

Anàlisi dels perfils d'expressió de microRNAs en malalties hematològiques: Síndromes mielodisplàsiques i Limfoma de Hodgkin

Aina Pons Rosell

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.tesisenxarxa.net) 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.tesisenred.net) 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.tesisenxarxa.net) 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.



TESI DOCTORAL
FACULTAT DE MEDICINA

**Anàlisi dels perfils d'expressió de microRNAs
en malalties hematològiques: Síndromes
mielodisplàsiques i Limfoma de Hodgkin**

Directors de Tesi

Dr. Alfons Navarro Ponz

Dr. Benet Nomdedeu

Aina Pons Rosell

Barcelona 2010

Als meus pares, al meu germà i al Lao

Al Dr. Mariano Monzó i a l'Alfons Navarro

AGRAÏMENTS

Durant tots aquests anys he après moltíssimes coses que m'han fet créixer no només pel que fa a la ciència sinó també com a persona, he après de cada una de les persones que m'he anat creuant en aquest camí i a qui els hi haig d'agraïr que tot això hagi estat possible.

En primer lloc vull agrair-li al Dr. Monzó, al Marià, la confiança que va dipositar en mi desde el primer dia que vaig arribar al laboratori, per fer-me costat en els moments difícils i per tots els bons consells que m'ha donat no només a nivell professional sinó també en el camp personal, fent-me créixer com a persona i ajudant-me a superar els problemes.

A l'Alfons, segurament a la persona de qui he absorvit més coneixaments en aquest camí i a qui li haig d'agraïr tantes coses que no sabia per on començar. En primer lloc per la seva paciència a l'hora de transmetre els seus coneixements de forma totalment altruïsta, per la seva manera d'entendre la ciència i la seva constància, sempre has aconseguit que en moments on jo hagués tirat la tovallola que veiés una mica d'esperança per seguir endavant, pel seu entusiasme i sobretot t'agraeixo el teu bon humor a l'hora de treballar, hem rigut tant...no ho oblidaré mai.

Al Dr. Urbano, l'Álvaro, que tot i que va marxar a Sevilla... m'ha demostrat ser una gran persona que sempre ha dedicat temps perquè els projectes sortíssin endavant i per crear un bon ambient de treball. Sempre em va transmetre confiança i seguretat a l'hora de tirar endavant els projectes; gracias Álvaro por abrirme las puertas de la hematología.

Al Dr. Nomdedeu, per atendre'm sempre que ho he necessitat, gràcies Benet per tot.

Als meus pares i al meu germà que m'han donat suport durant tots aquests anys, també donant-me bons consells en els moments difícils i que sense la seva paciència i perseverància no hauria arribat fins aquí. Gràcies als tres per tot el que m'heu ajudat.

Agraïments

Al Lao, amb qui ho he compartit tot desde que ens vam conèixer, a la persona més comprensiva que conec i que té un cor on tot hi té cabuda, respectant i cuidant sempre a les persones que l'envolten, a tú Lao per ser com ets i per ajudar-me a seguir endavant sempre que han sorgit problemes.

A la meva família: avis tiets, cosines...tots m'heu ajudat en algun moment, en especial li vull agrair al meu tiet, al Kiko, que va demostrar ser un excel·lent metge i una excel·lent persona, sempre volcat a ajudar als altres i que malauradament ens va deixar. Kiko, sempre seràs amb nosaltres!

A tots aquells que he anat coneixent al lab i que tots d'una manera o altre m'han aportat coses bones.

A les nenes del lab, a la Silvi pel seu bon humor, perquè sempre ha tingut temps per a mi i per totes les persones que l'envolten, perquè té un gran cor i sempre ha tingut un somriure per a tothom i s'ha evocat a ajudar als altres sempre que ho hem necessitat.

Silvieta, hem compartit tants bons moments que en diverses ocasions has estat la meva confident i per això t'agraeixo tot el que has fet per mi.

A l'Anna, per a mi com un pilar, que en els moments més difícils sempre hi és i et fa veure els problemes d'una altra manera, sempre buscant el costat positiu de les coses. Gràcies Anna per donar-me un cop de mà sempre que ho he necessitat, per fer-me veure l'hematologia amb aquesta gran rialla!! I que a part de ser una gran hematòloga també és una gran cuinera, gràcies Anneta.

A la Tanieta, amb qui he compartit molts bons moments, amb qui ens hem compenetrat perfectament al laboratori i de qui admiro la seva sinceritat a l'hora de dir les coses i la seva generositat. La meva companya infatigable de batalles perdudes contra l'Alfons i el seu "ordre" al lab. A tú també Tanieta, gràcies.

A la Sònia, la meua companya als inicis de les PCR de metilació, no oblidaré mai el dia que per culpa d'un carret defectuós vam sortir plorant de riure del lab, amb tu Sònia he après a que hi ha coses que encara que pensis que mai és el moment de fer-les només és qüestió de prioritzar i tu ja ho has fet, felicitats per la teua decisió, et desitjo el millor!

A la Rosa que sempre ha tingut un moment per escoltar i et fa sentir com a casa, gràcies Rosita per tots els bons moments que hem passat juntes. Ets una gran companya i una gran mare! Felicitats.

Al Bernat, que sempre ha tingut un moment per dedicar-me quan ho he necessitat, que ha sabut entendre sempre els meus dubtes. Crec que no existeix millor estadístic que aquell que és capaç de combinar coneixements biològics com ho fa el Bernat.

Al Miquel, amb qui vaig compartir molts bons moments al lab i de qui he après moltíssimes coses, sempre amb aquest posat tímid tan graciós; una persona sensible i entranyable a qui hem trobat molt a faltar.

A la Carme, que amb la seva manera de veure el món ens ha fet riure moltíssim i sé que encara que de vegades tregui el seu caràcter té un gran cor i un gran sentit de l'humor.

Al Gerardo, que sempre ha tingut aquesta vessant crítica que et fa reflexionar, encara que al principi pensés que érem molt diferents, crec que tenim més coses en comú del que em pensava.

A la gent d'hematologia, en especial al Dr. Montserrat i a la Dra. Moreno, la Carol; per confiar en mi i per donar-me l'oportunitat d'acabar quan l'Álvaro va marxar.

Finalment també els vull agrair al Dr. Besses i a la Dra. Bellosillo l'oportunitat que m'han donat de poder treballar amb ells i per la confiança que dipositen en mi cada dia.

Agraïments

Gràcies també a la Fundació IMIM-Hospital del Mar per la seva col·laboració en la impressió d'aquesta tesi.

Gràcies a tots

ABREVIATURES UTILITZADES

SMD: Síndromes mielodisplàsiques

MO: Moll de l'os

LMA: Leucèmia Mieloide Aguda

LAL: Leucèmia Aguda Limfoblàstica

CMH: cèl·lula mare hematopoiètica

LLC: Leucemia Linfàtica Crònica

ARS: l'Anèmia Refractària Sideroblàstica

AR: Anèmia Refractària

AREB: l'Anèmia Refractària amb excés de blastes

LMMC: Leucèmia Mielomonocítica Crònica

AREB-T: Anèmia Refractària amb excés de Blastes en Transformació

MP: Mieloproliferatiu

FAB: French-American-British

OMS: Organització Mundial de la Salut

CRDM: Citopènia Refractària amb Displàsia Multilineatge

CRDM-SA: Citopènia Refractària amb Displàsia Multilineatge i sideroblastes en anell

AR: Anèmia Refractària

AR-SA: Anèmia Refractària amb sideroblastes en anell

MLL: proteïna de fusió (*mixed lineage leukemia*)

VEB: Virus Epstein Barr

LH: Limfoma de Hodgkin

H/RS: Hodgkin Reed-Sternberg

CG: Centre Germinal

RISC: *RNA-induced silencing complex*

GR: Ganglis Reactius

CM: Cel·lularitat Mixta

EN: Esclerosis Nodular

IPSS: International Prognostic Scoring System

Abreviatures

HLA: Antígen Leucocitari Humà

LMMJ: leucèmia mielomonocítica infantil

FAS L: Fas lligand

VEGF: vascular endotelial growth factor

bFGF basic fibroblast growth factor

TNF: Factor de necrosis tumoral

TGF β : Factor de creixement transformant β

IL-3: interleuquina 3

LHPLN: Linfoma de Hodgkin amb predomini linfocític nodular

AEM: Antígen epitelial de membrana

Ig: Immunoglobulines

BCR: receptor d'antígen de cèl·lula B

NK: Natural Killer

AGRAÏMENTS.....	7
ABREVIATURES UTILITZADES.....	13
1- INTRODUCCIÓ.....	19
1.1 Síndromes mielodisplàsiques (SMD).....	19
1.1.1 <i>Descripció</i>	19
1.1.2 <i>Etiopatogènia</i>	22
1.1.3 <i>Període de latència</i>	22
1.1.4 <i>Factors causants d'una SMD</i>	23
1.2 Criteris de classificació.....	26
1.2.1 <i>International Prognostic Scoring System (IPSS)</i>	30
1.2.2 <i>MicroArrays com a eina de classificació d'una SMD</i>	32
1.2.3 <i>Citognètica en les Síndromes Mielodisplàsiques</i>	33
1.3 Tractament i pronòstic.....	37
1.4 SMD i marcadors moleculars.....	41
1.5 Síndromes Mielodisplàsiques i microambient.....	43
1.6 Limfoma de Hodgkin (LH).....	45
1.6.1 <i>Descripció</i>	45
1.6.2 <i>Epidemiologia del LH</i>	45
1.6.2 <i>Classificació del LH (Histopatologia)</i>	46
1.6.3 <i>Immunofenotip</i>	47
1.6.4 <i>Biologia molecular de les cèl·lules de Hodgkin i de Reed-Sternberg</i>	50
1.6.5 <i>Virus de l'Epstein Barr en el LH</i>	54
1.6.6 <i>Paper del microambient en el LH</i>	56
1.7 Història i Concepte dels microRNAs.....	59
1.7.1 <i>Estructura dels microRNAs</i>	60
1.7.2 <i>Biogènesis dels microRNAs</i>	61
1.7.3 <i>Mecanismes d'acció dels microRNAs</i>	63
1.7.4 <i>Característiques generals dels microRNAs:</i>	64
1.7.5 <i>MicroRNAs i càncer</i>	66
1.7.6 <i>MicroRNAs en hematologia</i>	67
1.7.7 <i>Eines de predicció de dianes</i>	73
2-HIPÒTESIS I OBJECTIUS.....	79
3-MATERIAL I MÈTODES.....	83
3.1 Mostres de pacients amb SMD.....	83
3.2 Mostres de pacients amb LH.....	84
3.3 Extracció d'RNA.....	85
3.3.1 <i>Extracció d'RNA de sang perifèrica i moll de l'os</i>	85
3.3.2 <i>Extracció d'RNA a partir de la mostra resuspesa en Trizol</i>	85
3.3.3 <i>Extracció d'RNA a partir de mostres incloses en parafina</i>	86

3.4 Selecció dels microRNAs analitzats en SMD	87
3.5 Transcripció reversa i quantificació dels microRNAs per PCR a temps real.....	87
3.6 Hibridació in-situ dels microRNAs	90
3.7 Descongelació i cultiu de línies cel·lulars	90
3.8 Anàlisi del VEB.....	91
3.9 Anàlisi estadístic	91
4- RESULTATS	97
4.1- RESUM ARTICLE 1: Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic syndromes.....	97
4.2- RESUM ARTICLE 2: MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma	107
5- DISCUSSIÓ.....	119
6- CONCLUSIONS.....	127
7- ANNEXES	131
7.1 Participació a Congressos dels treballs presentats.....	131
7.2 Altres articles relacionats amb el tema de la tesi en els que he col·laborat.....	133
7.3 Altres articles no relacionats amb el tema de la tesi en els que he col·laborat.....	133
8- BIBLIOGRAFIA	137

INTRODUCCIÓ

1- INTRODUCCIÓ

1.1 Síndromes mielodisplàsiques (SMD)

1.1.1 Descripció

Les síndromes mielodisplàsiques (SMD) també anomenades preleucèmia són malalties en les quals el moll de l'os no funciona normalment i no es produeixen suficients cèl·lules sanguínies madures. Les SMD són un grup de trastorns caracteritzats per una o més citopènies en sang perifèrica, secundàries a la disfunció del moll de l'os. Aquest síndrome pot sorgir *de novo* o com a causa d'un tractament de quimioteràpia o radioteràpia. La mielodisplàsia secundària generalment té un pronòstic més precari, tot i que en aquest estudi s'ha treballat amb mielodisplàsies de *novo*.

El pronòstic dels pacients està directament relacionat amb el número de cèl·lules blàstiques al moll de l'os i amb el grau de citopènies en sang perifèrica.

Les síndromes mielodisplàsiques poden transformar a leucèmia mieloide aguda (*LMA*) en un 30% dels casos.

El moll de l'os és el teixit on trobem les cèl·lules mare hematopoietiques poden diferenciar-se per donar lloc a tots els subtipus cel·lulars (Figura 1). Aquestes cèl·lules del moll de l'os són el que anomenem blastes, cèl·lules inmadures i encara indiferenciades que tenen la capacitat de produir els diferents glòbuls capaços de fer les diferents funcions.

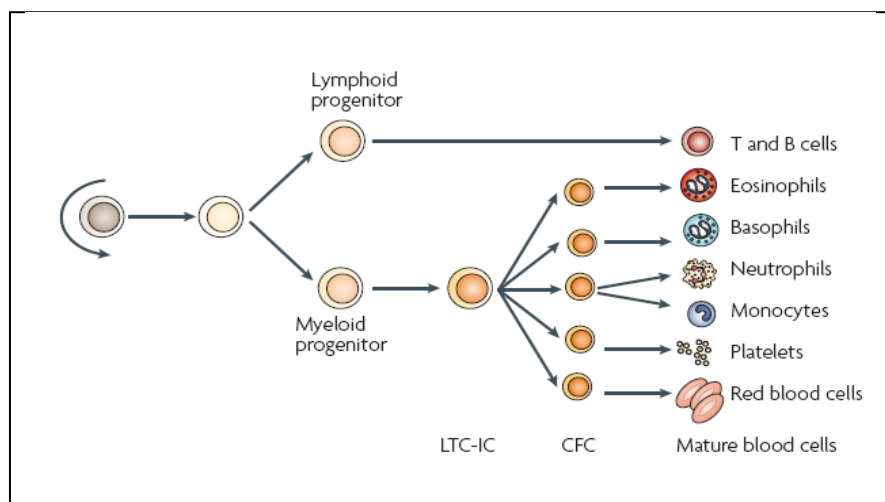


Figura 1. Procés normal d'hematopoesi a partir de cèl·lules stem hematopoietiques multipotents (Seth J. Corey et al. Nature 2007)

Alguns estudis els anys 1950 i 1960 van establir que el procés en el qual les cèl·lules hematopoètiques es diferencien en els diferents subtipus cel·lulars és el que s'anomena hematopoesis. Aquest procés de formació, desenvolupament i maduració prové d'una cèl·lula mare hematopoètica (CMH) o *hematopoietic stem cell (HSC)* pluripotent capaç de donar lloc als progenitors linfoïdes i mieloides.

En el cas de les SMD es produiria un dany a la cèl·lula mare hematopoètica que produiria una clona displàsica que entraria en competència amb la hematopoesis normal, produint una disminució de les línies cel·lulars madures (Figura 2).

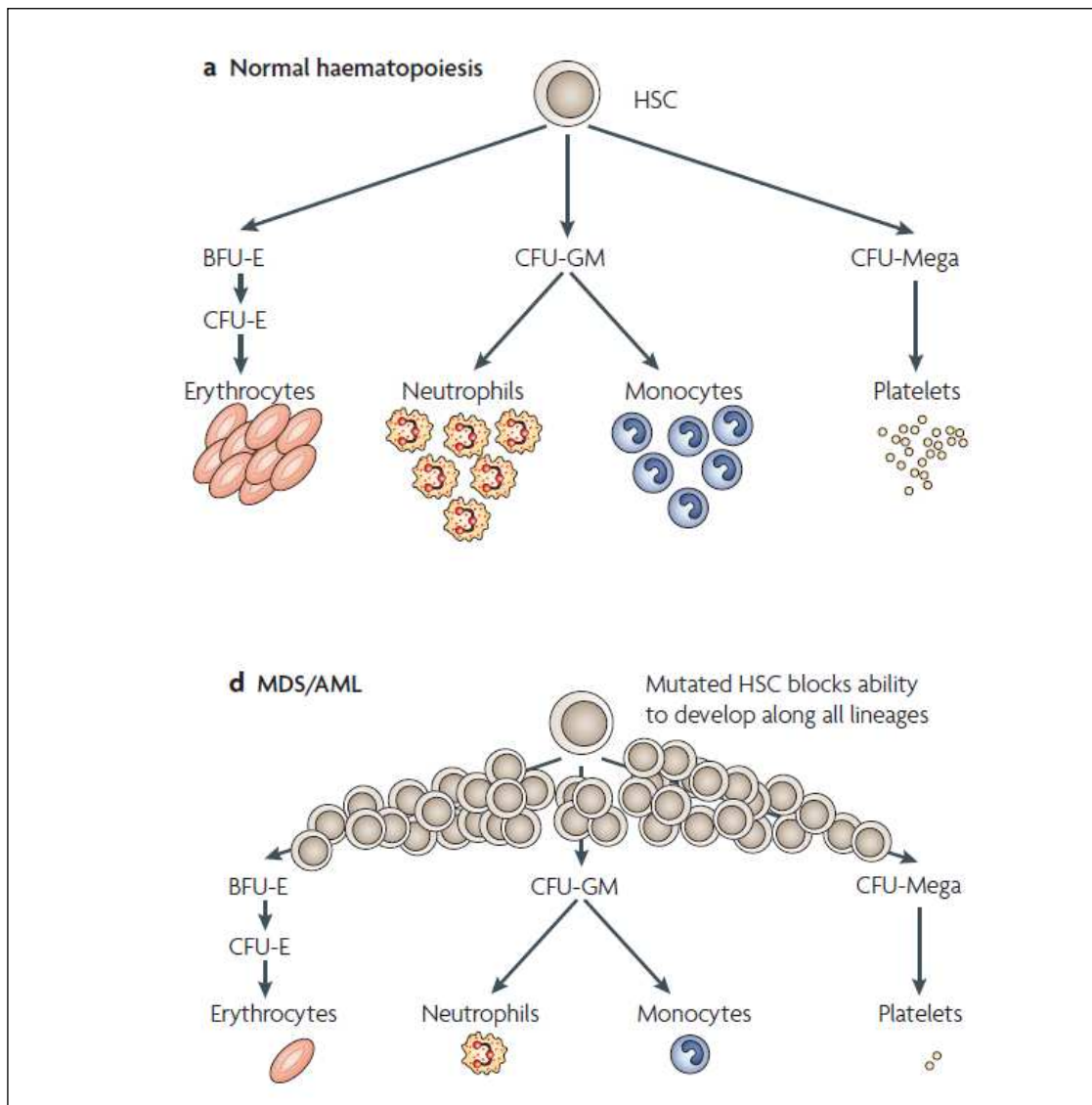


Figura 2. Procés en el qual la clona mielodisplàsica entra en competència amb la hematopoesis normal produint una deficiència de les línies cel·lulars madures (Seth J. Corey et al. Nature 2007)

Les SMD són un conjunt heterogeni de malalties del sistema hematopoietic caracteritzades per un grau variable de displasia a la medul·la òssea i en sang perifèrica, un nombre de citopenies en sang perifèrica i un risc de transformació a leucèmia mieloide aguda (LMA). Encara que hi havia precedents històrics, el concepte terminològic de les síndromes mielodisplàsiques no es va establir de forma definitiva amb motiu de l'acord classificatori del grup cooperatiu internacional FAB fins el 1982[1]. La majoria de casos de SMD primaris es presenten sense cap relació amb circumstàncies etiològiques conegudes i tenen una major incidència en persones d'edat avançada (>75 anys) tot i que també poden afectar a joves. El primer signe que es pot manifestar en un pacient amb aquesta malaltia i més comunament és l'anèmia. Disminució dels número de glòbuls vermells madurs capaços de transportar l'oxigen. També és possible trobar un baix número de leucòcits en sang perifèrica, això dificultaria el pacient combatre les infeccions de forma normal i un altre dels signes que podem trobar és que el número de plaquetes estigui per sota del que és habitual.

Es poden classificar en SMD primaris (80-90% dels casos) mentre que la resta, les SMD secundaries, sí que es poden relacionar amb factors mediambientals (tòxics industrials, radiació ionitzant, benzè i tractaments oncològics). Aquestes últimes mostren un comportament clínic més agressiu i de pitjor pronòstic.[2]

Les SMD tenen una gran incidència a l'edat adulta (més del 90% dels casos per sobre dels 55 anys) i predominen en el sexe masculí (1.4/1). La seva incidència real oscil·la entre el 3.2 % i el 12.6 % de la població general. Aquesta incidència pot incrementar amb l'edat de forma que entre els 75 i els 79 anys és de 34 per cada 100.000 homes i de 17 per cada 100.000 dones, essent similar a la Leucèmia Linfàtica Crònica (LLC).

Un estudi d'un grup alemany va demostrar que entre el 1986 i el 1990 en una població de 547.000 persones la incidència per sota dels 50 anys era de 0.22/100.000 habitants, en el grup d'edat entre 50 i 69 anys la incidència augmentava considerablement 4.88/100.000 habitants i dins el grup de més de 70 anys era de 22.8/100.000 habitants. Un increment progressiu i important en la incidència de les SMD durant els últims anys s'atribueix a l'augment en la pràctica dels anàlisis de sang i els aspirats medul·lars en pacients d'edat avançada.

1.1.2 Etiopatogènia

Les SMD són expansions clonals inicialment no malignes. La clona displàsica es genera a partir de la proliferació d'una stem cell mutant. La hematopoiesis displàsica s'expandeix i entra en competència amb la hematopoiesi normal (Figura 2), substituint-la progressivament en un interval de temps, la rapidesa de la qual, defineix en part, la gravetat i el pronòstic del pacient. Les primeres etapes de la hematopoesi displàsica es caracteritza per un increment de l'apoptosis. Això genera una hematopoiesis ineficaç i la presència de citopènies a la sang perifèrica en un grau variable. Existeix un dèficit cel·lular funcional de les tres línies maduratives de les cèl·lules sanguínies que potencia el risc clínic de les citopènies. En les fases evolutives més avançades de les SMD l'activitat apoptòtica disminueix, però es fan presents altres factors de risc, fonamentalment aquells que deriven de la inestabilitat genètica, fenomen característic de la clona displàsica i que queda patent en l'alta incidència d'alteracions cromosòmiques i amb la presència d'alteracions funcionals i mutacions dels gens reguladors (N-RAS, FMS, P53, WT-1, etc).

Com a conseqüència de l'alta incidència de transformació a LMA (30%), es va estudiar quines podrien ser les causes d'aquesta transformació o quins eren els factors de risc. Actualment es coneix la transcendència pronòstica d'algunes alteracions cromosòmiques (cariotip complex, monosomia 7, deleció del 7q) que comporten aquest risc de transformació leucèmica. També cal destacar que la incidència d'alteracions immunitàries en les SMD són d'una magnitud superior a la que comportaria una associació casual. Així que s'observen incidències de tipus autoimmune (anèmia hemolítica i plaquetopènia), reumatismes i vasculitis. L'aparent explicació per aquests fenòmens seria el compromís displàsic dels progenitors linfoïdes, descendents de la stem cell mutant i pertant podrien ser incloses com a alteracions funcionals de l'expansió clonal.[3][4]

1.1.3 Període de latència

Els pacients que presenten una SMD de novo, els temps de latència d'aquesta són desconeguts. Des del punt de vista biològic hi ha com a mínim dues fases en el desenvolupament de la malaltia: en primer lloc es produeix un dany al moll de l'os que

comporta canvis en el comptatge de les cèl·lules sanguínies i en segon lloc es comencen a detectar característiques clíniques rellevants de la malaltia com per exemple l'anèmia. Per això és important poder diferenciar canvis com poden ser disminució de la concentració d'hemoglobina deguda a l'edat, d'aquells canvis atribuïbles a estadis prematurs de la malaltia.[5]

El desenvolupament de les SMD després de l'exposició a agents causants d'aquesta pot fer variar els períodes de latència. Aquests canvis poden ser de 1 a 41 anys per la exposició a diferents tipus de radiació [6] o de 1 a 10 anys per agents alquilants citotòxics.[7]

1.1.4 Factors causants d'una SMD

1.1.4.1 Fàrmacs quimioteràpics i citotòxics

És sabut que l'exposició a agents quimioteràpics incrementa el risc de desenvolupar una SMD. [8] Alguns citotòxics estan implicats en el desenvolupament d'una SMD i el risc augmenta després d'un trasplant autòleg de cèl·lules progenitores. Una de les característiques en el tractament de malalties amb una elevada taxa de curabilitat com el Limfoma de Hodgkin és reduir el risc de les complicacions tardanes, ja que indicacions recents mostren com les noves teràpies promouen menys risc de transformació leucèmica i SMD associats al tractament., desafortunadament alguns agents per tractar malalties linfoïdes com la fluradabina o els radioimmunoconjugats estan associats a un increment del procés de leucemització.[9]

Per altra banda, com a mínim 2 grups d'agents alquilants inductors d'una SMD secundària i d'una transformació leucèmica han estat identificats en grups de pacients amb la mateixa citogenètica o perfil d'expressió de gens.[10] El primer grup correspon a aquells pacients que pateixen anomalies en el cromosoma 7 i on les mutacions de RAS són freqüents, mentre que el segon grup correspon a aquell amb anomalies al cromosoma 5 amb/o sense anomalies al 7 i sovint associats amb un cariotip complex i mutacions a P53 (gen supressor tumoral).

1.1.4.2 Altres possibles causes

Radiació ionitzant

En molts casos la mielodisplàsia apareix després de llargs períodes d'exposició a radiacions, bé sigui per algun tractament que requereix per combatre alguna malaltia com per l'exposició a radiacions a conseqüència d'una bomba nuclear. En alguns casos les SMD apareixen després de 40 anys d'haver estat sotmès a aquesta radiació, encara que és impossible de quantificar quants anys han de transcórrer desde l'exposició a la radiació fins a l'aparició d'una SMD, la incidència de les SMD pot incrementar després de l'exposició a una radiació total del cos per un trasplant autòleg de cèl·lules mare.

Benzè

El grup de Travis i els seus col·laboradors van fer un estudi prospectiu i van veure que aquells pacients que havien estat exposats a benzè tenien una elevada incidència de displàsia i com a conseqüència acabaven desenvolupant una SMD o una LMA.[11] Yin i els seus col·laboradors van veure que d'un total de 74.828 pacients que havien estat exposats a benzè, un 95 %, patien una SMD en algun moment.[12] Des d'aleshores la legislació ha restringit l'exposició de benzè als llocs de treball, ja que produeix toxicitat al moll de l'òs, aplasia, desenvolupament de SMD i progressió a LMA. També s'ha vist una associació en cultius in vitro de cèl·lules hematopoètiques incubades amb benzè que desenvolupen les anomalies citogenètiques més freqüents en SMD i LMA.[13]

Edat

La incidència de la malaltia incrementa amb l'edat. Aquest fet podria tenir una explicació bé sigui per l'acumulació progressiva a l'exposició a agents tòxics al llarg dels anys o bé perquè les cèl·lules stem del moll de l'os de persones en edat avançades són més susceptibles a patir danys, per altra banda els progenitors hematopoètics disminueixen a mesura que avança l'edat cosa que fa pensar que el procés d'autorenovació cel·lular es veu reduït.[14] Per tant podem afirmar que les cèl·lules mare van acumulant danys a la cèl·lula que fan que disminueixi el seu desenvolupament i la seva capacitat de substituir les cèl·lules sanguínies, sobretot després de

l'estrés hematopoiètic, el dany de les cèl·lules mare en l'hematopoesis i el procés d'auto renovació cel·lular queden limitats per l'edat del pacient.[15]

Predisposició genètica

La majoria dels pacients que pateixen una SMD a l'edat adulta no tenen cap factor associat al desenvolupament d'aquesta; en els casos de SMD infantils un 30 % d'aquells que presenten una anèmia de Fanconi acaben desenvolupant una SMD o una LMA cap als 40 anys i les anomalies en els seus cariotips són similars a aquelles que han aparegut de novo. S'han descrit alguns casos de SMD familiar tot i que no són gaire freqüents. Un increment del risc de patir una malaltia autoimmune s'ha relacionat amb un subtipus de pacients que contenen un antígen leucocitari humà (HLA) en concret (HLA-DR15), un increment d'aquest ha estat observat en pacients que pateixen una SMD.[16]

Alguns grups han estudiat variacions polimòrfiques en gens que codifiquen per enzims que metabolitzen toxines ambientals com un factor de predisposició a patir un càncer i el grup de Rothman van veure l'any 1997 com una variant polimòrfica en el gen NADP(H) pot influir a desenvolupar una SMD després d'haver estat exposats a benzè.

1.2 Criteris de classificació

No va ser fins el 1982 quan el grup de Bennett i el seus col·laboradors van proposar un model de classificació basat en les característiques morfològiques de la medul·la òssea i la sang perifèrica.[17] Com a criteris cito-morfològics s'utilitza la presència de sideroacresia amb un percentatge medul·lar de sideroblastes en anell superior al 15% que definia l'Anèmia Refractària Sideroblàstica (ARS). En funció del percentatge de blastes en medul·la òssea com a entitats sense blastosis medul·lar significativa (<5%) es distingeixen les entitats Anèmia Refractària (AR) i l'Anèmia Refractària Sideroblàstica (ARS). En el cas de l'Anèmia Refractària amb excés de blastes (AREB) i la Leucèmia Mielomonocítica Crònica (LMMC) hi hauria una blastosis medul·lar entre 6 i 19%. Mentre que en els casos d'Anèmia Refractària amb excés de Blastes en Transformació (AREB-T) la blastosis medul·lar estaria entre un 20 i un 29%. Com a criteri de classificació fonamental i diferencial amb la AREB, la LMMC té una monocitosis absoluta en sang perifèrica igual o superior a 1×10^9 leucòcits/L.

El grup FAB (French-American-British) va establir un punt de tall de 13×10^9 leucòcits/L, per sota del qual es considerava com a categoria de mielodislàsia (LMMC/SMD) mentre que si era superior es considerava mieloproliferativa (LMMC/MP). Segons el percentatge de blastes en sang perifèrica es podrien classificar en AR i ARS (0% blastes), AREB i LMMC (<5%) i AREB-T (entre 5-29%).

Validacions posteriors a la classificació de la FAB en sèries extenses han demostrat que les entitats sense blastosis medul·lar o perifèrica significativa mostren un millor pronòstic especialment l'entitat ARS en la qual la incidència de transformació leucèmica és poc freqüent. Per altra banda l'increment de la blastosis significa un increment del risc, essent la AREB-T la de pitjor pronòstic. Això fa que la classificació de la FAB tingui un significat pronòstic demostrat tant per la supervivència com pel risc de transformació leucèmica i ha estat durant molts anys una eina important en la pràctica clínica.[18] Aquesta classificació ha servit durant molts anys per fer una aproximació del pronòstic i del tractament a seguir; Durant més de 25 anys ha estat una eina important arreu del món i no ha d'ésser subestimada, tot i que ha rebut diverses crítiques. Per exemple la inclusió de la LMMC en un grup que potser és més mieloproliferatiu que displàsic, no considerar el grau de displàsia, la fragilitat dels criteris classificatoris de la AR que permeten confondre-la amb patologies

medul·lars de naturalesa no clonal, l'existència d'un 10% de SMD que serien inclassificables segons els criteris de la FAB i la consideració de variants de les SMD amb una possible transcendència pronòstica (Taula 1).

Els avenços en la citogenètica i la seva correlació clínica i pronòstica ha estat un fet transcendent pel que fa a entendre millor les SMD i les leucèmies agudes, és per aquest motiu que uns anys més tard, el 1999 un grup d'experts va revisar la classificació de la FAB.[19]

Subtipus	Blastes en SP	Blastes en MO	Sideroblastes en anell	Monòcits en SP	Auer rods
Anèmia Refractària (AR)	< 1%	< 5%	< 15% en MO	< 1,000/ μ l	NO
Anèmia Refractària amb sideroblastes en anell (ARSA)	< 1%	< 5%	> 15% en MO	< 1,000/ μ l	NO
Anèmia Refractària amb excés de blastes (AREB)	< 5%	5-20%	< 15% en MO	< 1,000/ μ l	NO
Anèmia Refractària amb excés de blastes en transformació (AREB)	> 5%	20-30%	< 15% en MO	< 1,000/ μ l	Possib.
Leucèmia Mielomonocítica Crònica (CMML)	< 5%	0-20%	< 15% en MO	> 1,000/ μ l	NO

Taula 1. Criteris de classificació FAB.

La classificació de la OMS (Organització Mundial de la Salut) no només té en compte els criteris morfològics com són el percentatge de blastes a la medul·la i el percentatge de sideroacresia medul·lar sinó que integra nous criteris de classificació com són el grau de displasia medul·lar (unilineal, bilineal o trilineal), criteris citogenètics i criteris clínics.

En aquesta nova classificació s'estableix noves categories com l'anèmia refractària amb excés de blastes (AREB) i la CMML queda subdividida respecte el percentatge de blastes al moll de l'os. Un altre canvi important si comparem la classificació de la FAB amb la OMS és la desaparició de la categoria AREB-T i aquell grup amb un 20% de mieloblastes o més es classifiquen com a LMA (Taula 2). L'AREB-T de la FAB passa a ser considerada com una LMA amb displàsia multilínea, tot i que per la classificació de la OMS són de gran importància les anomalies citogenètiques clonals associades a una LMA, amb independència del percentatge de blastes en medul·la òssea o en sang perifèrica.

	Característiques en sang	Característiques en moll de l'os
Anèmia Refractària (AR)	Anèmia Sense blastes o pocs blastes	Displàsia Eritroide < 5% blastes < 15% sideroblastes en anell
Anèmia Refractària amb sideroblastes en anell (AR-SA)	Anèmia Sense blastes	Displàsia Eritroide < 5% blastes >15% sideroblastes en anell
Citopènia Refractària amb Displàsia Multilineatge (CRDM)	Citopènies (Bicitopènia o Pancitopènia) Sense blastes o pocs blastes Sense auer rods <1x10 ⁹ /L monòcits	Displàsia en > 10% de les cèl·lules en 2 o més línies cel·lulars mieloides < 5% blastes en moll de l'os sense auer rods < 15% de sideroblastes en anell
Citopènia Refractària amb Displàsia Multilineatge i sideroblastes en anell (CRDM-SA)	Citopènies (Bicitopènia o Pancitopènia) Sense blastes o pocs blastes Sense auer rods <1x10 ⁹ /L monòcits	Displàsia en > 10% de les cèl·lules en 2 o més línies cel·lulars mieloides > 15% sideroblastes en anell < 5% blastes Sense auer rods
Anèmia Refractària amb excés de blastes-1 (AREB-1)	Citopènies < 5% blastes Sense auer rods <1x10 ⁹ /L monòcits	Displàsia unilineal o multilineal 5% a 9% blastes Sense auer rods
Anèmia Refractària amb excés de blastes-2 (AREB-2)	Citopènies 5% al 19% de blastes Pocs auer rods <1x10 ⁹ /L monòcits	Displàsia unilineal o multilineal 10% a 19% blastes Pocs auer rods
Síndromes Mielodisplàsiques no classificables (SMD-I)	Citopènies Sense blastes o pocs blastes Sense auer rods	Displàsia unilineal en granulòcits i megacariòcits < 5% blastes Sense auer rods
Síndromes Mielodisplàsiques associades a la deleció del 5q	Anèmia < 5% blastes Plaquetes normal o incrementades	Megacariòcits en augment amb nucli hipolobulat < 5% blastes Sense auer rods Deleció del 5q

Taula 2. Criteris de classificació de la OMS.

La classificació de les SMD especialment en aquells que tenen un 5% de blastes al moll de l'os és una tasca difícil per els citomorfologistes i els hematòlegs avui en dia, a més el punt de tall que s'utilitza per definir una displàsia és del 10% mentre que si es tracta de pacients de LMA aquest augmenta fins a un 50%.

Aquest sistema classificatori considera l'Anèmia Refractària (AR) dins els grups sense blastosis medul·lar (<5%) i perifèrica (<1%) significativa quan la displàsia és exclusivament eritroide, distingint-la d'una segona entitat en la qual a més de la displàsia unilineal eritroide el moll de l'os mostra més d'un 15% de sideroblastes en anell: Anèmia Refractària amb Sideroblastes en Anell (AR-SA).

Dins el grup de Citopènia Refractària amb Displàsia Multilineal (CRDM) podem dir que trobem la presència de displàsia bilineal o trilineal, la visualització d'un 10% o més elements de les sèries medulars sense blastosis medul·lar o perifèrica significativa; dins aquest grup considerem una variant la Citopènia Refractària amb Displàsia Multilineal amb sideroblastes en anell (CRDM-SA) aquelles amb un percentatge de sideroblastes superior al 15%. Pel que fa al grup dels no classificables (SMD-I) trobem una displàsia unilineal no eritroide en granulòcits o megacariòcits i finalment aquelles SMD associades a la deleció del 5q que només mostren una anomalia citogenètica única i estan associades a anèmia, nombre de plaquetes normals o augmentades i megacariòcits amb nucli hipolobulat al moll de l'os.

Dins aquelles entitats amb blastosis significativa es defineix l'AREB amb criteris similars als de la FAB, però amb la consideració adicional pròpia d'aquest sistema classificatori en dos subtipus: AREB-1 amb blastosis medul·lar entre un 5% i un 9% i blastosis perifèrica inferior al 5% i la AREB-2 amb la blastosis medul·lar entre un 10% i un 19% i la perifèrica entre un 5% i un 19%.

La OMS considera un subgrup de malalties sota la denominació de LMA i SMD relacionades amb el tractament (t-LAM i t-SMD) dins de les quals es distingeixen dues entitats, les relacionades amb els agents alquilants i la radiació i les relacionades amb els inhibidors de la Topoisomerasa II.

La Leucèmia Mielomonocítica Crònica (LMMC) que havia estat considerada per la FAB dins el grup de SMD s'inclou en una nova categoria que són les Síndromes Mielodisplàsiques/ Mieloproliferatives (SMD/MP).[20] Es tracta d'un grup de malalties que al principi expressen característiques de displàsia i proliferació alhora, cosa que fa difícil de classificar-les en un dels dos grups. Fins el 2002 no es coneixien alteracions citogenètiques o diferències moleculars entre aquells pacients que presentaven característiques de SMD o MP, a més alguns pacients que presentaven inicialment CMML no proliferativa eventualment passaven a ser proliferatives amb un augment de les cèl·lules de la sèrie blanca [21]; per aquest motiu el comitè de la OMS va decidir no dividir la CMML en 2 subtipus i aquest constitueix una categoria separada, amb un elevat numero de blastes i un pronòstic desfavorable.[22;23]

1.2.1 International Prognostic Scoring System (IPSS)

El grup de Greenberg i els seus col·laboradors van analitzar un total de 816 pacients, per tal de realitzar un estudi multivariat incloent com a índex pronòstic el risc de transformació leucèmica.[18] El que van observar és que tenint en compte altres variables podien classificar els pacients dins de quatre subgrups els quals donaven unes corbes de supervivència de Kaplan-Meier ben diferents a les corbes aconseguides segons la classificació de la FAB. (Figura 3)

Aquesta nova classificació tenia en compte els següents paràmetres i pertant els incloïa en l'índex final:

- Citopènies (0-3), Hb <10g/dl, neutròfils <1500/ μ l, plaquetes <100.000/ μ l
- Blastes en medul·la òssea (< 5%, 5-10%, 11-20%, 21-30%)
- Citogenètica Bona: cariotip normal, 5q-, 20q-, -y

Dolenta: caritip complexe, 7q-, -7

Intermitja: resta de cariotips

Basant-se en aquests tres paràmetres van establir un índex pronòstic que va permetre fer una classificació dels pacients en quatre categories (Taula 3)

- Baix Risc: índex = 0
- Risc Intermig-1: índex =0.5-1
- Risc Intermig-2: índex = 1.5-2
- Alt Risc: índex \geq 2.5

Variable pronòstic	0	0.5	1	1.5	2
%Blastes en MO	< 5	5-10	-	11-20	21-30
Citogenètica	bona	intermitja	dolenta	-	-
Citopènies	0/1	2/3	-	-	-

Taula 3. Classificació IPSS (Greenberg et al. Blood 1997)

L'aplicació d'aquest índex representa un major progrés i constitueix una eina molt important en la classificació que permet fer un pronòstic i establir un tractament.

A continuació podem veure les corbes de Kaplan Meier que van obtenir el grup dels 816 pacients analitzats i classificats segons el nou índex IPSS (Figura 3 i 4).

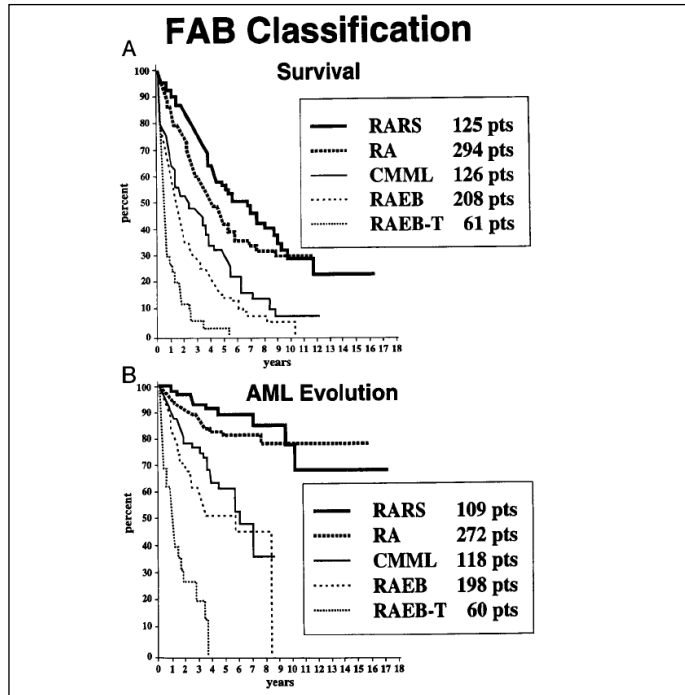


Figura 3. Corbes de Kaplan Meier de supervivència (a) i evolució a transformació leucèmica (b) de pacients segons la classificació de la FAB. (Greenberg et al. Blood 1997)

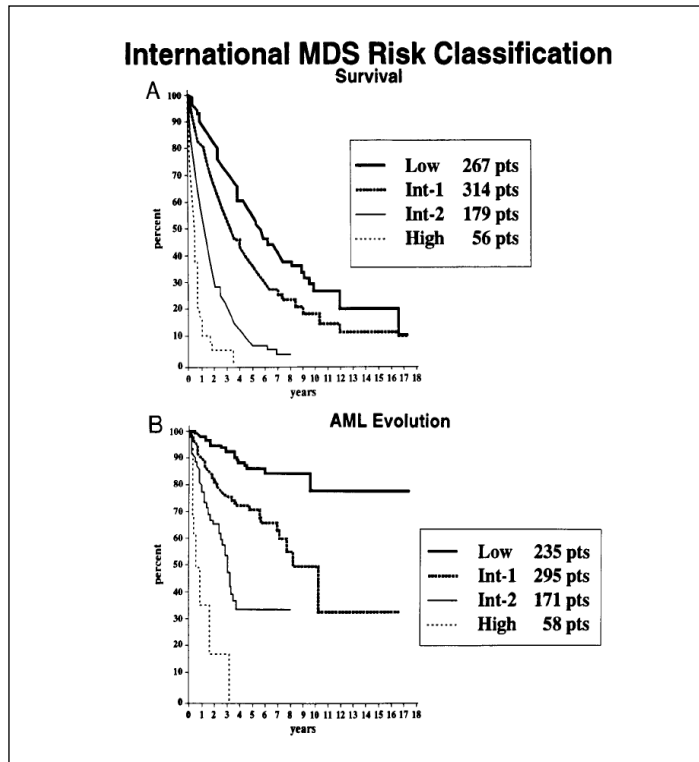


Figura 4. Corbes de supervivència (A) i de transformació leucèmica (B) segons l'índex IPSS (Greenberg et al. Blood 1997)

1.2.2 MicroArrays com a eina de classificació d'una SMD

L'any 2001 el grup de Miyazato van separar cèl·lules de la medul·la òssea CD133+ i les van comparar entre pacients afectes d'una SMD i aquells afectes d'una LMA. Van trobar que hi havia un conjunt de gens diferencialment expressats en aquests dos grups, gens que codificaven per factors de transcripció i proteïnes involucrades en la regulació de la reacció d'oxidació-reducció, així com gens que codificaven per proteïnes de membrana. Un exemple d'aquests és el gen *Dlk* que s'expressava en la majoria dels casos de SMD però no ho feia en els casos de LMA. Aquests resultats van ser validats per PCR a temps real i van concloure que existeix una signatura que permet classificar aquestes dues malalties.[24]

Un altre grup alemany, l'any 2002, van analitzar l'expressió de gens en cèl·lules del moll de l'os CD34+ previament seleccionades de 4 pacients d'alt risc, 7 de baix risc i 4 controls sans. Mitjançant l'anàlisi de perfils d'expressió de gens, van veure que hi havia 11 gens que permetien classificar aquests pacients entre baix risc i alt risc, i aquests dos grups dels controls.[25] Els resultats es van validar en una nova sèrie de 8 pacients i es van repetir els experiments mitjançant PCR a temps real. Els gens *RAI3*, *IEX1*, *STIP1* estaven desregulats. Aquests resultats feien pensar que els casos de SMD de baix risc estaven caracteritzats per la falta de proteïnes de defensa, augmentant la sensibilitat al dany cel·lular, mentre que els casos d'alt risc tenien com a característica principal l'expressió de gens associats a la proliferació cel·lular.

Alguns articles descriuen perfils d'expressió de gens com a eina de diagnòstic per les leucèmies agudes.[26], [27]. L'any 2006 dos grups van realitzar un estudi prospectiu i van analitzar un total de 4000 pacients amb leucèmia aguda i mielodisplàsia en 11 centres diferents amb una reproduccibilitat del 95.6%.[28],[29] Establint a partir d'aquí una nova eina de diagnòstic en malalties hematològiques mitjançant l'aplicació de microarrays.[27]

Per tal de discriminar entre una SMD i una LMA es pot fer mitjançant el nombre de blastes al moll de l'os, tot i que les alteracions cromosòmiques són idèntiques en ambdós grups i de vegades no ens permetrien classificar les dues patologies, el percentatge de blastes al moll de l'os, pot tenir un valor pronòstic.

Haferlach i els seus col·laboradors van analitzar el perfil d'expressió de 70 pacients amb SMD i 238 LMA mitjançant microarrays d'*Affimetrix* i van veure que només l'expressió de

l'FLT3 es relacionava directament amb un alt percentatge de blastes, mentre que uns altres 12 s'expressaven de forma elevada en aquells casos que presentaven un percentatge de blastes més baix al moll de l'os. Entre aquests trobem els gens: ARG1, CEACA1, LCN2, MMP9 i STOM, la majoria d'aquests estan sobreexpressats en granulòcits madurs i involucrats en la diferenciació i l'apoptosis.[30] (*MDS and AML Are Closely Related Diseases: Gene Expression Patterns Reveal Clear Similarities with Respect to Karyotypes and Are Less Related to the Bone Marrow Blast Percentages.abstract 2004*)

La classificació de les SMD no és fàcil, l'index pronòstic IPSS i la classificació de la OMS són dos paràmetres a tenir en compte, mentre que la displàsia i el percentatge de blastes al moll de l'os són també paràmetres importants a l'hora de fer la classificació i difícils de reproduir, pertant en un futur es busquen noves eines, com poden ser els perfils d'expressió de gens i de microRNAs, per tal de classificar millor els pacients i veure quina és la millor via de tractament per a cada un d'ells.

1.2.3 Citogenètica en les Síndromes Mielodisplàsiques

Cariotip Normal

Del 30 al 60% dels pacients de mielodisplàsia presenten un cariotip normal. Aquest grup de pacients es presenta genèticament heterogeni ja que la detecció d'algunes anomalies cromosòmiques o alteracions a nivell molecular no es poden detectar amb els mètodes citogenètics estàndards. La supervivència mitja d'aquests pacients és de 3,8 anys i la progressió a LMA es produeix en un 25% dels casos en un període mig de 5,6 anys.

Pèrdua del cromosoma Y

La importància biològica i clínica de la pèrdua del cromosoma Y és desconeguda, s'ha observat que la pèrdua d'aquest cromosoma és habitual en moltes malalties malignes i s'ha vist associat a l'edat. També podem dir que es troba en un 7,7% de pacients sense cap malaltia hematològica i en un 10,7% de pacients amb una síndrome mielodisplàsica. L'any 2000 el grup de Wiktor i els seus col·laboradors van veure que el percentatge de cèl·lules amb una deleció de cromosoma Y en pacients amb malalties hematològiques era

significativament més gran. Un percentatge >75% de pacients amb deleció del cromosoma Y, en cèl·lules en metafase, pot predir una malaltia hematològica, però únicament aquesta anomalia no pot servir com a eina de diagnòstic per una mielodisplàsia.[31]

Deleció del 20q

La deleció del braç llarg del cromosoma 20 és una anomalia freqüent en malalties mieloides. Té una freqüència aproximada d'un 5% en pacients de mielodisplàsia i d'un 7% en mielodisplàsia secundària. Les característiques principals d'aquests pacients afectes d'una mielodisplàsia són el baix risc de transformació a LMA i una major supervivència.[32;33] Si aquesta anomalia no es troba associada a cap altre el pronòstic del pacient és més bo que si la trobem dins un cariotip complexe.

Pèrdua del cromosoma 5 o deleció del 5q

La pèrdua del cromosoma sencer o una deleció de 5q s'observa en un 10-20% dels pacients en SMD, mentre que si es tracta d'una mielodisplàsia secundària la trobem en un 40%. Aquesta anomalia és pròpia dels subgrups AREB 1 i 2 i s'associen amb cariotips complexes, aquests pacients tenen un pitjor pronòstic, una progressió ràpida cap a la LMA, una gran resistència al tractament i una curta supervivència.[34] La deleció de 5q té una major freqüència en dones (2:1)

Les característiques principals d'aquesta són: una anèmia macrocítica amb un nombre de plaquetes normal o elevat, els subgrups AR o AREB (Anèmia Refractària o Anèmia Refractària amb excés de blastes) són els que es diagnostiquen amb més freqüència. També podem trobar anomalies al moll de l'os en la línia megacariocítica. A més a més aquests pacients tenen un millor pronòstic, un baix risc de transformació leucèmica i un període de supervivència més llarg.

Adició del cromosoma 8

La incidència del guany del cromosoma 8 és d'un 10% en pacients de mielodisplàsia. Aquesta anomalia no es considera un factor de risc, de fet normalment pot venir associada amb altres anomalies que sí que es consideren com a factors de risc i que tenen un significat

pronòstic, pertant aquest grup es considera de risc intermig. En un estudi univariat van veure que aquells pacients que només tenien una adició del cromosoma 8 tenien un pitjor comportament que aquells que pertanyien al grup de risc intermig.[35]

Pèrdua del cromosoma 7 o deleció del 7

La pèrdua del cromosoma 7 o la deleció del 7 es troba com una sola anormalitat aproximadament en un 5% dels pacients amb una mielodisplàsia de novo, encara que la freqüència en nens és d'un 50% en mielodisplàsia de novo i un 55% en mielodisplàsia secundària. Aquest cas pot ocórrer en tres situacions clíniques:

- Mielodisplàsia de novo i LMA
- Mielodisplàsia o LMA secundàries, post-tractament
- Leucèmia mieloide

El síndrome anomenat monosomia del 7 ha estat descrit en nens, amb una major freqüència en mascles (4:1) amb la presència de hepatoesplenomegalia, leucocitosis, trombocitopènia i mal pronòstic. Es creu que la deleció del 7q coopera amb la desregulació de la senyal via RAS en la patogènia de la leucèmia mielomonocítica infantil (LMMJ). L'activació de la via de RAS es produeix per mutacions en els gens KRAS1 o NRAS, inactivant mutacions en el gen que codifica per NF1 o gens que codifiquen per les fosfatases PTPN11/SHP2. L'exposició a agents tòxics està associat a aquesta pèrdua o deleció del cromosoma 7.

Síndrome 17p-

S'ha vist que la pèrdua del braç curt del cromosoma 17 es troba en un 5% dels casos de mielodisplàsia. Aquesta pèrdua pot produir diferents anomalies, incloent translocacions, delecions i reordenaments. Aproximadament un terç dels pacients tenen una SMD secundària i la majoria presenten un cariotip complex. El síndrome 17p- està associat a característiques morfològiques especials com poden ser: disgranulopoiesis i presència de petits granulòcits. La malaltia clínicament és agressiva, presenta resistència al tractament i una curta supervivència. El gen TP53 es troba codificat a la zona 17p13.1, es tracta d'un gen supressor de tumors; en aquests casos és freqüent la pèrdua d'un al·lel del gen TP53, la pèrdua de l'altre al·lel només es dona en un 30% dels casos.[36]

Translocació del cromosoma 11q23

Un estudi de 550 pacients amb anormalitats en 11q23 van demostrar que un 5,1% dels casos presentaven una SMD, un 25% presentaven una SMD secundària i en ambdós casos anaven acompanyades d'un cariotip complexe.[37] La mitjana de la supervivència era inferior als 19 mesos amb una transformació leucèmica en el 20% dels casos. Aquesta translocació fusiona el gen MLL "*mixed lineage leukemia*" sobre la banda cromosòmica 11q23 i el gen AF4 sobre el cromosoma 4q21 originant l'expressió d'un transcrit per la fusió dels cromosomes translocats. Aquest transcrit quimèric MLL-AF4 és mediador de la transformació leucèmica.[38]

Translocació t(11;16)

Aquesta translocació es dona principalment en SMD secundàries encara que també es pot trobar en LMA-tardanes. Es troba relacionada amb translocacions en el gen MLL en malalties de tipus mieloide. El gen MLL es pot fusionar amb el gen CBP del cromosoma 16. MLL és una proteïna que regula la transcripció per exemple dels gens HOX durant el desenvolupament embrionari. CBP és una proteïna involucrada també en la transcripció de gens. Aquests gens presenten múltiples translocacions en diferents malalties hematològiques i pertant la seva funció ha de ser molt ben estudiada pel seu significat en la progressió dels pacients.[39]

Cariotip Complexe

El cariotip complexe normalment està format per 3 o més aberracions cromosòmiques en la majoria dels casos es produeix una pèrdua de material genètic. El trobem en un 20% dels casos de SMD i en un 90% dels casos de SMD secundàries. Les aberracions més freqüents són aquelles que es troben en els cromosomes 5 i 7 i els cariotips complexes són en general aquells que tenen un pitjor pronòstic.

1.3 Tractament i pronòstic

Una millor comprensió de la biologia molecular de la malaltia va ser clau pel desenvolupament de la primera teràpia no intensiva que tingués un impacte important en l'evolució de la SMD. El mes de Maig de l'any 2004 es va desenvolupar el primer tractament pels pacients amb Síndromes Mielodisplàsiques: els inhibidors de les metiltransferases.

Inhibidors de les metiltransferases

La modificació epigenètica en malalties malignes ve produïda pel silenciament gènic induït pel procés d'hiper-metilació. Aquest es produeix degut a l'increment de l'activitat de la DNA metiltransferasa I, enzim que uneix un grup metil covalentment a la posició 5' de la citosina dels residus CpG, generalment trobat en regions promotores. La hiper-metilació d'aquestes zones en gens supressors de tumors porta a terme el descontrol de la proliferació cel·lular i pertant inhibidors d'aquestes ajudarien a restaurar l'activitat de supressió tumoral.

Inhibidors de les histones deacetilases

Canvis en la cromatina es produeixen en el procés epigenètic durant la transformació neoplàstica. Mentre que la hipermetilació del promotor està associada a gens supressors de tumors, també es coneixen altres modificacions que controlen la condensació de la cromatina i l'activitat promotora. Les modificacions com l'acetilació, la metilació i la fosforilació són responsables de la formació de complexos que controlen l'expressió gènica.

El fenilbutirat sòdic s'ha utilitzat per induir l'acetilació d'histones, l'expressió de p21, la parada del cicle cel·lular a G1 i l'apoptosis in vitro.[40]

Inhibidors de les farnesil transferases

Els gens de la família de RAS intervenen en diferents vies cel·lulars com poden ser la proliferació, el creixement i la supervivència. L'adició d'un grup farnesil en aquestes proteïnes citoplasmàtiques permet que siguin transportades a la membrana cel·lular on són integrades a les vies de transducció de senyal. El gen RAS pot ser activat per altres proteïnes que requereixen del procés d'adició d'un grup farnesil, i pertant la seva expressió està controlada per múltiples mecanismes i la inhibició d'aquestes és una via per reprimir el creixement descontrolat de les cèl·lules tumorals.

Inhibidor del receptor de les tirosin quinases

Aquests agents inhibeixen vies de senyalització activades per la unió del receptor del factor de creixement endotelial i altres tipus de receptors com poden ser c-Kit, Flt-3, PDGFR β o bFGF. S'ha vist que en un model de càncer de colon aquestes mol·lècules poden inhibir la metastàsis i la proliferació.

Un bon exemple d'inhibidor de les tirosin quinases és l'*Imatinib Mesylate (Gleevec)*. Aquest és un fàrmac molt potent capaç d'actuar a nivell de les tirosin quinases com BCR/ABL, PDGFR i c-Kit. Els llocs actius de les tirosin quinases tenen un lloc d'unió d'ATP, l'activitat enzimàtica d'aquests consisteix en transferir un grup fosfat de l'ATP als residus de tirosina del substrats. L'imatinib actua a nivell del lloc d'unió de l'ATP de bcr/abl inhibint l'activitat enzimàtica de forma competitiva.

Inhibidors de proteosoma

Els proteosomes són enzims que regulen algunes senyals cel·lulars mitjançant la degradació de proteïnes reguladores o els seus inhibidors i són dianes terapèutiques. El bortezomid és un inhibidor del proteosoma i és utilitzat en pacients amb un mieloma múltiple o en aquells pacients que pateixen una SMD .

La majoria de pacients requereixen de contínues transfusions sanguínies i recentment l'aprovació d'un quelant de ferro d'administració oral (Desferasirox), va suposar una millora de la qualitat de vida dels pacients.[41] Tot i això, aquells pacients de baix risc que reben transfusions amb força freqüència o que la malaltia progressa fins a augmentar la severitat de les citopènies i la presència de noves anomalies citogenètiques són els que s'han de tractar.

Anti-Angiogènics

La Lenalidomida és un potent immunomodulador, anàleg de la Talidomida; aquests dos fàrmacs pertanyen al grup dels anomenats IMiD, però la Lenalidomida s'ha demostrat que té menys efectes secundaris. Aquest fàrmac va ser aprovat el desembre de 2005 per la FDA, per aquells pacients amb deleció de 5q que pertanyien al grup de pitjor pronòstic.[42;43] La Talidomida i la Lenalidomida són agents antiangiogènics que inhibeixen la resposta cel·lular i la proliferació de les cèl·lules que expressen el receptor VEGF (Figura 5). Podem veure com

després del tractament amb Lenalidomida els pacients presenten una millora important al moll de l'os. El percentatge de mieloblastes pot passar d'un 34% a un 5% després del tractament mentre que el nombre de granulòcits madurs augmenta (Figura 6).

Altres agents utilitzats són els inhibidors de les metaloproteases i anticossos monoclonals contra VEGF, com el Bevacizumab.

Els pacients amb SMD presenten un increment de la densitat de microvesícules a la mèdula òssea. Alguns dels gens que s'han estudiat i que estan involucrats en aquest procés són: VEGF, TNF α , bFGF. Quan VEGF es troba desregulat pot provocar repercussions en l'eficàcia de l'hematopoesis.

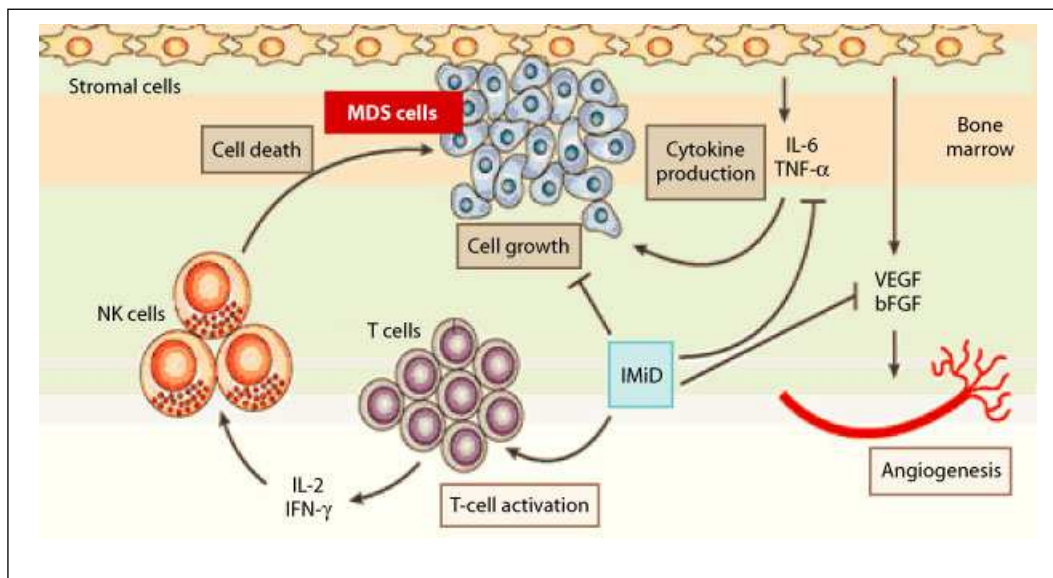


Figura 5. Mecanismes d'acció d'un potent modulador com la Talidomida que té capacitats mielosupressores. Els agents derivats de la Talidomida o la Lenalidomida anomenats IMiD actuen com a agents anticancerígens. (Bartlett JB et al. Nat Rev Cancer, 2004.)

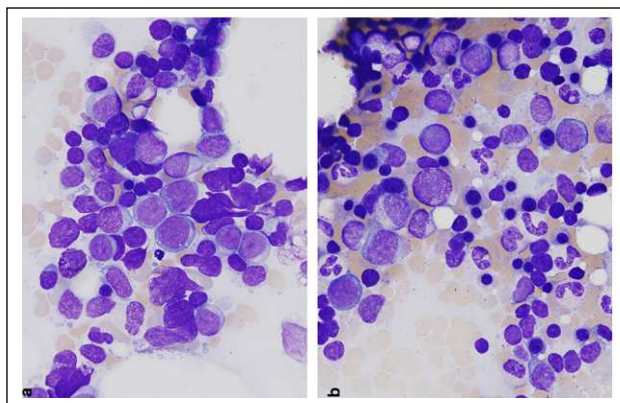


Figura 6. Aspirats medul-lars de pacients abans i després del tractament amb Lenalidomida (Mesa RA et al. Leukemia 2006)

1.4 SMD i marcadors moleculars

Per tal de comprendre millor la biologia de la malaltia i poder trobar característiques específiques que ajudessin al diagnòstic i al tractament, durant els últims anys s'han fet esforços per trobar defectes moleculars en les SMD associats a algunes aberracions citogenètiques.

Un bon exemple és el gen MDS1-EVI-1, producte de la fusió de la regió N terminal de AML1 amb una petita regió de MDS1 i EVI-1. Aquesta proteïna de fusió oncogènica, va ser considerada com a factor causant d'una SMD. També es va descriure que la proteïna de fusió, AML-EVI-1 bloquejava la diferenciació hematopoètica i l'apoptosis dependent de TGF i JNK.

Un altre exemple de proteïna de fusió relacionada amb la patogènia de la SMD és la proteïna TEL-PDGFR, que deriva de la translocació t(5;12) i es va veure que produïa un descontrol de les cèl·lules hematopoètiques en ratolins transgènics.[42-44]

Per altra banda també es van descriure altres marcadors moleculars de les SMD no associats a defectes citogenètics; Alguns estudis genòmics han demostrat que els pacients afectes d'una SMD tenen una clara incidència de mutacions, essent els més freqüents el protooncogen NRAS (48%), seguides del gen FMS (12%) i del gen supressor de tumors P53 (8%). L'estat mutacional confereix un valor pronòstic predictiu tant pel que fa a la supervivència com pel que fa a la transformació leucèmica en les SMD. Un altre gen, l'WT1 és un gen supressor de tumors que es troba al cromosoma 11 i originàriament va ser identificat per la seva implicació en la patogènia del tumor de Wilms. Aquest gen es troba sobreexpressat en la majoria de les leucèmies mieloides i linfoblàstiques agudes així com en les SMD. Els nivells d'expressió de WT1 es relacionen amb els tipus de SMD progressant segons el nombre de blastes.[45]

També s'ha observat que una metilació aberrant del DNA en alguns gens supressors de tumors, promouen una variació de la clona que podria comportar el canvi cap a una transformació leucèmica.[46]

Alguns estudis d'expressió gènica en pacients afectes d'una SMD mostren alguns perfils d'expressió de gens que permeten diferenciar entre una SMD i individus sans.(Taula 4) Mentre que uns altres permeten fer una classificació entre els diferents subtipus així com la diferència entre una LMA de novo o una LMA post-mielodisplàsica.[47]

Gen	Funció	Posició cromosòmica
TACSTD2	tumor-associated calcium signal transducer 2	1p32-p31
UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	3p21.3
TNNC1	troponin C type 1 (slow)	3p21.3-p14.3
KDEL2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	7p22.1
CLC	Charcot-Leyden crystal protein	19q13.1
H-PLK	zinc finger protein 117	7q11.21
RGS19	regulator of G-protein signaling 19	20q13.33
ATF3	activating transcription factor 3	1q32.3
FARP1	FERM, RhoGEF (ARHGEF) and pleckstrin domain protein 1 (chondrocyte-derived)	13q32.2
GNG7	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7	19p13.3
TPD	tumor protein D52-like 1	6q22-q23

Taula 4. Gens que permeten classificar entre individus sans i SMD d'alt i baix risc (Mano H, Leukemia and Lymphoma 2006)

1.5 Síndromes Mielodisplàsiques i microambient

En pacients en etapes prematures d'una SMD es produeix un augment de l'apoptosis cel·lular al moll de l'os, aquest fet va posar de manifest que hi havia algun factor microambiental que podia produir aquest dany. En diversos estudis s'ha vist la deficiència relativa o la sobreproducció de nombroses citoquines com, IL 1 β , IL-6, IL-8, stem cell factor, eritropoietina, TGF- β , GM-CSF i TNF- α en moll de l'os i sèrum de pacients amb resultats conflictius [48;48-50] De totes les citoquines un increment de TNF- α s'ha vist associat a un increment de l'expressió de l'antigen Fas en cèl·lules CD34+. Fas és una proteïna de membrana que pot iniciar senyals apoptòtiques en resposta al crosslinking pel Fas lligand (Fas L). L'activació downstream resultant de les caspases, indica la importància de mantenir uns nivells alts de TNF- α per promoure l'apoptosis en les SMD. L'origen d'un increment de TNF- α pot venir produït per macròfags i limfòcits T presents en el microambient del moll de l'os. [51;52]

Un altre aspecte a tenir en compte del microambient al moll de l'os és la neo-angiogènesis. L'angiogènesis juga un paper important en el creixement del tumor i la metastasis.[53] S'ha demostrat un increment de la densitat de microvesícules al moll de l'os en pacients hematològics.[54;55] La neovascularització està regulada per una varietat de molècules angiogèniques que alliberen tant les cèl·lules tumorals com les normals. En alguns pacients amb LMA s'ha descrit un augment de l'expressió d'algunes citoquines angiogèniques i factors de creixement. Algunes de les molècules més importants són: *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *angiogenin*, TNF- α i TGF- β . [56;57] L'any 2004 van veure com el factor VEGF proporcionava un índex pronòstic tant en pacients amb LMA com en les SMD.[58] Tauro i els seus col·laboradors, l'any 2002, van comparar la capacitat d'aquestes d'alterar la proliferació i la supervivència d'una línia cel·lular dependent de l'estimulació amb IL-3, la F-36P. Els resultats que van obtenir van suggerir que en pacients amb SMD, la funció anormal de l'estroma, pot influir augmentant l'apoptosis de les cèl·lules hematopoietiques dins el microambient del moll de l'os, tot i que aquests resultats van ser posats en dubte per part d'un grup americà el mateix any. Primer de tot opinaven que el títol de l'article es contradeïa amb els resultats obtinguts i que els nivells alts d'apoptosis de les cèl·lules hematopoietiques podien ser degudes a la falta del factor estimulador de creixement

(IL-3) que necessita la línia F-36P utilitzada per fer l'estudi. I pertant els resultats no tindrien res a veure amb un efecte inhibitori de l'hematopoiesis per part de les cèl·lules estromals.[59;60]

Tots els grups coincideixen en què falten models més fiables per reproduir un model de cultiu in vitro, només d'aquesta manera es podrà analitzar el paper de les cèl·lules estromals del microambient en l'hematopoiesis de les SMD. Pertant podem afirmar que el paper del microambient dins aquesta patologia continua essent poc clar i és pertant encara una línia d'investigació a seguir.

1.6 Limfoma de Hodgkin (LH)

1.6.1 Descripció

El Limfoma de Hodgkin (LH) és un càncer que s'origina al teixit limfàtic. Aquest teixit compren els ganglis limfàtics i els òrgans relacionats que formen part del sistema immunològic i el sistema productor de cèl·lules sanguínies.

Els ganglis limfàtics produeixen i emmagatzemen els limfòcits, les cèl·lules encarregades de combatre les infeccions i es comuniquen a través de tot el cos mitjançant els vasos limfàtics. Aquests són els encarregats de transportar el líquid limfàtic.

Els òrgans relacionats amb el sistema limfàtic són: la melsa, el moll de l'os i el timus. La melsa està composta principalment per limfòcits madurs i inmadurs i la seva funció consisteix en eliminar les cèl·lules i altres substàncies de rebuig. La medul·la òssea és el teixit esponjós situat dins els ossos que s'encarrega de la generació de nous glòbuls blans i vermells, el timus s'encarrega d'una funció important que és la maduració dels limfòcits T, encarregats de coordinar la resposta immune cel·lular així com cooperar en la producció d'anticossos per part dels limfòcits B.

El LH és una malaltia que pot originar-se a qualsevol part del cos, generalment s'origina als ganglis limfàtics de la part superior del cos i es pot propagar a través dels vasos limfàtics a altres ganglis, així com també es pot arribar a propagar al fetge i als pulmons.

1.6.2 Epidemiologia del LH

- **Incidència:** el LH suposa un 1% dels càncers aproximadament i un 10% de tots els limfomes. L'incidència és de 3 casos nous a l'any per cada 100.000 habitants, al contrari que els limfomes no Hodgkin la seva incidència es manté estable al llarg del temps.

- **Edat:** la malaltia del LH presenta una distribució bimodal, donat que hi ha un pic de màxima incidència entre els 20 i els 35 anys. I també apareix un segon pic en edats més avançades, a partir dels 50 anys.
- **Sexe:** la malaltia és més freqüent en homes que en dones amb una relació (1,5-2:1).
- **Nivell socioeconòmic:** És més freqüent en persones amb nivell socioeconòmic elevat, que en les de baix nivell, però aquest últim grup presenten un pitjor pronòstic.

La taxa de supervivència és aproximadament del 90% dels casos quan la malaltia és detectada en etapes encara prematures, per aquest motiu es considera un dels càncers amb una elevada taxa de curabilitat.

1.6.2 Classificació del LH (Histopatologia)

El LH pot ser classificat en 4 subtipus diferents segons la morfologia de les cèl·lules de *Reed-Sternberg* i la composició de les cèl·lules reactives infiltrants.

Les Cèl·lules de Reed Sternberg són cèl·lules molt grans generalment multinucleades o amb un nucli cel·lular bilobulat, amb nuclèols prominents en forma d'inclusions. Aquestes cèl·lules poden ser CD30 i CD15 positives i normalment CD20 i CD45 negatives. La presència d'aquestes cèl·lules és molt important pel diagnòstic d'aquesta patologia.

Les cèl·lules de Reed Sternberg tenen tres varietats histològiques:

- Varietat mononuclear, amb un sol nucli i un nuclèol prominent
- Cèl·lules Ilacunars: amb nuclis multilobulats i rodejats d'un abundant citoplasma
- Varietat linfocítica o histiocítica, que conté nuclis polipoides i nuclèols poc evidents amb una moderada quantitat de citoplasma

Esclerosis Nodular: és el subtipus més comú. En aquest s'observa un patró parcialment nodular degut a les bandes fibroses de colàgen. La cèl·lula característica és la variant lacunar de les cèl·lules de Hodgkin Reed-Sterneberg (H/RS). Aquestes cèl·lules acostumen a ser

escasses (1%). El component no neoplàsic conté limfòcits, histiòcits, cèl·lules plasmàtiques, eosinòfils i neutròfils. És freqüent la presència de necrosis, essent més nombroses les cèl·lules neoplàsiques al voltant de d'aquests focus necròtics. En aquest subtipus es poden distingir 2 graus d'afectació basant-se amb el número i el tipus de cèl·lules neoplàsiques als noduls. Sembla que els subtipus II no té relació amb la supervivència global, però sí que sembla associar-se a la supervivència en aquells pacients que recauen; fet que suggereix que aquestes formes podrien beneficiar-se de tractaments més agressius.[61] Encara que actualment aquest gradient no es considera de gran importància desde que el grup britànic "British National Lymphoma Investigation Group" van suprimir aquesta classificació per no aportar diferències en el tractament.[62;63]

Cel·lularitat mixta: en aquest subtipus l'infiltrat és difús i les cèl·lules neoplàsiques són de Reed-Sternberg. Aquestes cèl·lules són bi o multinucleades amb nuclèols grans i eosinòfils i és el subtipus que més freqüentment va acompanyat de l'infecció pel virus de l'Epstein Barr (VEB). Tant l'esclerosi nodular com la cel·lularitat mixta poden afectar àrees interfol·liculars dels ganglis limfàtics i es poden acompanyar per hiperplàsia fol·licular.

Limfoma de Hodgkin ric en limfòcits: en aquest, les cèl·lules neoplàsiques són de tipus clàssic o lacunar i el component no neoplàsic està constituït majoritàriament per limfòcits. Un grup petit d'aquests casos pot tenir un patró de creixement vagament nodular, amb centres germinals als nòduls i a les cèl·lules neoplàsiques del mantell dels fol·licles i les àrees interfol·liculars. Aquests casos han de diferenciar-se dels casos de **Hodgkin amb predomini linfocític nodular (LHPLN)** i per això és important l'estudi de l'immunofenotip.

1.6.3 Immunofenotip

Les cèl·lules neoplàsiques del LH clàssic en la majoria dels casos expressen els marcadors CD15+, CD30+. (Figura 7) essent negatius per a CD45. La freqüència amb la que es detecta l'expressió de CD15 és diferent en les diferents sèries, probablement degut a variacions tècniques.

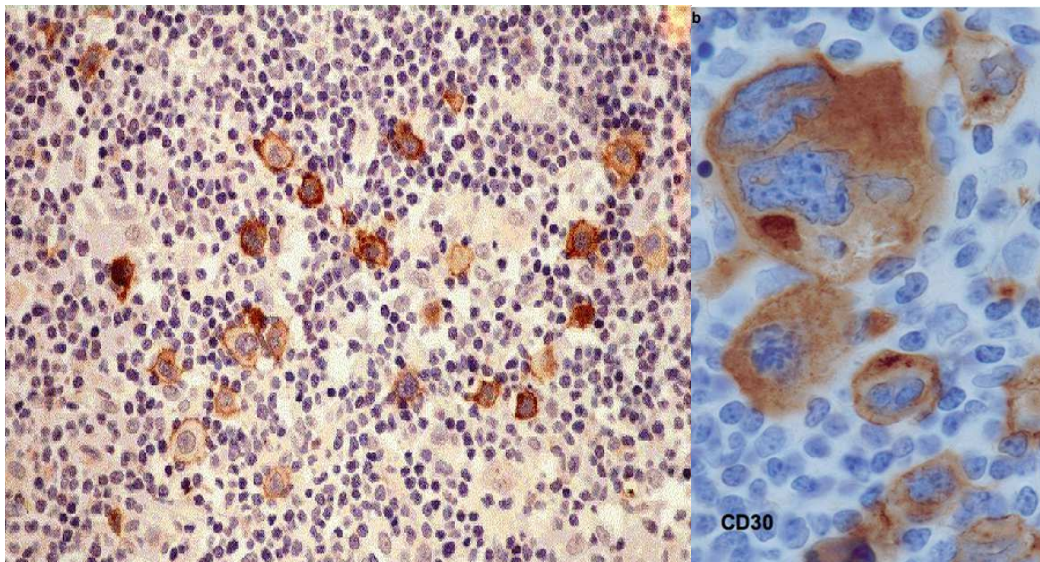


Figura 7: LH clàssic. Expressió de l'antigen d'activació CD30 en cèl·lules neoplàsiques. (Hans knecht, et al 2010)

Només en un petit nombre de casos es detecta en les cèl·lules de RS una expressió dèbil de diferents antigens de llinatge B com el CD20 i el CD79a. Un altre antigen associat al llinatge B que s'expressa en un 90% dels casos és PAX-5 i un altre característica de l'immunofeotip és l'absència de factors de transcripció OCT-2 i BOB-1.

Les cèl·lules de Hodgkin i RS es caracteritzen per un immunofenotip variable i poc constant, amb una remarcable pèrdua d'antigens associats a cèl·lules B i expressió d'antigens d'altres llinatges cel·lulars. Només una petita proporció (20-30%) de cèl·lules de H/RS expressen marcadors típics de cèl·lula B com CD19, CD20, CD22 i CD79a. Marcadors inapropiats de cèl·lula T, cèl·lules dendrítiques i granulòcits com CD2, CD4, CD5, CD8, granzima, CD15 o fascina poden ser detectats en cèl·lules de H/RS. És important remarcar que les cèl·lules de H/RS no mostren expressió de CD45RA i de l'antigen epitelial de membrana (AEM). Aquests marcadors són importants ja que permeten diferenciar el LH al diagnòstic d'altres tipus de limfomes. Altres antigens importants, que són bàsics per la determinació del diagnòstic del LHc són: CD30 (Ber-H2) i CD15. A més s'ha observat que hi ha una correlació entre CD30 i el factor

Marcador	Expressió Qualitativa/Quantitativa
Marcador de cèl·lules B	
BSAP	Positivitat dèbil / >95 dels casos, >70% de les H/RS
CD19	Positiu / 20% dels casos, <50% de les H/RS
CD20	Positiu / 30% dels casos, 40% de les H/RS
CD21	Positiu / 10-40% dels casos, 10-60% de les H/RS
CD22	Positiu / 20% dels casos
CD23	Positiu / 30% dels casos
CD79a	Positiu / 10% dels casos, 20% de les H/RS
CD138	Positiu / 1% dels casos
Marcador de cèl·lules T	
CD2	Positiu / 4% dels casos, 40% de les H/RS
CD3	Positiu / 1% dels casos, 40% de les H/RS
CD4	Positiu / 2% dels casos, 40% de les H/RS
CD5	Positiu / <1% dels casos, 40% de les H/RS
CD8	Positiu / <1% dels casos, 40% de les H/RS
Granzyme	Positiu / 18% dels casos, 10-50% de les H/RS
TIA-1	Positiu / 10% dels casos
Marcadors d'activació	
CD25	Positiu / casi tots els casos
CD30	Positiu / 99% dels casos, >99% de les H/RS
CD40	Positiu / 70-100% dels casos
Marcadors inapropiats de llinatge	
CD15	Positiu / >70% dels casos, 5-95% de les H/RS
EMA	Positivitat dèbil en <5% dels casos
Fascina	Positiu / 100% dels casos
Altres marcadors	
ALK1	Negatiu
BCL6	Positiu / 10% dels casos, >10% de les H/RS
CD43	Negatiu
CD45RA	Negatiu
MUM1	Positiu / 100% dels casos, >10% de les H/RS
Vimentina	Positiu en totes les H/RS

Taula 5. Marcadors de cèl·lula de Hodgkin/Reed-Sternberg

nuclear de supervivència NF-κB, el qual pot ser activat in vitro per CD30, indicant la importància de CD30 en aquesta patologia. La introducció de noves tecnologies, entre elles els microarrays,

ens han proporcionat grans quantitats d'informació sobre l'immunofenotip de les cèl·lules de H/RS (Taula 5), que es resumeix de la següent manera: el 40% dels casos de LHc expressen marcadors de superfície de cèl·lules B en les cèl·lules de H/RS i aproximadament un 10% dels marcadors de cèl·lules T. Entre aquests marcadors podem destacar a *BASP (Pax-5)* que és necessari pel manteniment de la identitat de cèl·lula B i que s'expressa dèbilment en la majoria de les cèl·lules de H/RS. Una altra característica de l'immunofenotip és l'absència de factors de transcripció *OCT-2* i *BOB-1*, així com *PU.1*.

1.6.4 Biologia molecular de les cèl·lules de Hodgkin i de Reed-Sternberg

Degut a l'expressió aberrant de marcadors de varis llinatges cel·lulars com granulòcits, limfòcits T o B o cèl·lules dendrítiques, l'origen cel·lular de les cèl·lules de RS ha estat un enigma durant dècades. Mitjançant l'anàlisi d'aïllament d'aquestes cèl·lules de seccions de teixits amb LH i la seva posterior anàlisi per PCR per amplificar els gens de les Immunoglobulines (Ig) V reordenades es va poder descobrir que les cèl·lules de RS tenien un origen clonal derivat de cèl·lules B en les que s'havia produït un reordenament dels gens de les Ig V. En la majoria dels casos de LHc i de LH de predomini limfocític nodular tenien mutacions somàtiques de inactivació i reordenament dels gens de les Ig en la regió V, cosa que suggeria l'origen de les cèl·lules B dins el centre germinal (CG) ja que les hipermutacions somàtiques dels gens de les Ig tenen lloc de forma específica en les cèl·lules B dels CG.

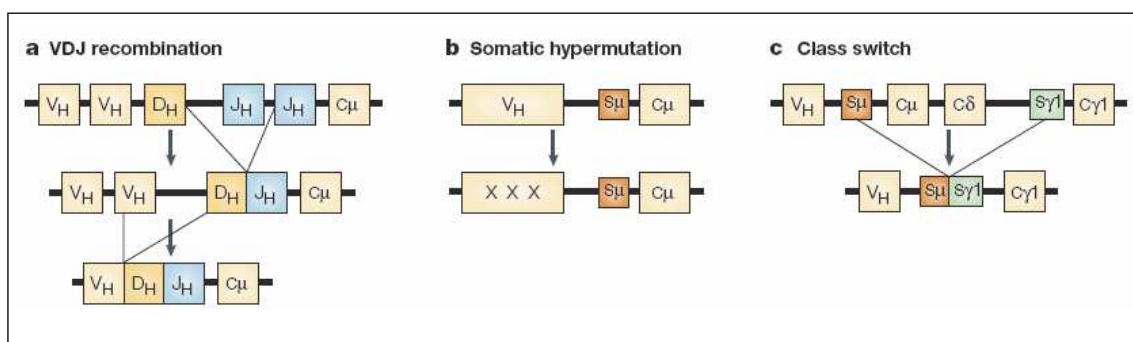


Figura 8. Procès molecular de remodelació dels gens de les IgGs. (Küppers Nature Reviews Cancer 2005).

Les cèl·lules de H/RS presenten una falta d'expressió de Ig que s'explica per mutacions al gen de les Ig que inactiven parcialment la transcripció de Ig.[64-67] Per altra banda pot ser degut a activadors clau de la transcripció de Ig com *OCT-2*, *BOB-1* i *PU.1*. [68-72] Una altre de les

causes que s'han trobat in vitro és l'activació de la transcripció per hipermetilació de la zona promotora.[73] D'aquesta manera les cèl·lules de H/RS no produeixen Ig ni tenen un receptor d'antigen de cèl·lules B (BCR) funcional. En un estat normal aquestes cèl·lules B del CG sense un BCR funcional entrarien en apoptosi i serien eliminades[74;75]; però o bé les cèl·lules de H/RS desenvolupen mecanismes per escapar de l'apoptosi o bé són rescatades per la infecció del virus VEB.[76-78] Aquest últim pas seria el major event oncogènic en el procés de limfomagènesis en el LH.

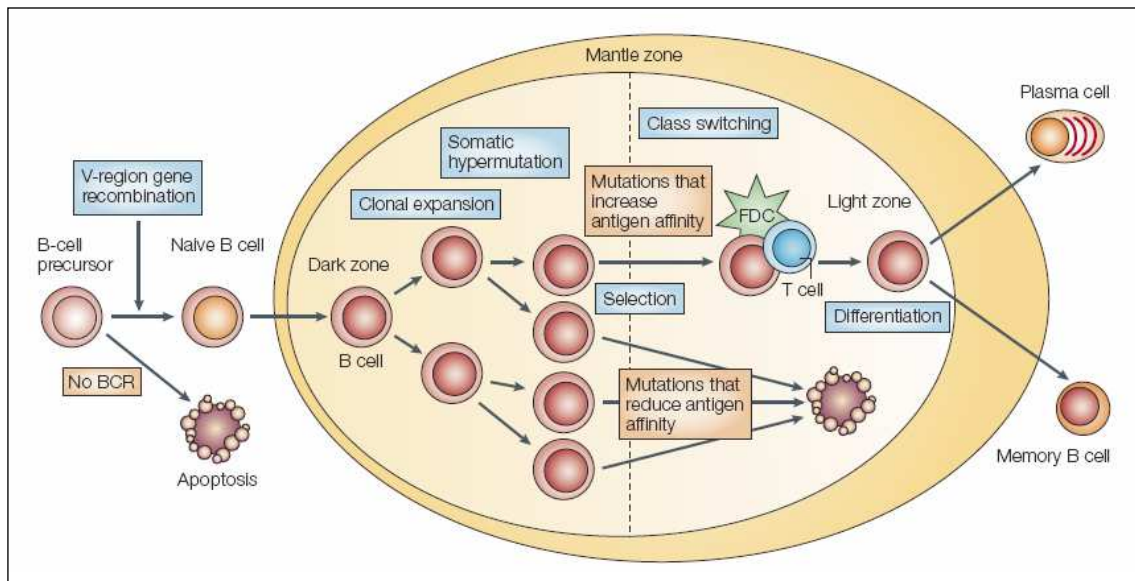


Figura 9. Diferenciació de les cèl·lules B en el centre germinal. (Küppers, Nature Reviews Cancer 2005)

Malgrat que les cèl·lules de H/RS deriven de cèl·lules B, l'anàlisi de l'expressió de microarrays de línies cel·lulars, mostren que han perdut l'expressió de la majoria de marcadors de membrana de cèl·lula B; característica única entre els limfomes de cèl·lula B.[79] Això reforçaria la hipòtesis de que aquestes cèl·lules BCR negatives eviten l'entrada en apoptosi i sobreviuen. Les alteracions genètiques relacionades amb aquesta patologia són encara desconegudes, en la majoria de casos existeixen alteracions numèriques de cromosoma així com amplificacions i delecions d'algunes regions cromosòmiques.[80;81]

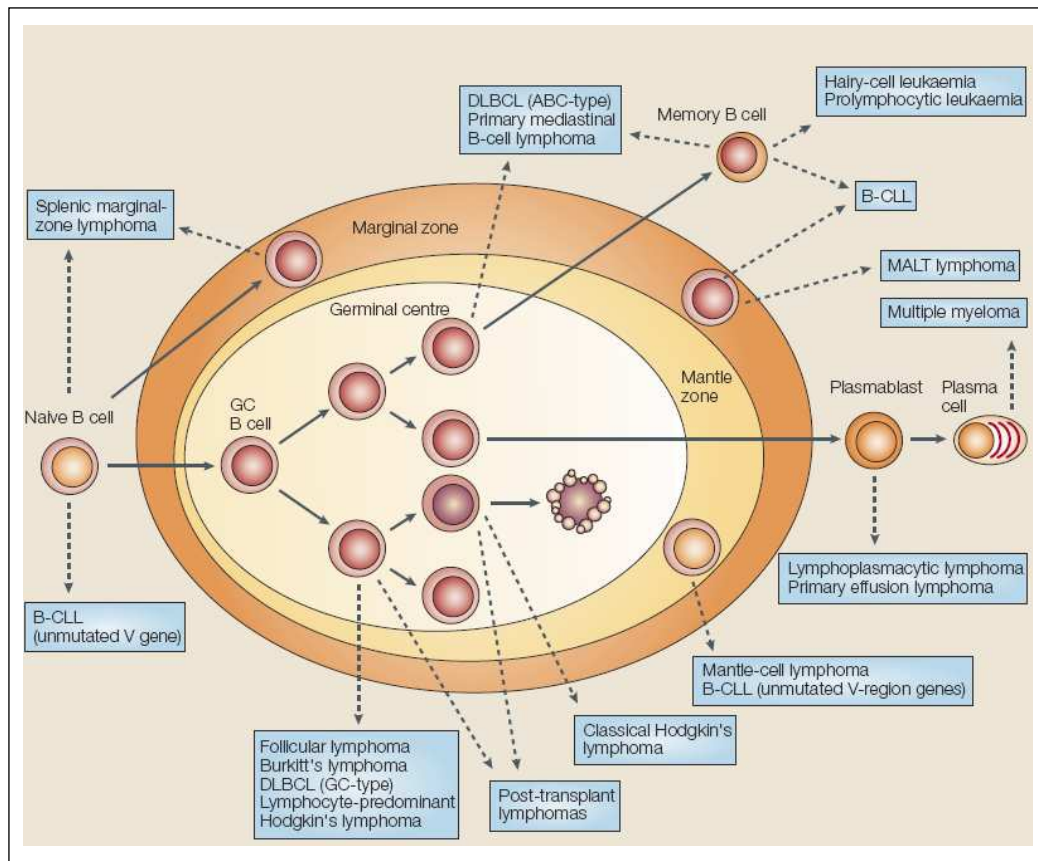


Figura 10. Procés de maduració d'una cèl·lula B. (Küppers, Nature Reviews Cancer 2005)

Algunes de les aberracions cromosòmiques són recurrents com per exemple el guany de 2p i 9p, però la identificació de gens rellevants està encara pendent. S'han identificat alteracions genètiques que contribueixen a l'activació constitutiva de la via de NF- κ B.[82-85] A més a més, últimament s'ha vist l'expressió aberrant de múltiples proteïnes i l'activació de vies de senyalització que contribueixen a la supervivència de les cèl·lules de H/RS. En concret l'activació de Notch1, de múltiples receptors Tirosina quinases, de les vies de PI3K/AKT i MEK/ERK i dels factors de transcripció NF- κ B, STAT i AP-1. La inhibició experimental d'alguns d'aquests mòduls de senyalització revela la importància de la seva activació constitutiva en les cèl·lules de H/RS, pel manteniment de la supervivència i la proliferació. (Taula 6)

D'altra banda, el punt clau és l'escapada de les cèl·lules de H/RS de l'entrada en apoptosi, i algunes de les vies que són actives de forma constitutiva contribueixen a la supervivència d'aquestes cèl·lules, sent potser *NF- κ B*, el factor més important.

Via de senyalització	Efecte proposat per a l'activació
<i>JAK-STAT</i>	Indueix la proliferació i promou la supervivència
<i>AP-1</i>	Indueix proliferació.
<i>Notch1</i>	Indueix proliferació, inhibeix l'apoptosis i possiblement redueix el fenotip de cèl·lula B
<i>MAPK/ERK</i>	Indueix proliferació i inhibeix apoptosis.
<i>PI3K/AKT</i>	Promou supervivència
<i>NF-κB</i>	Inhibeix apoptosis, indueix proliferació, recluta cèl·lules T cap al limfoma i promou disseminació
Receptors de Tirosina Quinases: <i>PDGFRA, DDR2, EPHB1, RON, TRKB, TRKA</i> y <i>MET</i> .	Indueix proliferació, altres

Taula 6. Vies de senyalització, factors de transcripció activats constitutivament en les cèl·lules de H/RS i efectes proposats de l'activació.

Ambdues vies convergeixen a nivell de la caspasa 3 i 7, les quals són activades per ruptura de la seva forma inactiva (procaspasa) per la caspasa 9, i provoquen l'entrada en apoptosis. Les cèl·lules de H/RS expressen CD95 (Fas) i altres membres de la família dels *TNFR* com *TNFR1*, *TRAIL-R1* i *TRAIL-R2*. [86;87] Les cèl·lules de H/RS també expressen CD95 lligand. [88;89] però tot i així s'han mostrat resistents a la inducció de mort cel·lular per aquesta via en estudis in vitro. [90] En alguns casos, en freqüència molt baixa, s'han trobat mutacions al gen CD95 que causen aquesta resistència. [86;91] Es pot destacar la detecció d'elevats nivells d'expressió de la proteïna cel·lular inhibidora *FLICE* (*c-FLIP*) a les cèl·lules de H/RS, [92] una proteïna que regula negativament l'entrada en apoptosis via CD95, interferint en la formació del complex DISC. El Knockdown per a *c-FLIP* produeix una sensibilització de les línies cel·lulars derivades de LH a la inducció de mort cel·lular via CD95, cosa que implica que *c-FLIP* juga un paper central en la prevenció de l'entrada en apoptosis intervinguda per CD95 a les cèl·lules de H/RS. [93]

Aquestes cèl·lules també mostren un mal funcionament en la via intrínseca d'apoptosis. L'activitat de les caspases està modulada per les proteïnes inhibidores d'apoptosis. Les proteïnes *XIAP* (X-linked inhibitor of apoptosis) s'uneixen a les caspases 3, 7 i 9, i inhibeixen la seva activitat proteolítica. La sobreexpressió d'aquestes per diferents estímuls provoca la inhibició de l'apoptosis i recentment s'ha detectat la seva expressió en línies cel·lulars de LH i

en cèl·lules de H/RS provinents de biopsies[94]. La inhibició de les proteïnes XIAP en cèl·lules de LH, restaura de nou la sensibilitat de les cèl·lules a l'entrada d'apoptosis via caspasa 3. La sobreexpressió de *c-FLIP* a les cèl·lules de H/RS pot ser deguda a l'activitat constitutiva de NF-κB, però l'expressió de les proteïnes XIAP sembla ser independent de l'activació de NF-κB. [95;96]

1.6.5 Virus de l'Epstein Barr en el LH

El VEB és un herpesvirus de tipus gamma 1 que és present en el 90% de la població adulta mundial. La infecció normalment es desenvolupa durant la infantesa, encara que la primoinfecció clínicament aparent és la mononucleosis infecciosa, que generalment afecta els individus que no han tingut contacte amb el VEB fins a la joventut. La seva porta d'entrada és l'orofaringe (a través de la saliva) i després de la primoinfecció els individus es converteixen en portadors de la infecció durant tota la vida.

El virus infecta inicialment les cèl·lules epitelials de l'orofaringe utilitzant per penetrar en elles la glicoproteïna 350/220 del seu embolcall que s'uneix el receptor cel·lular CD21. Amb la producció de nous virions s'infecten les cèl·lules contigües. Durant aquesta fase el VEB infecta als limfòcits B i prolifera en sang perifèrica i ganglis limfàtics. Després de la infecció primària, el VEB roman present en una petita població de limfòcits B, en una situació de relativa inactivitat coneguda com a infecció latent. En el cicle lític es produeix replicació, síntesi proteica i gènesi de nous virions, mentre que en la fase de latència es produeixen només algunes proteïnes i no es desenvolupen virions. Durant la fase latent s'expressen de forma constant dos RNAs no codificants, *EBER-1 i 2*, i les proteïnes latents: els antígens nuclears *EBNA-1, 2, 3 A, 3B, 3C i LP*, i les proteïnes de membrana cel·lular *LMP-1, 2A i 2B*. Totes aquestes proteïnes no s'expressen alhora a la mateixa cèl·lula hoste i depenent dels gens expressats s'han descrit 3 tipus diferents de latència, que s'observen en les diferents línies cel·lulars i en les diferents patologies associades al VEB. En el limfoma de Hodgkin trobem el tipus de latència II, amb l'expressió d'*EBNA-1, LMP-1, LMP-2A/B i EBERS*. Les diferències entre els gens que codifiquen les proteïnes *EBNA2, 3A i 3C* permeten distingir els dos subtipus de VEB, denominats VEB 1 i 2.

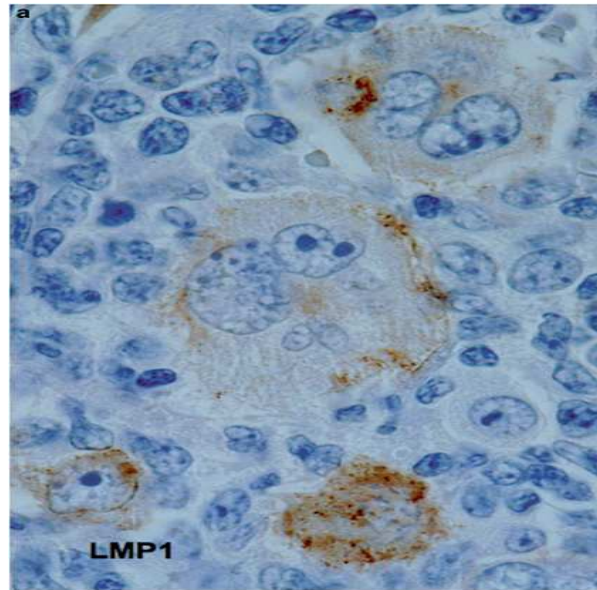


Figura 11. Expressió de LMP1 en cèl·lules de Hodgkin i de Reed Sternberg VEB + (Hans knecht, et al 2010).

La persistència del VEB en la fase de latència als limfòcits B infectats o en teixits, es veu afavorida pel baix nombre de proteïnes que se sintetitzen, la qual cosa redueix les possibilitats que siguin reconegudes per les cèl·lules T citotòxiques i pertant esquiven la resposta immune. Una de les proteïnes que s'expressen en major quantitat és LMP-1, la qual juga un paper important ja que és capaç d'alterar funcions crítiques de la cèl·lula B, com la transcripció gènica, el control del cicle cel·lular i la regulació de l'apoptosis (Figura 11). És mitjançant aquesta proteïna que el VEB garanteix la supervivència de la cèl·lula infectada i la seva pròpia.[97]

Aproximadament en un 40% dels casos de LHc, les cèl·lules de H/RS estan infectades per VEB. El VEB mostra un patró monoclonal d'infecció i persisteix a través del curs de la malaltia, cosa que suggereix que juga un paper important en el procés de patogènesis.[98] Durant la seva infecció, el VEB en el LHc expressa: *EBNA-1* que és important per a la replicació de la genoma viral, *LMP-1* que mimetitza el receptor CD40 activat que té un paper important en la diferenciació dels limfòcits B i en la supervivència de les cèl·lules B de centre germinal [99] i activa *NFkB*, i *LMP-2a* que és una proteïna relacionada amb la família *src* de les tirosina quinases que participa en el control del cicle lític del VEB i a més pot subsituir la funció del

BCR, essent un senyal de supervivència essencial per a les cèl·lules B.[100;101] LMP-2 pot estar rescatant les cèl·lules del CG que tinguin mutacions que desafavoreixin l'apoptosis.[102] Malgrat tot això, no és encara gaire clar si el VEB és capaç de rescatar les cèl·lules BCR deficientes de l'entrada en apoptosis en els CG. Tres estudis van abordar aquesta qüestió i van observar que VEB era capaç de rescatar de l'entrada en apoptosis. No obstant això, els estudis tenien la limitació que el tipus de latència que mostrava el VEB en el rescat era del tipus III amb l'expressió de 9 proteïnes, mentre que en el LH expressa el tipus II amb l'expressió de només 3 proteïnes. Una de les explicacions per a aquest fet podria ser que en el rescat inicial s'expressés la latència III i després aquesta passés a II. A més, les dues proteïnes probablement més importants en el rescat de les cèl·lules B i en el procés de limfomagènesis, LMP-1 i LMP-2a, s'expressen en els dos tipus de latència. La supervivència de les cèl·lules deficientes de BCR a través de la infecció del VEB demostra el paper central del VEB als estadis primers de la patogènesis del LH.[103-106]

1.6.6 Paper del microambient en el LH

El Limfoma de Hodgkin clàssic es caracteritza per una infiltració de diferents subtipus cel·lulars del sistema immune, incloent: cèl·lules T, cèl·lules B, cèl·lules plasmàtiques neutròfils, eosinòfils i mastòcits. (Figura 12) Les cèl·lules de HRS representen un 1% de la cel·lularitat total en el tumor. Aquest microambient és essencial per la supervivència de les cèl·lules de H/RS. Aquest fet ve demostrat per la dificultat d'aquestes cèl·lules de créixer en cultius o en ratolins immunodeprimits. Sembla ser que les cèl·lules de H/RS regulen el microambient promovent l'atracció d'algunes cèl·lules infiltrants mitjançant la secreció de citoquines, com per exemple: CCL5, CCL17 i CCL22 que atrauen cèl·lules TH2 i Treg.[107;108] La secreció d'IL-5, CCL5, CCL28 i factors estimuladors de colònies (granulòcits-macròfags) causen el reclutament d'eosinòfils al microambient del Limfoma de Hodgkin.[107] CCL5 a més a més atrau cèl·lules mastocítiques. Per altra banda les cèl·lules de HRS també secreten IL-8 la qual atrau els neutròfils. Aquestes citoquines no només tenen un efecte en l'atracció de cèl·lules cap al microambient, sinó que a més a més tenen un efecte directe en la supervivència i la proliferació com s'ha demostrat en el cas de CCL5.

Les cèl·lules CD4+ normalment representen una gran població cel·lular en el teixit limfoide, una fracció d'aquestes cèl·lules són cèl·lules T "helper" CD4+ i poden tenir un paper patogènic en l'estimulació de la supervivència de les cèl·lules de H/RS.

Algunes interaccions cel·lulars en el teixit del Limfoma de Hodgkin poden involucrar múltiples molècules. Les cèl·lules de H/RS estimulen els fibroblasts mitjançant diferents factors com TNF α , factors de creixement transformant β (TGF β) i factors de creixement fibroblàstic; l'activació de fibroblasts a la vegada produeix *eotaxin* i CCL5, contribuint a l'atracció d'eosinòfils i cèl·lules T reguladores dins el Limfoma de Hodgkin.[109]

El microambient cel·lular del LH tendeix a evadir l'atac de les cèl·lules T citotòxiques o les cèl·lules NK (natural killers). Una gran part de cèl·lules T CD4+ no són cèl·lules T "helper" sinó que són cèl·lules T reguladores, aquestes cèl·lules poden tenir un paper patogènic ja que existeixen indicis que poden suprimir l'acció citotòxica de les cèl·lules T, inhibint l'atac d'aquestes cèl·lules T contra les cèl·lules de H/RS.[110]

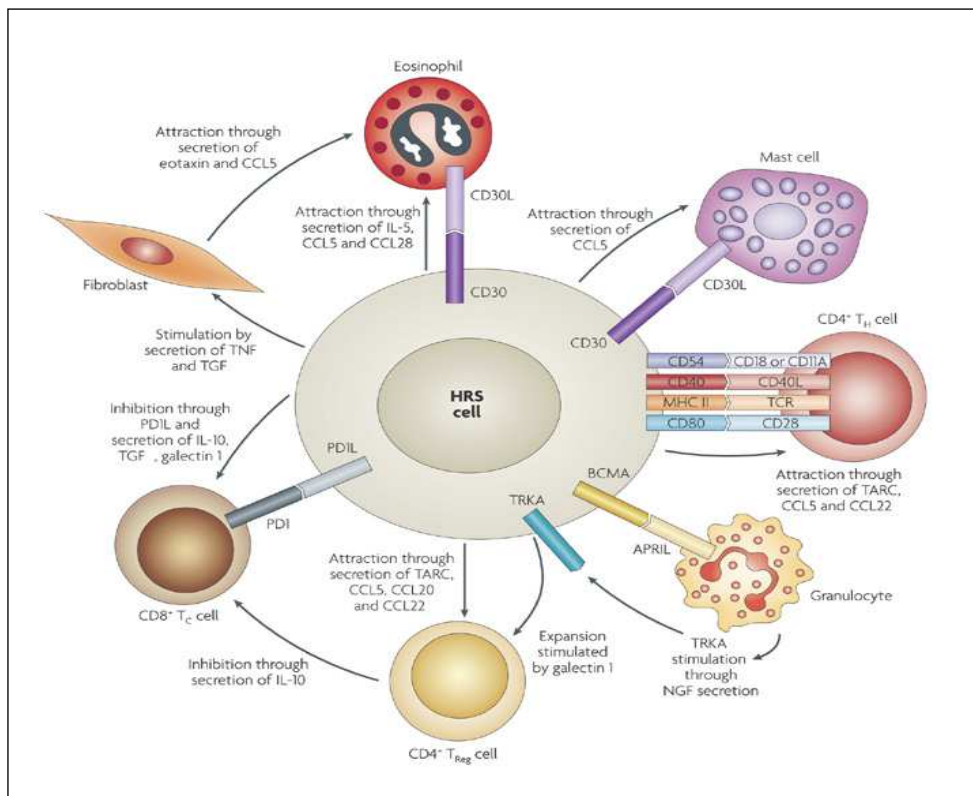


Figura 12. Esquema de les interaccions cel·lulars de les cèl·lules de HRS amb el microambient (Küppers, Nature Reviews 2008)

Com s'ha dit anteriorment el virus de l'Epstein Barr també pot tenir un paper important en la patogènia del LH. Aquelles persones que han patit una mononucleosis infecciosa tenen un risc més elevat de patir un Limfoma de Hodgkin VEB+; durant aquesta infecció les cèl·lules de H/RS perden les seves característiques clau.[111;112]

Finalment pertant podem dir que les cèl·lules característiques d'aquesta patologia, les cèl·lules de H/RS atrauen diferents cèl·lules en el seu microambient tumoral que afavoreix la seva supervivència i les ajuden a evadir l'atac de cèl·lules T citotòxiques i de cèl·lules NK.

1.7 Història i Concepte dels microRNAs

A finals dels anys 80, un grup de científics liderats per R. Jorgensen treballava per l'obtenció de petúnies més acolorides mitjançant la introducció en la planta d'una copia extra del gen d'un enzim que participava en la producció de pigments d'antocianina, el qual atorgava el color porpra a aquestes flors. Els resultats van ser sorprenents ja que s'esperaven obtenir petúnies transgèniques molt més acolorides i per contra van obtenir flors blanques que per tant no tenien pigments d'antocianines.[113] Al mateix temps, científics de la Universitat de Roma que treballaven amb el fong *Neurospora crassa* intentaven sobreexpressar un pigment taronja que sintetitza el fong també introduint copies extra del gen, i els resultats obtinguts van ser els mateixos que en el cas anterior. Per tant es va demostrar que aquest fenomen, denominat fins ara per Jorgensen "co-supressió" i que passaria a dir-se "*quelling*", no era únic de les petúnies. Més tard es va veure que aquest fet succeïa a nivell post-transcripcional i llavors es va denominar "Silenciament de gens post-transcripcional" o PTGS. Al 1995 un estudiant de la Universitat de Cornell que treballava introduint oligonucleòtids antisentit a *Caenorhabditis elegans* (nemàtode) per inhibir l'expressió d'alguns gens involucrats en el desenvolupament, va veure que era molt més eficient la supressió del gen i més duradora si introduïa l'oligonucleòtid *forward* i *reverse*. Malgrat aquests resultats no va poder explicar aquest fenomen. Va ser al 1998 quan el grup de C. Mello de la Universitat de Carnegie, va demostrar que el PTGS era produït per la formació de RNA de doble cadena en el nemàtode.[114] A. Fire que també treballava en aquest grup va denominar RNA d'interferència (RNAi) a la molècula que provocava aquest comportament. Actualment es sap que el fenomen de PTGS i *quelling* que es produeix en plantes i fongs i el fenomen de RNAi que es produeix en animals són el mateix. També es presenta en llevats i insectes, però no hi ha constància de la seva existència en bacteries. L'RNA d'interferència és un mecanisme molt poderós pel qual es regula l'expressió gènica en el citoplasma mitjançant la repressió de la traducció dels RNA missatgers (RNAm), la seva degradació i es limita la invasió de gens estranys provinents de virus i de transposons. Els microRNAs van ser descoberts per Victor Ambros l'any 1993, però no se'ls hi va donar nom fins l'any 2001 quan es van publicar tres articles a la revista *Science* descrivint la seva funció. L'any 2008 mitjançant anàlisis computacionals es va suggerir la presència d'uns 50.000 microRNAs diferents al genoma humà capaços de regular milers de gens.

1.7.1 Estructura dels microRNAs

Els microRNAs són molècules petites d'uns 22 nucleòtids que es troben codificats en gens, es transcriuen del DNA però no codifiquen per proteïnes i actuen com a reguladors de l'expressió gènica unint-se a l'RNA missatger i inhibint la seva traducció a proteïna.

Els microRNAs van ser descoberts inicialment l'any 1993 i van veure que el gen *lin-4* que actua en el control del desenvolupament de *C.elegans* no codificava per una proteïna sinó que produïa 2 microRNAs petits un de 22 nucleòtids i l'altre de 61, aquest últim van veure que podia adoptar una conformació en *stem loop*. Van observar com aquests RNAs tenien zones antisense complementàries a múltiples llocs de la zona UTR 3' del gen *lin-14*.(Figura 13)[115] El grup de Ruvkun el mateix any van veure que encara que els nivells d'RNA missatger de *lin-14* fossin els mateixos la quantitat de proteïna es veia disminuïda.[116] Després del descobriment de *lin-4* a *C.elegans* s'han descobert altres microRNAs en altres espècies els quals presenten un patró d'expressió depenent del tipus cel·lular i del teixit.[117]

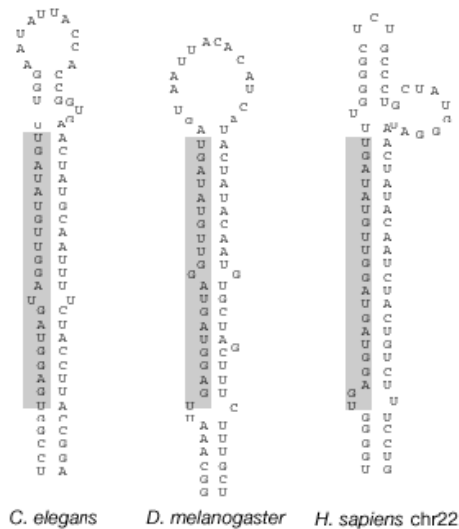


Figura 13. Estructura del let-7. En aquesta figura podem observar l'estructura de let-7 abans de ser processat. En gris veiem la seqüència madura del let-7 que es troba perfectament conservada en les tres espècies mentre que la resta de la seqüència que anomenem del microRNA encara immadur varia en cada una d'elles.

L'any 2000 els grups de Reinhart i Slack van trobar un altre microRNA el let-7a a *C.elegans* que codificava per un RNA regulador d'uns 22 nucleòtids i que actuava promovent el desenvolupament de la larva fins a la forma adulta.[118;119] Fins el moment s'han registrat un total de 8619 entrades de microRNAs. (Figura 14)

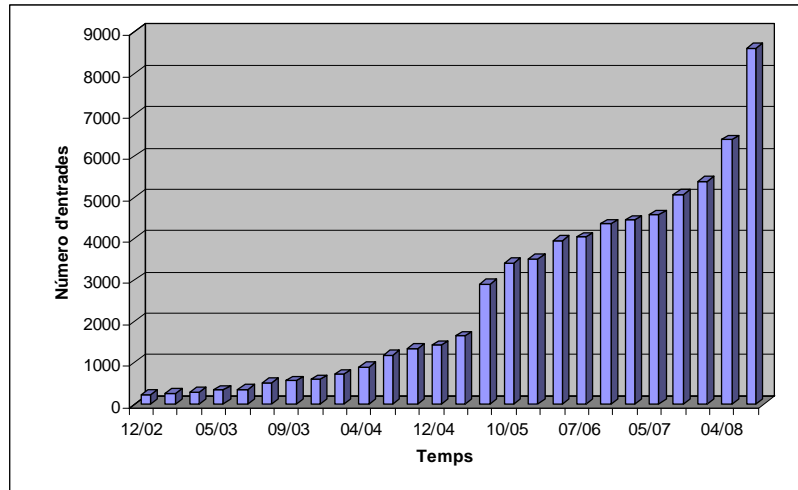


Figura 14. Evolució del número de microRNAs descoberts desde l'any 2002 fins a finals del 2008, segons la base de dades de miRBase.

1.7.2 Biogènesis dels microRNAs

Els microRNAs són molècules de 22 nucleòtids de cadena senzilla, que no codifiquen per proteïna, aquestes molècules poden regular l'expressió dels seus gens diana unint-se de forma complementària a l'RNA missatger. En mamífers s'han trobat cents de microRNAs alguns dels quals són específics de teixit o específics segons l'estadi de desenvolupament. Alguns microRNAs són reguladors importants del desenvolupament tant en animals com en plantes.[120;121]

La majoria dels microRNAs caracteritzats es troben en regions intròniques de gens que codifiquen per proteïnes (90%) mentre que també els podem trobar en regions intergèniques o exòniques. Els transcrits primaris (pri-microRNA) són generats per la polimerasa 2. Els pri-microRNAs poseeixen un grup 7- metil-guanosina a la regió 5' que està poliadenilada.[122] Aquest pri-microRNA forma una estructura de *hairpin stem-loop* la qual és tallada al nucli per una ribonucleasa anomenada Drosha; aquesta talla de forma asimètrica les dues cadenes per llocs propers a la base de l'estructura primària en forma de *stem loop*, de forma que el producte resultant dona lloc a un pre-microRNA d'uns 60-70 nucleòtids, que serà processat en els passos següents.

Aquest pre-microRNA serà exportat al citoplasma mitjançant la Exportin 5, un cop al citoplasma aquesta molècula de 70 nucleòtids serà tallada per la endonucleasa RNasa III anomenada *Dicer*. En aquest punt tenim una molècula de doble cadena anomenada microRNA

duplex, del qual se separaran les dues cadenes i una d'elles donarà lloc al microRNA madur d'uns 20-25 nucleòtids que s'incorpora al complexe ribonucleoproteic conegut com a *RNA-induced silencing complex* (RISC).[123;124]

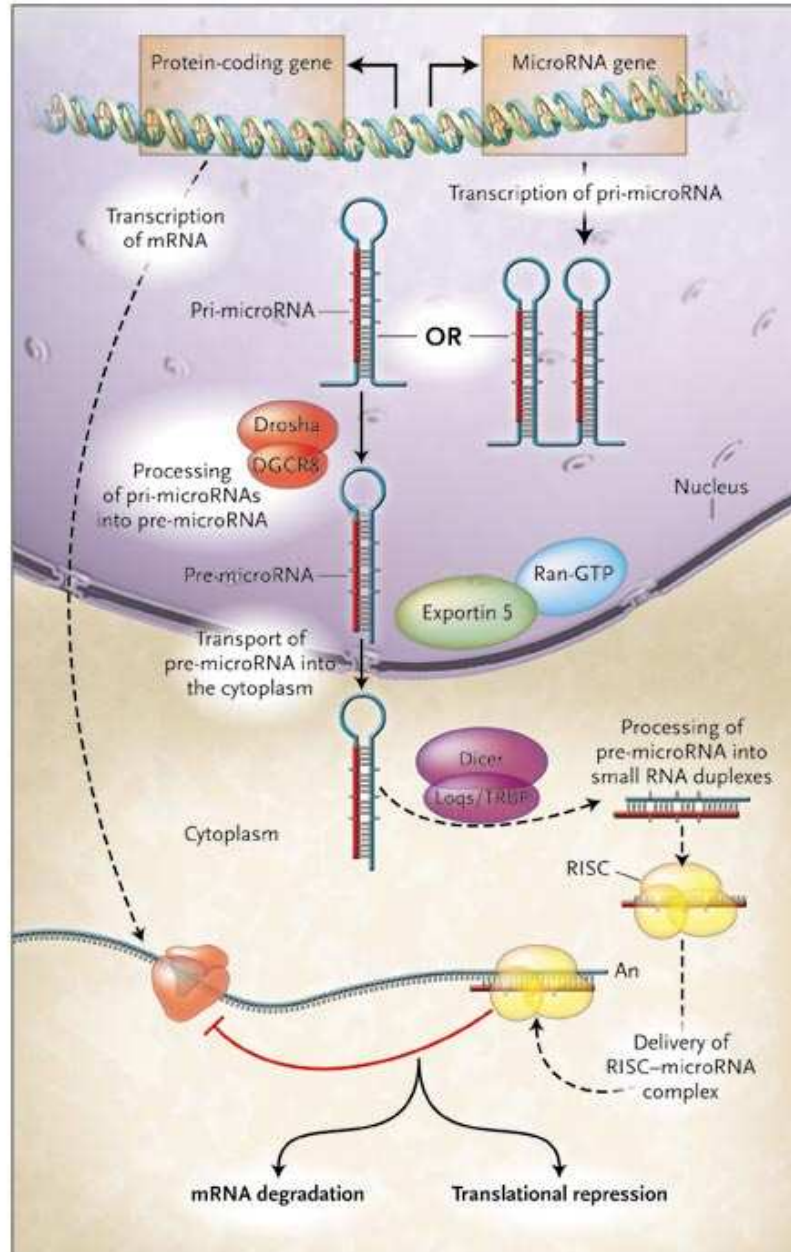


Figura 15. Esquema de la biogènesi dels microRNAs des del nucli de la cèl·lula fins que el microRNA reconeix l'RNA missatger diana. (Chen CZ, NEJM 2008)

Aquest complex confereix d'una maquinària catalítica responsable de la degradació de l'RNA missatger diana i de la inhibició de la traducció, mentre que l'altre cadena és degradada.

La cadena que no és degradada es coneix com la cadena “guia” que és seleccionada per la proteïna Argonauta en funció de l'estabilitat de l'extrem 5'. L'altre cadena, la cadena sentit, és degradada pel complexe RISC. (Figura 15)

Els microRNAs s'aparellen amb la seqüència de bases amb la molècula d'RNA missatger complementària; i en animals la majoria dels casos indueixen la inhibició de la traducció d'aquest RNA missatger.

Encara no queda clar com el complexe RISC localitza els RNA missatgers complementaris a l'interior de la cèl·lula.

Les proteïnes Argonauta es troben localitzades a les regions específiques del citoplasma anomenades *P-bodies* (cossos P, cossos citoplasmàtics o cossos GW), els qual són regions amb altes tasses de degradació d'RNA missatger.[125]

1.7.3 Mecanismes d'acció dels microRNAs

Els mecanismes pels quals els microRNAs regulen l'expressió gènica són encara en un intens debat.[125;126] Hi ha diversos treballs publicats que indiquen que els microRNAs en cèl·lules animals reprimixen l'expressió gènica de 4 maneres diferents:

- * degradació de la proteïna durant la traducció
- * inhibició de la elongació de la traducció
- * terminació prematura de la traducció (disgregació dels ribosomes)
- * inhibició de la iniciació de la traducció

A més a més els microRNAs en animals poden induir la degradació dels mRNA diana encara que la complementarietat no sigui total. Tot i que els mecanismes de degradació solen ser diferents, els microRNAs indueixen la degradació dels mRNA diana mitjançant l'eliminació de l'extrem 5' i de la cua poli-A de 3'. [127]

S'han proposat diferents mecanismes d'acció i les diferències observades es deuen a deficiències en els experiments realitzats, en alguns casos originats per la utilització de models erronis en els estudis de regulació de la traducció.[128]

Estudis recents han detectat que en determinades condicions, els microRNAs poden activar la síntesi protèica, és el cas del microRNA miR-369-3 que s'ha vist associat de forma directa als elements AREs, regions riques en AU per tal d'activar la traducció i als microRNPs (micro-ribonucleoproteïnes) que tenen un paper molt versàtil en resposta al cicle cel·lular. Van proposar

que la regulació de la traducció per part dels microRNPs oscil·lava entre la repressió i l'activació durant el cicle cel·lular.[128;129]

1.7.4 Característiques generals dels microRNAs:

- S'associen a la regió 3' UTR dels RNA missatger diana.
- Es necessiten molts llocs d'unió per activar la resposta dels microRNAs (la unió d'un de sol no produeix efectes significatius en la majoria dels casos)
- Un RNA missatger està regulat per diferents microRNAs
- Un únic microRNA pot controlar l'activitat de cents de RNAs missatgers diferents[130]

En un estudi publicat al Nature del 2008 del grup de Selbach i els seus col·laboradors, utilitzen una tècnica d'espectrometria de masses SILAC (Stable Isotope Labelling with Aminoacids in Cell cultura) com a marcadors estable dels aminoàcids amb isòtops pesats en cultiu cel·lular per detectar les proteïnes afectades de reduir o augmentar els nivells d'un microRNA concret. Aquests estudis mostren com un únic microRNA pot reduir els nivells de gran quantitat de proteïnes mitjançant el bloqueig de la traducció. [131;132]

L'efecte dels microRNAs sobre les proteïnes pot ser útil de forma que els nivells d'expressió de la proteïna no variïn gaire o pot ser més potent de manera que els microRNAs intervenen en la regulació de l'expressió gènica de forma complexa i interconnectada.

- L'especificitat i la funció dels microRNAs està determinada per la seqüència llavor, aquesta seqüència consta de 2 a 7 nucleòtids i es troba a la regió 5' UTR dels microRNAs madurs.
- Aquests nucleòtids han de ser obligatoriament complementaris al RNA missatger diana.[133]
- Un microRNA pot ser funcional encara que no hagi estat sintetitzat al nucli: un microRNA introduït a la cèl·lula per transfecció pot inhibir eficaçment la síntesis de proteïnes.

Hi ha diverses teories que discuteixen sobre el grau de complementaritat que ha d'existir entre el microRNA i l'RNA missatger per tal que es porti a terme la inhibició de la traducció. Segons

Doench i Sharp, l'habilitat dels microRNAs per suprimir la traducció depèn en gran part de l'energia lliure d'unió dels 8 primers nucleòtids dels extrems 5'. [134] Segons aquesta teoria, un sol microRNA pot inhibir un gran número de gens.

Quan un microRNA guia l'RNA missatger cap a la degradació el tall es produeix exactament al mateix lloc en què els siRNA actuarien, entre els nucleòtids 10 i 11 del microRNA. [135]

Després de la degradació de l'RNA missatger, el microRNA roman intacte i pot guiar fins al reconeixement i la destrucció dels RNA missatgers addicionals. En general en aquest mecanisme d'acció la complementarietat es pot donar tant en regions codificants com en regions 3'UTR.

S'ha descobert algun cas on s'ha vist que el microRNA s'uneix a la regió 5'UTR no codificant. En aquest cas el microRNA té funció activadora de l'expressió gènica, encara que no està clar si es tracta d'un mecanisme únic o si representa un mecanisme desconegut encara dels microRNAs. [136]

A continuació podem veure una figura on es mostren totes les possibles localitzacions dels microRNAs en els transcrits d'RNA. Desde regions intròniques, intergèniques com exòniques (Figura 16).

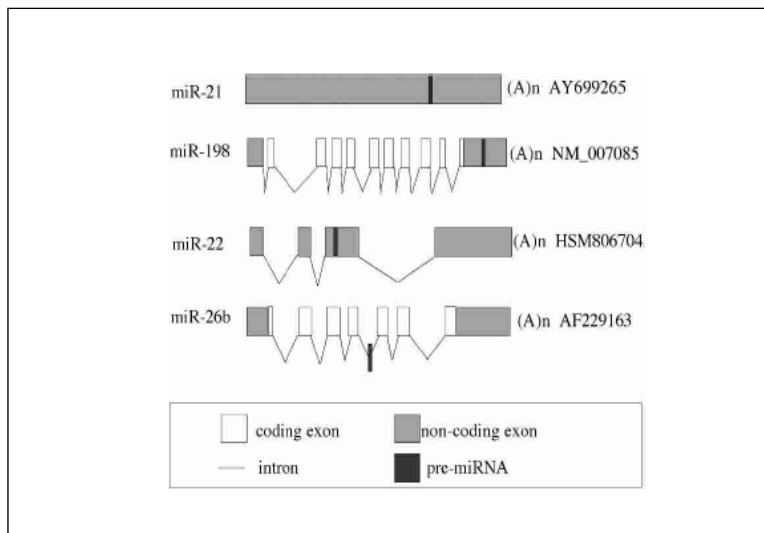


Figura 16. Esquema de la localització dels microRNAs en els transcrits d'RNA. (Cai X et al. RNA 2004)

1.7.5 MicroRNAs i càncer

Des de que es van descobrir els microRNAs ja hi ha diversos estudis que avalen el paper d'aquests en processos tumorals. Se sap que els microRNAs es troben de forma freqüent en regions genòmiques associades al càncer, en regions que s'anomenen fràgils.[137] Els microRNAs tant poden actuar com a oncogens com a gens supressors de tumors, com és el cas del cluster miR-17-92 que en unes condicions pot tenir una funció oncogènica mentre que amb unes altres condicions podria tenir la funció inversa.[138;139]

Des de fa pocs anys s'han establert patrons d'expressió de microRNAs per relacionar-los d'una forma directa amb el diagnòstic, l'estadi, la progressió de la malaltia, el pronòstic o la resposta al tractament. Aquests patrons s'han utilitzat per identificar aquells que són diana d'activació de vies oncogèniques o aquells que estan involucrats amb gens que codifiquen per proteïnes relacionades amb el càncer.[138;140]

L'expressió aberrant d'aquests microRNAs està associada a molts tipus de càncer, tant en tumors sòlids com en hematològics. Encara que el mecanisme pel qual es veu alterada la seva funció i els mecanismes de regulació d'aquests no es coneixen del tot. Tot i que recentment s'ha suggerit que existeix un mecanisme pel qual alguns microRNAs queden segregats. Aquest mecanisme es coneix amb el nom de "*mimicry*" es tracta de gens que no codifiquen per proteïnes i que tenen uns motius d'unió complementaris a algun microRNA, aquest fet fa que el microRNA quedi unit i no pugui actuar inhibint la traducció a proteïna o degradant directament l'RNA missatger diana en plantes.[141] A la figura següent, Figura 17, podem observar un esquema de com actuaria aquest mecanisme.

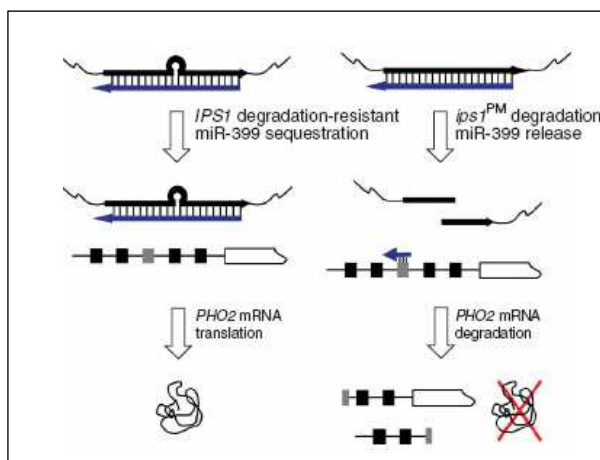


Figura 17. Model d'inhibició de la funció dels microRNAs anomenat "*mimicry*" (José Manuel Franco-Zorrilla, Nat Genet. 2007)

1.7.6 MicroRNAs en hematologia

El procés que anomenem hematopoiesis està sustingut per una continua diferenciació de les *stem cell* hematopoiètiques multipotents cap a cèl·lules progenitores hematopoiètiques donant lloc a les línies cel·lulars sanguínies madures. La regulació de la hematopoiesis consisteix en 2 esglaons, l'autorenovació de les *stem cell* hematopoiètiques i la diferenciació de les *stem cell* hematopoiètiques i les cèl·lules progenitores hematopoiètiques. La diferenciació de les *stem cell* hematopoiètiques dóna lloc a la formació de cèl·lules multipotents que han perdut la capacitat d'autorenovació però encara tenen capacitat de diferenciació cap a diferents tipus cel·lulars.

Les cèl·lules progenitores hematopoiètiques (CPH) generen progenitors linfoïdes comuns capaços de formar limfòcits B i T i progenitors mieloides comuns que seran els encarregats de donar lloc als eritròcits, megacariòcits, granulòcits i monòcits.

1.7.6.1 Paper dels microRNAs en hematopoiesis

El primer estudi que es va realitzar que descrivia el paper d'alguns microRNAs en la diferenciació hematopoiètica va ser l'any 2004. En aquest estudi van veure com els microRNAs: miR-142, miR-181 i miR-223 estaven significativament sobreexpressats en cèl·lules hematopoiètiques i que la seva expressió estava regulada durant la hematopoiesis precoç. El microRNA miR-181 es trobava preferencialment expressat en cèl·lules B linfoïdes de medul·la òssea de ratolins i la seva expressió ectòpica en *stem cells* hematopoiètiques donava lloc a un increment de la fracció de cèl·lules de la línia B tant en assajos de diferenciació de cultius de teixit com en ratolins adults. miR-142 es va veure sobreexpressat en la línia B i la línia mieloide; mentre que miR-181 ho feia de forma restringida a la línia mieloide. Aquests resultats mostraven com els microRNAs poden jugar un paper important en la diferenciació cel·lular durant l'hematopoiesis.[142]

Un altre estudi de Felli i els seus col·laboradors l'any següent van veure com els nivells de 2 microRNAs: miR-221 i miR-222 es trobaven sobreexpressats en cèl·lules progenitores CD34⁺ mentre que els nivells d'aquests dos microRNAs disminuïen de forma gradual durant la diferenciació i la maduració. Mitjançant un anàlisi bioinformàtic de cerca de targets van veure que tenien com a possible diana el gen *Kit* i el van validar mitjançant la tècnica de la luciferasa;

a més a més els nivells de l'RNA missatger es correlacionaven de forma inversa amb els nivells dels microRNAs. Van proposar que aquests 2 microRNAs debiliten la proliferació i l'acceleració de la diferenciació de les cèl·lules eritropoietiques juntament amb la regulació del gen Kit. Nivells baixos d'aquests microRNAs durant el creixement eritropoietic permeten la traducció de la proteïna Kit.[143]

La diferenciació dels granulòcits humans està controlada pel circuit regulatori on està implicat el miR-223 i dos factors de transcripció: NFI-A i C/EBPalpha, aquests dos factors de transcripció competeixen pels llocs d'unió de la seqüència promotora del gen MIRN223 (miR-223). La unió de NFI-A inhibeix l'expressió del microRNA mentre que la unió de C/EBPalpha el sobreexpressa. La competència amb C/EBPalpha i la diferenciació granulocítica està afavorida per un feed-back negatiu en el qual miR-223 reprimeix la traducció de NFI-A.[144]

En un altre estudi van analitzar el perfil d'expressió d'alguns microRNAs en cèl·lules progenitores hematopoietiques CD34+, entre ells van veure com miR-10a, miR-126, miR-106, miR-10b, miR-17 i miR-20 es trobaven infraexpressats, pertant gens involucrats en la diferenciació megacariocítica quedarien desbloquejats.[145]

Recentment el grup de Georgantas l'any 2007 van identificar un grup de 33 microRNAs l'expressió dels quals era comuna entre la medul·la òssea i la sang perifèrica en stem cells progenitores hematopoietiques entre ells: miR-155, miR-181a, miR-221, miR-222, miR-223, miR-146 i miR-16-1. Fent un anàlisi bioinformàtic dels gens diana sobre els quals actuarien aquests microRNAs van veure que miR-146, miR-155 i miR-181a podien actuar prevenint la diferenciació de les cèl·lules progenitores prematures cap a estadis més madurs, mentre que miR-16-1, miR-103 i miR-107 podien actuar bloquejant la diferenciació cap a estadis més tardans en el desenvolupament. miR-221, miR-222 i miR-223 es van proposar com a controladors del desenvolupament hematopoietic en estadis finals. A més a més van veure que miR-155 controla la diferenciació mieloide i eritrocitària.[146]

A part d'estudiar el paper que juguen els microRNAs en la hematopoesis també s'ha estudiat, en ratolí, el paper de Dicer. Mitjançant la seva deleció al timus en dos moments diferents: en estadis més prematurs de desenvolupament de les cèl·lules T i en estadis més avançats. Sorprenentment en els dos estudis realitzats aquesta deficiència pot no inhibir la diferenciació de les cèl·lules T, però pot bloquejar el desenvolupament de CD8+ perifèric i reduir el nombre de cèl·lules CD4+, que quan són estimulades augmenta l'apoptosis i disminueix la proliferació.

Aquests estudis avalen la hipòtesis de que la vida mitja dels microRNAs en aquests experiments és més llarga del que cabria esperar i que els microRNAs poden ser importants en el desenvolupament de les cèl·lules T. [147;148] Encara que Dicer és una molècula important en el desenvolupament embrionari, el paper dels microRNAs per determinar estadis més avançats del desenvolupament de limfòcits, queda poc clar. [149;150]

1.7.6.2 Paper dels microRNAs en leucèmies

S'han fet diversos estudis de microRNAs en leucèmies. L'any 2006 Landais i els seus col·laboradors van concloure que la sobreexpressió de miR-106a, miR-20b, miR-19b-2 i miR-92-2 té un potencial oncogènic important i van veure per primera vegada alguns gens diana d'aquests microRNAs implicats en leucèmies de cèl·lules T.[151]

També relacionat amb leucèmia de cèl·lules T, s'ha vist que miR-93 i miR-130b actuen a la regió 3' UTR del gen TP53INP1 (supresor de tumors), també van veure com augmentant l'expressió d'aquest gen incrementava l'apoptosis i pertant aquest estava implicat en la proliferació i la supervivència.[152]

En un altre estudi van identificar alguns microRNAs diferencialment expressats entre cèl·lules de LLC i CD5+. Mitjançant arrays d'expressió de microRNAs van identificar 2 grups de microRNAs relacionats amb la presència de mutacions a la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines.[153]

També en cèl·lules de LLC s'ha vist que hi ha una reducció global dels nivells d'expressió de microRNAs, alguns com miR-181a, let-7a i miR-30d s'han vist constitutivament infraexpressats i sorprenentment els RNA missatgers diana d'aquests es troben localitzats en una petita regió del cromosoma 1, que es troba freqüentment alterada en càncers.[154]

Els microRNAs miR-143 i miR-145 són dos marcadors biològics que permeten diferenciar entre cèl·lules B malignes i cèl·lules B normals, aquests contribueixen a la carcinogènesis ja que inhibeixen el creixement cel·lular actuant sobre ERK5.[155]

Els microRNAs miR-15 i miR-16 es troben localitzats a 13q14, una regió freqüentment delecionada en més de la meitat dels casos de LLC; l'expressió d'aquests microRNAs mostra que es troben delecionats o infraexpressats en la majoria dels casos i a més a més s'ha vist que aquests microRNAs actuen sobre Bcl2 induint l'apoptosis in vitro, cosa que fa pensar que juguen un paper important com a gens supressors de tumors.[156;157]

Pel que fa a la leucèmia mieloide aguda (LMA) respecte la leucèmia linfoblàstica (LAL), es van trobar dos grups de microRNAs que ens permetien classificar aquests dos grups miR-128a, miR-128b, miR-151*, miR-5, miR-130b i miR-210 es trobaven sobreexpressats en LAL respecte LMA mentre que un altre grup de 21 microRNAs ho feien en LMA respecte LAL.[158]

També s'ha vist que en ratolins transgènics la sobreexpressió de miR-155 provoca una malaltia linfoproliferativa semblant a la leucèmia aguda linfoblàstica en humans, aquest fet dóna suport a la hipòtesis que la sobreexpressió d'aquest microRNA està implicat directament en l'inici i la progressió de la malaltia.[159]

El Juny del 2008 el grup de Bueno MJ i els seus col·laboradors, van veure com una regió cromosòmica fràgil que es perd en moltes malalties hematològiques codifica per un 12% de tots els microRNAs, incloent el miR-203. Aquest microRNA està a més a més hipermetilat en molts tumors hematopoètics, incloent la LMC i alguna LAL. miR-203 actua sobre el gen ABL1, que es troba activat en malalties hematològiques. La re-expressió d'aquest microRNA redueix els nivells de proteïna ABL1 i BCR-ABL1 (proteïna de fusió) i inhibeix la proliferació cel·lular. Aquest microRNA actua com a supressor tumoral i la re-expressió d'aquest pot tenir beneficis terapèutics en algunes malalties hematopoètiques.[160] L'expressió ectòpica de miR-223 és suficient per reprogramar la diferenciació mieloide programada en diferents subtipus de leucèmia.[161]

També l'any 2008 un grup anglès van intentar relacionar l'expressió de microRNAs amb els cariotips diferents en la LMA, van veure que efectivament existeix un potencial important de classificació dels microRNAs i que pertant aquests estan jugant un paper important en la etiologia de la leucèmia.[162]

1.7.6.3 Paper dels microRNAs en limfomes

En el cas dels limfomes s'ha estudiat el cluster miR-17-92 i el seu paper en la limfomagènesis. Inomata i els seus col·laboradors van transfectar el cluster en dos línies cel·lulars, genèticament diferents de limfoma de cèl·lules B. Les cèl·lules Raji transfectades amb el cluster mostraven un augment de l'expressió de Bcl2, mentre que les cèl·lules SUDHL4 transfectades mostraven un augment del creixement, facilitant la progressió del cicle cel·lular a G1 i una disminució de l'expressió de CDKN1A. Això feia pensar que el cluster miR-17-92 té un paper important en la

limfomagènesis i que tenia diferents dianes d'acció en els diferents subtipus de limfomes de cèl·lules B.[163]

Quatre microRNAs miR-210, miR-155, miR-106a i miR-17-5p es van trobar significativament sobreexpressats en limfoma difús de cèl·lules B grans (LDCBG) respecte teixit normal mentre que un grup d'onze microRNAs es trobaven infraexpressats. [164]

L'expressió de microRNAs s'ha vist com a eina d'utilitat a l'hora de fer un diagnòstic. Comparant els nivells de 3 microRNAs (miR-155, miR-210 i miR-21) en sèrum de pacients de LDCBG i comparant-los amb controls sans; van veure que els nivells d'aquests eren molt més elevats en pacients i que a més a més l'expressió de miR-21 estava associada a la supervivència lliure de malaltia ($p=0.05$).[165]

Pel que fa al Limfoma de Hodgkin, Van den Berg i els seus col·laboradors van observar que BIC estava altament expressat en el 90% dels casos de Limfoma de Hodgkin i a arrel d'això el grup de Metzler van proposar una regió filogenèticament conservada de 138 nucleòtids codificada dins el gen BIC, que donava lloc a la seqüència precursora de miR-155.[166;167] A continuació van veure que ambdós transcrits: BIC i miR-155 es trobaven sobreexpressats en LDCBG i de forma similar es va veure en el Limfoma de Hodgkin i el limfoma mediastínic primari de cèl·lules B.[168-170]

Una amplificació genòmica comú als Linfomes de cèl·lules B és la regió 13q31, aquesta regió conté la seqüència precursora del cluster miR-17-92, que inclou les seqüències de 7 microRNA madurs. La sobreexpressió del cluster activa l'expressió de c-myc i accelera el desenvolupament tumoral en models de ratolí de Limfoma de cèl·lules B, activant així el procés de limfomagènesis. Aquesta activació sembla que no és individual sinó que té un efecte cooperatiu mitjançant un mecanisme pel qual c-myc és activat alhora per E2F1, un factor de transcripció proapoptòtic.[139]

A continuació podem veure una taula dels estudis que s'han fet en microRNAs en el camp de l'hematologia, amb els microRNAs que surten diferencialment expressats i la patologia en la que s'han observat aquests canvis d'expressió. (Taula 7)

Patologia	microRNAs	Via d'actuació	Bibliografia	Dianes validades
Limfoma cèl·lules B	miR-17 i miR-20a	Sobreexpressats	Inomata et al. Blood. 2008	-
Limfoma difús de cèl·lules B (DLBCL)	miR-210, miR-155, miR-106a, miR-17-5p	Sobreexpressats	Roehle et al. Br J Haematol. 2008	-
	miR-150, miR-145, miR-328, miR-139, miR-99a, miR-10a, miR-95, miR-149, miR-320, miR-151, let-7e	Infraexpressats	Roehle et al. Br J Haematol. 2008	-
(DLBCL) B cell malignancies	miR-143, miR-145	infraexpressats	Akao et al. Cancer Sci. 2007	-
Limfoma difús de cèl·lules B (DLBCL)	miR-155, miR-210 and miR-21	Sobreexpressats en sèrum	Lawrie et al. Br J Haematol. 2008	-
Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas	miR-155	Altament expressat	Kluiver et al. J Pathol. 2005	-
Human B-cell lymphomas	cluster mir-17-92	sobreexpressats	He et al. Nature 2005	E2F1
Limfoma maligne	miR-17-5p, miR-17-3p, miR-19a, miR-19b, miR-20 and miR-92-1	Sobreexpressats en línies cel·lular amb amplificació 13q31	Tagawa & Seto, Leukemia 2005	-
MYC-rearranged lymphoma	miR-17-3p i miR-17-5p	Sobreexpressats	Tagawa et al. Cancer Sci. 2007	TβRII
Limfoma del mantell	miR-16	Actua regulant el cicle cel·lular	Chen et al. Blood. 2008	CCND1
Mieloma múltiple	cluster miR-17-92 i miR-21	Bloquejen l'apoptosis	Pichiorri et al. PNAS. 2008	
	miR-106b-25, miR-181a, and miR-32	Mantenen nivells baixos de P53	Pichiorri et al. PNAS. 2008	PCAF
	miR-335, miR-342, and miR-561	Sobreexpressats	Ronchetti et al. BMC Med Genomics. 2008	-
LAL	miR-128a, miR-128b, miR-151*, miR-5, miR-130b, and miR-210	Sobreexpressats en LAL vs LMA	Mi et al. PNAS. 2008	-
	let-7b, miR-223, let-7e, miR-125a, miR-130a, miR-221, miR-222, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-27a, miR-27b, let-7a, let-7c, miR-199b, miR-26a, miR-335, miR-21, miR-22, miR-424, and miR-451	Infraexpressats en LAL vs LMA	Mi et al. PNAS. 2008	-
LAL	miR-124a	Infraexpressat en LAL per hipermetilació	Agirre et al. Cancer Res. 2009	CDK6
LAL	miR-155	Sobreexpressió en ratolins transgènics induïx progressió malaltia	Costinean et al. PNAS. 2006	-
LAL	miR-708 i miR-196b	Es correlacionen amb diferents subtipus de LAL	Schotte et al. Leukemia 2008	-
LAL	miR-203	Sobreexpressió inhibeix la proliferació cel·lular	Bueno et al. Cancer Cell 2008	ABL1 i BCR-ABL
Limfoma fol·licular	miR-9, miR-301, miR-213, miR-9*, miR-330, miR-106a, miR-338, miR-155, hsa-miR-210	Sobreexpressats vs DLBCL	Roehle et al. Br J Haematol. 2008	-
	miR-320, hsa-miR-149, hsa-miR-139	Infraexpressats vs DLBCL	Roehle et al. Br J Haematol. 2008	-

Limfoma de Hodgkin	miR-9 i let-7a	Sobreexpressats	Nie et al. Am J Pathol. 2008	PRDM1/Blimp-1
Limfoma de Hodgkin	miR-135a	Realionat amb la supervivència lliure de malaltia	Navarro et al. Blood 2009	JAK2
Limfoma de Burkitt	let-7a	Sobreexpressió de let-7 ^a fa disminuir mRNA de MYC i nivells proteics	Sampson et al. Cancer Res. 2007	MYC
Limfoma de Burkitt	let-7c i miR-34b	Infraexpressats vs controls	Leucci et al. Pathol. 2008	-
Limfoma de Burkitt	miR-127	Sobreexpressat en LB EBV positiu vs negatiu	Leucci et al. Int J Cancer 2009	BLIMP1, XBP1
Limfoma de Burkitt	miR-155	Sobreexpressat	Metzler et al. Genes Chromosomes Cancer 2004	-
Limfoma de Burkitt	cluster mir-17-92	Sobreexpressat	Woods et al. J Biol Chem. 2007	E2F1
Limfoma de Burkitt	miR-26a	Infraexpressat	Sander et al. Blood 2008	EZH2
Malalties limfoproliferatives	cluster miR-17-92	Ratolins amb sobreexpressió d'aquest microRNA desenvolupen malalties limfoproliferatives i autoimmunes		PTEN, proapoptot ic protein Bim

Taula 7. Patologies hematològiques on s'han observat diferències en l'expressió de microRNAs i algunes dianes ja validades (resultats obtinguts de la base de dades: <http://www.mir2disease.org/>)

1.7.7 Eines de predicció de dianes

Són diversos els mètodes que s'han utilitzat per la predicció de dianes de microRNAs. A continuació en detallarem algunes de les més comuns. Com ja hem comentat anteriorment un microRNA pot tenir diverses dianes d'acció, a les quals pot unir-se de forma no complementària i segons el grau d'unió de la seed sequence amb l'RNA missatger diana trobem moltíssimes interaccions possibles.

Hi ha diverses bases de dades de predicció de dianes de microRNAs disponibles a la xarxa i cada una d'elles utilitza un algoritme diferent. (Taulas 8 i 9) Una de les premisses més importants és la seqüència a la regió 5' del microRNA, aquesta seqüència ha de ser complementària a la de l'RNA missatger, a més a més també es té en compte l'anàlisi termodinàmic del complex microRNA-mRNA calculant l'energia lliure del complex. Normalment la regió 5' del microRNA és perfectament complementària a la seqüència de l'RNA missatger diana i generalment es troba conservada en microRNAs paràlegs; és el que s'anomena seqüència llavor (*seed sequence*).

Base de dades	URL	Característiques principals	Referències
miR Base	http://www.microna.sanger.ac.uk	Seqüències de microRNAs, anotacions i predicció computacional de dianes	Griffiths-Jones et al. 2004
Argonaute	http://www.rna.uni-heidelberg.de/apps/zmf/argonaute/interface	Informació detallada dels microRNAs i les seves dianes	Shahi et al. 2006
microRNAMap	http://www.microRNAMap.mbc.nctu.edu.tw	predicció computacional de microRNAs i dianes	Hsu et al. 2006
TarBase	http://www.diana.pcbi.upenn.edu/tarbase.html	Verificació experimental de les dianes de microRNAs	Sethupathy et al. 2006
Arabidopsis Small RNA Project Database	http://www.asrp.cgrb.oregonstate.edu/	Seqüències de microRNAs d' <i>Arabidopsis</i> i els gens diana corresponents	Gustafson et al. 2005

Taula 8. Bases de dades de microRNAs i les seves dianes

Nom del Software	URL	Organisme	Referències
TargetScan	http://genes.mit.edu/targetscan/	Vertebrats	Lewis et al. 2003
miRanda	http://www.microna.org/	Mosques, Vertebrats	Enright et al. 2003, John et al. 2004
DIANA-microT	http://diana.pcbi.upenn.edu/DIANA-microT/	Vertebrats	Kiriakidou et al. 2004
RNAhybrid	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/mahybrid/	Mosques	Rehmsmeier et al. 2004
GUUGle	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/guugle/	Mosques	Gerlach et al. 2006
PicTar	http://pictar.bio.nyu.edu/	Nemàtodes, mosques i vertebrats	Grun et al. 2005, Krek et al. 2005, Lall et al. 2006
MicroInspector	http://microRNA.imbb.forth.gr/microinspector/	-	Rusinov et al. 2005
MovingTargets		Mosques	Burgler et al. 2005
FastCompare	http://tavazoelab.princeton.edu/microRNAs/	Nemàtodes, mosques	Chan et al. 2005
miRU	http://bioinfo3.noble.org/microRNA/miRU.htm	Plantes	Zhang 2005
TargetBoost	http://demo1.interagon.com/demo/	Nemàtodes, mosques	Saetrom et al. 2006
Rna22	http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html	Nemàtodes, mosques i vertebrats	Miranda et al. 2006
miTarget	http://cbit.snu.ac.kr/~miTarget/	-	Kim et al. 2006

Taula 9. Algoritmes computacionals per la predicció de dianes de microRNAs

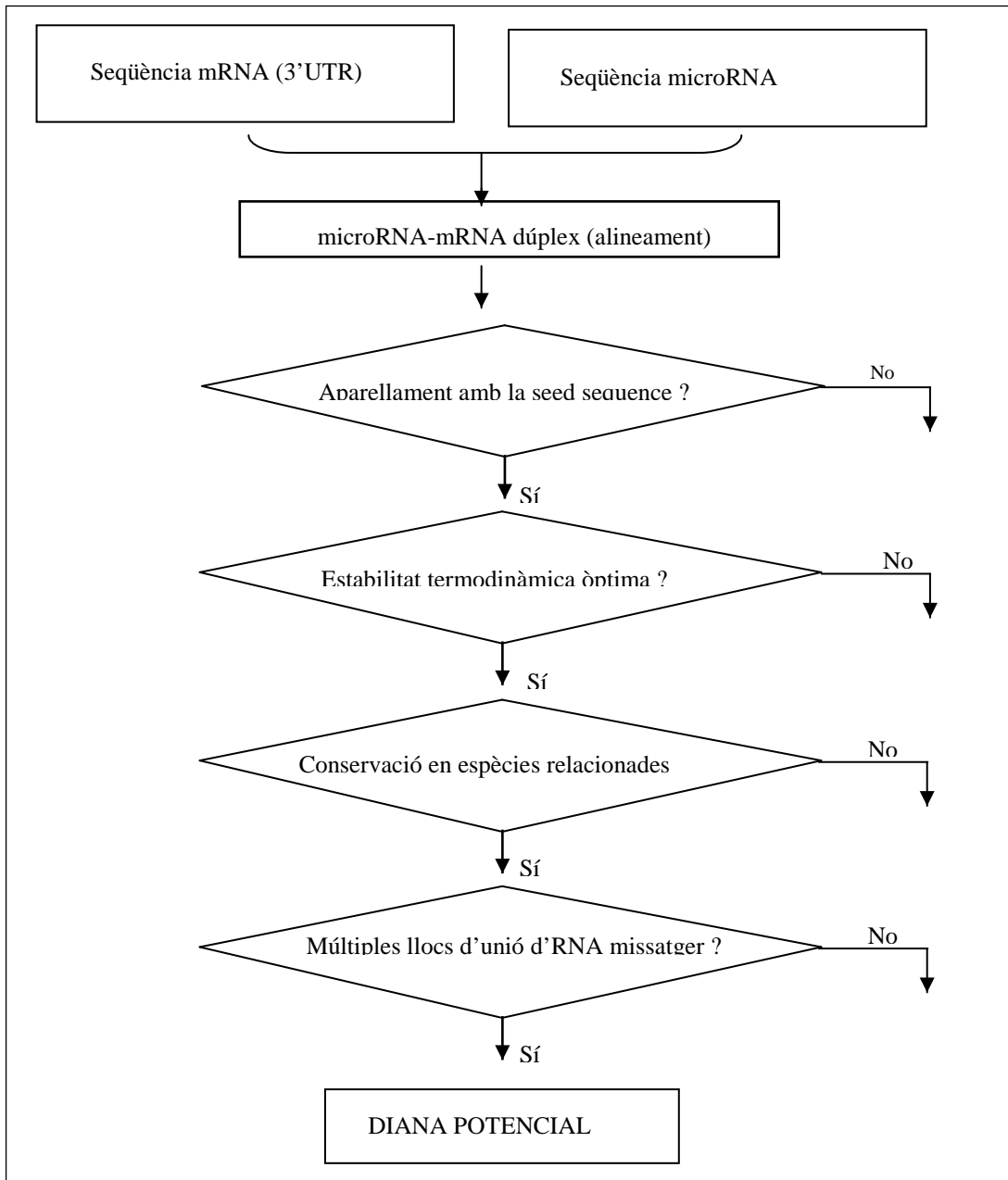


Figura 18. Esquema on es representen tots els passos a tenir en compte abans de trobar una diana potencial d'un microRNA (Watanabe et al. Gene 2006)

S'han fet anàlisis dels patrons de complementarietat en vertebrats [171], humans [172], mosques [173;174] i cucs [174-176] i s'ha vist que la regió 3' UTR dels microRNAs és menys important tot i que en algun estudi han vist que la forta unió de l'extrem 3' del microRNA pot compensar una unió més dèbil a l'extrem 5'. [173] També s'ha vist com a mínim un cas en què el gen diana està regulat independentment de la unió de la *seed sequence*. [177] Un desparellament a la regió central de la unió dona lloc a un bucle que pot ser significatiu per la regulació de l'expressió del gen diana. Tot això fa pensar que els mecanismes pels quals un

microRNA reconeix l'RNA missatger diana difereix entre espècies i segons les condicions cel·lulars i que pertant queda encara molta feina per fer.

En la majoria dels algoritmes de predicció de dianes les propietats termodinàmiques de formació del complex microRNA-mRNA es calcula segons l'energia lliure d'unió (ΔG) que és considerat com un aspecte important per la seva avaluació. Un software molt utilitzat per predir l'energia lliure i les estructures secundàries és el Vienna package.[178]

El grau de conservació de les seqüències és un altre criteri utilitzat com a filtre de predicció de dianes.(Figura 18) Alguns algoritmes identifiquen seqüències 3'UTR ortòlogues i després miren si aquesta seqüència està conservada en altres espècies. Generalment es fa un alineament de seqüències mitjançant BLAST o AVID.[179;180]

Un gran nombre d'estudis han vist com un microRNA s'uneix al seu mRNA diana i que un grup de microRNAs poden actuar conjuntament controlant l'expressió de les seves dianes.[181;181;182] A més algunes evidències experimentals indiquen que el grau de regulació de les dianes varia segons el nombre de microRNAs que s'hi uneixen. [183]

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

2-HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Hipòtesis

En les SMD es desconeix el mecanisme molecular que dóna lloc al curs evolutiu de la malaltia, se sap que en les fases inicials de la malaltia predomina el procés d'apoptosis cel·lular, mentre que en la transformació leucèmica predomina una autorenovació ilimitada. Es desconeix si aquesta transformació es deu a canvis a la cèl·lula mare o a canvis en l'expressió gènica de les cèl·lules madures que adquireixen característiques de cèl·lula mare.

Pel que fa al Limfoma de Hodgkin és una malaltia en que les cèl·lules neoplàsiques, les cèl·lules de Hodgkin y les de Reed-Sternberg, conformen menys de l'1 % de la cel·lularitat total. Ambdues cèl·lules deriven de cèl·lules B madures que en els centres germinals haurien d'haver entrat en apoptosis després d'adquirir mutacions poc beneficioses en els IgG, però que enlloc d'això conseqüen escapar de l'apoptosis malignitzant-se.

Recentment, els microRNAs han adquirit una gran importància en la biologia tumoral ja que s'ha observat que poden jugar un paper clau en l' iniciació i progressió tumoral, podent jugar un paper com oncogèns o gens supressors de tumors. Concretament en malalties hematooncològiques s'ha observat la importància dels microRNAs en la caracterització de leucèmies i linfoemes, on la desregulació dels quals dóna lloc a una desregulació de la supervivència i la diferenciació de les cèl·lules progenitores hematopoètiques, mitjançant la regulació de proteïnes claus en el control del cicle cel·lular o de l'apoptosis. A més, últimament s'ha donat molta importància als microRNAs com a eina de gran ajuda a l'hora de fer el diagnòstic, sobretot en aquelles patologies on el diagnòstic no és tant evident, ja que mitjançant l'anàlisi del patró d'expressió de microRNAs es pot realitzar la classificació tumoral de forma molt més acurada que mitjançant l'anàlisi de l'expressió de RNAs missatgers.

Segons aquests fonaments, considerem que en l'evolució de les SMD tan en les seves fases més inicials com durant el procés de transformació a leucèmia mieloide aguda (LMA), els microRNAs juguen un paper essencial en la seva regulació. De manera que l'anàlisi del patró d'expressió dels microRNAs ens permetrà entendre millor la malaltia, així com detectar aquells pacients que arriben a fer una transformació leucèmica.

Per altre banda en el Limfoma de Hodgkin, l'anàlisi dels miRNAs en ganglis limfàtics dels pacients ens permetran caracteritzar millor la malaltia, tan a nivell de cèlula tumoral com a nivell

de microambient tumoral. De forma que l'anàlisi dels microRNAs ens permetrà entendre millor els mecanismes pel quals les cèl·lules B de les que deriva la cèl·lula de H/RS escapen de l'apoptosis malignitzant-se.

Basant-nos en aquestes hipòtesis ens marquem els següents objectius:

Objectius generals:

Analitzar en pacients afectes d'una Síndrome Mielodisplàsica i en pacients amb un limfoma de Hodgkin l'expressió de microRNAs per tal de aprofundir en el coneixement de les dugues malalties.

Objectius específics:

Per les SMD:

1. Analitzar en pacients afectes d'una Síndrome Mielodisplàsica l'expressió de microRNAs relacionats amb la hematopoiesis en comparació amb controls sans.
2. Estudiar la relació entre l'expressió de microRNAs en mèdula òsea (MO) i sang perifèrica (SP) en pacients afectes d'una SMD.
3. Relacionar l'expressió dels microRNAs amb les característiques clíniques i el seu paper com a marcadors pronòstic.
4. Investigar les cèl·lules diana on aquests microRNAs estan sobreexpressats mitjançant hibridació *in-situ*.

Pel Limfoma de Hodgkin:

5. Analitzar el patró d'expressió de microRNAs en ganglis limfàtics de pacients afectes d'un LH, respecte a ganglis limfàtics normals.
6. Analitzar les possibles diferències entre l'expressió de microRNAs en els diferents subtipus (esclerosi nodular, cel·lularitat mixta).
7. Identificar aquells microRNAs expressats en les cèl·lules tumorals mitjançant *hibridació in situ*.
8. Estudiar el paper que juga el virus de l'Epstein Barr en el desenvolupament del LH mitjançant els microRNAs.

MATERIAL I MÈTODES

3-MATERIAL I MÈTODES

3.1 Mostres de pacients amb SMD

Es van obtenir mostres de sang perifèrica i moll de l'os de pacients amb SMD que van ser recollides entre el gener de 2007 i el juliol del mateix any. En total 25 pacients i 12 controls. A continuació podem veure la taula de les característiques clíniques dels pacients analitzats (Taula 10).

Característiques	n	(%)
Edat – anys		
Mitjana (Rang)	72	(55-99)
Sexe Masculí	13	52
Classificació per la OMS		
AREB I	5	20
AREB II	2	8
CRDM	11	44
CRDM-SA	3	12
CMMML	2	8
RARS	1	4
SMD-no classificable	1	4
IPSS		
Baix	22	88
Alt	3	12
Blastes en MO		
< 5 %	17	68
5-9 %	4	16
10-20 %	2	4
> 20 %	2	12
Citogenètica		
Cariotip Normal	14	56
del(5q) única anomalia	3	12
del(5q) + 1 anomalia	3	12
del(5q) + 2 anomalies	1	4
del(7q)	1	4
del(20q)	1	4
t (8)	1	4
Not Done	1	4
LMA post-SMD	3	12
Transfusions sanguínies	10	40

Taula 10. Característiques clíniques dels pacients amb SMD

Es van analitzar un total de 25 pacients afectes d'una SMD, 13 dels quals eren homes i 12 dones, amb una mitjana d'edat de 72 anys (rang 54-99) i 12 controls. Tots obtinguts del mateix centre (l'Hospital Clínic de Barcelona). Set pacients patien una anèmia refractària amb excés de blastes (AREB-I, n=5; AREB-II, n=2); Onze patien una citopènia refractària amb displàsia multilineatge (CRDM), tres patien una citopènia refractària amb displàsia multilineatge amb sideroblastes en anell (CRDM-SA), dos una leucèmia mielomonocítica crònica (CMML) i un pacient una anèmia refractària amb sideroblastes en anell (ARSA) i un pacient pertanyia al grup de SMD no classificables.

Vint-i-tres pacients presentaven un IPSS baix mentre que 2 pacients pertanyien al grup de IPSS alt.

3.2 Mostres de pacients amb LH

Es van analitzar quaranta-nou mostres de ganglis limfàtics inclosos en parafina de pacients diagnosticats amb Limfoma de Hodgkin entre Gener de 1996 i Juny de 2005. D'aquests, 37 casos eren esclerosi nodular i 12 cel·lularitat mixta, d'acord amb la classificació de la OMS. Tots els pacients van ser diagnosticats i van tenir un seguiment a l'Hospital Clínic de Barcelona.

Característiques	n	%
Edat mitjana (Rang)	32 (15-80)	
Sexe masculí	27	55
Histologia		
Esclerosi nodular	37	76
Cel·lularitat mixta	12	24
Presència de VEB	16	36
Simptomatologia B	25	51
Massa Bulky	11	22
Anèmia (Hb <105 g/L)	12	24
Leucocitosis ($\geq 15 \times 10^9/L$)	9	18
Linfocitopènia ($< 0.6 \times 10^9/L$ or $< 8\%$ of WBC)	7	14
Hipoalbuminèmia (< 40 g/L)	17	36
LDH elevada (> 450 UI/L)	18	37
β -2-microglobulina elevada (> 2.5 mg/dL)	12	29
Estadiatge III-IV	23	47
Índex de Hasenclever	12	33

Taula 11. Característiques clíniques dels pacients amb LH.

Les principals característiques clíniques i biològiques d'aquests pacients es mostren a la taula 11. Com a controls es van utilitzar 10 ganglis reactius de diferents localitzacions. A més es va utilitzar un grup de validació format per 30 pacients addicionals de característiques similars i 5 ganglis reactius més.

3.3 Extracció d'RNA

3.3.1 Extracció d'RNA de sang perifèrica i moll de l'os

L'extracció d'RNA de les mostres de sang perifèrica i de moll de l'os es van realitzar mitjançant Trizol, però previament es van separar les cèl·lules mitjançant la tècnica del Ficoll.

El Ficoll és un mètode de centrifuga en gradient de densitat per la separació de les cèl·lules mononuclears i els granulòcits de la sang perifèrica i la medul·la òssea, quan la sang s'exten sobre el Ficoll s'exposa a forces centrífugues. Les cèl·lules mononuclears romanen a la interfase entre el plasma (fase superior) i el Ficoll (fase inferior) mentre que els eritròcits i els granulòcits graviten cap al fons.

3.3.2 Extracció d'RNA a partir de la mostra resuspesa en Trizol

Tant les mostres procedents del moll de l'os com de la sang perifèrica una vegada resuspeses en Trizol es va finalitzar l'extracció d'RNA de la mateixa manera, utilitzant el protocol estàndard del laboratori.

La concentració d'RNA i la seva puresa van ser analitzada mitjançant el nanodrop ND-1000, Spectrophotometer. Fent una lectura podem saber si la puresa de l'RNA és bona segons si obtenim una $A_{260/280}$ amb una ratio entre 1.8 i 2.1.

La lectura a 260 fa referència a la concentració d'àcids nucleics i la de 280 a les proteïnes que trobem a la mostra. Per tant el resultat de la divisió és el que anomenem RATIO i aquest valor l'hem de trobar entre 1.7 i 2.1 perquè pugui ser considerada una extracció correcta.

MicroRNA	Localització cromosòmica	Dianes predites
miR-10a	17q21.32	HOXA1, HOXA3, HOXD10, CRK, FLT1
miR-10b	2q31.1	HOXA1, HOXA3, HOXD10, ETS1, CRK, FLT1
miR-15a	13q14.2	LUZP1, FGF2, GDI1, GPR63, TGIF2, IHPK1, DEDPRO1
miR-16-1	13q14.2	LUZP1, FGF2, BCL2L2, GPR63, TGIF2, IHPK1, DEDPRO1, MIFN2
miR-17-3p	13q31.3	FOXP1, EBF, RAB21, FGFR1, CDK2AP2
miR-17-5p	13q31.3	TAL1, SKI, FLT1, RUNX1, CRK, FOG1, ETS1, MEIS1
miR-18a	13q31.3	NRG1, ESR1, PURB, CDK11, MECP2
miR-19a	13q31.3	ADCY1, TA-KRP, KLF13, NEUROD1, ATXN1, MLLT2
miR-19b-1	13q31.3	AK6, PTEN, E1ABP, HOXA5, IGFBP3, IRX5, ZNF238
miR-20b	Xq26.2	MYLIP, RBP1-LIKE
miR-21	17q23.2	PLAG1, SMAD7, SOX5, PDCD4
miR-24	9q22.32/ 19p13.12	TGIF2, GARP, RASGRP4, ELL, BCL2L11
miR-92-1	13q31.3	NFYC, BCL9, MAP2K4, E2F3, PIK3R3
miR-103	5q34/ 20p13	CHRD, DICER1, CPEB2, LUZP1, BCL2L2
miR-107	10q23.31	CHRD, CDK6, LUZP1, DICER1, CPEB2
miR-126	9q34.3	CRK, EVI2, HOXA9, MAFB, CMAF
miR-128	2q21.3	HSNST, TESK2, GPR156, RGS16
miR-142-3p	17q23.2	
miR-142-5p	17q23.2	
miR-146a	5q33.3	TRAF6, IRAK1, KLF7, FBXL10, EIF5A2
miR-150	19q13.33	MYB, ZFP91, ELK1, HLP1R, SDFR1
miR-155	21q21.3	
miR-181a	1q31.3	ZNF150, MAP3K10, GRB10, HOXC8
miR-221	Xp11.3	KIT, TCF12, NAP1L5, CDKN1B, RAP1B, ETS1
miR-222	Xp11.3	KIT
miR-223	Xq12	HLF, MEF2C, HHEX, NFIA, KRAS, PTPB2

Taula 12. Llistat dels microRNAs analitzats en SMD.

3.3.3 Extracció d'RNA a partir de mostres incloses en parafina

Es va extreure RNA total de mostres de teixit incloses en parafina així com de línies cel·lulars; mitjançant el Kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Ambion) seguint el protocol del fabricant i la concentració d'RNA va ser quantificada usant nanodrop ND-1000, Spectrophotometer.

3.4 Selecció dels microRNAs analitzats en SMD

La selecció dels microRNAs es va fer segons la bibliografia ja descrita previament, a la taula 12 podem veure tots aquells microRNAs analitzats, la seva localització cromosòmica i les possibles dianes d'interacció utilitzant les eines de predicció de dianes: PicTar, TargetScan i miRBase.

3.5 Transcripció reversa i quantificació dels microRNAs per PCR a temps real

El cDNA es va sintetitzar mitjançant RNA total amb primers específics per cada microRNA mitjançant *TaqMan microRNA Assay Protocol* (Applied Biosystems). Aquest sistema permet amplificar microRNAs madurs sintetitzant primer el cDNA amb primers específics en forma d'*stem loop* i la quantificació per PCR a temps real gràcies a l'allargament de cadena produït pel desplegament del primer en *stem loop* que permet la unió de 2 primers i una sonda necessaris per la quantificació (Figura 19).

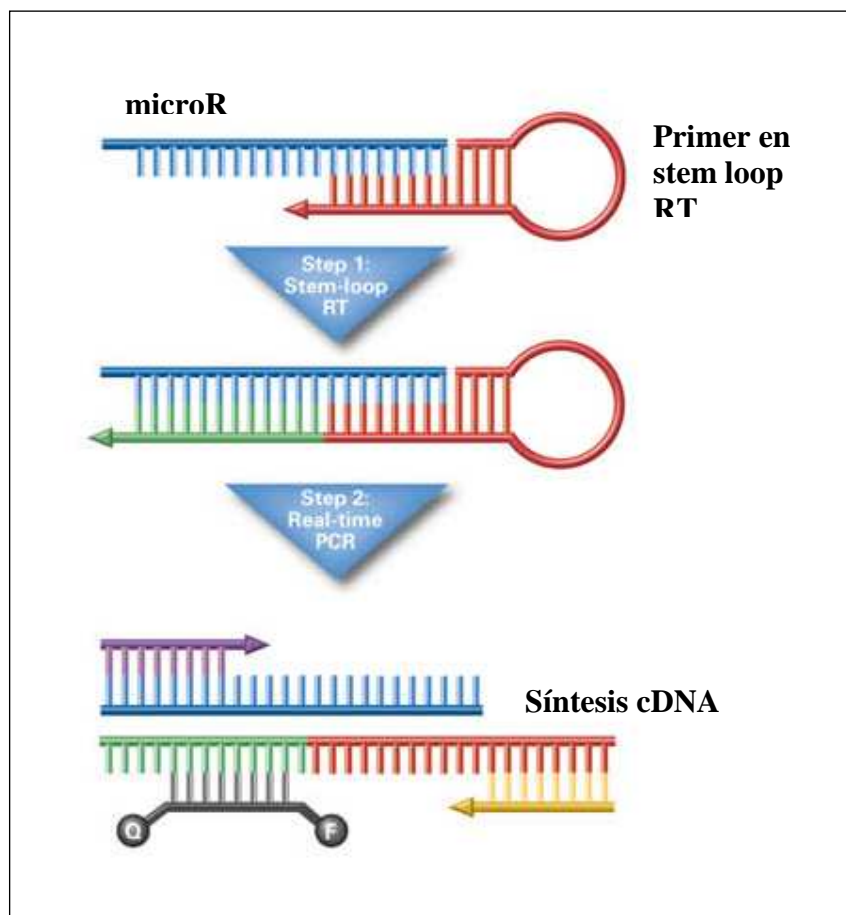


Figura 19. Esquema de la reacció de retrotranscripció de microRNAs. (Applied Biosystems)

En el primer pas l'RNA es retrotranscriu a cDNA utilitzant uns primers específics (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit). En el segon pas el cDNA producte de la PCR s'amplifica per TaqMan® Universal PCR Master Mix.

Per la reacció en cadena de la polimerasa es necessiten 2 primers, un forward i l'altre reverse, un per cada una de les cadenes. A més a més també hi ha una sonda complementària a la seqüència que volem analitzar entremig dels 2 primers. Aquesta sonda porta unit un reporter i un quencher no fluorescent. Quan aquesta sonda queda intacte la proximitat del reporter amb el quencher fa que la fluorescència quedi inhibida, mentre que quan aquesta sonda és tallada per la DNA Polimerasa la separació del reporter del quencher confereix un augment de la fluorescència que només es detecta si la sonda és complementària a la seqüència que estem analitzant. Aquest procés és actiu en cada cicle d'amplificació. A continuació podem observar les corbes resultants del procés d'amplificació per PCR a temps real i un esquema amb les concentracions de mostra i primers utilitzades (Figura 20 i 21).

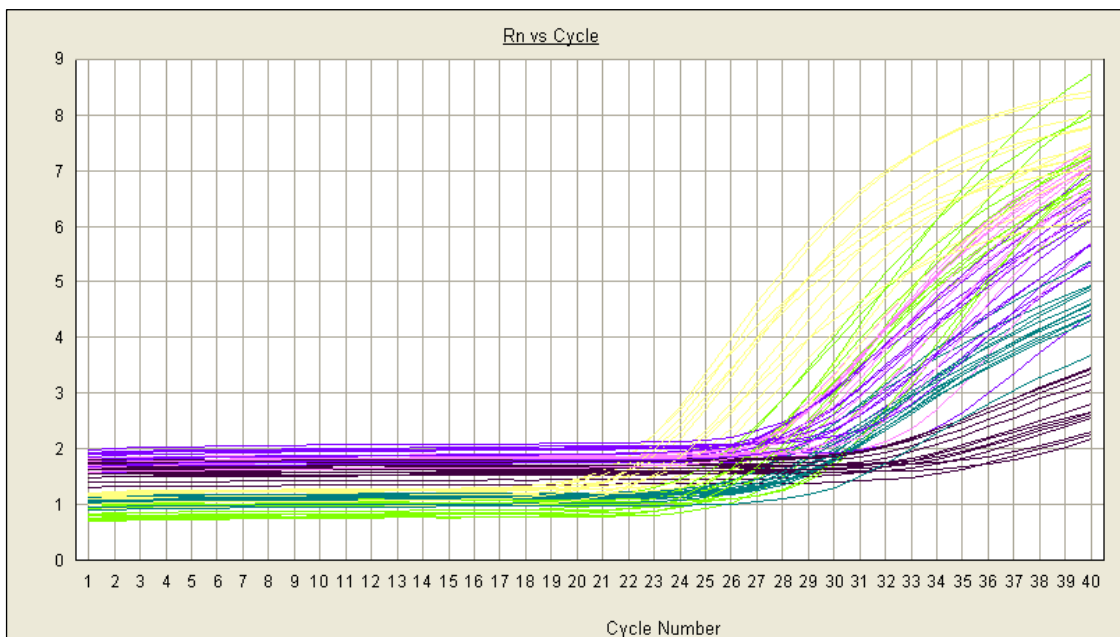


Figura 20. Corbes d'amplificació dels microRNAs mitjançant Real Time PCR System 7500 d'Applied Biosystems.

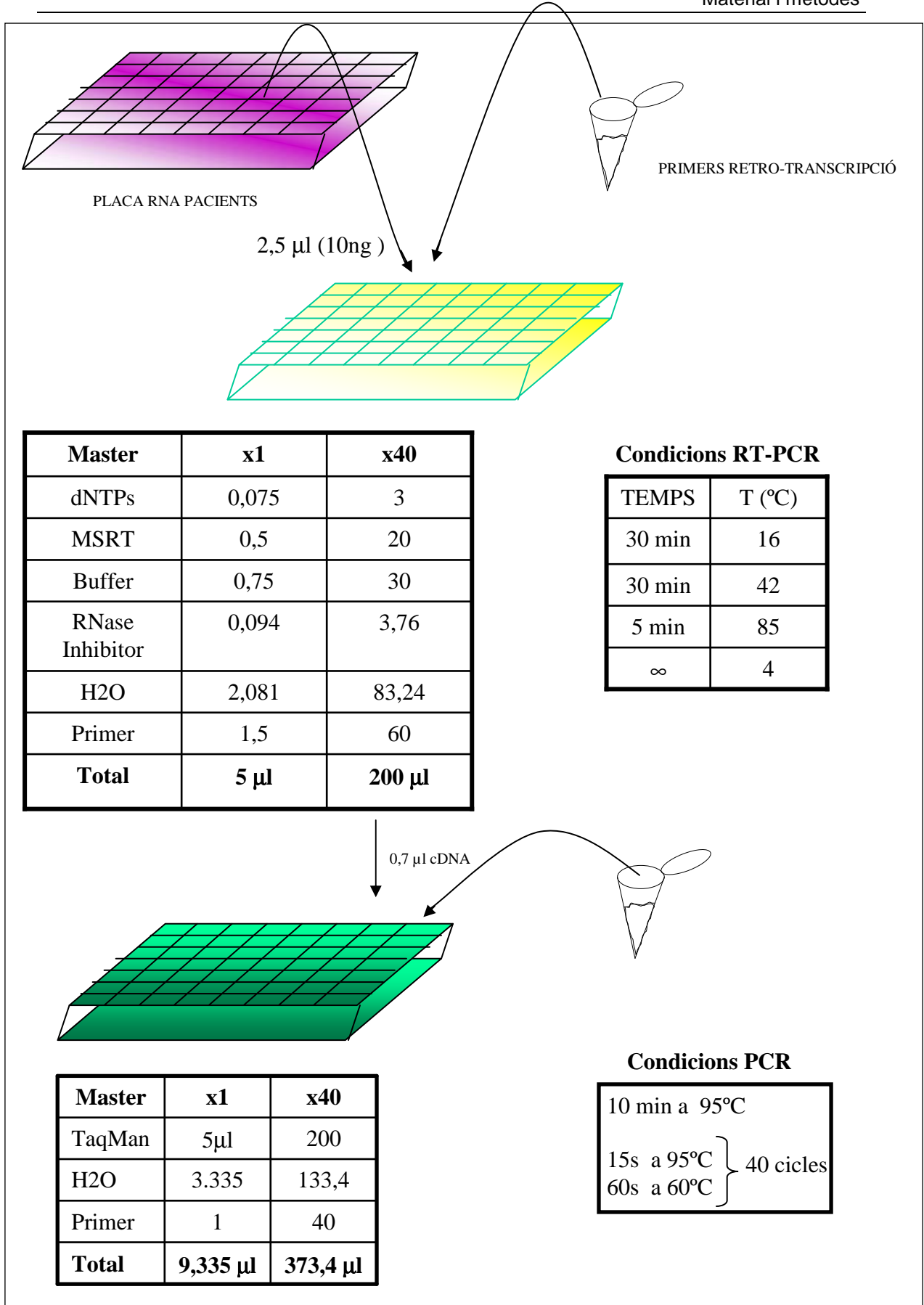


Figura 21. Esquema dels diferents passos d'amplificació i quantificació dels microRNAs i condicions en cada una de les etapes.

3.6 Hibridació in-situ dels microRNAs

Per aquesta tècnica es van utilitzar extensions de moll d'os de pacients afectes d'una SMD sobre porta-objectes tractats amb bind-siland i fixats amb formol.

Les sondes LNA (Locked Nucleic Acid) són sondes amb una modificació a l'anell de ribosa que forma un anell bicíclic; Aquestes, segueixen l'aparellament de les bases de Watson i Crick però les modificacions que presenten els hi proporcionen unes característiques especials:

- Són més sensibles i específiques i tenen unes T_m (temperatures de melting) molt homogènies i més elevades
- Permeten analitzar el contingut de microRNAs, be sigui per arrays com per PCR, partint de mostres de RNA total, sense la necessitat d'enriquir-les.
- Permeten detectar un gran nombre de variants dels microRNAs, de manera que són menys sensibles a la heterogeneïtat a l'extrem 3'.

Els passos realitzats són els següents:

- Incubació de la sonda (overnight)
- Bloqueig de la peroxidasa endògena
- Revelat Anti-FITC
- Tinció amb hematoxilina

3.7 Descongelació i cultiu de línies cel·lulars

La línia cel·lular F-36P és una línia derivada d'un pacient afectat per una Síndrome Mielodisplàsica que progressa a Leucèmia Mieloide Aguda. Aquesta línia és absolutament dependent de GM-CSF o IL-3, factors estimuladors de colònies imprescindibles pel seu creixement. Les altres tres línies cel·lulars utilitzades van ser: LH: L-1236 (cel·lularitat mixta), L-428 i HD-MY-Z (esclerosi nodular).

Les cèl·lules es van descongelar en RPMI 1640 (GIBCO, BRL Life Technologies) complementat amb un 10% de suero fetal boví (FCS), 2mM de L-Glutamina i 50µg/ml de penicilina/estreptomicina. La línia es va mantenir en cultiu en una atmosfera humida a 37°C i al 5% de CO₂ i a unes concentracions de 0,5-1x10⁶ cèl/ml.

3.8 Anàlisi del VEB

La detecció del VEB a les mostres de limfoma d'Hodgkin va ser estudiada en tots els casos per hibridació in situ per a la detecció de l'RNA del virus de VEB (EBER 1 i 2, inform EBER, Ventana Medical System) en una plataforma automàtica BenchMark XT (Finestra Medical Systems) i per PCR a temps real utilitzant sondes i primers específics per al segment altament conservat BamH1W del VEB.

3.9 Anàlisi estadístic

En l'anàlisi d'expressió de microRNAs la normalització és un procés crític i un aspecte a tenir en compte a l'hora de fer una quantificació acurada dels microRNAs. Normalment el mètode més utilitzat és la normalització per un gen housekeeping, l'expressió del qual es manté de forma estable. En el cas dels microRNAs no queda molt clar quins són aquells que es poden utilitzar com a normalitzadors de forma general ja que segons les mostres que s'analitzen en cada cas s'utilitza un normalitzador diferent. Alguns dels microRNAs més utilitzats són: RNU6B, RNU44 i let-7a.

En el nostre cas es va utilitzar l'RNU24 pels casos de SMD i el let-7a i la mediana global en l'estudi de LH; els RNU són small nuclear RNAs que generalment s'utilitzen en aquest tipus d'anàlisi, i es va procedir a triar aquest ja que era el que mantenia una expressió més estable en tot el conjunt de mostres analitzades.

La quantificació relativa es va fer mitjançant el mètode del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Els resultats van ser analitzats amb el BRB Array Tools (versió 3.7 software <http://www.linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) i el TIGR Multiexperiment viewer (versió 4.0 software <http://www.tm4.org/mev.html>) per tal d'identificar aquells microRNAs diferencialment expressats entre pacients i controls. Així com l'SPSS versió 12.0. Per tal d'identificar els microRNAs amb expressió significativament diferent entre els diferents grups es va utilitzar 2 anàlisis multivariats de permutacions: *Significance Analysis of MicroArrays* (SAM) i la T-Student basada en permutacions mutivariades; en aquest últim anàlisi, les diferències entre microRNAs, van ser considerades significatives si la p-valor era menor que 0,001. Així com també el Class Comparison Between Groups of Arrays.

Class Comparison Between Groups of Arrays: és una eina per comparar dos o més grups definits. D'aquesta manera es poden identificar gens que es troben diferencialment expressats

entre dos grups, utilitzant una variança randomitzada. Els gens o microRNAs que es consideren significativament diferents són aquells amb unes p-valor inferiors a 0,001. El llindar de significància utilitzat és molt estrict, de manera que es limita el número de falços positius.

Significance Analysis of MicroArrays (SAM): identifica gens significativament diferents utilitzant t-test. L'anàlisi es basa en un test no parametric ja que els valors dels quals partim no segueixen una distribució normal. En aquest mètode s'utilitzen permutacions repetitives per tal de determinar si l'expressió d'un gen o en aquest cas, d'un microRNA, es troba relacionat amb alguna de les característiques clínic –biològiques dels pacients.

Identificació de possibles gens diana de microRNAs: Per la identificació es van utilitzar programes de predicció de possibles interaccions entre els microRNAs i els RNA missatgers diana. Els programes utilitzats són els següents:

- **PicTar:** <http://www.pictar.bio.nyu.edu/>
- **MirBase** <http://www.microrna.sanger.ac.uk/>
- **TargetScan:** <http://www.targetscan.org/>

RESULTATS

ARTICLE 1:

Hematopoiesis-related microRNA expression in
myelodysplastic
syndromes

AINA PONS, BENET NOMDEDEU, ALFONS NAVARRO, ANNA GAYA, BERNAT GEL,
TANIA DIAZ, SANDRA VALERA, MARIA ROZMAN, MOHAMED BELKAID,
EMILI MONTSERRAT, & MARIANO MONZO.

Leukemia & Lymphoma, 2009

4- RESULTATS

4.1- RESUM ARTICLE 1: Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic syndromes

Existeixen diversos estudis que avalen el paper dels microRNAs involucrats en mecanismes de diferenciació cel·lular, ja que en les SMD es desconeix el curs evolutiu que dona lloc a la patologia, el motiu del següent estudi fou determinar diferències en l'expressió de microRNAs que ens permetessin classificar els pacients dels controls sans; així com trobar aquells microRNAs més significatius en aquesta patologia.

En l'anàlisi dels resultats observem una sobreexpressió de 12 microRNAs en MO de pacients respecte els casos control: miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-10a, miR-10b, miR-15a, miR-16, miR-222, miR-155, miR-181a, miR-21 i miR-126; cinc dels quals també es troben sobreexpressats en SP dels pacients: miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-15a i miR-21.

També s'ha vist l'expressió diferencial de dos microRNAs miR-15a i miR-16 entre els grups d'alt risc i baix risc en MO i SP respectivament i per altra banda, en el 28% de pacients amb una deleció del 5q, trobem 6 microRNAs sobreexpressats: miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-21, miR-146 i miR-155.

Dos microRNAs miR-181a i miR-222 es veuen sobreexpressats progressivament en casos de pacients amb SMD i LMA post-SMD. L'expressió d'aquests dos microRNAs es va analitzar en una línia cel·lular de LMA, la F-36P on es va veure l'expressió elevada de miR-222, però no de miR-181a. També es va analitzar per hibridació *in-situ* aquelles cèl·lules que expressaven miR-222 i miR-181a en extensions de MO de pacients i vam poder observar com la senyal del miR-222 es trobava al citoplasma de les cèl·lules promielocítiques i blastes, mentre que miR-181a s'expressava en cèl·lules promielocítiques i polimorfonuclears.

miR-181a és un microRNA involucrat en la diferenciació hematopoiètica i s'ha vist relacionat amb el fenotip de la LMA suggerint un possible paper en el desenvolupament i la diferenciació del tumor.[142;184] A més a més aquest microRNA s'ha vist associat a la supervivència lliure d'event.[185]

L'any 2005 Felli i els seus col·laboradors van veure com augmentant l'expressió de miR-221 i miR-222 en cèl·lules CD34+ provocaven un dany en la proliferació i acceleraven la

Resultats

diferenciació dels eritròcits, juntament amb una baixada dels nivells proteics de *Kit*, el qual es trobaria alterat en molts dels pacients afectes d'una SMD.

ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic syndromes

AINA PONS¹, BENET NOMDEDEU², ALFONS NAVARRO¹, ANNA GAYA², BERNAT GEL¹, TANIA DIAZ¹, SANDRA VALERA³, MARÍA ROZMAN², MOHAMED BELKAID², EMILI MONTSERRAT², & MARIANO MONZO¹

¹Unit of Human Anatomy, Molecular Oncology Laboratory, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain, ²Hematology Department, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain, ³Pathology Department, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

(Received 14 April 2009; revised 23 June 2009; accepted 25 June 2009)

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are negative regulators of expression of genes involved in hematopoiesis. The present study sought to link hematopoiesis-relevant miRNAs with myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS progression to acute myeloid leukemia (AML). We assessed 25 mature miRNAs in total RNA from bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) of 25 newly diagnosed patients with MDS and 12 controls. Twelve miRNAs in BM and six in PB were differentially expressed between patients with MDS and controls. Three of these miRNAs, belonging to the cluster 17–92, were overexpressed in both BM and PB. miR-15a in BM ($p = 0.034$) and miR-16 in PB ($p = 0.005$) were differentially expressed between low-risk and high-risk groups. miR-222 ($p = 0.0023$) and miR-181a ($p = 0.014$) expression was higher in AML than in MDS in both BM and PB. This study adds further evidence to the role of miRNAs in the pathogenesis of MDS and their transformation into AML.

Keywords: MicroRNA, hematopoiesis, MDS, post-MDS AML, miR-222, miR-181a

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of clonal hematologic disorders characterized clinically and morphologically by ineffective hematopoiesis and subsequent frequent development (25%) of acute myeloid leukemia (AML) [1]. MDS occur most frequently in older people – median age at diagnosis is 65 years – and the disease becomes more common with increasing age [2]. The French–American–British (FAB) group proposed a classification system based on morphologic features of dysplasia, the presence of ringed sideroblasts, and the number of blasts and monocytes [3]. The FAB MDS classification, which has since been modified by the World Health Organization (WHO) [4], can be used in conjunction with the International Prognostic Scoring System (IPSS), a useful tool for

predicting survival and risk of leukemia. The IPSS divides MDS into different stages based on marrow morphology, cytogenetic features, and blood cytopenias [5].

The mechanisms involved in MDS pathogenesis and disease progression are poorly understood. The biological hallmark of MDS is a defective capacity for self-renewal and differentiation of stem cells, probably due to imperfect interactions between hematopoietic progenitors and marrow stromal cells [6].

In recent years, microribonucleic acids (miRNAs) have been identified as a novel mechanism in gene regulation [7]. miRNAs are small non-coding 19–25-nt RNAs that regulate gene expression by targeting mRNAs to inhibit translation [8]. miRNAs are differentially expressed between normal and cancer tissues and can be used to distinguish between different tumors [9–11]. Although it is widely

Correspondence: Dr. Mariano Monzo, MD, PhD, Human Anatomy Unit, Molecular Oncology Laboratory, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, C/Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain. Tel: +34934021903. Fax: +34934035263. E-mail: mmonzo@ub.edu

recognized that miRNAs have an important function in hematopoiesis and hematological disease, their exact role is yet to be elucidated. To date, only a few studies have examined the role of miRNAs in hematopoiesis. Chen *et al.* [12] analyzed the expression of 150 miRNAs from murine bone marrow (BM) and identified three miRNAs specifically expressed in hematopoietic cells: miR-181a, miR-223 and miR-142. These miRNAs presumably act by silencing processes critical for normal mouse hematopoiesis. miR-150 and miR-146 have been related to murine hematopoietic development [13]. In human cell lines, miR-223 was overexpressed in myeloid cells, while miR-142 was underexpressed in myeloid lineages and B-lineage cells, indicating the significance of miRNAs in human hematopoietic diseases [14]. The miR-221/miR-222 cluster regulates erythropoiesis by inhibiting kit protein production in erythroid culture of CD34+ cells and the erythroid leukemia TF-1 cell line [15]. In addition, miR-223 plays a role in granulopoiesis in association with two transcription factors [16]. Interestingly, some miRNAs have megakaryocytic transcription factor as a target and are thus involved in megakaryocytopoiesis: miR-10a, miR-126, miR-106, miR-10b, miR-17, and miR-20 [17]. Another group of miRNAs has also been related to the hematopoietic process in early stem-progenitor stage, blocking differentiation to a more mature stage: miR-17, miR-24, miR-146, miR-155, miR-128a, and miR-181 [18]. Other miRNAs may block differentiation in a later stage of hematopoiesis: miR-16, miR-103, and miR-107 [18]. Finally, miR-221, miR-222, and miR-223 may block differentiation in a terminal stage (Supplementary Table I) [15,16,18].

MDS are usually diagnosed based on findings in BM and peripheral blood (PB). In order to determine whether the miRNAs that are active in hematopoiesis also play a similar role in the development of MDS, we assessed the expression of these hematopoiesis-related miRNAs in BM and PB of 25 patients with MDS and 12 normal controls and examined the role of these miRNAs as predictive markers of AML development.

Materials and methods

Patients

BM and PB samples were collected from 12 controls and 25 newly diagnosed patients with MDS at Hospital Clinic of Barcelona between January and July 2007. Seven patients had refractory anemia with excess of blasts (RAEB-I, $n = 5$; RAEB-II, $n = 2$); 11 had refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD); 3 had RCMD with ringed sideroblasts

Table I. Main clinical characteristics of patients with MDS.

Characteristics	n (%)
Age (years)	72 (55–99)*
Gender	
Male	13 (52)
Female	12 (48)
WHO classification	
RAEB I	5 (20)
RAEB II	2 (8)
RCMD	11 (44)
RCMD-RS	3 (12)
CMML	2 (8)
RARS	1 (4)
MDS-U	1 (4)
IPSS	
Low-risk	22 (88)
High-risk	3 (12)
BM blasts	
< 5%	17 (68)
5–9%	4 (16)
10–20%	2 (8)
> 20%	2 (8)
Cytogenetics	
Normal karyotype	14 (56)
del(5q) alone	3 (12)
del(5q) + 1 anomaly	3 (12)
del(5q) + 2 anomaly	1 (4)
del(7q)	1 (4)
del(20q)	1 (4)
t(8)	(4)
Not done	1 (4)
Leukemic transformation	3 (12)
Red blood cell transfusion	10 (40)

RCMD, refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD-RS, refractory cytopenia with multilineage dysplasia with ringed sideroblasts; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; RARS, refractory anemia with ring sideroblasts; WHO, World Health Organization; IPSS, International Prognostic Scoring System; BM, bone marrow; RAEB I, Refractory anemia with excess of blasts type I; RAEB II, Refractory anemia with excess of blasts type II; MDS-U, myelodysplastic syndrome unclassifiable.

*Values represent median (range).

(RCMD-RS); 2 had chronic myelomonocytic leukemia (CMML); 1 had refractory anemia with ring sideroblasts (RARS); and 1 had unclassified MDS. Twenty-two patients had IPSS low-risk (LR) (low or intermediate-1), and three patients had IPSS high-risk (HR) (intermediate-2 and high). Informed consent was obtained from all patients. Clinical characteristics of the patients are summarized in Table I.

Ribonucleic acid extraction, reverse transcription, and real time polymerase chain reaction quantification

Mononuclear cells were purified by density-gradient centrifugation on Ficoll and total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies[®], Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA (2.5 ng/reaction)

was reverse-transcribed with specific looped RT primers for each miRNA as previously described [19]. The 10- μ L reactions were performed using reagents from the high-capacity cDNA Archive Kit (PN 4322171, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 3.8 U RNase inhibitor (PN N8080119, Applied Biosystems) and incubated for 30 min at 16°C, 30 min at 40°C, 5 min at 85°C, and then held at 4°C. For the real-time PCR step, cDNA samples were used as templates in 10- μ L reactions containing primers and probes for each miRNA according to the manufacturer's instructions. All reactions were run on an ABI7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the following conditions: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. All reactions were performed in duplicates and included no template and no RT as negative controls for each gene. Normalization was performed with *RNU24* because it had the lowest expression variability in the miRNA expression patient dataset. The cycle threshold (CT) was determined automatically for each gene, and $2^{-\Delta\Delta CT}$ was used for the relative quantification of each miRNA. All the analyzed miRNAs are summarized in Supplementary Table I.

Statistical analysis

Data were analyzed using BRB Array Tools version 3.5.0 software (Biometric Research Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health; <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) and SPSS 14.0. Differential expression between BM-MDS versus BM-controls and PB-MDS versus PB-controls was examined with Class Comparison methods (BRB Array Tools) and Student *t*-test.

Results

Microribonucleic acid expression in patients with MDS

Twelve miRNAs were overexpressed in BM-MDS compared with BM-controls (miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-10a, miR-10b, miR-15a, miR-16, miR-222, miR-155, miR-181a, miR-21, miR-126), six of which were also overexpressed in PB-MDS compared with PB-controls (miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-15, miR-21, miR-142-3p) (Figure 1). In addition, miR-142-3p was also overexpressed in PB-MDS but not in BM-MDS compared with controls. The mean fold change of these miRNAs and their significance are described in Table II.

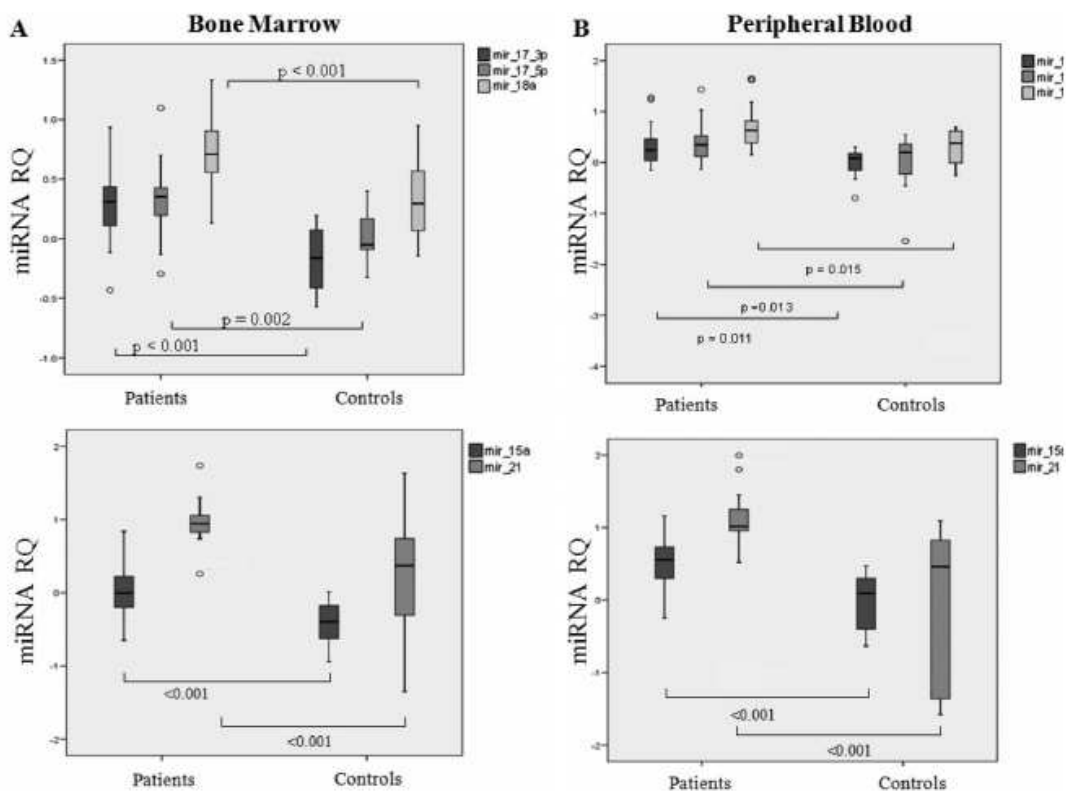


Figure 1. Common differentially expressed miRNAs in both BM (A) and PB (B) between patients and controls.

Table II. Mean fold change of miRNAs differentially expressed in MDS *versus* controls.

MicroRNA	Chromosome location	BM fold change	<i>p</i> value	PB fold change	<i>p</i> value
miR-10a	17q21.32	10.79	0.046	–	NS
miR-10b	2q31.1	6.05	0.029	–	NS
miR-15a	13q14.2	7.41	<0.001	17.29	<0.001
miR-16-1	13q14.2	24.56	0.012	–	NS
miR-17-3p	13q31.3	3.39	<0.001	3.28	0.011
miR-17-5p	13q31.3	2.51	0.002	4.12	0.013
miR-18a	13q31.3	2.94	<0.001	8.09	0.015
miR-21	17q23.2	3.87	<0.001	4.32	<0.001
miR-126	9q34.3	3.03	0.012	–	NS
miR-142-3p	17q23.2	–	NS	3.06	0.007
miR-155	21q21.3	1.94	0.020	–	NS
miR-181a	1q31.3	2.33	0.046	–	NS
miR-222	Xp11.3	1.91	0.005	–	NS

MDS, myelodysplastic syndromes; BM, bone marrow; PB, peripheral blood.

Microribonucleic acids and patient characteristics

We examined the potential association between miRNA expression and clinical and biologic patient characteristics: age, gender, LDH level, β -2-microglobulin level, stage, WHO classification, blastocytosis, IPSS classification, and AML transformation.

miR-181a, miR-222, and miR-155 in BM were upregulated in 21 advanced patients with MDS and downregulated in four early-stage MDS ($p=0.002$, $p=0.014$, $p=0.015$, respectively). miR-15a was overexpressed in BM in three IPSS patients with high-risk ($p=0.007$) [Figure 2 (A)], and miR-16 was overexpressed in PB in 18 of 22 IPSS patients with low-risk ($p=0.027$) [Figure 2 (B)].

Seven patients (28%) showed a 5q deletion. In these patients, six miRNAs were overexpressed in BM: miR-17-5p ($p=0.009$), miR-18a ($p=0.011$), miR-17-3p ($p=0.011$), miR-21 ($p=0.012$), miR-155 ($p=0.016$), and miR-146 ($p=0.041$). With the exception of miR-146, these miRNAs were also overexpressed in BM of other patients with MDS. Only miR-21 ($p=0.001$) and miR-17-3p ($p=0.023$) showed a differential expression in PB in 5q-deletion patients.

The BM expression levels of two miRNAs (miR-181a and miR-222) increased steadily from controls to MDS to AML (Figure 3). To further elucidate these findings, we analyzed the expression of miR-181a and miR-222 in the post-MDS AML F-36 cell line. High levels of miR-222 but not of miR-181a were observed in the cell line (data not shown).

Discussion

In early MDS, impaired differentiation and increased apoptosis predominate, but as disease progression to AML occurs, increased proliferation and accumulation of immature cells occur [20]. We have analyzed

25 hematopoiesis-related miRNAs in the BM and PB of patients with MDS in order to identify alterations in their expression that might affect MDS development and progression. Although we did not specifically select CD34+ cells, many of the miRNAs that were found overexpressed in our study have also been found overexpressed in CD34+ cells, including miR-16, miR-17, miR-181a, and miR-222 [18]. Twelve miRNAs were overexpressed in BM, six of which were also overexpressed in PB: miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-15a, and miR-21, and miR-142-3p. miR-17-3p, miR-17-5p, and miR-18a belong to the cluster 17-92, which is overexpressed in many kinds of tumors [21] and which acts to promote proliferation. This cluster may play an important role in increased proliferation and accumulation of immature cells during MDS progression through regulation of E2F family transcription factors involved in cell cycle and apoptosis. When expression of these miRNAs is elevated, E2F1 protein decreases, leading to attenuation of induced apoptosis [21–23]. miR-21, known for its anti-apoptotic effect [24], has also been shown to collaborate with the miR-17-92 cluster in transformation [25].

Although miR-146 expression was dysregulated in 5q-deletion patients, it was not differentially expressed in other patients with MDS, and the high miR-146 expression may be due to a distinct microenvironment in 5q-deletion patients [26]. Patients with MDS have a defective immune response manifested by increased susceptibility to bacterial infections, autoimmune phenomena, and high incidence of lymphoid malignancies [27]. miR-146 plays a crucial role in immunity by regulating the acute inflammatory response after pathogen recognition by toll-like receptors on monocytes or macrophages [28]. miR-146 expression is induced to

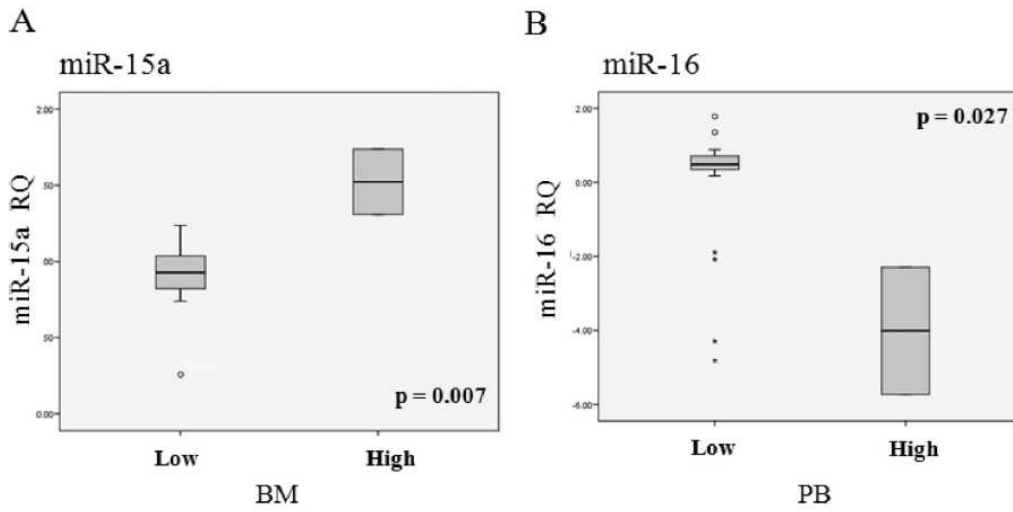


Figure 2. Expression of miR-15a in BM (A) and miR-16 in peripheral blood (B) in IPSS low-risk versus high-risk patients.

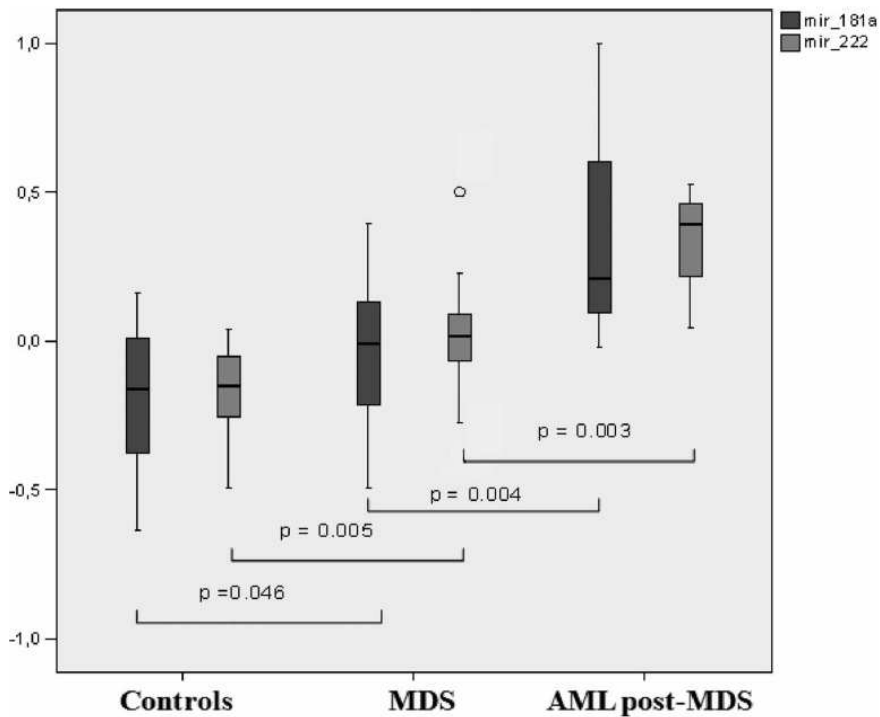


Figure 3. Expression levels of miR-181a and miR-222 in controls, patients with MDS and patients with post-MDS AML.

bacterial ligands or IL-1 and TNF. TRAF1 and IRAK1, key molecules in the TLR-IL-1 β pathway, are direct targets of this miRNA [28].

We identified two miRNAs with progressively higher expression from controls to early-stage MDS to advanced MDS to post-MDS AML: miR-181a ($p=0.001$) and miR-222 ($p=0.007$). miR-181a is

involved in hematopoietic lineage differentiation [12], and has recently been related to the AML morphological phenotype, suggesting a possible role in the developmental lineage and differentiation of the tumor [29]. The miR-181 family has also been associated with event-free survival in AML [30]. In addition, it has been reported that changes in

miR-222 lead to differentiation of hematopoiesis via c-kit receptor expression [15], which is commonly altered in MDS [31].

Despite the low number of samples analyzed and their relative heterogeneity in terms of stage and IPSS scoring groups, our data can provide the basis for new avenues of investigation in MDS and post-MDS AML.

Acknowledgments

The authors are grateful to Silvia Pairet for her excellent technical assistance, and Renee O'Brate for her assistance in writing the manuscript. This work was supported in part by FISS (PI060087) from the Spanish Ministry of Public Health and by the SDCSD of the School of Medicine of the University of Barcelona.

References

1. Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. *N Engl J Med* 1999;340:1649–1660.
2. Germing U, Strupp C, Kundgen A, et al. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2004;89:905–910.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189–199.
4. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292–2302.
5. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079–2088.
6. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes – coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med* 2005;352:536–538.
7. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–297.
8. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294:853–858.
9. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259–269.
10. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 2006;25:6188–6196.
11. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999–3004.
12. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303:83–86.
13. Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, et al. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 2005;6:R71.
14. Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, et al. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res* 2006;30:643–647.
15. Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18081–18086.
16. Fazi F, Rosa A, Fatica A, et al. A microcircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005;123:819–831.
17. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5078–5083.
18. Georgantas RW III, Hildreth R, Morisot S, et al. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2750–2755.
19. Navarro A, Gaya A, Martinez A, et al. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008;111:2825–2832.
20. Yoshida Y, Mufti GJ. Apoptosis and its significance in MDS: controversies revisited. *Leuk Res* 1999;23:777–785.
21. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435:828–833.
22. Woods K, Thomson JM, Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem* 2007;282:2130–2134.
23. Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, et al. Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res* 2008;68:5540–5545.
24. Lu Z, Liu M, Stribinski V, et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 2008;27:4373–4379.
25. Connolly E, Melegari M, Landgraf P, et al. Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *Am J Pathol* 2008;173:856–864.
26. Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Montesinos JJ, rana-Trejo RM, Mayani H. *In vitro* characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2002;26:677–686.
27. Micheva I, Thanopoulou E, Michalopoulos S, et al. Defective tumor necrosis factor alpha-induced maturation of monocyte-derived dendritic cells in patients with myelodysplastic syndromes. *Clin Immunol* 2004;113:310–317.
28. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12481–12486.
29. Debernardi S, Skoulakis S, Molloy G, Chaplin T, von-Melver A, Young BD. MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis. *Leukemia* 2007;21:912–916.
30. Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, et al. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358:1919–1928.
31. Pfeilstocker M, Karlic H, Nosslinger T, et al. Myelodysplastic syndromes, aging, and age: correlations, common mechanisms, and clinical implications. *Leuk Lymphoma* 2007;48:1900–1909.

ARTICLE 2:

MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma

**ALFONS NAVARRO, ANNA GAYA, ANTONIO MARTINEZ, ALVARO URBANO-ISPIZUA,
AINA PONS, OLGA BALAGUÉ, BERNAT GEL, PAU ABRISQUETA, ARMANDO LOPEZ-
GUILLERMO, ROSA ARTELLS, EMILI MONTSERRAT, AND MARIANO MONZO.**

4.2- RESUM ARTICLE 2: *MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma*

En aquest estudi veiem com dels 156 microRNAs analitzats mitjançant un *Hierarchical Cluster Analysis* observem la classificació de tres entitats ben diferenciades: esclerosis nodular (EN), cel·lularitat mixta (CM) i ganglis reactius normals (GR).

Al fer un anàlisi específic d'aquells microRNAs amb PAM i SAM trobem un conjunt de microRNAs diferencialment expressats entre EN i GR, un altre conjunt entre CM i GR i un tercer grup que ens permet diferenciar els casos d'EN dels de CM.

Es van identificar de forma precisa un conjunt de 25 microRNAs que constituïen una signatura que ens permetia classificar aquells casos de LH d'aquells ganglis reactius. Aquesta signatura es va poder validar en una sèrie de 30 casos de LH i 5 GR addicionals.

Mitjançant les bases de dades de predicció de dianes de microRNAs: MirBase i TargetScan, vam seleccionar un grup de gens on podien estar actuant aquests 25 microRNAs i que poguessin estar relacionats amb vies metabòliques similars; per aquest anàlisi es van utilitzar els programes DAVID database i GENIG. Pertant vam aconseguir reduir els milers de possibles gens diana d'aquests microRNAs i donar una llista d'aquells amb més probabilitat de ser dianes en el nostre model tumoral. D'aquesta manera trobem gens relacionats amb la biologia de la cèl·lula B com PU.1, J-chain, CD79b i CD138, altres relacionats amb el cicle cel·lular i la supervivència com PTEN i altres amb l'apoptosis com BCL2 i FASLG.

D'aquests 25 microRNAs analitzats en vam escollir tres segons les seves dianes predites i la regió cromosòmica on es trobaven codificats; per tal de validar si l'expressió d'aquests provenia de les cèl·lules de H/RS. miR-21 (PTEN, TPM1; 17q23.2), miR-134 (J-Chain; 14q32.31) i miR-138 (PU.1; 7q32.2). Dels tres casos en tots es va poder veure una senyal citoplasmàtica en les cèl·lules de H/RS, així com una senyal nuclear en limfòcits reactius que componen l'infiltrat tumoral de miR-21 i miR-138. Com a control positiu es va utilitzar el miR-155 el qual ja s'havia descrit que es trobava sobreexpressat en el LH.[170]

Per tal d'averiguar si l'expressió diferencial d'aquests 25 microRNAs en el LH respecte els ganglis reactius era deguda al microambient o a les cèl·lules tumorals (que en aquest cas conformen només un 1% del total), es va analitzar la seva expressió en 3 línies cel·lulars L-428, L-1236 i HDMYZ, i es va observar com la majoria es trobaven diferencialment expressats entre cada una de les línies respecte la mitjana dels ganglis reactius. Només 5 dels 25: miR-220,

miR-302a, miR-302b, miR-302c i miR-325, tenien una expressió semblant als controls i pertant ens indicaria que aquests estarien sobreexpressats per les cèl·lules reactives del microambient tumoral.

Per altra banda també es van analitzar en les línies cel·lulars aquells 36 microRNAs que es veien diferencialment expressats entre els subtipus EN i CM i vam observar com 32 dels microRNAs analitzats tenien diferències significatives també en les 3 línies cel·lulars mentre que els 4 restants: miR-122a, miR-154, miR-302d i miR-371, no s'expressaven. Pertant podríem afirmar també que la diferència d'expressió que havíem trobat entre aquests dos subtipus podria ser deguda a diferències del microambient no tumoral.

Pel que fa a l'anàlisi de la importància de la infecció pel virus VEB en pacients amb LH, es va analitzar mitjançant SAM (*Significance Analysis of microArrays*) aquells microRNAs diferencialment expressats entre VEB+ i VEB- i vam observar diferències significatives en 10 microRNAs. Al restringir l'anàlisi per les mostres d'EN veiem tres microRNA: miR-96, miR-128a i miR-128b infraexpressats en els casos VEB+. D'aquests tres només un es veuria inclòs a la signatura dels 25 microRNAs, fet que fa pensar que el virus no és un element primari de transformació del LH clàssic.

Respecte les possibles associacions entre l'expressió de microRNAs i els paràmetres clínics i biològics dels pacients, es van analitzar les característiques clíniques: edat, sexe, simptomatologia B, presència de massa Bulky, anèmia, leucocitosis, linfocitopènia, lipoalbuminèmia, ESR, LDH, β -2-microglobulina, presència tumoral extranodal, estadiatge, índex de Hasenclever, positivitat per CD15 i CD20 i densitat de cèl·lules tumorals i linfòcits T al microambient tumoral i es va trobar alguna associació entre l'expressió de microRNAs i els diferents estadiatges.

miR-138 i miR-328, tendien a sobreexpressar-se en estadis temprans respecte a altres més avançats. Per tal de validar aquests resultats es va ampliar l'estudi amb 30 mostres més de pacients amb unes característiques similars als inicials. El que es va observar va ser que així com la diferència d'expressió de miR-138 entre estadis temprans i avançats es mantenia, la diferència d'expressió de miR-328 entre ambdós grups es perdia.

MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma

Alfons Navarro,^{1,2} Anna Gaya,^{2,3} Antonio Martinez,^{2,4} Alvaro Urbano-Ispizua,^{2,3} Aina Pons,^{1,2} Olga Balagué,^{2,4} Bemat Gel,⁵ Pau Abrisqueta,^{2,3} Armando Lopez-Guillermo,^{2,3} Rosa Artells,^{1,2} Emili Montserrat,^{2,3} and Mariano Monzo^{1,2}

¹Department of Human Anatomy and Embryology, Laboratory of Molecular Oncology, Medical School, Barcelona University, Barcelona; ²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona; ³Department of Hematology, Hospital Clinic, Barcelona; ⁴Hematopathology Section, Laboratory of Pathology, Hospital Clinic, Barcelona; and ⁵Department of Software, Technical University of Catalonia (UPC), Barcelona, Spain

MicroRNAs (miRNAs) are negative regulators of gene expression that play an important role in hematopoiesis and tumorigenesis. We analyzed miRNA expression in classic Hodgkin lymphoma (cHL) and the influence of Epstein-Barr virus (EBV) infection on the miRNA expression profiles. The expression of 157 miRNAs in lymph nodes from 49 cHL patients and 10 reactive lymph nodes (RLNs) was ana-

lyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR). Hierarchic clustering revealed 3 well-defined groups: nodular sclerosis cHL, mixed cellularity cHL, and RLNs. A distinctive signature of 25 miRNAs differentiated cHL from RLNs, and 36 miRNAs were differentially expressed in the nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes. These results were validated in a set of 30 cHLs and 5 RLNs, and in 3 cHL

cell lines. miR-96, miR-128a, and miR-128b were selectively down-regulated in cHL with EBV. Our findings suggest that miRNAs play an important role in the biology of cHL and may be useful in developing therapies targeting miRNAs. (Blood. 2008;111:2825-2832)

© 2008 by The American Society of Hematology

Introduction

Mature microRNAs (miRNAs) are naturally occurring small noncoding RNAs that act as negative regulators of gene expression through messenger RNA interference. These molecules were described for the first time in 1993 by Ambros and colleagues in *Caenorhabditis elegans* (Lee et al¹), and to date, hundreds of miRNAs have been identified in other species, including viruses.^{2,3} miRNAs are encoded by intronic or intergenic DNA regions, primarily as large molecules that can exceed 1 Kb, and are cleaved by an RNase complex into fragments with characteristic stem-loop structures. In the cytoplasm, a RNase called Dicer further cleaves miRNA to generate a duplex molecule of 21 to 25 nucleotides in length.⁴ One of the 2 chains is the mature miRNA that binds a protein complex called the RNA-induced silencing complex (RISC). When a miRNA and a messenger RNA exhibit total complementarities, RISC is capable of degrading target messenger RNA,⁴ whereas if an incomplete base pairing complementarity takes place, translational silencing of the target occurs. Through these mechanisms, miRNAs decrease translation of human genes.^{5,6}

miRNAs play an important role in cellular proliferation and differentiation and embryonic development, and they also act as oncogenes or tumor suppressor genes.⁷⁻¹⁰ Notably, the majority of miRNAs are found in cancer-associated genomic regions or in chromosome-fragile sites,¹¹ suggesting an important role for miRNAs in human tumorigenesis. There is also evidence that the influence of miRNAs in oncogenesis might be indirectly driven. For example, the presence of some viruses in a cell may change the host miRNA pattern.¹² Viruses may participate in the origin of some tumors, such as the Epstein-Barr virus (EBV) in Hodgkin lymphoma (HL).

HL is a neoplasm characterized by the presence of relatively few tumoral cells (Hodgkin and Reed-Sternberg cells) in a nonneoplastic microenvironment.¹³ Hodgkin and Reed-Sternberg cells arise from germinal center B cells.¹⁴ Classic HL (cHL) is subclassified according to the morphology of Reed-Sternberg cells and the composition of the cellular background into nodular sclerosis, mixed cellularity, lymphocyte-rich, and lymphocyte depletion.¹⁵ The 2 former subtypes are the most frequent forms of cHL and contain a variable proportion of neoplastic cells.

EBV is present in the malignant cells of 40% to 60% of cHL patients. However, the precise role of the EBV in the pathogenesis of cHL is unknown. It has been reported that viruses have their own miRNA set,¹⁶ and that there is an interaction between the host miRNAs and virus miRNAs.^{17,18} The interaction between the virus and the malignant cells in cHL might be mediated in part by miRNAs.

To investigate whether a specific expression signature of miRNAs is associated with cHL, we assessed the expression of 156 miRNAs, the majority of which are related to hematopoiesis or tumorigenesis,^{7,8,11} in lymph nodes from patients with nodular sclerosis and mixed cellularity cHL and compared the expression patterns with those in reactive lymph nodes (RLNs). We also examined the influence of EBV on the expression pattern of miRNAs in cHL patients.

Methods

Approval for these studies was obtained from the Institutional Review Board of Hospital Clinic, Barcelona. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Submitted June 20, 2007; accepted December 12, 2007. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 18, 2007; DOI 10.1182/blood-2007-06-096784.

A.N. and A.G. contributed equally to this article.

The online version of this article contains a data supplement.

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.

© 2008 by The American Society of Hematology

Table 1. Main clinical characteristics of cHL patients, N = 49

Characteristic	No.	%
Median age, y (range)	32 (15-80)	
Sex, M/F	27/22	55/45
Histology		
Nodular sclerosis	37	76
Mixed cellularity	12	24
EBV+*	16	36
B symptoms	25	51
Bulky mass	11	22
Anemia, Hb level less than 10 ⁵ g/L	12	24
Leukocytosis, more than 15 × 10 ⁹ /L	9	18
Lymphocytopenia, less than 0.6 × 10 ⁹ /L or less than 8% of WBC	7	14
Hypoalbuminemia, less than 40 g/L	17	36
High LDH level, more than 450 U/L	18	37
High β-2-microglobulin level, more than 25 mg/L	12	29
Stage III-IV	23	47
Hasenclever index more than 3†	12	33

WBC indicates white blood cell.
 *Nine (26%) of 34 nodular sclerosis versus 7 (70%) of 10 mixed cellularity ($P = .01$).
 †Calculated only in 36 patients with advanced disease (stages III-IV, B symptoms, or bulky mass).

Tissue samples and cell lines

Forty-nine specimens of formalin-fixed paraffin-embedded lymph nodes from patients diagnosed with cHL (37 nodular sclerosis and 12 mixed cellularity) between January 1996 and June 2005 were assessed. All patients were diagnosed and followed up in a single institution. Table 1 shows the clinical and biologic characteristics of the patients. Ten RLNs were used as controls. In addition, a validation set of 30 formalin-fixed paraffin-embedded lymph nodes from cHL patients (22 nodular sclerosis and 8 mixed cellularity) and 5 RLNs were analyzed. Finally, human HL cell lines L-428 and HD-MY-Z (nodular sclerosis) and L-1236 (mixed cellularity) were analyzed to discriminate between miRNAs expressed in the cell and those present only in the microenvironment. The cell lines were cultured in RPMI 1640 containing 20% fetal calf serum (Invitrogen, Paisley, United Kingdom).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections, as previously described.¹⁹ Briefly, paraffin sections on silane-coated slides were dewaxed and subjected to antigen retrieval (Target Retrieval Solution; Dako, Carpinteria, CA) in a microwavable pressure cooker. Primary antibodies against CD20 (L26; Dako), CD5 (NCL-CD5; Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, United Kingdom), CD30 (BerH2; Dako), and CD15 (Leu M1; Novocastra) were incubated, and the slides were counterstained in Gill hematoxylin and mounted in Pertex (Histolab, Gothenburg, Sweden).

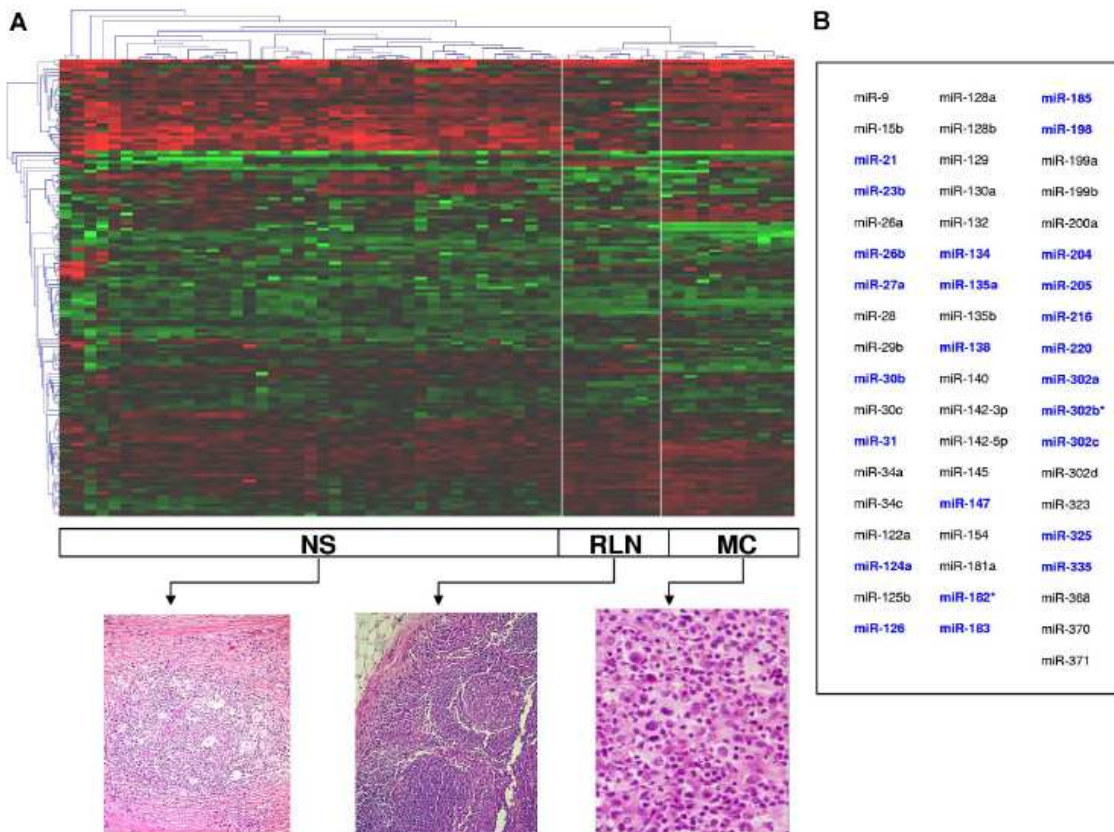


Figure 1. miRNA expression pattern in cHL. (A) Unsupervised hierarchic cluster analysis categorized 3 clusters corresponding to nodular sclerosis (NS), mixed cellularity (MC), and reactive lymph nodes (RLNs). A corresponding typical histology is shown. The data were presented as log₁₀ of relative quantification normalized in regard to global median and relative to the 10 reactive lymph node median as calibration method. (B) A set of 55 miRNAs classified all samples into NS, MC, or RLN (PAM analysis). In blue, the 25 miRNAs comprising the miRNA expression signature capable of distinguishing between cHLs and RLNs.

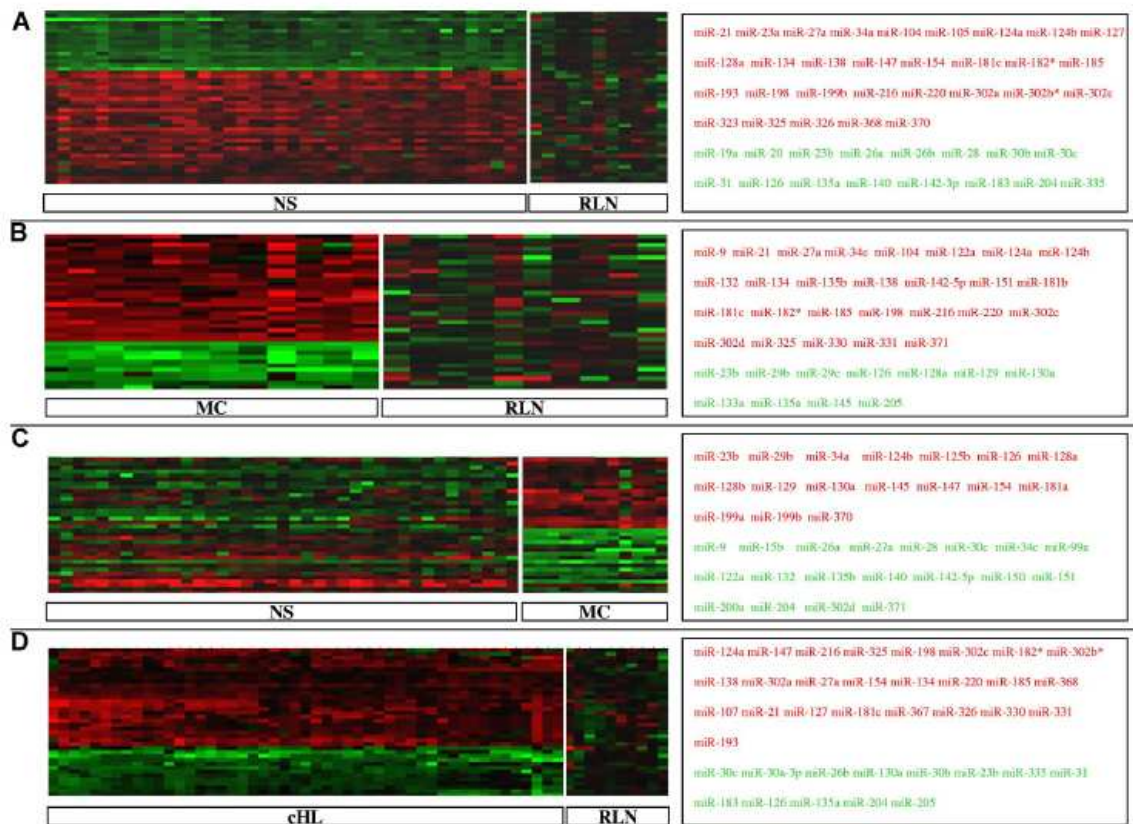


Figure 2. Differential expression of miRNAs in cHL subtypes and in reactive lymph nodes. (A) Nodular sclerosis (NS) versus reactive lymph nodes (RLN). (B) Mixed cellularity (MC) versus reactive lymph nodes. (C) NS versus MC. (D) All cHL cases (NS and MC) versus RLN. miRNAs overexpressed (in red) or underexpressed (in green) are shown in boxes (SAM analysis).

RNA extraction, reverse transcription, and real-time polymerase chain reaction (PCR) quantification

Total RNA was extracted from 49 formalin-fixed paraffin-embedded cHL lymph nodes and from 10 RLNs, using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation (Applied Biosystems, Foster City, CA) as per the manufacturer's protocol. The same methods were used for RNA extraction in the validation data set of 30 cHL lymph nodes and 5 RLNs. RNA was extracted from the 3 cell lines using Trizol total RNA isolation reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) as per the manufacturer's protocol.

cdNA was synthesized from total RNA using gene-specific primers of 156 different mature miRNAs (TaqMan MicroRNA Assay Protocol, Early Access Kit; Applied Biosystems; Table S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Real-time PCR was performed using an Applied Biosystems 7500 Sequence detection system.

miRNA analysis by chromogenic in situ hybridization

Fluorescein (FITC) 5'-labeled locked-nucleic-acid (LNA)-incorporated miRNA ribo probes for miR-21, miR-134, miR-138, and miR-155 (miR-CURY LNA detection; Exiqon, Woburn, MA) were used in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections on silane-coated slides (Vision BioSystem, Mount Waverley, Australia). Chromogenic in situ hybridization was performed in an automated platform Bond Max (Vision BioSystems). Slides were pretreated with protease 1 for 10 minutes at 37°C. A total amount of 300 μ L 25-nM probe was hybridized in 1 \times sodium chloride-sodium citrate hybridization buffer (SSC) (Innogenetics, Gent, Belgium) up to 50°C for 2 hours. We used a prediluted mouse anti-FITC antibody (Vision BioSystems) for 20 to 60 minutes followed by a biotin-free,

polymeric horseradish peroxidase (HRP)-linker antibody conjugate system (Refine Detection System; Vision BioSystems). DAB was used as a chromogen reacting for 10 minutes and hematoxylin was used as a counterstain.

EBV analysis

The presence of EBV in cHL lymph nodes was examined by in situ hybridization for EBV RNA in an automated platform BenchMark XT (EBER 1 and 2, Inform EBER; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), and real-time PCR using specific primers and probe for the highly conserved segment BamHIW of EBV.²⁰

Statistical analysis

miRNA expression data were normalized by 2 different approaches: global-median normalization and let7-a miRNA as previously described.²¹ Data were analyzed using BRB Array Tools version 3.5.0 software (Biometric Research branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health; <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) and TIGR Multiexperiment viewer version 4.0 software (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA; <http://www.tm4.org>). Hierarchic clustering was performed using average linkage and Euclidean distance. To identify miRNAs with significant differential expression between the 2 histologic subgroups and those that might be influenced by the presence of EBV, 2 multivariate permutation tests were performed: significance analysis of microarrays (SAM) and Student *t* test based on multivariate permutation (with random variance model). Differences between miRNAs were considered statistically significant if the *P* value was less than .001. The prediction analysis of microarrays (PAM) and class prediction methods (BRB Array Tools) were

Table 2. Composition of the miRNA signature of cHL

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

The putative targets shown were selected based on functional aspects (David Database) and on described gene associations (GENIG). NA indicates not applicable.

*Putative target genes identified from Mirbase and TargetScan using DAVID database and GENIG software.

†Target genes experimentally validated were identified from Tarbase.

used to determine a set of miRNAs able to classify the samples into cHL and RLNs and to differentiate between the 2 histologic subgroups. To identify functional interactions of putative target genes of miRNAs, obtained from Mirbase,²² TargetScan,²³ and Tarbase²⁴ databases, we used DAVID database²⁵ and GENIG (ALGGEN; Technical University of Catalonia, Barcelona, Spain; <http://algggen.lsi.upc.edu>).

Results

miRNA patterns in cHL patients and in RLNs

Unsupervised hierarchic clustering of the cHL and RLN samples was performed on the entire set of unfiltered data. The heat map of miRNA expression categorized 3 well-defined clusters corresponding to nodular sclerosis cHL, mixed cellularity cHL, and RLNs (Figure 1). Thirty-eight miRNAs were differentially expressed in cHL versus RLNs (Figure 2; Table S2), and a set of 55 miRNAs was able to further classify all samples into nodular sclerosis cHL, mixed cellularity cHL, or RLNs (Figure 1). A specific miRNA expression signature consisting of 25 of these 55 miRNAs precisely differentiated between cHLs and RLNs (Figure 1; Table 2). In addition, 36 miRNAs were differentially expressed in nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes (Figure 2). These findings were confirmed in the validation set of 30 cHLs and 5 RLNs (Figure S1).

Analysis of miRNA expression in human HL cell lines

cHL tumors are composed of different reactive cell types and tumor cells represent a minority. To elucidate whether different signatures might discover different tumor compositions rather than be specific

for tumor cells, we analyzed the 25-miRNA signature that discriminated between cHLs and RLNs in 3 different human HL cell lines: L-428, HD-MY-Z, and L-1236 (Figure 3). We found that 20 of the 25 miRNAs analyzed were expressed by the human HL cell lines and were therefore likely to have been expressed by the tumor cells rather than the microenvironment. The 5 miRNAs (miR-220, miR-302a, miR-302b, miR-302c, and miR-325) that were not expressed in the cell lines but were overexpressed in the cHL cases may have been expressed by the reactive microenvironment. MiR-21, miR-27a, miR-147, miR-182, miR-183, and miR-216 were the most strongly up-regulated miRNAs in the HL cell lines (Figure 3A).

Moreover, we analyzed the 36 miRNAs that were differentially expressed in the nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes and found that 32 were expressed in the cell lines; miR-122a, miR-154, miR-302d, and miR-371 were not expressed in the cell lines, suggesting differences in the reactive microenvironment. MiR-34a, miR-128b, miR-129, and miR-200a were the most strongly differentially expressed miRNAs between L-428 and HD-MY-Z nodular sclerosis HL cell lines versus L-1236 mixed cellularity HL cell line.

miRNA analysis by chromogenic in situ hybridization

To examine whether miRNAs that were more highly expressed in cHLs than in RLNs were detected preferentially in tumor or reactive cells, we analyzed 20 cHL lymph nodes using highly sensitive chromogenic in situ hybridization. We first analyzed miR-155 as a positive control, as previously described in cHL.²⁶ We observed a cytoplasmic signal in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, as well as in scattered reactive lymphocytes and

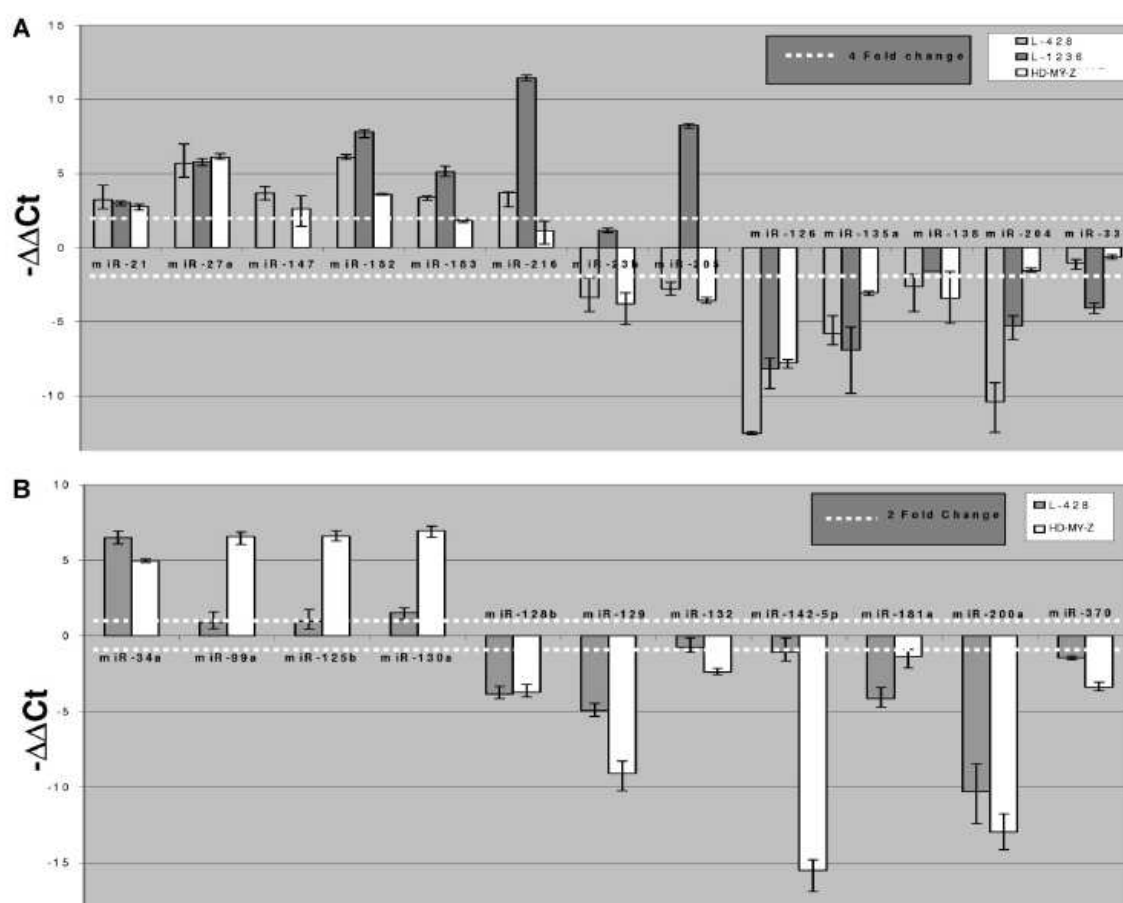


Figure 3. Analysis in human Hodgkin lymphoma (HL) cell lines: L-428 and HD-MY-Z (nodular sclerosis) and L-1236 (mixed cellularity). (A) 25-miRNA signature. This figure shows the \log_2 of fold change ($-\Delta\Delta Ct$) of the 13 miRNAs most differentially expressed in the cell lines. The dotted line indicates a 4-fold difference in expression compared with the mean of expression of reactive lymph nodes. (B) Thirty-two of the 36 miRNAs differentially expressed in lymph nodes of nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes were also differentially expressed in the cell lines. Panel B depicts only the 11 miRNAs with at least a 2-fold difference in expression between the 2 subtypes. Error bars represent SD.

activated histiocytes, as recently reported²⁷ (Figure 4). Based on functional and target analyses and on the chromosomal locations of the miRNAs (Table 2), we selected 3 miRNAs with a potential role in tumorigenesis and analyzed them by chromogenic in situ hybridization in the 20 cases: miR-21 (validated target *PTEN*, encoded in 17q32.2²⁸); miR-134 (putative target *J-chain*, encoded in 14q32.31²⁸); and miR-138 (putative target *PU.1*, encoded in 7q32.2²⁹). In all 20 cases, a cytoplasmic signal was observed in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, and we also observed a certain degree of miRNA expression in surrounding lymphocytes. Moreover, a nuclear signal was identified in some reactive tumor-infiltrating lymphocytes for miR-21 and miR-138 (Figure 4).

Effect of EBV infection on miRNA expression in cHL

Ten miRNAs were differentially expressed in EBV⁺ cHL compared with EBV⁻ cHL. In EBV⁺ cases, miR-96, miR-128a, miR-128b, miR-129, and miR-205 were underexpressed and miR-28, miR-130b, miR-132, miR-140, and miR-330 were overexpressed (Figure 5). In the subgroup of nodular sclerosis cHL, 3 miRNAs (miR-96, miR-128a, and miR-128b) were significantly

underexpressed in EBV⁺ cHL compared with EBV⁻ cHL. All but one of the mixed cellularity cHLs were EBV⁺.

Association between miRNA expression and clinical parameters

We analyzed a possible association of miRNA expression with clinical and biologic patient characteristics: age, sex, B symptoms, bulky mass, anemia, leukocytosis, lymphocytopenia, hypoalbuminemia, ESR, LDH level, β -2-microglobulin level, extranodal involvement, stage, Hasenclever index, positivity for CD15, positivity for CD20, and density of tumoral cells and T lymphocytes in the tumor microenvironment. We found that miR-138 was overexpressed in Ann Arbor stage I-II disease ($P = .003$), while miR-328 was overexpressed in Ann Arbor stage III-IV disease ($P = .004$). To further investigate this possible association between miRNA expression and disease stage, we analyzed the expression of miR-138 and miR-328 in 30 additional patients from the validation data set (18 stage I-II; 12 stage III-IV). When results for both the original set and the validation set were combined, we found that miR-138 was overexpressed in stage I-II disease but not in stage III-IV

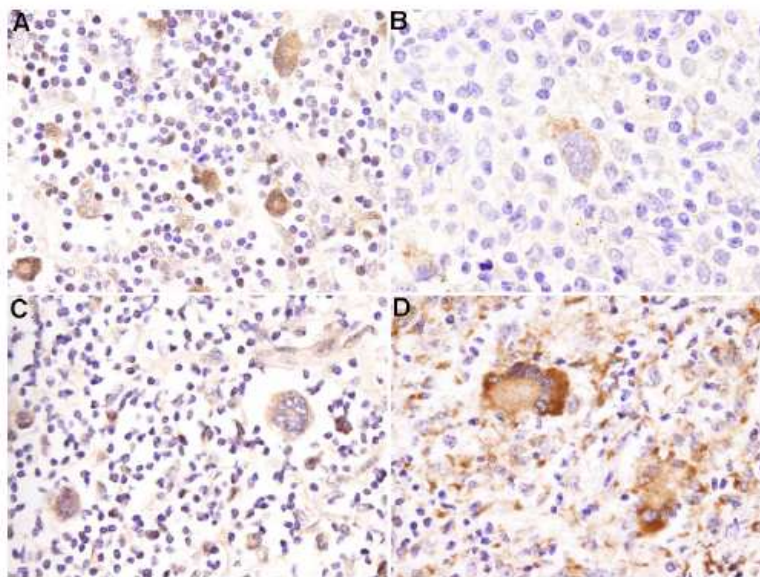


Figure 4. Chromogenic in situ hybridization of cHL cases. Cytoplasmic expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of miR-21 (A), miR-134 (B), miR-138 (C), and miR-155 (D). miR-155 was used as positive control of the hybridization technique. (Microscope, Olympus BX51 [Olympus, Center Valley, PA]; camera, Olympus DP70; lens, UPlanFI 40 \times /0.75; software, Olympus DP Controller.)

($P = .001$; Figure S2), but no association was observed between miR-328 expression and disease stage.

Discussion

Prior studies have shown that a small subset of miRNAs may define tumor entities better than microarray expression data from thousands of messenger RNAs.³⁰ In the present study, we have characterized for the first time a 25-miRNA signature that can differentiate between cHLs and RLNs. In addition, a small number of miRNAs were differentially expressed in mixed cellularity and nodular sclerosis subtypes. Finally, overexpression of one miRNA (miR-138) was related with Ann Arbor stage I-II cHL. miR-138 has been reported to be overexpressed in other tumors,³¹ where it seems to be associated with an undifferentiated state.³²

The differential miRNA expression observed between cHLs and RLNs may be explained by cytogenetic changes in the Hodgkin

and Reed-Sternberg cells. The genomic region 17q has previously been associated with frequent gains in cHL,²⁸ and miR-21 is encoded in this chromosomal region (Table 2). Other previously described chromosomal gains in cHL²⁸ include 2p, where miR-216 is encoded, 22q, where miR-185 is encoded, and 14q, where miR-134 is encoded. One of the most frequent losses involves 4q, where miR-302a, miR-302b, and miR-302c are encoded,^{28,33} and 3p, where miR-135a is encoded.³⁴

The analysis of the 25-miRNAs cHL signature in cell lines showed a set of strongly up-regulated miRNAs (miR-21, miR-27a, miR-147, miR-182, and miR-216) and a set of down-regulated miRNAs (miR-126, miR-135a, and miR-204) supporting our observations in patient samples. However, other miRNAs showed a different expression pattern in the patient samples compared with the cell lines. Those differences could be due to the expression of miRNAs by the reactive microenvironment in patient samples or to the molecular and chromosomal alterations of cell lines produced by the immortalization process.³⁵

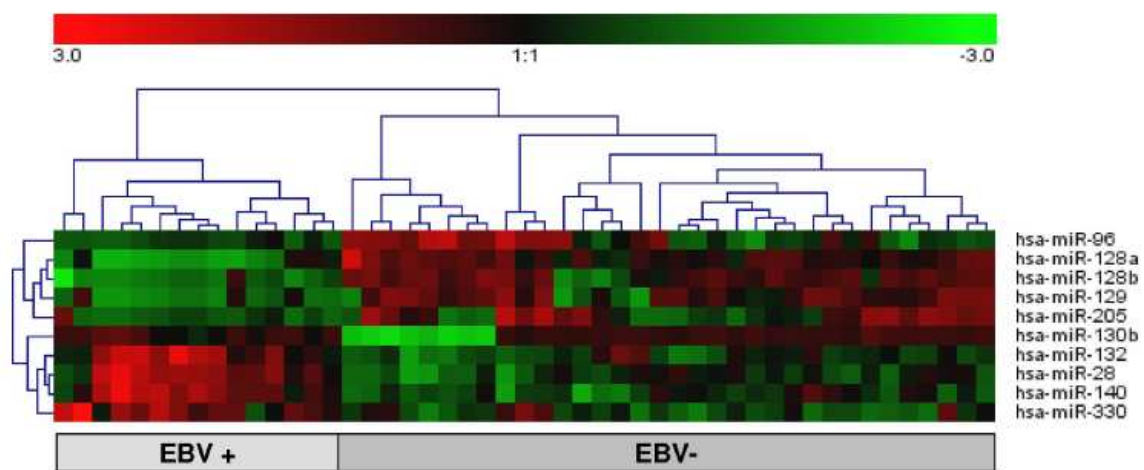


Figure 5. MiRNAs differentially expressed in EBV+ versus EBV- cases.

Chromogenic in situ hybridization showed a preferential expression of miR-21, miR-134, and miR-138 in the cytoplasm of Hodgkin and Reed-Sternberg cells, suggesting that miRNA silencing may be biologically relevant in cHL tumor cells; moreover, the miRNA expression observed in lymphocytes provides some evidence that miRNA expression in the tumor microenvironment is also important to the biology and clinical behavior of cHL.^{13,36,37} The cHL tumor microenvironment differs among the histologic subtypes, and in the present study, a differential pattern of miRNA expression was observed in mixed cellularity and nodular sclerosis subtypes. The subsequent analysis of cell lines revealed that some miRNAs were also differentially expressed in the Hodgkin and Reed-Sternberg cells in the 2 histologic subtypes. Although prior studies had shown that miR-155 is overexpressed in cHL,²⁶ the molecular signature in the present study does not include miR-155. However, chromogenic in situ hybridization showed that miR-155 was constantly expressed in atypical cells in all the cHL cases analyzed as well as in reactive lymphocytes and activated macrophages.^{26,27}

Since miRNAs differentially expressed in cHL cases target putative and validated genes involved in survival, apoptosis, and B-cell functions, our findings can provide the basis for a better understanding of the complex mechanisms of transformation of a normal B cell into a tumor cell. One of the most striking features of cHL tumor cells is their acquisition of survival advantages while largely lacking expression of most of the B cell-associated genes.^{14,38,39} miR-21, which was overexpressed both in cHL lymph nodes and in the human HL cell lines, has been reported to favor cell survival by indirect up-regulation of antiapoptotic genes.⁴⁰⁻⁴⁴ cHL is a neoplasm of B cells characterized by an incomplete B-cell phenotype, due to down-regulation of some transcription factors crucial to the full development of a mature B-cell program.¹⁴ The mechanisms causing down-regulation of the transcriptional program in cHL cells are not totally understood, but some epigenetic events are proving to be important in the silencing of B-cell genes.⁴⁵ miRNAs may be a new regulatory epigenetic event, with an important role regulating the translation of a number of different genes in the complicated regulatory network that leads normal B cells from the germinal center⁴⁶ to Hodgkin and Reed-Sternberg cells.

Prior reports had suggested that virus miRNAs can play an important role in the host-pathogen interaction networks. Moreover, viruses might trigger changes in the host miRNA expression pattern, thus favoring cancer development.^{12,47,48} We identified a subset of 10 host miRNAs whose expression was influenced by the presence of EBV. The effect of EBV on host miRNAs might explain the reported association of EBV with the clinical course of cHL patients.⁴⁹ Interestingly, only one of the miRNAs differentially expressed in EBV⁺ cases was included in the 25-miRNA expression signature differentiating cHL from RLN, leading us to speculate that EBV is not a primary transforming event in cHL, a

concept that is also supported by the fact that the majority of the cHL cases were EBV⁻.⁴⁹

In summary, cHLs express a characteristic miRNA signature different from that of normal RLNs, with a small number of miRNAs differentially expressed in mixed cellularity and nodular sclerosis and one differentially expressed in early- and advanced-stage disease. Some of these miRNAs were expressed in Hodgkin and Reed-Sternberg cells but not in reactive cells. In addition, EBV influences host miRNA expression in cHL. These findings suggest that miRNAs may play an important role in the biology of cHL, and they may be useful in the development of therapies targeting miRNAs in tumor cells in cHL patients.^{40,50}

Acknowledgments

The authors are grateful to Isabel Sanchez and Misael Nolasco, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, for providing the 3 cell lines; to Ingrid Lopez and Dolors Fuster for their excellent histology work; to Silvia Pairet for technical assistance; to Dr Beatriz Zafrá from the Spanish Division of Menarini Diagnostics for her support in the situ hybridization development; to Dr Eva Bandres for her support in the data analysis; and to Renee O'Brate for her assistance in writing the paper.

This work was supported in part by RETICS 07 from Instituto de Salud Carlos III, by Program Project grants (BM-05/219) from La Caixa, and by FISS 050209 and FISS 060087 from the Spanish Ministry of Public Health. O.B. is a fellow supported by the Instituto de Salud Carlos III.

Authorship

Contribution: A.N. designed and performed the research, analyzed the data, and wrote the paper; A.G. designed the research, selected cases, analyzed the clinical data, and wrote the paper; A.M. designed and performed the research, analyzed the data, and wrote the paper; A.U.-I. and M.M. designed the research, analyzed the data, and wrote the paper; A.P. and O.B. performed the research and analyzed the data; B.G. analyzed the data and performed the statistical analysis; P.A. and A.L.-G. analyzed the clinical data; R.A. analyzed the data; and E.M. wrote the paper.

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

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

References

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C-elegans heterochronic gene Lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to Lin-14. *Cell*. 1993;75:843-854.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschli T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294:853-858.
- Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*. 2005;37:766-770.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:858-862.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-297.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5:522-531.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs: microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:259-269.
- Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev*. 2006;16:4-9.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435:828-833.
- Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. 2006;25:6188-6196.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, 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;101:2999-3004.
- Yeung ML, Bennasser Y, Myers TG, et al. Changes in microRNA expression profiles in HIV-1-transfected human cells. *Retrovirology*. 2005;2:81-88.

13. Sanchez-Aguilera A, Montalban C, de la Cueva P, et al. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;108:662-668.
14. Kuppers R, Brauning A. Reprogramming of the tumour B-cell phenotype in Hodgkin lymphoma. *Trends Immunol*. 2006;27:203-205.
15. Jaffe ES. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001.
16. Kim DN, Chae HS, Oh ST, et al. Expression of viral microRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Virol*. 2007;81:1033-1036.
17. Jopling CL, Yi MK, Lancaster AM, Lemon SM, Samow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science*. 2005;309:1577-1581.
18. Triboulet R, Mari B, Lin YL, et al. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*. 2007;315:1579-1582.
19. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2006;108:2957-2964.
20. Ryan JL, Fan H, Glaser SL, et al. Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *J Mol Diagn*. 2004;6:378-385.
21. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, et al. Identification by real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer*. 2006;5:29-38.
22. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucl Acids Res*. 2006;34:D140-D144.
23. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115:787-798.
24. Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG. TarBase: a comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *RNA*. 2006;12:192-197.
25. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*. 2003;4:3-13.
26. Kluiver J, Poppema S, de JD, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*. 2005;207:243-249.
27. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:1604-1609.
28. Chui DT, Hammond D, Baird M, et al. Classical Hodgkin lymphoma is associated with frequent gains of 17q. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;38:126-136.
29. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11755-11760.
30. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435:834-838.
31. He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:19075-19080.
32. Choong ML, Yang HH, McNiece I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol*. 2007;35:551-564.
33. Kluiver J, Kok K, Pfeil I, et al. Global correlation of genome and transcriptome changes in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*. 2007;25:21-29.
34. Johansson B, Billstrom R, Kristofferson U, et al. Deletion of chromosome arm 3p in hematologic malignancies. *Leukemia*. 1997;11:1207-1213.
35. Leupin N, Kuhn A, Hugli B, et al. Gene expression profiling reveals consistent differences between clinical samples of human leukaemias and their model cell lines. *Br J Haematol*. 2006;135:520-523.
36. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004;351:2159-2169.
37. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood*. 2005;105:1851-1861.
38. Martin-Subero JI, Klapper W, Sotnikova A, et al. Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*. 2006;66:10332-10338.
39. Schermer I, Brauning A, Klein U, et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;101:1505-1512.
40. Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007;26:2799-2803.
41. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005;65:6029-6033.
42. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133:647-658.
43. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. Prepublished October 29, 2007 as DOI: 10.1038/sj.onc.1210856.
44. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2008;283:1026-1033.
45. Ushmorov A, Ritz O, Hummel M, et al. Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood*. 2004;104:3326-3334.
46. Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, et al. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2007;121:1156-1161.
47. Sarnow P, Jopling CL, Norman KL, Schutz S, Wehner KA. MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4:651-659.
48. Pfeffer S, Voignot O. Viruses, microRNAs and cancer. *Oncogene*. 2006;25:6211-6219.
49. Jarrett RF, Stark GL, White J, et al. Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood*. 2005;106:2444-2451.
50. Wurdinger T, Costa FF. Molecular therapy in the microRNA era. *Pharmacogenomics J*. 2007;7:297-304.

DISCUSSIÓ

5- DISCUSSIÓ

Patró d'expressió de microRNAs en les SMD

Les SMD són un conjunt de malalties caracteritzades per una maduració ineficaç de les cèl·lules hematopoiètiques i una freqüent transformació a LMA, ja que els microRNA han estat relacionats amb la regulació de la diferenciació, la maduració i la identitat cel·lular, proposem que els microRNAs tenen un paper important en el desenvolupament de la malaltia així com en el la transformació d'alguns pacients a LMA. Ara per ara no existeix cap marcador molecular capaç de detectar una SMD precoç ni de predicció d'aquesta transformació, per tant l'expressió de microRNAs com a eina de diagnòstic i predicció podrien ser de gran ajuda.

En l'anàlisi de microRNAs en les SMD hem pogut demostrar com alguns dels microRNAs previament seleccionats poden donar diferències d'expressió significatives tal com ens plantejarem inicialment. Les SMD estan caracteritzades per una hematopoiesis ineficaç i una freqüent transformació a LMA. Els mecanismes implicats en la patogènia de la malaltia i la seva progressió són desconeguts. Se sap que les stem cell en les SMD no tenen capacitat per auto renovar-se i diferenciar-se potser degut a una interacció imperfecta entre els progenitors hematopoiètics i les cèl·lules estromals del moll de l'os.

En aquest estudi no s'ha fet selecció de cèl·lules CD34 positives ja que la majoria dels microRNAs seleccionats es trobaven sobreexpressats en aquestes cèl·lules. Un grup de microRNAs: miR-17-3p, miR-17-5p i miR-18a pertanyen al cluster miR-17-92, que s'ha vist sobreexpressat en diferents tipus de tumors i que actuen promovent la proliferació. Aquest cluster pot tenir un paper important en l'increment de la proliferació i l'acumulació de cèl·lules immadures durant la progressió de les SMD, mitjançant la regulació de E2F1.[138;186;187]

Per altra banda el microRNA miR-21 conegut pel seu efecte antiapoptòtic també s'ha vist relacionat amb el cluster miR-17-92 en la transformació. [188;189] Antecedents sobre l'estudi del microRNA miR-150 indiquen que en SMD poden regular l'expressió de MYB; factor de transcripció important en la regulació hematopoiètica, en aquest cas el microRNA diferencialment expressat seria miR-155, que té com una de les seves dianes predites el mateix gen; pertant podria estar regulant també l'expressió d'aquest.[190] miR-146 podria considerar-se un microRNA important en aquells pacients amb deleció de 5q ja que és un microRNA que es troba altament expressat en aquells

pacients amb SMD 5q negatius. El fet que aquest microRNA només sigui diferent en els casos 5q negatius i no en les SMD en general respecte els controls; podria explicar-se pel fet que en aquests casos existeix un microambient diferent. Els pacients amb una SMD tenen una resposta immune deficiente que es manifesta amb un increment d'infeccions bacterianes, respostes autoimmunes i una elevada incidència a patir una patologia limfoide. miR-146 juga un paper important en la immunitat, regulant la resposta immflamatòria aguda, després de reconèixer l'antígen mitjançant els TLR (Toll-like receptors). L'expressió de miR-146 podria estar induïda per lligands bacterians o IL-1 i TNF. Les molècules IRAK 1 i TRAF 1 són claus en la regulació de la via TLR-IL-1 β i són dianes directes d'aquest microRNA.[191]

En resum hem trobat un conjunt de microRNAs diferencialment expressats entre els pacients amb SMD i els controls sans; per altra banda també trobem algun microRNA implicat en la progressió de la malaltia cap a una LMA ja que sabem que aquests microRNA tenen com a dianes gens implicats en la diferenciació i pertant els microRNAs actuarien bloquejant aquesta diferenciació. No hem trobat una signatura de microRNAs que ens permeti fer un pronòstic o que es pugui correlacionar amb la citogenètica dels pacients amb SMD ja que per aconseguir-ho necessariem fer un estudi amb un gran nombre de pacients degut a la heterogeneïtat que trobem dins les SMD.

Patró d'expressió de microRNAs en el Limfoma de Hodgkin

Estudis previs han mostrat que un petit conjunt de microRNAs pot definir diferents entitats tumorals millor que un microarray d'expressió que analitzi centenars d'RNAs missatgers.[192] En l'anàlisi dels microRNAs al limfoma de Hodgkin, hem caracteritzat per primera vegada una signatura d'expressió de 25 microRNAs que són capaços de diferenciar entre limfoma de Hodgkin clàssic i ganglis reactius. A més hem mostrat un petit grup de microRNAs que estava diferencialment expressat entre els subtipus de cel·lularitat mixta i esclerosi nodular. I finalment hem demostrat com un microRNA (miR-138) es troba relacionat amb l'estadiatge d'Ann Arbor I-II en el limfoma de Hodgkin clàssic. Aquest microRNA s'ha vist sobreexpressat en altres tumors i sembla estar associat amb un estadiatge més indiferenciat.[193;194]

L'expressió diferencial de microRNAs observada entre LH i els ganglis reactius es pot explicar en alguns casos per canvis citogenètics a les cèl·lules H/RS. La regió 17q està associada amb freqüents guanys en limfoma de Hodgkin clàssic,[195] on trobem miR-21 codificat. Altres guanys cromosòmics que han estat descrits al LH inclouen 2p, 22q, 14q i pèrdues com 4q i 3p.[196-198]

L'anàlisi dels casos per hibridació in situ va mostrar una expressió preferencial de miR-21, miR-134 i miR-138 al citoplasma de les cèl·lules de H/RS. Això suggereix, que el silenciament de microRNAs pot ser biològicament rellevant a les cèl·lules tumorals en el LH. També podem observar certa senyal en limfòcits B acompanyants, cosa que indica que l'expressió en el microambient tumoral és important en la biologia d'alguns tipus de limfoma i en la seva progressió clínica.[199-201]

Al limfoma de Hodgkin clàssic el microambient tumoral difereix entre els diferents subtipus histològics, i en aquest estudi hem trobat un patró d'expressió de microRNAs diferent en el subtipus cel·lularitat mixta i esclerosi nodular. L'anàlisi en les línies cel·lulars va mostrar que alguns dels microRNAs diferencialment expressats en els dos subtipus estaven també diferencialment expressats en les diferents línies cel·lulars, provinents d'esclerosi nodular o cel·lularitat mixta. Els microRNAs que s'expressen diferencialment en els casos de LH clàssic, tenen com a possibles dianes, gens implicats en la supervivència, l'apoptosis i gens relacionats amb les funcions de les cèl·lules B entre d'altres. Pertant la nostra aportació pot proveir d'una base per comprendre millor el complex mecanisme de transformacions que sofreix una cèl·lula B normal cap a una cèl·lula

tumoral. Una de les característiques més importants de les cèl·lules tumorals del LH és l'adquisició d'avantatges de supervivència, alhora que es perd l'expressió de la majoria de gens associats a cèl·lules B.[202;203] El microRNA miR-21 es troba sobreexpressats tant als ganglis de Hodgkin com en les línies cel·lulars humanes de LH i havia estat prèviament descrit com a activador de la supervivència cel·lular regulant indirectament gens antiapoptòtics.[204-206]

En el Linfoma de Hodgkin es produeix la regulació negativa d'alguns factors de transcripció pel desenvolupament complet d'una cèl·lula B; aquesta regulació ve produïda per alguns mecanismes epigenètics i és per això que els microRNAs podrien estar jugant un paper important com a reguladors epigenètics en aquest procés. L'expressió diferencial en el LH clàssic pot ser explicada en alguns casos per recurrents inestabilitats cromosòmiques, com els freqüents guanys cromosòmics en miR-21, miR-134, miR-185 i les pèrdues com en miR-135a, miR-302a, miR-miR-302b i miR-miR-302c.[197;198;207]

Treballs previs havien suggerit que els microRNAs del virus de VEB podien jugar un paper important a les xarxes d'interacció entre hoste i patògen. A més, els virus podrien provocar canvis en els patrons d'expressió de microRNAs, i d'aquesta forma afavorir el desenvolupament del càncer.[208-210] En aquest estudi es van identificar un conjunt de 10 microRNAs de l'hoste, dels quals es veia l'expressió influïda per la presència o absència del VEB. Un d'ells, miR-96, té dianes predites involucrades en l'activació de la via de NFkB i en la inhibició de vies d'apoptosis. L'efecte del VEB en els microRNAs de l'hoste podria explicar l'associació vista entre el VEB i el curs clínic dels pacients amb limfoma de Hodgkin. De forma interessant, només un dels microRNAs que estaven diferencialment expressats entre els casos VEB+ i els VEB- estava inclòs en la firma de 25 microRNAs, que diferenciava LHc dels ganglis reactius. Aquest fet ens porta a especular que el VEB no és un element de transformació primari a la limfoma de Hodgkin clàssic, concepte que està també recolzat pel fet que la majoria dels casos de LH clàssic són EBV-.[211]

Estudis previs havien mostrat que miR-155, el qual té PU.1 com a diana gènica predita, està sobreexpressat en limfoma de Hodgkin.[170] Malgrat que la signatura de microRNAs de LH que hem trobat, no inclou a miR-155, la hibridació in situ va mostrar que miR-155 està sobreexpressat a les cèl·lules atípiques, així com als limfòcits reactius i els macròfags activats.[212] La raó per la qual

miR-155 no apareix en la nostra signatura, podria ser degut a que no s'expressa en tots els casos de LH i també que podem trobar-lo sobreexpressat al microambient reactiu tumoral.

Trobem un patró d'expressió de microRNAs compartit tant pels casos d'esclerosi nodular, com pels casos de cel·lularitat mixta, cosa que podria suggerir que ambdós subtipus histològics poden representar diferents aspectes de l'evolució de la mateixa malaltia.

En resum, la limfoma de Hodgkin expressa un patró de microRNAs característic diferent dels ganglis reactius normals, amb un subconjunt de microRNAs diferencialment expressats entre els dos subtipus histològics de cel·lularitat mixta i esclerosi nodular i un microRNA diferencialment expressat als estadis inicials de la malaltia en comparació amb els més avançats. Alguns d'aquests microRNAs estaven expressats a les cèl·lules d'Hodgkin i de Reed-Sternberg, però no a les cèl·lules reactives acompanyants. A més, el VEB influeix en el patró d'expressió dels microRNAs de l'hoste en el LH.

Discussió conjunta: anàlisi de l'expressió de microRNAs en dos models tumorals diferents.

L'objectiu principal de l'estudi va ser analitzar el paper que juguen els microRNAs en dos models tumorals diferents: SMD i LH. Aquestes dues patologies són ben diferents ja que mentre que les SMD són expansions clonals d'origen mieloide; el LH té un origen clonal derivat de cèl·lules B en les quals no s'ha produït un reordenament dels gens de les Ig i aquestes cèl·lules no han estat capaces d'entrar en apoptosi. De totes maneres en ambdós models tumorals podem observar la sobreexpressió de miR-21, un microRNA altament relacionat amb processos antiapoptòtics i pertant una vegada més quedaria patent la importància que pot tenir aquest microRNA a l'hora de regular aquelles cèl·lules que haurien d'entrar en apoptosi però no ho fan.

També trobem diferències en l'expressió del cluster miR-17-92; aquest cluster es troba codificat a la regió 13q31, sovint amplificada en limfomes de cèl·lules B: limfoma difús de cèl·lules grans, limfoma del mantell o limfoma fol·licular. En canvi en el LH és una regió que es pot perdre fàcilment i aquest fet podria explicar el perquè aquesta patologia sigui menys agressiva que altres tipus de limfoma.

En ambdós models tant diferents veiem com el microambient juga un paper important, sobretot en el LH que és un camp molt més estudiat que no pas en el cas de les SMD on es creu que les cèl·lules estromals podrien afectar el comportament de les cèl·lules hematopoiètiques, però ara per ara és un camp on queda molt per descobrir.

CONCLUSIONS

6- CONCLUSIONS

SMD

1. Una firma de 5 microRNAs relacionats amb el procés d'hematopoiesis normal (miR- 17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-15a i miR-21) caracteritza les Síndromes Mielodisplàsiques tan a nivell de sang perifèrica com de médula òssea.
2. Alts nivells de miR-15a en médula òssea i baixos nivells de miR-16 en sang perifèrica caracteritzen als pacients amb síndrome mielodisplàsica amb IPSS d'alt risc.
3. miR-181a i miR-222 presenten un patró d'expressió esgraonat creixent en médula òssea desde els controls als pacients amb una leucèmia mielodisplàsica aguda post- mielodisplàsia.
4. L'expressió de miR-146 està sobreexpressat en el microambient dels pacients 5q-.

LH

5. Una firma de 25 microRNAs caracteritza el limfoma de Hodgkin clàssic.
6. Els microRNAs permeten discriminar entre LH esclerosis nodular i LH cel·lularitat mixta.
7. miR-21, miR-134 i miR-138 són expressats de forma específica en les cèl·lules de Hodgkin/Reed Sternberg presents en els ganglis dels pacients amb LH.
8. De la signatura de 25 microRNAs de LHcl majoria, 20, s'expressen en les cèl·lules tumorals. Mentre que 5, miR-220, miR-302a, miR-302b, miR-302c i miR-325, es troben sobreexpressats exclusivament per les cèl·lules del microambient rector tumoral.
9. miR-34a, miR-99a, miR-125b, miR-130a, miR-128b, miR-129, miR-132, miR-142-5p, miR-181a, miR-200a i miR-370 són microRNAs que estan diferencialment expressats en les cèl·lules de H/RS esclerosis nodular respecte a les cèl·lules de H/RS cel·lularitat mixta.
10. L'anàlisi per hibridació in situ i de les línies cel·lulars ens confirmen la importància de miR-21 en el limfoma de Hodgkin.
11. La presència del VEB afecta al patró d'expressió de microRNAs humans dels ganglis afectes de LH.

CONCLUSIONS CONJUNTES

12. Existeix la desregulació d'alguns microRNAs comuns en SMD i LH, tot i ser dues patologies tant diferents.
13. En ambdues patologies el microambient juga un paper clau, i els microRNAs apareixen afectats no tan sols en les cèl·lules malignes, sinó també en les cèl·lules acompanyants.

ANNEXES

7- ANNEXES

7.1 Participació a Congressos dels treballs presentats

Congressos Nacionals:

Autors: Navarro A, Gaya A, Urbano-Ispizua A, **Pons A**, Gel B, Granell M, Artells R, Jansa S, Marínez C, López-Guillermo, Montserrat E y Monzo M.

Títol: Análisis de la expresión de microRNA en el linfoma de Hodgkin (LH).

Tipus de participació: Oral

Congrés: XLVIII Reunión Nacional de la AEHH

Lloc de Celebració: Granada

Data: 26-28 d'octubre del 2006

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

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

Tipus de participació: Pòster

Congrés: ASEICA

Lloc de Celebració: Las Palmas de Gran Canaria

Data: 10-12 de maig del 2007

Autors: Navarro A, Gaya A, Martínez A, Urbano-Ispizua A, **Pons A**, Balague O, Gel B, Abrisqueta P, López-Guillermo A, Artells R, Montserrat E, Monzó M.

Títol: Análisis de la expresión in-situ de microRNAs en células de Hodgkin y Reed-Sternberg y en el microambiente no tumoral en linfoma de Hodgkin.

Tipus de participació: Oral

Congrés: AEHH

Lloc de Celebració: Pamplona

Data: 25-27 d'octubre del 2007

Autors: **A. Pons**, B. Nomdedeu, A. Navarro, A. Gaya, S. Pairet, M. Granell, S. Valera, B.Gel, E. Montserrat, M. Monzo.

Títol: Expressió de microRNA en pacients afectes d'una Síndrome Mielodisplàsica.

Tipus de participació: Oral

Congrés: AEHH

Lloc de Celebració: Murcia

Data: 23-25 d'octubre del 2008

Congressos Europeus:

Autors: Navarro A, Gaya A, **Pons A**, Abrisqueta P, Gel B, Martínez A, López-Guillermo A, Martínez C, Granell M, Artells R, Jansa S, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Monzo M.

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

Tipus de participació: Oral

Congrés: EHA

Lloc de Celebració: Viena

Data: 7-10 de juny del 2007

Congressos Americans:

Autors: Navarro A, Gaya A, **Pons A**, Abrisqueta P, Gel B, Martínez A, Lopez-Guillermo A, Martínez C, Granell M, Artells R, Jansa S, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Monzo M.

Títol: Analysis of microRNA Patterns in Hodgkin's Lymphoma (HL).

Tipus de participació: Oral

Congrés: ASH

Lloc de Celebració: Orlando

Data: 9-11 de desembre del 2006

Autors: A. Navarro, A. Martínez, O. Balagué, A. Gaya, A. **Pons, A.** Urbano-Ispizua, E. Montserrat, M. Monzo.

Títol: MicroRNA Analysis by In Situ Hibridization in Hodgkin Lymphoma.

Tipus de participació: Pòster

Congrés: ASH

Lloc de Celebració: Atlanta

Data: 8-11 de desembre del 2007

Autors: **A. Pons**, B. Nomdedeu, A. Navarro, A. Gaya, S. Pairet, M. Granell, S. Valera, B. Gel, E. Montserrat, M. Monzo.

Títol: Hematopoietic miRNAs Expression in Myelodysplastic Syndromes.

Tipus de participació: Pòster

Congrés: ASH

Lloc de Celebració: San Francisco

Data: 8-11 de desembre del 2008

7.2 Altres articles relacionats amb el tema de la tesis en els que he col·laborat

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

Autors: Alfons Navarro, Tania Diaz, Antonio Martinez, Anna Gaya, **Aina Pons** et al.

Revista: Blood

Any: Sep 2009

7.3 Altres articles no relacionats amb el tema de la tesis en els que he col·laborat

Títol: *Common variants in NLRP2 and NLRP3 genes are strong prognostic factors for the outcome of HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation*

Autors: Miquel Granell, Alvaro Urbano-Ispizua, **Aina Pons** et al.

Revista: Blood

Any: Sep 2008

Títol: *Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesions*

Autors: Ramírez N, Bandrés E, Navarro A, **Pons A** et al.

Revista: European Journal Oncology

Any: Sep 2008

BIBLIOGRAFIA

8- BIBLIOGRAFIA

1. J.M.Bennett, D.Catovsky, M.T.Daniel, G.Flandrin, D.A.Galton, H.R.Gralnick, C.Sultan, Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes, *Br.J.Haematol.*, (1982) 189-199.
2. D.P.Steensma, J.M.Bennett, The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment, *Mayo Clin.Proc.*, (2006) 104-130.
3. H.T.Nishino, C.C.Chang, Myelodysplastic syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis, *Arch.Pathol.Lab Med.*, (2005) 1299-1310.
4. D.V.Catenacci, G.J.Schiller, Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review, *Blood Rev.*, (2005) 301-319.
5. H.Nilsson-Ehle, R.Jagenburg, S.Landahl, A.Svanborg, Blood haemoglobin declines in the elderly: implications for reference intervals from age 70 to 88, *Eur.J.Haematol.*, (2000) 297-305.
6. W.C.Moloney, Radiogenic leukemia revisited, *Blood*, (1987) 905-908.
7. N.Mauritzson, M.Albin, L.Rylander, R.Billstrom, T.Ahlgren, Z.Mikoczy, J.Bjork, U.Stromberg, P.G.Nilsson, F.Mitelman, L.Hagmar, B.Johansson, Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001, *Leukemia*, (2002) 2366-2378.
8. J.Pedersen-Bjergaard, D.H.Christiansen, M.K.Andersen, F.Skovby, Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities, *Leukemia*, (2002) 2177-2184.
9. J.O.Armitage, P.P.Carbone, J.M.Connors, A.Levine, J.M.Bennett, S.Kroll, Treatment-related myelodysplasia and acute leukemia in non-Hodgkin's lymphoma patients, *J.Clin.Oncol.*, (2003) 897-906.
10. Z.Qian, A.A.Fernald, L.A.Godley, R.A.Larson, M.M.Le Beau, Expression profiling of CD34+ hematopoietic stem/ progenitor cells reveals distinct subtypes of therapy-related acute myeloid leukemia, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (2002) 14925-14930.
11. L.B.Travis, C.Y.Li, Z.N.Zhang, D.G.Li, S.N.Yin, W.H.Chow, G.L.Li, M.Dosemeci, W.Blot, J.F.Fraumeni, Jr., ., Hematopoietic malignancies and related disorders among benzene-exposed workers in China, *Leuk.Lymphoma*, (1994) 91-102.
12. S.N.Yin, R.B.Hayes, M.S.Linet, G.L.Li, M.Dosemeci, L.B.Travis, Z.N.Zhang, D.G.Li, W.H.Chow, S.Wacholder, W.J.Blot, An expanded cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China. Benzene Study Group, *Environ.Health Perspect.*, (1996) 1339-1341.
13. M.T.Smith, L.Zhang, M.Jeng, Y.Wang, W.Guo, P.Duramad, A.E.Hubbard, G.Hofstadler, N.T.Holland, Hydroquinone, a benzene metabolite, increases the level of aneusomy of chromosomes 7 and 8 in human CD34-positive blood progenitor cells, *Carcinogenesis*, (2000) 1485-1490.

14. S.B.Marley, J.L.Lewis, R.J.Davidson, I.A.Roberts, I.Dokal, J.M.Goldman, M.Y.Gordon, Evidence for a continuous decline in haemopoietic cell function from birth: application to evaluating bone marrow failure in children, *Br.J.Haematol.*, (1999) 162-166.
15. Z.G.Van, Genetic control of stem cells: implications for aging, *Int.J.Hematol.*, (2003) 29-36.
16. Y.Sauntharajah, R.Nakamura, J.M.Nam, J.Robyn, F.Loberiza, J.P.Maciejewski, T.Simonis, J.Molldrem, N.S.Young, A.J.Barrett, HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome, *Blood*, (2002) 1570-1574.
17. J.M.Bennett, D.Catovsky, M.T.Daniel, G.Flandrin, D.A.Galton, H.R.Gralnick, C.Sultan, Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes, *Br.J.Haematol.*, (1982) 189-199.
18. P.Greenberg, C.Cox, M.M.LeBeau, P.Fenaux, P.Morel, G.Sanz, M.Sanz, T.Vallespi, T.Hamblin, D.Oscier, K.Ohyashiki, K.Toyama, C.Aul, G.Mufti, J.Bennett, International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes, *Blood*, (1997) 2079-2088.
19. J.W.Vardiman, N.L.Harris, R.D.Bruning, The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms, *Blood*, (2002) 2292-2302.
20. J.M.Bennett, D.Catovsky, M.T.Daniel, G.Flandrin, D.A.Galton, H.Gralnick, C.Sultan, C.Cox, The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group, *Br.J.Haematol.*, (1994) 746-754.
21. U.Germing, N.Gattermann, H.Minning, A.Heyll, C.Aul, Problems in the classification of CMML--dysplastic versus proliferative type, *Leuk.Res.*, (1998) 871-878.
22. F.Onida, H.M.Kantarjian, T.L.Smith, G.Ball, M.J.Keating, E.H.Estey, A.B.Glassman, M.Albitar, M.I.Kwari, M.Beran, Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients, *Blood*, (2002) 840-849.
23. A.M.Storniolo, W.C.Moloney, D.S.Rosenthal, C.Cox, J.M.Bennett, Chronic myelomonocytic leukemia, *Leukemia*, (1990) 766-770.
24. A.Miyazato, S.Ueno, K.Ohmine, M.Ueda, K.Yoshida, Y.Yamashita, T.Kaneko, M.Mori, K.Kirito, M.Toshima, Y.Nakamura, K.Saito, Y.Kano, S.Furusawa, K.Ozawa, H.Mano, Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction, *Blood*, (2001) 422-427.
25. W.K.Hofmann, V.S.de, M.Komor, D.Hoelzer, W.Wachsman, H.P.Koeffler, Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow, *Blood*, (2002) 3553-3560.
26. E.J.Yeoh, M.E.Ross, S.A.Shurtleff, W.K.Williams, D.Patel, R.Mahfouz, F.G.Behm, S.C.Raimondi, M.V.Relling, A.Patel, C.Cheng, D.Campana, D.Wilkins, X.Zhou, J.Li, H.Liu, C.H.Pui, W.E.Evans, C.Naeve, L.Wong, J.R.Downing, Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling, *Cancer Cell*, (2002) 133-143.
27. T.Haferlach, A.Kohlmann, S.Schnittger, M.Dugas, W.Hiddemann, W.Kern, C.Schoch, Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling, *Blood*, (2005) 1189-1198.
28. T.Haferlach, A.Kohlmann, U.Bacher, S.Schnittger, C.Haferlach, W.Kern, Gene expression profiling for the diagnosis of acute leukaemia, *Br.J.Cancer*, (2007) 535-540.

29. F.J.Staal, G.Cario, G.Cazzaniga, T.Haferlach, M.Heuser, W.K.Hofmann, K.Mills, M.Schrappé, M.Stanulla, L.U.Wingen, J.J.van Dongen, B.Schlegelberger, Consensus guidelines for microarray gene expression analyses in leukemia from three European leukemia networks, *Leukemia*, (2006) 1385-1392.
30. T.Haferlach, A.Kohlmann, W.Kern, W.Hiddemann, S.Schnittger, C.Schoch, Gene expression profiling as a tool for the diagnosis of acute leukemias, *Semin.Hematol.*, (2003) 281-295.
31. A.Wiktor, B.A.Rybicki, Z.S.Piao, M.Shurafa, B.Barthel, K.Maeda, D.L.Van Dyke, Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease, *Genes Chromosomes.Cancer*, (2000) 11-16.
32. T.Vallespi, M.Imbert, C.Mecucci, C.Preudhomme, P.Fenaux, Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes, *Haematologica*, (1998) 258-275.
33. E.Wattel, J.L.Lai, M.Hebbar, C.Preudhomme, D.Grahek, P.Morel, F.Bauters, P.Fenaux, De novo myelodysplastic syndrome (MDS) with deletion of the long arm of chromosome 20: a subtype of MDS with distinct hematological and prognostic features?, *Leuk.Res.*, (1993) 921-926.
34. C.Aul, D.T.Bowen, Y.Yoshida, Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes, *Haematologica*, (1998) 71-86.
35. F.Sole, B.Espinet, G.F.Sanz, J.Cervera, M.J.Calasan, E.Luno, F.Prieto, I.Granada, J.M.Hernandez, J.C.Cigudosa, J.L.Diez, E.Bureo, M.L.Marques, E.Arranz, R.Rios, J.A.Martinez Climent, T.Vallespi, L.Florensa, S.Woessner, Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica Hematologica, *Br.J.Haematol.*, (2000) 346-356.
36. J.L.Lai, C.Preudhomme, M.Zandecki, M.Flactif, M.Vanrumbeke, P.Lepelley, E.Wattel, P.Fenaux, Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations, *Leukemia*, (1995) 370-381.
37. B.J.Bain, A.V.Moorman, B.Johansson, A.B.Mehta, L.M.Secker-Walker, Myelodysplastic syndromes associated with 11q23 abnormalities. European 11q23 Workshop participants, *Leukemia*, (1998) 834-839.
38. A.von Bergh, P.Gargallo, B.De Prijck, H.Vranckx, R.Marschalek, I.Larripa, P.Kluin, E.Schuuring, A.Hagemeyer, Cryptic t(4;11) encoding MLL-AF4 due to insertion of 5' MLL sequences in chromosome 4, *Leukemia*, (2001) 595-600.
39. J.D.Rowley, S.Reshmi, O.Sobulo, T.Musvee, J.Anastasi, S.Raimondi, N.R.Schneider, J.C.Barredo, E.S.Cantu, B.Schlegelberger, F.Behm, N.A.Doggett, J.Borrow, N.Zeleznik-Le, All patients with the T(11;16)(q23;p13.3) that involves MLL and CBP have treatment-related hematologic disorders, *Blood*, (1997) 535-541.
40. A.A.Miller, E.Kurschel, R.Osieka, C.G.Schmidt, Clinical pharmacology of sodium butyrate in patients with acute leukemia, *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.*, (1987) 1283-1287.
41. D.De, I, D.M.Ward, J.Kaplan, Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation, *Blood*, (2009).
42. A.List, S.Kurtin, D.J.Roe, A.Buresh, D.Mahadevan, D.Fuchs, L.Rimsza, R.Heaton, R.Knight, J.B.Zeldis, Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes, *N.Engl.J.Med.*, (2005) 549-557.

43. A.List, G.Dewald, J.Bennett, A.Giagounidis, A.Raza, E.Feldman, B.Powell, P.Greenberg, D.Thomas, R.Stone, C.Reeder, K.Wride, J.Patin, M.Schmidt, J.Zeldis, R.Knight, Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion, *N.Engl.J.Med.*, (2006) 1456-1465.
44. K.A.Ritchie, A.A.Aprikyan, D.F.Bowen-Pope, C.J.Norby-Slycord, S.Conyers, S.Bartelmez, E.H.Sitnicka, D.D.Hickstein, The Tel-PDGFRbeta fusion gene produces a chronic myeloproliferative syndrome in transgenic mice, *Leukemia*, (1999) 1790-1803.
45. D.Cilloni, E.Gottardi, F.Messa, M.Fava, P.Scaravaglio, M.Bertini, M.Girotto, C.Marinone, D.Ferrero, A.Gallamini, A.Levis, G.Saglio, Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes, *J.Clin.Oncol.*, (2003) 1988-1995.
46. Y.Jiang, A.Dunbar, L.P.Gondek, S.Mohan, M.Rataul, C.O'Keefe, Y.Sauntharajah, J.P.Maciejewski, Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML, *Blood*, (2008).
47. H.Mano, DNA micro-array analysis of myelodysplastic syndrome, *Leuk.Lymphoma*, (2006) 9-14.
48. D.Bowen, S.Yancik, L.Bennett, D.Culligan, K.Resser, Serum stem cell factor concentration in patients with myelodysplastic syndromes, *Br.J.Haematol.*, (1993) 63-66.
49. M.Fontenay-Roupie, D.Bouscary, M.Guesnu, F.Picard, J.Melle, C.Lacombe, S.Gisselbrecht, P.Mayeux, F.Dreyfus, Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction, *Br.J.Haematol.*, (1999) 464-473.
50. A.B.Maurer, A.Ganser, R.Buhl, G.Seipelt, O.G.Ottmann, U.Mentzel, R.G.Geissler, D.Hoelzer, Restoration of impaired cytokine secretion from monocytes of patients with myelodysplastic syndromes after in vivo treatment with GM-CSF or IL-3, *Leukemia*, (1993) 1728-1733.
51. S.D.Mundle, B.Y.Mativi, K.Bagai, G.Feldman, P.Cheema, U.Gautam, S.Reza, J.D.Cartlidge, P.Venugopal, V.Shetty, S.A.Gregory, E.Robin, S.Rifkin, R.Shah, A.Raza, Spontaneous down-regulation of Fas-associated phosphatase-1 may contribute to excessive apoptosis in myelodysplastic marrows, *Int.J.Hematol.*, (1999) 83-90.
52. G.M.Gersuk, C.Beckham, M.R.Loken, P.Kiener, J.E.Anderson, A.Farrand, A.B.Troutt, J.A.Ledbetter, H.J.Deeg, A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome, *Br.J.Haematol.*, (1998) 176-188.
53. J.Folkman, Angiogenesis inhibitors generated by tumors, *Mol.Med.*, (1995) 120-122.
54. M.G.Alexandrakis, F.H.Passam, D.S.Kyriakou, C.Dambaki, G.Katrinakis, G.Tsirakis, J.Konsolas, E.N.Stathopoulos, Expression of the proliferation-associated nuclear protein MIB-1 and its relationship with microvascular density in bone marrow biopsies of patients with myelodysplastic syndromes, *J.Mol.Histol.*, (2004) 857-863.
55. G.Pruneri, F.Bertolini, D.Soligo, N.Carboni, A.Cortelezzi, P.F.Ferrucci, R.Buffa, G.Lambertenghi-Deliliers, F.Pezzella, Angiogenesis in myelodysplastic syndromes, *Br.J.Cancer*, (1999) 1398-1401.
56. M.Albitar, T.Manshour, C.Gidel, C.Croce, S.Kornblau, S.Pierce, H.M.Kantarjian, Clinical significance of fragile histidine triad gene expression in adult acute lymphoblastic leukemia, *Leuk.Res.*, (2001) 859-864.

57. S.Faderl, H.M.Kantarjian, Novel therapies for myelodysplastic syndromes, *Cancer*, (2004) 226-241.
58. Q.Hu, A.L.Dey, Y.Yang, Y.Shen, I.B.Jilani, E.H.Estey, H.M.Kantarjian, F.J.Giles, M.Albitar, Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, and not receptor 2, is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes, *Cancer*, (2004) 1884-1891.
59. S.D.Mundle, Comment on 'Functional disturbance of marrow stromal microenvironment in the myelodysplastic syndromes' by S Tauro et al, *Leukemia*, (2002) 960-961.
60. S.Tauro, M.D.Hepburn, C.M.Peddie, D.T.Bowen, M.J.Pippard, Functional disturbance of marrow stromal microenvironment in the myelodysplastic syndromes, *Leukemia*, (2002) 785-790.
61. J.A.Ferry, R.M.Linggood, K.M.Convery, J.T.Efird, R.Eliseo, N.L.Harris, Hodgkin disease, nodular sclerosis type. Implications of histologic subclassification, *Cancer*, (1993) 457-463.
62. J.L.Hess, S.Bodis, G.Pinkus, B.Silver, P.Mauch, Histopathologic grading of nodular sclerosis Hodgkin's disease. Lack of prognostic significance in 254 surgically staged patients, *Cancer*, (1994) 708-714.
63. D.J.van Spronsen, L.W.Vrints, G.Hofstra, M.A.Crommelin, J.W.Coebergh, W.P.Breed, Disappearance of prognostic significance of histopathological grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease for unselected patients, 1972-92, *Br.J.Haematol.*, (1997) 322-327.
64. H.Kanzler, R.Kuppers, M.L.Hansmann, K.Rajewsky, 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) 1495-1505.
65. R.Kuppers, K.Rajewsky, M.Zhao, G.Simons, R.Laumann, R.Fischer, M.L.Hansmann, 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) 10962-10966.
66. T.Marafioti, M.Hummel, I.Anagnostopoulos, H.D.Foss, B.Falini, G.Delsol, P.G.Isaacson, S.Pileri, H.Stein, Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells, *N.Engl.J.Med.*, (1997) 453-458.
67. T.Marafioti, M.Hummel, H.D.Foss, H.Laumen, P.Korbjuhn, I.Anagnostopoulos, H.Lammert, G.Demel, J.Theil, T.Wirth, H.Stein, Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription, *Blood*, (2000) 1443-1450.
68. A.Jox, T.Zander, R.Kuppers, J.Irsch, H.Kanzler, M.Kornacker, H.Bohlen, V.Diehl, J.Wolf, Somatic mutations within the untranslated regions of rearranged Ig genes in a case of classical Hodgkin's disease as a potential cause for the absence of Ig in the lymphoma cells, *Blood*, (1999) 3964-3972.
69. R.Kuppers, Molecular biology of Hodgkin's lymphoma, *Adv.Cancer Res.*, (2002) 277-312.
70. R.Kuppers, I.Schwering, A.Brauninger, K.Rajewsky, M.L.Hansmann, Biology of Hodgkin's lymphoma, *Ann.Oncol.*, (2002) 11-18.
71. D.Re, M.Muschen, T.Ahmadi, C.Wickenhauser, A.Staratschek-Jox, U.Holtick, V.Diehl, J.Wolf, Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells, *Cancer Res.*, (2001) 2080-2084.

72. H.Stein, T.Marafioti, H.D.Foss, H.Laumen, M.Hummel, I.Anagnostopoulos, T.Wirth, G.Demel, B.Falini, 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) 496-501.
73. J.Theil, H.Laumen, T.Marafioti, M.Hummel, G.Lenz, T.Wirth, H.Stein, Defective octamer-dependent transcription is responsible for silenced immunoglobulin transcription in Reed-Sternberg cells, *Blood*, (2001) 3191-3196.
74. F.Jundt, K.Kley, I.Anagnostopoulos, P.K.Schulze, A.Greiner, S.Mathas, C.Scheidereit, T.Wirth, H.Stein, B.Dorken, Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease, *Blood*, (2002) 3060-3062.
75. E.Torlakovic, A.Tierens, H.D.Dang, J.Delabie, 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) 1807-1814.
76. K.P.Lam, R.Kuhn, K.Rajewsky, In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death, *Cell*, (1997) 1073-1083.
77. Y.J.Liu, D.Y.Mason, G.D.Johnson, S.Abbot, C.D.Gregory, D.L.Hardie, J.Gordon, I.C.MacLennan, Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis, *Eur.J.Immunol.*, (1991) 1905-1910.
78. A.Ushmorov, O.Ritz, M.Hummel, F.Leithauser, P.Moller, H.Stein, T.Wirth, Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression, *Blood*, (2004) 3326-3334.
79. J.Wang, C.R.Taylor, Apoptosis and cell cycle-related genes and proteins in classical Hodgkin lymphoma: application of tissue microarray technique, *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.*, (2003) 206-213.
80. S.Joos, C.K.Menz, G.Wrobel, R.Siebert, S.Gesk, S.Ohl, G.Mechtersheimer, L.Trumper, P.Moller, P.Lichter, T.F.Barth, Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2, *Blood*, (2002) 1381-1387.
81. K.Weber-Matthiesen, J.Deerberg, M.Poetsch, W.Grote, B.Schlegelberger, Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease, *Blood*, (1995) 1464-1468.
82. E.Cabannes, G.Khan, F.Aillet, R.F.Jarrett, R.T.Hay, Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α , *Oncogene*, (1999) 3063-3070.
83. F.Emmerich, M.Meiser, M.Hummel, G.Demel, H.D.Foss, F.Jundt, S.Mathas, D.Krappmann, C.Scheidereit, H.Stein, B.Dorken, Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells, *Blood*, (1999) 3129-3134.
84. F.Emmerich, S.Theurich, M.Hummel, A.Haeflker, M.S.Vry, K.Dohner, K.Bommert, H.Stein, B.Dorken, Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *J.Pathol.*, (2003) 413-420.
85. B.Jungnickel, A.Staratschek-Jox, A.Brauninger, T.Spieker, J.Wolf, V.Diehl, M.L.Hansmann, K.Rajewsky, R.Kuppers, Clonal deleterious mutations in the I κ B α gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma, *J.Exp.Med.*, (2000) 395-402.
86. E.M.Maggio, B.A.van den, D.de Jong, A.Diepstra, S.Poppema, Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma, *Am.J.Pathol.*, (2003) 29-35.

87. L.Xerri, N.Carbuccion, P.Parc, J.Hassoun, F.Birg, Frequent expression of FAS/APO-1 in Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphomas, *Histopathology*, (1995) 235-241.
88. S.S.Metkar, K.N.Naresh, A.A.Redkar, C.S.Soman, S.H.Advani, J.J.Nadkarni, Expression of Fas and Fas ligand in Hodgkin's disease, *Leuk.Lymphoma*, (1999) 521-530.
89. C.S.Verbeke, U.Wenthe, R.Grobholz, H.Zentgraf, Fas ligand expression in Hodgkin lymphoma, *Am.J.Surg.Pathol.*, (2001) 388-394.
90. D.Re, A.Hofmann, J.Wolf, V.Diehl, A.Staratschek-Jox, Cultivated H-RS cells are resistant to CD95L-mediated apoptosis despite expression of wild-type CD95, *Exp.Hematol.*, (2000) 348.
91. M.Muschen, D.Re, A.Brauninger, J.Wolf, M.L.Hansmann, V.Diehl, R.Kuppers, K.Rajewsky, Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Cancer Res.*, (2000) 5640-5643.
92. A.Dutton, J.D.O'Neil, A.E.Milner, G.M.Reynolds, J.Starczynski, J.Crocker, L.S.Young, P.G.Murray, 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) 6611-6616.
93. S.Mathas, A.Lietz, I.Anagnostopoulos, F.Hummel, B.Wiesner, M.Janz, F.Jundt, B.Hirsch, K.Johrens-Leder, H.P.Vornlocher, K.Bommert, H.Stein, B.Dorken, c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis, *J.Exp.Med.*, (2004) 1041-1052.
94. H.Kashkar, C.Haefs, H.Shin, S.J.Hamilton-Dutoit, G.S.Salvesen, M.Kronke, J.M.Jurgensmeier, XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells, *J.Exp.Med.*, (2003) 341-347.
95. M.Hinz, P.Loser, S.Mathas, D.Krappmann, B.Dorken, C.Scheidereit, Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *Blood*, (2001) 2798-2807.
96. S.Kreuz, D.Siegmund, P.Scheurich, H.Wajant, NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling, *Mol.Cell Biol.*, (2001) 3964-3973.
97. A.B.Rickinson, Q.Y.Yao, L.E.Wallace, The Epstein-Barr virus as a model of virus-host interactions, *Br.Med.Bull.*, (1985) 75-79.
98. P.Brousset, D.Schlaifer, F.Meggetto, E.Bachmann, S.Rothenberger, J.Pris, G.Delsol, H.Knecht, Persistence of the same viral strain in early and late relapses of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease, *Blood*, (1994) 2447-2451.
99. E.Kilger, A.Kieser, M.Baumann, W.Hammerschmidt, Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor, *EMBO J.*, (1998) 1700-1709.
100. R.G.Caldwell, J.B.Wilson, S.J.Anderson, R.Longnecker, Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals, *Immunity.*, (1998) 405-411.
101. S.Casola, K.L.Otipoby, M.Alimzhanov, S.Humme, N.Uyttersprot, J.L.Kutok, M.C.Carroll, K.Rajewsky, B cell receptor signal strength determines B cell fate, *Nat.Immunol.*, (2004) 317-327.

102. M.Vockerodt, G.Belge, D.Kube, J.Irsch, R.Siebert, H.Tesch, V.Diehl, J.Wolf, J.Bullerdiek, A.Staratschek-Jox, An unbalanced translocation involving chromosome 14 is the probable cause for loss of potentially functional rearranged immunoglobulin heavy chain genes in the Epstein-Barr virus-positive Hodgkin's lymphoma-derived cell line L591, *Br.J.Haematol.*, (2002) 640-646.
103. D.Bechtel, J.Kurth, C.Unkel, R.Kuppers, Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas, *Blood*, (2005) 4345-4350.
104. D.Benharroch, Y.Shemer-Avni, Y.Y.Myint, A.Levy, E.Mejirovsky, I.Suprun, Y.Shendler, I.Prinsloo, S.Ariad, B.Rager-Zisman, M.Sacks, J.Gopas, Measles virus: evidence of an association with Hodgkin's disease, *Br.J.Cancer*, (2004) 572-579.
105. S.Chaganti, A.I.Bell, N.B.Pastor, A.E.Milner, M.Drayson, J.Gordon, A.B.Rickinson, Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes, *Blood*, (2005) 4249-4252.
106. C.Mancao, M.Altmann, B.Jungnickel, W.Hammerschmidt, Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus, *Blood*, (2005) 4339-4344.
107. B.F.Skinnider, T.W.Mak, The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma, *Blood*, (2002) 4283-4297.
108. M.Fischer, M.Juremalm, N.Olsson, C.Backlin, C.Sundstrom, K.Nilsson, G.Enblad, G.Nilsson, Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue, *Int.J.Cancer*, (2003) 197-201.
109. F.Jundt, I.Anagnostopoulos, K.Bommert, F.Emmerich, G.Muller, H.D.Foss, H.D.Royer, H.Stein, B.Dorken, Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils, *Blood*, (1999) 2065-2071.
110. M.K.Gandhi, E.Lambley, J.Duraiswamy, U.Dua, C.Smith, S.Elliott, D.Gill, P.Marlton, J.Seymour, R.Khanna, Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients, *Blood*, (2006) 2280-2289.
111. J.Kurth, T.Spieker, J.Wustrow, G.J.Strickler, L.M.Hansmann, K.Rajewsky, R.Kuppers, EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency, *Immunity.*, (2000) 485-495.
112. J.Kurth, M.L.Hansmann, K.Rajewsky, R.Kuppers, Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (2003) 4730-4735.
113. Q.Que, R.A.Jorgensen, Homology-based control of gene expression patterns in transgenic petunia flowers, *Dev.Genet.*, (1998) 100-109.
114. A.Fire, S.Xu, M.K.Montgomery, S.A.Kostas, S.E.Driver, C.C.Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, (1998) 806-811.
115. R.C.Lee, R.L.Feinbaum, V.Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, (1993) 843-854.
116. B.Wightman, I.Ha, G.Ruvkun, Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*, *Cell*, (1993) 855-862.

117. M.Lagos-Quintana, R.Rauhut, A.Yalcin, J.Meyer, W.Lendeckel, T.Tuschl, Identification of tissue-specific microRNAs from mouse, *Curr.Biol.*, (2002) 735-739.
118. B.J.Reinhart, F.J.Slack, M.Basson, A.E.Pasquinelli, J.C.Bettinger, A.E.Rougvie, H.R.Horvitz, G.Ruvkun, The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, (2000) 901-906.
119. F.J.Slack, M.Basson, Z.Liu, V.Ambros, H.R.Horvitz, G.Ruvkun, The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor, *Mol.Cell*, (2000) 659-669.
120. C.D.Novina, P.A.Sharp, The RNAi revolution, *Nature*, (2004) 161-164.
121. G.Meister, T.Tuschl, Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA, *Nature*, (2004) 343-349.
122. Y.Lee, M.Kim, J.Han, K.H.Yeom, S.Lee, S.H.Baek, V.N.Kim, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *EMBO J.*, (2004) 4051-4060.
123. Y.Lee, C.Ahn, J.Han, H.Choi, J.Kim, J.Yim, J.Lee, P.Provost, O.Radmark, S.Kim, V.N.Kim, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*, (2003) 415-419.
124. E.Lund, S.Guttinger, A.Calado, J.E.Dahlberg, U.Kutay, Nuclear export of microRNA precursors, *Science*, (2004) 95-98.
125. G.L.Sen, H.M.Blau, Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies, *Nat.Cell Biol.*, (2005) 633-636.
126. A.Eulalio, E.Huntzinger, E.Izaurralde, Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing, *Cell*, (2008) 9-14.
127. A.Eulalio, J.Rehwinkel, M.Stricker, E.Huntzinger, S.F.Yang, T.Doerks, S.Dorner, P.Bork, M.Boutros, E.Izaurralde, Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing, *Genes Dev.*, (2007) 2558-2570.
128. M.Kozak, Faulty old ideas about translational regulation paved the way for current confusion about how microRNAs function, *Gene*, (2008) 108-115.
129. S.Vasudevan, Y.Tong, J.A.Steitz, Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation, *Science*, (2007) 1931-1934.
130. H.E.Check, Thousands of proteins affected by miRNAs, *Nature*, (2008) 562.
131. M.Selbach, B.Schwanhausser, N.Thierfelder, Z.Fang, R.Khanin, N.Rajewsky, Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs, *Nature*, (2008) 58-63.
132. D.Baek, J.Villen, C.Shin, F.D.Camargo, S.P.Gygi, D.P.Bartel, The impact of microRNAs on protein output, *Nature*, (2008) 64-71.
133. B.P.Lewis, C.B.Burge, D.P.Bartel, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell*, (2005) 15-20.
134. J.G.Doench, P.A.Sharp, Specificity of microRNA target selection in translational repression, *Genes Dev.*, (2004) 504-511.
135. G.Hutvagner, P.D.Zamore, A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex, *Science*, (2002) 2056-2060.

136. C.L.Jopling, M.Yi, A.M.Lancaster, S.M.Lemon, P.Sarnow, Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA, *Science*, (2005) 1577-1581.
137. G.A.Calin, C.Sevignani, C.D.Dumitru, T.Hyslop, E.Noch, S.Yendamuri, M.Shimizu, S.Rattan, F.Bullrich, M.Negrini, C.M.Croce, Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (2004) 2999-3004.
138. L.He, J.M.Thomson, M.T.Hemann, E.Hernando-Monge, D.Mu, S.Goodson, S.Powers, C.Cordon-Cardo, S.W.Lowe, G.J.Hannon, S.M.Hammond, A microRNA polycistron as a potential human oncogene, *Nature*, (2005) 828-833.
139. K.A.O'Donnell, E.A.Wentzel, K.I.Zeller, C.V.Dang, J.T.Mendell, c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression, *Nature*, (2005) 839-843.
140. G.A.Calin, C.M.Croce, MicroRNA signatures in human cancers, *Nat.Rev.Cancer*, (2006) 857-866.
141. J.M.Franco-Zorrilla, A.Valli, M.Todesco, I.Mateos, M.I.Puga, I.Rubio-Somoza, A.Leyva, D.Weigel, J.A.Garcia, J.Paz-Ares, Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity, *Nat.Genet.*, (2007) 1033-1037.
142. C.Z.Chen, L.Li, H.F.Lodish, D.P.Bartel, MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation, *Science*, (2004) 83-86.
143. N.Felli, L.Fontana, E.Pelosi, R.Botta, D.Bonci, F.Facchiano, F.Liuzzi, V.Lulli, O.Morsilli, S.Santoro, M.Valtieri, G.A.Calin, C.G.Liu, A.Sorrentino, C.M.Croce, C.Peschle, MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (2005) 18081-18086.
144. F.Fazi, A.Rosa, A.Fatica, V.Gelmetti, M.L.De Marchis, C.Nervi, I.Bozzoni, A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis, *Cell*, (2005) 819-831.
145. R.Garzon, F.Pichiorri, T.Palumbo, R.Iuliano, A.Cimmino, R.Aqeilan, S.Volinia, D.Bhatt, H.Alder, G.Marcucci, G.A.Calin, C.G.Liu, C.D.Bloomfield, M.Andreeff, C.M.Croce, MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (2006) 5078-5083.
146. R.W.Georgantas, III, R.Hildreth, S.Morisot, J.Alder, C.G.Liu, S.Heimfeld, G.A.Calin, C.M.Croce, C.I.Civin, CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (2007) 2750-2755.
147. B.S.Cobb, T.B.Nesterova, E.Thompson, A.Hertweck, E.O'Connor, J.Godwin, C.B.Wilson, N.Brockdorff, A.G.Fisher, S.T.Smale, M.Merkenschlager, T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer, *J.Exp.Med.*, (2005) 1367-1373.
148. S.A.Muljo, K.M.Ansel, C.Kanellopoulou, D.M.Livingston, A.Rao, K.Rajewsky, Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer, *J.Exp.Med.*, (2005) 261-269.
149. E.Bernstein, S.Y.Kim, M.A.Carmell, E.P.Murchison, H.Alcorn, M.Z.Li, A.A.Mills, S.J.Elledge, K.V.Anderson, G.J.Hannon, Dicer is essential for mouse development, *Nat.Genet.*, (2003) 215-217.
150. C.Kanellopoulou, S.A.Muljo, A.L.Kung, S.Ganesan, R.Drapkin, T.Jenuwein, D.M.Livingston, K.Rajewsky, Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing, *Genes Dev.*, (2005) 489-501.

151. S.Landais, S.Landry, P.Legault, E.Rassart, Oncogenic potential of the miR-106-363 cluster and its implication in human T-cell leukemia, *Cancer Res.*, (2007) 5699-5707.
152. M.L.Yeung, J.Yasunaga, Y.Bennasser, N.Duseti, D.Harris, N.Ahmad, M.Matsuoka, K.T.Jeang, Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1, *Cancer Res.*, (2008) 8976-8985.
153. G.A.Calin, C.G.Liu, C.Sevignani, M.Ferracin, N.Felli, C.D.Dumitru, M.Shimizu, A.Cimmino, S.Zupo, M.Dono, M.L.Dell'Aquila, H.Alder, L.Rassenti, T.J.Kipps, F.Bullrich, M.Negrini, C.M.Croce, MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (2004) 11755-11760.
154. S.Marton, M.R.Garcia, C.Robello, H.Persson, F.Trajtenberg, O.Pritsch, C.Rovira, H.Naya, G.Dighiero, A.Cayota, Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis, *Leukemia*, (2008) 330-338.
155. Y.Akao, Y.Nakagawa, Y.Kitade, T.Kinoshita, T.Naoe, Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies, *Cancer Sci.*, (2007) 1914-1920.
156. G.A.Calin, C.D.Dumitru, M.Shimizu, R.Bichi, S.Zupo, E.Noch, H.Alder, S.Rattan, M.Keating, K.Rai, L.Rassenti, T.Kipps, M.Negrini, F.Bullrich, C.M.Croce, 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) 15524-15529.
157. A.Cimmino, G.A.Calin, M.Fabbri, M.V.Iorio, M.Ferracin, M.Shimizu, S.E.Wojcik, R.I.Aqeilan, S.Zupo, M.Dono, L.Rassenti, H.Alder, S.Volinia, C.G.Liu, T.J.Kipps, M.Negrini, C.M.Croce, miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (2005) 13944-13949.
158. S.Mi, J.Lu, M.Sun, Z.Li, H.Zhang, M.B.Neilly, Y.Wang, Z.Qian, J.Jin, Y.Zhang, S.K.Bohlander, M.M.Le Beau, R.A.Larson, T.R.Golub, J.D.Rowley, J.Chen, MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (2007) 19971-19976.
159. S.Costinean, N.Zanesi, Y.Pekarsky, E.Tili, S.Volinia, N.Heerema, C.M.Croce, Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (2006) 7024-7029.
160. M.J.Bueno, d.C.Perez, I, C.M.Gomez de, J.Santos, G.A.Calin, J.C.Cigudosa, C.M.Croce, J.Fernandez-Piqueras, M.Malumbres, Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression, *Cancer Cell*, (2008) 496-506.
161. F.Fazi, S.Racanicchi, G.Zardo, L.M.Starnes, M.Mancini, L.Travaglini, D.Diverio, E.Ammatuna, G.Cimino, F.Lo-Coco, F.Grignani, C.Nervi, Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein, *Cancer Cell*, (2007) 457-466.
162. A.xon-Mclver, P.East, C.A.Mein, J.B.Cazier, G.Molloy, T.Chaplin, L.T.Andrew, B.D.Young, S.Debernardi, Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia, *PLoS.ONE.*, (2008) e2141.
163. M.Inomata, H.Tagawa, Y.M.Guo, Y.Kameoka, N.Takahashi, K.Sawada, MicroRNA-17-92 downregulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes, *Blood*, (2008).
164. A.Roehle, K.P.Hoefig, D.Repsilber, C.Thorns, M.Ziepert, K.O.Wesche, M.Thiere, M.Loeffler, W.Klapper, M.Pfreunds Schuh, A.Matolcsy, H.W.Bernd, L.Reiniger, H.Merz, A.C.Feller,

- MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas, *Br.J.Haematol.*, (2008) 732-744.
165. C.H.Lawrie, S.Gal, H.M.Dunlop, B.Pushkaran, A.P.Liggins, K.Pulford, A.H.Banham, F.Pezzella, J.Boulton, J.S.Wainscoat, C.S.Hatton, A.L.Harris, Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma, *Br.J.Haematol.*, (2008) 672-675.
166. B.A.van den, B.J.Kroesen, K.Kooistra, J.D.de, J.Briggs, T.Blokzijl, S.Jacobs, J.Kluiver, A.Diepstra, E.Maggio, S.Poppema, High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma, *Genes Chromosomes.Cancer*, (2003) 20-28.
167. M.Metzler, M.Wilda, K.Busch, S.Viehmann, A.Borkhardt, High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma, *Genes Chromosomes.Cancer*, (2004) 167-169.
168. P.S.Eis, W.Tam, L.Sun, A.Chadburn, Z.Li, M.F.Gomez, E.Lund, J.E.Dahlberg, Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, (2005) 3627-3632.
169. J.Kluiver, E.Haralambieva, J.D.de, T.Blokzijl, S.Jacobs, B.J.Kroesen, S.Poppema, B.A.van den, Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma, *Genes Chromosomes.Cancer*, (2006) 147-153.
170. J.Kluiver, S.Poppema, J.D.de, T.Blokzijl, G.Harms, S.Jacobs, B.J.Kroesen, B.A.van den, BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas, *J.Pathol.*, (2005) 243-249.
171. B.P.Lewis, I.H.Shih, M.W.Jones-Rhoades, D.P.Bartel, C.B.Burge, Prediction of mammalian microRNA targets, *Cell*, (2003) 787-798.
172. M.Kiriakidou, P.T.Nelson, A.Kouranov, P.Fitziev, C.Bouyioukos, Z.Mourelatos, A.Hatzigeorgiou, A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets, *Genes Dev.*, (2004) 1165-1178.
173. J.Brennecke, A.Stark, R.B.Russell, S.M.Cohen, Principles of microRNA-target recognition, *PLoS.Biol.*, (2005) e85.
174. A.Stark, J.Brennecke, R.B.Russell, S.M.Cohen, Identification of *Drosophila* MicroRNA targets, *PLoS.Biol.*, (2003) E60.
175. S.Lall, D.Grun, A.Krek, K.Chen, Y.L.Wang, C.N.Dewey, P.Sood, T.Colombo, N.Bray, P.Macmenamin, H.L.Kao, K.C.Gunsalus, L.Pachter, F.Piano, N.Rajewsky, A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*, *Curr.Biol.*, (2006) 460-471.
176. Y.Watanabe, N.Yachie, K.Numata, R.Saito, A.Kanai, M.Tomita, Computational analysis of microRNA targets in *Caenorhabditis elegans*, *Gene*, (2006) 2-10.
177. D.Didiano, O.Hobert, Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions, *Nat.Struct.Mol.Biol.*, (2006) 849-851.
178. S.Wuchty, W.Fontana, I.L.Hofacker, P.Schuster, Complete suboptimal folding of RNA and the stability of secondary structures, *Biopolymers*, (1999) 145-165.
179. M.S.Waterman, M.Eggert, A new algorithm for best subsequence alignments with application to tRNA-rRNA comparisons, *J.Mol.Biol.*, (1987) 723-728.
180. N.Bray, I.Dubchak, L.Pachter, AVID: A global alignment program, *Genome Res.*, (2003) 97-102.

181. A.J.Enright, B.John, U.Gaul, T.Tuschl, C.Sander, D.S.Marks, MicroRNA targets in *Drosophila*, *Genome Biol.*, (2003) R1.
182. B.John, A.J.Enright, A.Aravin, T.Tuschl, C.Sander, D.S.Marks, Human MicroRNA targets, *PLoS.Biol.*, (2004) e363.
183. A.Krek, D.Grun, M.N.Poy, R.Wolf, L.Rosenberg, E.J.Epstein, P.Macmenamin, P.da, I, K.C.Gunsalus, M.Stoffel, N.Rajewsky, Combinatorial microRNA target predictions, *Nat.Genet.*, (2005) 495-500.
184. S.Debernardi, S.Skoulakis, G.Molloy, T.Chaplin, A.Dixon-Mclver, B.D.Young, MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis, *Leukemia*, (2007) 912-916.
185. G.Marcucci, M.D.Radmacher, K.Maharry, K.Mrozek, A.S.Ruppert, P.Paschka, T.Vukosavljevic, S.P.Whitman, C.D.Baldus, C.Langer, C.G.Liu, A.J.Carroll, B.L.Powell, R.Garzon, C.M.Croce, J.E.Kolitz, M.A.Caligiuri, R.A.Larson, C.D.Bloomfield, MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia, *N.Engl.J.Med.*, (2008) 1919-1928.
186. A.Taguchi, K.Yanagisawa, M.Tanaka, K.Cao, Y.Matsuyama, H.Goto, T.Takahashi, Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster, *Cancer Res.*, (2008) 5540-5545.
187. K.Woods, J.M.Thomson, S.M.Hammond, Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors, *J.Biol.Chem.*, (2007) 2130-2134.
188. E.Connolly, M.Melegari, P.Landgraf, T.Tchaikovskaya, B.C.Tennant, B.L.Slagle, L.E.Rogler, M.Zavolan, T.Tuschl, C.E.Rogler, Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype, *Am.J.Pathol.*, (2008) 856-864.
189. Z.Lu, M.Liu, V.Stribinskis, C.M.Klinge, K.S.Ramos, N.H.Colburn, Y.Li, MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene, *Oncogene*, (2008) 4373-4379.
190. K.Hussein, K.Theophile, G.Busche, B.Schlegelberger, G.Gohring, H.Kreipe, O.Bock, Significant inverse correlation of microRNA-150/MYB and microRNA-222/p27 in myelodysplastic syndrome, *Leuk.Res.*, (2009).
191. K.D.Taganov, M.P.Boldin, K.J.Chang, D.Baltimore, NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (2006) 12481-12486.
192. J.Lu, G.Getz, E.A.Miska, E.Alvarez-Saavedra, J.Lamb, D.Peck, A.Sweet-Cordero, B.L.Ebert, R.H.Mak, A.A.Ferrando, J.R.Downing, T.Jacks, H.R.Horvitz, T.R.Golub, MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, (2005) 834-838.
193. M.L.Choong, H.H.Yang, I.McNiece, MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis, *Exp.Hematol.*, (2007) 551-564.
194. H.He, K.Jazdzewski, W.Li, S.Liyanarachchi, R.Nagy, S.Volinia, G.A.Calin, C.G.Liu, K.Franssila, S.Suster, R.T.Kloos, C.M.Croce, C.A.de la, The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (2005) 19075-19080.
195. D.T.Chui, D.Hammond, M.Baird, L.Shield, R.Jackson, R.F.Jarrett, Classical Hodgkin lymphoma is associated with frequent gains of 17q, *Genes Chromosomes.Cancer*, (2003) 126-136.

196. D.T.Chui, D.Hammond, M.Baird, L.Shield, R.Jackson, R.F.Jarrett, Classical Hodgkin lymphoma is associated with frequent gains of 17q, *Genes Chromosomes.Cancer*, (2003) 126-136.
197. B.Johansson, R.Billstrom, U.Kristoffersson, M.Akerman, S.Garwicz, T.Ahlgren, C.Malm, F.Mitelman, Deletion of chromosome arm 3p in hematologic malignancies, *Leukemia*, (1997) 1207-1213.
198. J.Kluiver, K.Kok, I.Pfeil, D.de Jong, T.Blokzijl, G.Harms, d.van, V, A.Diepstra, C.Atayar, S.Poppema, R.Kuppers, B.A.van den, Global correlation of genome and transcriptome changes in classical Hodgkin lymphoma, *Hematol.Oncol.*, (2007) 21-29.
199. S.S.Dave, G.Wright, B.Tan, A.Rosenwald, R.D.Gascoyne, W.C.Chan, R.I.Fisher, R.M.Brazier, L.M.Rimsza, T.M.Grogan, T.P.Miller, M.LeBlanc, T.C.Greiner, D.D.Weisenburger, J.C.Lynch, J.Vose, J.O.Armitage, E.B.Smeland, S.Kvaloy, H.Holte, J.Delabie, J.M.Connors, P.M.Lansdorp, Q.Ouyang, T.A.Lister, A.J.Davies, A.J.Norton, H.K.Muller-Hermelink, G.Ott, E.Campo, E.Montserrat, W.H.Wilson, E.S.Jaffe, R.Simon, L.Yang, J.Powell, H.Zhao, N.Goldschmidt, M.Chiorazzi, L.M.Staudt, Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells, *N.Engl.J.Med.*, (2004) 2159-2169.
200. S.Monti, K.J.Savage, J.L.Kutok, F.Feuerhake, P.Kurtin, M.Mihm, B.Wu, L.Pasqualucci, D.Neuberg, R.C.Aguiar, P.Dal Cin, C.Ladd, G.S.Pinkus, G.Salles, N.L.Harris, R.Dalla-Favera, T.M.Habermann, J.C.Aster, T.R.Golub, M.A.Shipp, Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response, *Blood*, (2005) 1851-1861.
201. A.Sanchez-Aguilera, C.Montalban, C.P.de la, L.Sanchez-Verde, M.M.Morente, M.Garcia-Cosio, J.Garcia-Larana, C.Bellas, M.Provencio, V.Romagosa, A.F.de Sevilla, J.Menarguez, P.Sabin, M.J.Mestre, M.Mendez, M.F.Fresno, C.Nicolas, M.A.Piris, J.F.Garcia, Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma, *Blood*, (2006) 662-668.
202. R.Kuppers, A.Brauninger, Reprogramming of the tumour B-cell phenotype in Hodgkin lymphoma, *Trends Immunol.*, (2006) 203-205.
203. I.Schwering, A.Brauninger, U.Klein, B.Jungnickel, M.Tinguely, V.Diehl, M.L.Hansmann, R.Dalla-Favera, K.Rajewsky, R.Kuppers, Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma, *Blood*, (2003) 1505-1512.
204. J.A.Chan, A.M.Krichevsky, K.S.Kosik, MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells, *Cancer Res.*, (2005) 6029-6033.
205. C.Roldo, E.Missiaglia, J.P.Hagan, M.Falconi, P.Capelli, S.Bersani, G.A.Calin, S.Volinia, C.G.Liu, A.Scarpa, C.M.Croce, MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior, *J.Clin.Oncol.*, (2006) 4677-4684.
206. M.L.Si, S.Zhu, H.Wu, Z.Lu, F.Wu, Y.Y.Mo, miR-21-mediated tumor growth, *Oncogene*, (2007) 2799-2803.
207. D.T.Chui, D.Hammond, M.Baird, L.Shield, R.Jackson, R.F.Jarrett, Classical Hodgkin lymphoma is associated with frequent gains of 17q, *Genes Chromosomes.Cancer*, (2003) 126-136.
208. S.Pfeffer, O.Voinnet, Viruses, microRNAs and cancer, *Oncogene*, (2006) 6211-6219.

-
209. P.Sarnow, C.L.Jopling, K.L.Norman, S.Schutz, K.A.Weher, MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses, *Nat.Rev.Microbiol.*, (2006) 651-659.
 210. M.L.Yeung, Y.Bennasser, T.G.Myers, G.Jiang, M.Benkirane, K.T.Jeang, Changes in microRNA expression profiles in HIV-1-transfected human cells, *Retrovirology.*, (2005) 81.
 211. R.F.Jarrett, G.L.Stark, J.White, B.Angus, F.E.Alexander, A.S.Krajewski, J.Freeland, G.M.Taylor, P.R.Taylor, Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study, *Blood*, (2005) 2444-2451.
 212. R.M.O'Connell, K.D.Taganov, M.P.Boldin, G.Cheng, D.Baltimore, MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, (2007) 1604-1609.