reactivos normales, con un subconjunto de miRNAs diferencialmente expresados entre los dos subtipos histológicos de celularidad mixta y esclerosis nodular, y un miRNA diferencialmente expresado en los estadios iniciales de la enfermedad en comparación con los más avanzados. Algunos de estos miRNAs estaban expresados en las células de Hodgkin y de Reed-Sternberg, pero no en las células reactivas acompañantes. Además, el VEB influye en el patrón de expresión de los miRNAs del huésped en el LHc.

## ***Discusión conjunta: análisis de la implicación de los miRNAs en dos modelos tumorales diferentes***

El objetivo principal de este estudio fue analizar el papel que juegan los miRNAs en el inicio y progresión tumoral en dos modelos tumorales diferentes. Para ello escogimos dos modelos tan diferentes como es el cáncer colorectal y el linfoma de Hodgkin. En el primero nos encontramos ante un modelo tumoral en el que lo que prima es la proliferación celular<sup>283, 284</sup>, mientras que en el segundo prima la inhibición de la apoptosis<sup>285, 286</sup>. En ambos modelos como hemos observado, juegan un papel regulador clave los miRNAs.

El epitelio intestinal es un tejido que se encuentra en elevada renovación y en el cual su homeostasis viene regulada por un balance entre proliferación, diferenciación y apoptosis celular. En las criptas, como ya hemos comentado, tenemos varios tipos celulares diferentes, todos ellos derivados de una célula progenitora pluripotente, la célula madre intestinal, la cual se localiza en la base de las criptas. En el cáncer colorectal nos encontramos con un modelo tumoral que deriva de una expansión clonal de una única célula madre intestinal<sup>287-289</sup> que adquiere mutaciones que provocan una proliferación desmesurada, produciéndose una expansión desde la base de las criptas hacia arriba de células epiteliales que proliferan hacia la luz intestinal. Se ha observado que en las criptas del colon, a diferencia de en las del intestino delgado, no se producen apoptosis espontáneas que formarían parte de la propia autorenovación de las células madre. En el intestino delgado las células madre intestinales dañadas serían destruidas vía apoptosis protegiendo de posibles mecanismos de carcinogénesis, mientras que en el colon las células dañadas sobrevivirían con una susceptibilidad incrementada a sufrir una transformación neoplásica<sup>266, 290</sup>. En este modelo, el principal cambio que se produce es un descontrol en el índice proliferativo, que conduce a la aparición del tumor. Existe otro modelo en el que también tenemos un alto índice proliferativo aunque de forma más controlada: la embriogénesis del colon. Quisimos analizar que mecanismos eran los que estaban activados en uno y otro, y controlados en el tejido normal adulto y encontramos un patrón de miRNAs que estaban diferencialmente expresados entre el tejido de colon normal y el tejido tumoral, y de estos, un subconjunto era compartido con las fases con mayor índice proliferativo de la embriogénesis de que disponíamos (semanas 7-8): el cluster miR-17-92. Este conjunto

de miRNAs está localizado en la región cromosómica 13.q31, región que se ve amplificada en varios tipos de tumores<sup>291</sup>, entre ellos varios tipos de linfomas<sup>292</sup>.

En el segundo modelo, el linfoma de Hodgkin, nos encontramos ante un modelo en el que prima la supervivencia vía inhibición de la apoptosis. Las células de Hodgkin y de Reed Sternberg son células tumorales con un conjunto de aberraciones que se reflejan en un fenotipo apoptosis-resistente. Proviene en la mayor parte de los casos, de células B maduras que han participado en la respuesta inmune que se desarrolla al centro germinal. Estas células B preapoptóticas en lugar de morir adquieren señales de supervivencia y pierden el fenotipo de célula B, transformándose en células de Hodgkin y de Reed Sternberg. Tienen un origen clonal<sup>214</sup> a pesar de que su patrón de presentación sean células tumorales separadas unas de otras y rodeadas de un microambiente reactivo, que principalmente está formado por linfocitos, macrófagos, eosinófilos, células plasmáticas, células estromales y fibroblastos. De forma que representan solamente una minoría de la población celular en el ganglio afecto de linfoma de Hodgkin. Parece ser que mediante la expresión de citoquinas (IL-4, IL-13, IL-10, TGF $\beta$ ) por las propias células de Hodgkin y de Reed Sternberg, estas están creando un microambiente que les es favorable, y que las protege de la apoptosis mediada por célula. Algunas de estas citoquinas están favoreciendo la proliferación de las células de Hodgkin y de Reed Sternberg, como la IL-13, y otras están favoreciendo el mantenimiento de un ambiente favorable caracterizado por la presencia de específicas células inmunes como eosinófilos (IL-5) o células T reguladoras (IL-10). En resumen, estas células de Hodgkin segregan una importante cantidad de factores al medio que acaban provocando un acercamiento de células reactivas que les permiten sobrevivir. En este sentido, hemos podido observar miRNAs importantes desde el punto de vista anti-apoptótico como son miR-21, y otros miRNAs que aparecen por las diferencias observadas en el microambiente reactivo no tumoral.

A pesar de encontrarnos ante dos modelos tumorales tan diferentes, incluso desde el tipo de célula y el modo en que se transforma en carcinogénica, que en un caso parece ser una célula madre y en el otro una célula madura diferenciada, observamos que en el patrón de miRNAs aparecen miRNAs que siguen el mismo patrón de expresión en los dos modelos tumorales, a pesar de las diferencias. Entre ellos vemos miR-21, miR-147, miR-182, miR-183 y miR-216, miRNAs importantes para el proceso de tumorigénesis, independientemente de las características que nos diferencien cada tipo tumoral. Mientras que los otros miRNAs que aparecen diferencialmente expresados entre el

tejido tumoral y su correspondiente tejido normal, serán miRNAs que nos estarán definiendo el tipo tumoral.

En el caso de miR-21, el cual parece estar relacionado mediante la actuación sobre diferentes dianas con procesos de inhibición de entrada en apoptosis, vemos que es un miRNA que tiene importancia en los dos modelos tumorales, de forma que en el cáncer colorectal a pesar de ser un modelo en el que prima el descontrol de la proliferación principalmente, vemos que miRNAs que evitan la entrada en apoptosis como miR-21, también juegan un papel clave en el desarrollo tumoral y eso nos lo está indicando principalmente el hecho de que aparezca sobreexpresado tanto en estadio I como en estadio II del cáncer colorectal. En el linfoma de Hodgkin este miRNA jugará un papel mucho más importante en la supervivencia de esta célula B preapoptótica que escapa de la entrada en apoptosis y va adquiriendo un fenotipo de célula de Hodgkin y de Reed Sternberg. El hecho de que lo veamos sobreexpresado en las células de Hodgkin y de Reed Sternberg y también en algunas de las células reactivas acompañantes, nos muestra que no sólo juega un papel en la supervivencia de las células de Hodgkin y de Reed Sternberg sino también en el mantenimiento del componente reactivo que protege a estas células tumorales de la inducción de apoptosis mediada por las células inmunitarias. En esta línea, un estudio en mieloma ha demostrado que a raíz de una señal externa, IL-6, se puede llegar a sobreexpresar un miRNA, en este caso miR-21. IL-6 es una de las interleuquinas que expresan las células de H/RS <sup>293, 294</sup>. Esta señal exógena de IL-6 activa STAT3 el cual puede unirse a la región UTR 5' de miR-21 activando su transcripción<sup>295</sup>, hecho que acaba derivando en una inhibición de la apoptosis. MiR-21 además ya se había encontrado previamente sobreexpresado en cáncer de mama<sup>97</sup>, pulmón, páncreas<sup>104</sup>, próstata <sup>296</sup>, estómago<sup>104</sup>, tiroides<sup>268</sup> y cerebral <sup>104, 296</sup>, hecho que todavía apoya más el hecho de que sea un miRNA importante en el mantenimiento tumoral en general.

Por otro lado, vemos una diferencia importante en la expresión de miRNAs entre los dos modelos tumorales que viene marcada principalmente por el cluster miR-17-92. Este cluster que juega un papel importante en la proliferación celular y que se le ha llegado a considerar como un oncogén,<sup>297</sup> ha sido previamente relacionado con varios tipos de linfomas de célula B, entre ellos el linfoma B difuso de células grandes, el linfoma folicular, el linfoma del manto o el linfoma B primario cutáneo <sup>268, 292</sup>. Pero vemos que en el caso del linfoma de Hodgkin no muestra una sobreexpresión, como lo hace en otros linfomas de célula B o en el cáncer colorectal. Se ha explicado la

sobreexpresión de este cluster por la amplificación de la región 13q31 donde está codificado, que está amplificada en los citados linfomas y que no se suele ver amplificada en el caso del linfoma de Hodgkin, al contrario, 13q es una de las regiones que se pierden más frecuentemente en Hodgkin<sup>270</sup>. Esta diferencia en la expresión del cluster miR-17-92 puede ser una de las claves que expliquen que el linfoma de Hodgkin sea mucho menos agresivo que otros linfomas de célula B que si presentan su sobreexpresión, y que tenga un índice proliferativo más bajo que los anteriores, y que el cáncer colorectal.

En conclusión vemos que dos tumores tan diferentes como el cáncer colorectal y el linfoma de Hodgkin, que tienen un mecanismo carcinogénico inicial diferente que incluye a miRNAs distintos, uno principalmente el cluster miR-17-92 y el otro miRNAs principalmente antiapoptóticos como miR-21, tienen un conjunto de miRNAs comunes que serán los implicados probablemente en el mantenimiento tumoral. El estudio de estos miRNAs así como de sus moléculas diana nos puede llevar a una mejor comprensión de los modelos tumorales, y probablemente la búsqueda de terapias contra este conjunto de miRNAs, así como contra los miRNAs más característicos de cada tumor nos acabará llevando hacia nuevas líneas terapéuticas que utilicen en combinación o solas la inhibición o expresión de miRNA como arma terapéutica contra el cáncer.