



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**TESIS DOCTORAL  
FACULTAD DE MEDICINA**

PROGRAMA DE DOCTORADO

ORGANOGENESIS I ANATOMÍA CLÍNICA I APLICADA

BIENIO 2002-2004

---

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

---

**Directores de Tesis**

**Dr. Mariano Monzó Planella**

**Dr. Álvaro Urbano Ispizua**

**Alfons Navarro Ponz**

**Barcelona, Enero de 2008**

# INTRODUCCIÓN



# INTRODUCCIÓN

## **Los microRNAs**

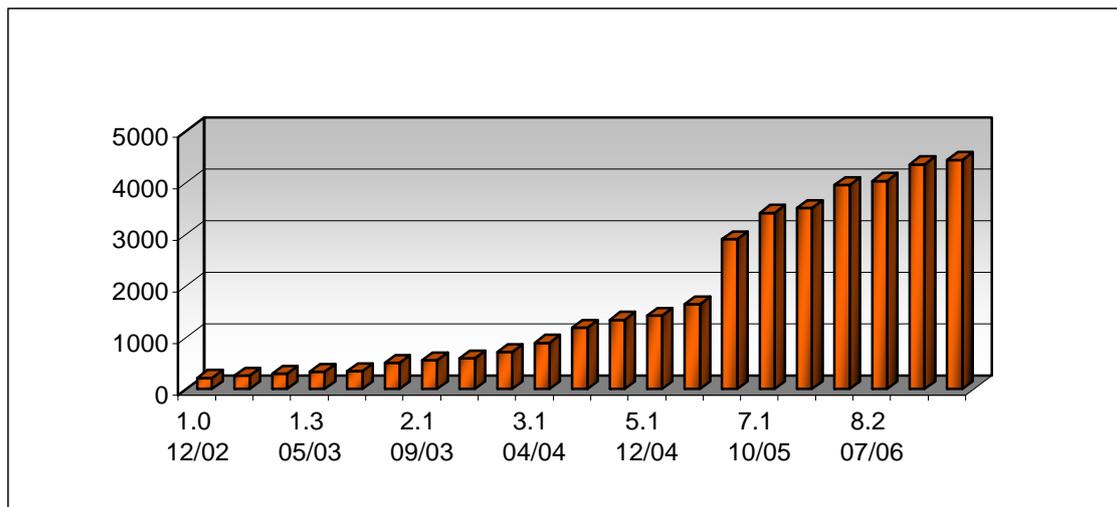
Los microRNAs (miRNAs) son unas pequeñas moléculas de RNA endógeno que no codifican para proteína y que actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica. Juegan un papel regulador muy importante en animales y plantas uniéndose a los RNA mensajeros (mRNA) inhibiendo su traducción a proteína. Forman parte de una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras génicas en organismos multicelulares, influenciando en los niveles finales de muchos genes que codifican para proteínas.

Estas pequeñas moléculas de RNA no codificante fueron inicialmente descubiertas en *C. elegans* por Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum<sup>1</sup>, quienes descubrieron que *lin-4*, un gen que actuaba en el control del desarrollo de *C. elegans*, no codificaba para proteína, pero en cambio producía dos RNAs pequeños, uno de 22nt y otro de 61nt de longitud. El más largo se vio que podía adoptar una conformación en *stem loop* y que era el precursor del más corto. Los laboratorios de Ambros y Ruvkun vieron que estos RNAs mostraban zonas *antisense* complementarias a múltiples sitios de la zona UTR 3' del gen *lin-14*<sup>1,2</sup>. Ruvkun y colaboradores mostraron que se veía una disminución de la cantidad de proteína sin que hubiera una reducción de los niveles de mRNA.

El pequeño RNA *lin-4* es ahora reconocido como el miembro fundador de una clase muy abundante de pequeños RNAs reguladores llamados microRNAs o miRNAs<sup>3-5</sup>.

Desde el descubrimiento de *lin-4* en *C. elegans* se han ido descubriendo miRNAs en otras especies y ahora sabemos que muchos organismos multicelulares expresan cientos de miRNAs, los cuales presentan un patrón de expresión dependiente de tipo celular y de tejido<sup>6</sup>. Sin embargo, no fue hasta 7 años después que se encontró el segundo miRNA conocido, *let-7*, otro gen en *C. elegans* que codificaba para un RNA regulador de unos 22nt. Este actuaba promoviendo el desarrollo de la larva tardía hacia la forma adulta de la misma manera que *lin-4* actuaba en el desarrollo temprano, en la transición del primer estadio larvario al segundo<sup>7,8</sup>. A raíz del descubrimiento de *let-7*, se le fueron descubriendo homólogos en otros genomas como el humano o el de otros animales bilaterales<sup>9</sup>. En humanos, según el último recuento en mirBase<sup>10, 11</sup> a Febrero de 2007 hay más de 500 miRNAs maduros registrados. Se han ido descubriendo sus dianas y

funciones, entre las que podemos destacar: control de la proliferación y muerte celular, metabolismo de los ácidos grasos en moscas, formación del patrón neuronal en nematodos, modulación de la diferenciación del linaje hematopoyético en mamíferos o control del desarrollo de las hojas y las flores en plantas, entre otras.



**Figura 1. Evolución en el descubrimiento de los miRNAs según MIRBASE.**

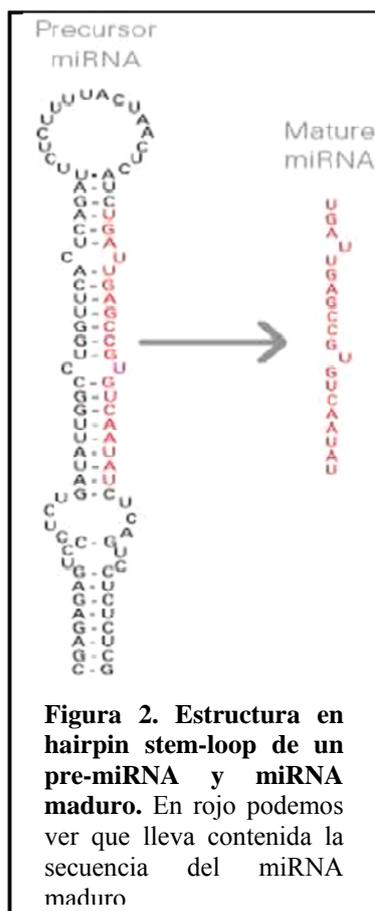
En la gráfica podemos ver la evolución en el descubrimiento de los miRNAs, a través del número de entradas disponibles en MIRBASE desde su primera actualización en el año 2002, con un total de 218 entradas, hasta la última actualización en Febrero de 2007, con ya 4449 entradas que representan miRNAs precursores en horquilla, que expresan 4274 miRNAs maduros, en primates, roedores, pájaros, peces, gusanos, moscas, plantas y virus.

## Biogénesis de los miRNAs

Los genes que codifican para los miRNAs están localizados principalmente dentro de los intrones de genes que pueden codificar para proteínas, así como también en regiones intergénicas o exónicas<sup>12, 13</sup>. En el primer caso, la expresión de los miRNAs puede ir correlacionada con la regulación transcripcional de su gen huésped y de esta manera explicaría una especificidad tisular debida a la expresión de diferentes grupos de genes<sup>14, 15</sup>. En el segundo caso, la expresión de los miRNAs viene regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores<sup>13</sup>. También se ha observado

que los miRNAs pueden estar derivados de secuencias repetitivas de DNA<sup>16</sup>.

Los microRNAs maduros son moléculas de unos 20-25 nucleótidos de longitud, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Éstos derivan de un procesamiento que se inicia en el núcleo de la célula y termina en el citoplasma donde realizan su función. Son transcritos por la RNA polimerasa II que produce una larga molécula de RNA que puede exceder 1 kb, conocida con el nombre de miRNA primario (pri-miRNAs)<sup>17, 18</sup>. Este forma una estructura en *hairpin stem-loop* (Figura 2), la cual es cortada en el núcleo por la endonucleasa RNasa III conocida con el nombre de Droscha, que está asociada con la proteína DGCR8 (en mamíferos) o Pasha (en *Drosophila* y *C. elegans*). *Droscha* corta de forma asimétrica ambas cadenas en los sitios cercanos a la base de la estructura primaria en forma de stem-loop, de forma que el



**Figura 2. Estructura en hairpin stem-loop de un pre-miRNA y miRNA maduro.** En rojo podemos ver que lleva contenida la secuencia del miRNA maduro

producto resultante es una molécula de unos 60-70 nucleótidos denominada pre-miRNA<sup>19, 20</sup>. Este pre-miRNA es exportado al citoplasma de forma activa a través del complejo dependiente de RAN-GTP, Exportina-5<sup>21, 22</sup>. Ran es un cofactor que une GTP durante la exportación nuclear de RNA. En el citoplasma, la molécula de GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miRNA es liberado del complejo exportador. Una vez en el citoplasma, esta molécula de unos 70nt será cortada por la endonucleasa RNasa III conocida como Dicer, asociada a las proteínas TRBP y PACT en mamíferos, dando

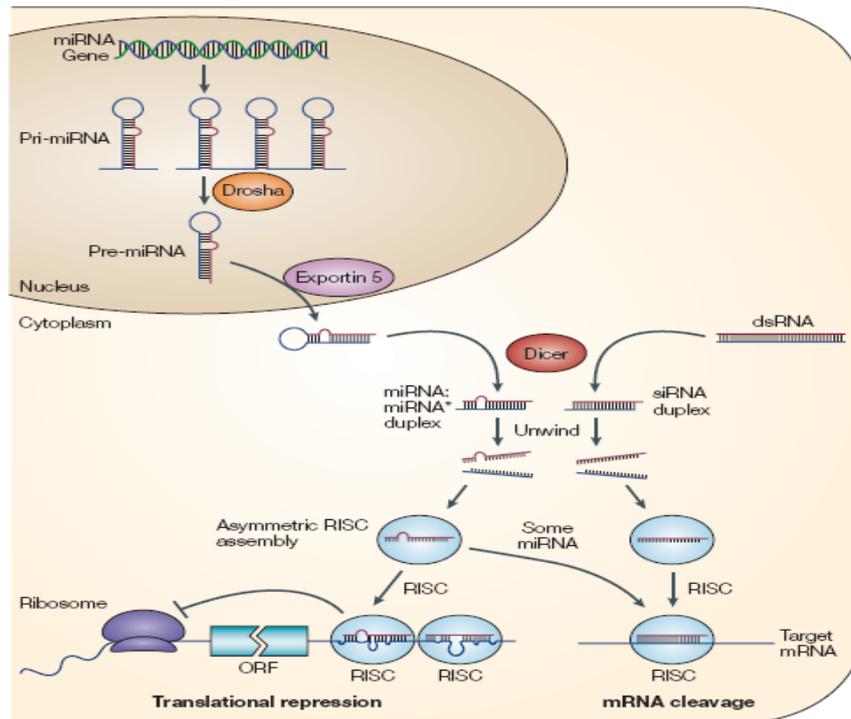
lugar a una molécula de doble cadena conocida como miRNA duplex<sup>21-24</sup>. De este miRNA duplex, se separaran las dos cadenas y una de ellas da lugar al miRNA maduro de unos 20-25nt que se incorpora al complejo ribonucleoproteico conocido como *RNA-induced silencing complex* (RISC)<sup>25,26</sup>, el cual es la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana y/o de la inhibición de la traducción, mientras que la otra cadena, conocida como miRNA\*, es degradada. El complejo RISC cuando actúa con miRNAs se le conoce como miRISC.

Los componentes conocidos del complejo miRISC humano incluyen a Dicer, a las proteínas Argonauta, a TRBP (*HIV-1 transactivation responsive element [TAR] RNA-binding protein*) y a PACT (una proteína de unión a RNA de doble cadena).

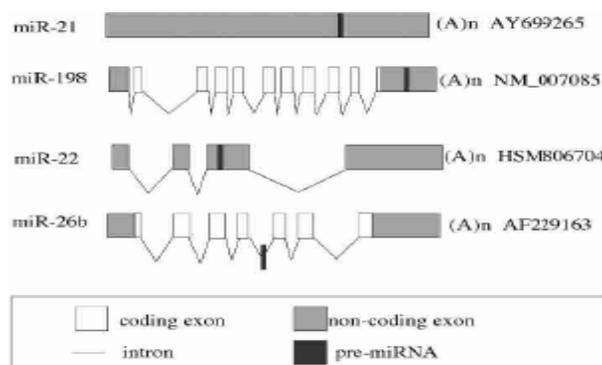
Dicer es una enzima muy conservada en casi todos los eucariotas. En algunas especies, homólogos de Dicer, como Dicer-1 y Dicer-2, tienen funciones específicas en el silenciamiento génico. En *Drosophila melanogaster*, Dicer-1 y Dicer-2 están involucradas en el procesamiento del pre-microRNA y en la generación de RNAs silentes (siRNA), respectivamente. Dicer contiene varios dominios entre ellos un dominio *DEAD-box RNA-helicase* (dominio conservado en la familia de enzimas que usan la hidrólisis de ATP para abrir RNA de doble cadena), un dominio DUF283 (de función desconocida), un dominio RIII (dominio conservado que participa en la reacción endonucleasa que produce la rotura de sustratos de RNA de doble cadena), un dominio de unión a RNAs de doble cadena (dsRNA) y un dominio PAZ (dominio conservado que se une específicamente a hélices de RNAs pequeños).

Como en el caso de Dicer, varias proteínas homologas a Argonauta han sido encontradas en diferentes especies y tienen diferentes funciones en el silenciamiento génico. AGO1 es necesaria para la producción del miRNA maduro, teniendo un papel en la biogénesis de los miRNAs. Todas las proteínas de la familia Argonauta tienen 2 dominios comunes, PAZ y PIWI.

En el complejo miRISC humano formado por TRBP, Dicer, AGO2 y PACT, el enzima catalítico que corta el mRNA diana es AGO2. Los dos pasos cruciales en el ensamblaje de miRISC son: la selección de la cadena de miRNA *sense* o *antisense*, seguido de la potencial destrucción de la otra cadena. Los pasos de estos dos mecanismos no se conocen con exactitud y no está claro si la cadena *sense* es destruida en todas las especies, pero una vez el miRISC se ha ensamblado con la cadena que le hace de guía, este se unirá al mRNA diana en la región UTR 3' para bloquear su traducción.



**Figura 3. Proceso de transcripción, maduración y mecanismos de acción de los miRNAs (He L & Hannon GJ, 2004).**



**Figura 4. Localización de los miRNAs en los transcritos de RNA (Cai X. et al 2004)**

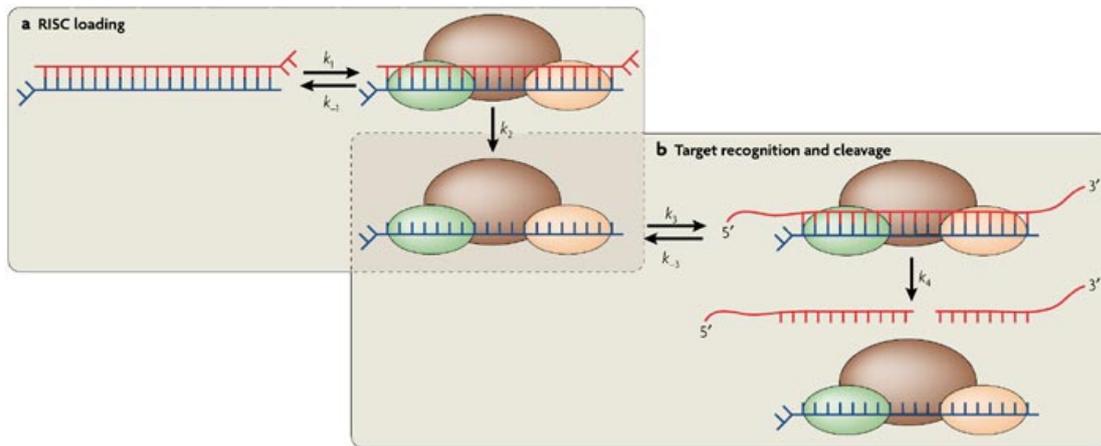
En la figura se muestran cuatro casos: miR-21, miR-198, miR-22 y miR-26b. MiR-21 se transcribe como parte de un RNA no codificante que no sufre splicing. MiR-22 se encuentra en una localización exónica de un RNA no codificante, que sí que sufre splicing. miR-26b y miR-198 se encuentran dentro de genes que codifican para proteína, el primero en zona intrónica y el segundo se encuentra codificado en la región UTR 3' del mRNA.

## ***Mecanismos de acción de los miRNAs***

Los miRNAs pueden regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales: la degradación del mRNA diana o mediante la represión traduccional. La utilización de un mecanismo u otro dependerá del mRNA diana. Una vez el miRNA se incorpore en el complejo citoplasmático RISC, actuará un mecanismo u otro dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con su diana. Si la complementariedad es elevada o total se producirá la degradación del mRNA<sup>27</sup>, mientras que si la complementariedad no es total o es insuficiente se producirá una inhibición de la traducción. Uno de los principales puntos de discusión en este campo gira entorno a dos cuestiones: que grado de complementariedad es necesario para el silenciamiento génico y cuántos miRISC son necesarios para inhibir la traducción. Según los conocimientos disponibles sobre los siRNA, se cree que serían necesarios al menos 11pb para una elevada afinidad en el reconocimiento del mRNA diana y la unión al miRISC. Por debajo de este número la afinidad del complejo miRISC por su diana se encuentra comprometida. Sin embargo, Doench y Sharp<sup>28</sup> reportaron que la habilidad de los miRNAs para suprimir la traducción dependía enormemente de la energía libre de unión entre los primeros 8nt del extremos 5' del miRNA y del mRNA diana. Según esto un miRNA puede actuar sobre muchas zonas UTR 3' de un gran número de genes. Estudios de microarrays mostraron que los miRNAs pueden inhibir muchos mRNA dianas que contengan secuencias que sean complementarias a las posiciones 2-7 del extremo 5' de un miRNA, región que se conoce como *seed sequence*<sup>29</sup>.

La segunda cuestión podría responderse considerando la afinidad del complejo miRISC por su diana. Las evidencias apuntan a que se requieren varias regiones de unión de miRNAs para una interacción miRNA-diana de alta afinidad que suprima la traducción. Es plausible pensar que un miRISC que reconoce una unión imperfecta entre miRNA y mRNA con sólo 7-9nt, se uniría a la diana con baja afinidad. Por lo que múltiples copias de miRISC podrían unirse a la diana para compensar la unión de baja afinidad entre el miRISC y el mRNA<sup>29,30</sup>.

Cuando un miRNA guía hacia la degradación de un mensajero, el corte se produce precisamente en el mismo sitio en que lo producen los siRNA en su actuación, entre los nucleótidos que rodean al residuo 10-11 del miRNA<sup>31</sup> (Figura 5).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figura 5. Proceso de destrucción de un RNA mensajero por la unión complementaria de un miRNA (Rana TM, 2007).**

Después de la degradación del mRNA, el miRNA permanece intacto y puede guiar hacia el reconocimiento y la destrucción de mRNAs adicionales. En general en este mecanismo de acción, la complementariedad se puede dar tanto en regiones codificantes como en regiones UTR 3', mientras que cuando actúa inhibiendo la traducción suele unirse a la región UTR 3' del mRNA. Existen excepciones como la que se ha observado en miR-122 que afecta positivamente la replicación del virus de la Hepatitis C, por unión a la región 5' no codificante (UTR 5')<sup>32</sup>. En este caso, el miRNA tiene función activadora de la expresión génica, aunque no está claro si es un mecanismo único o si representa un mecanismo de acción todavía desconocido de los miRNAs.

En el mecanismo de inhibición traduccional, el principal efector es RCK o p54<sup>33</sup> (componente del complejo miRISC). Estudios recientes muestran que algunos componentes de miRISC colocalizan en los *P-bodies* – puntos citoplasmáticos que contienen complejos proteicos – junto con mRNA reprimido traduccionalmente. Múltiples copias de un miRISC que contiene RCK/p54 puede iniciar un evento de oligomerización que secuestra al mRNA y lo transporta a los *P-bodies*. Una vez allí, el mRNA traduccionalmente reprimido podría permanecer en estructuras oligoméricas para su almacenamiento o podría formar un complejo con enzimas *decapping* y proteínas *cap-binding* que degradan el mRNA. En resumen, el miRNA en el miRISC indica la secuencia diana y RCK/p54 es la molécula efectora que transporta el mRNA hacia el almacenaje o procesamiento en los *P-bodies*<sup>34-36</sup>(Figura 6).

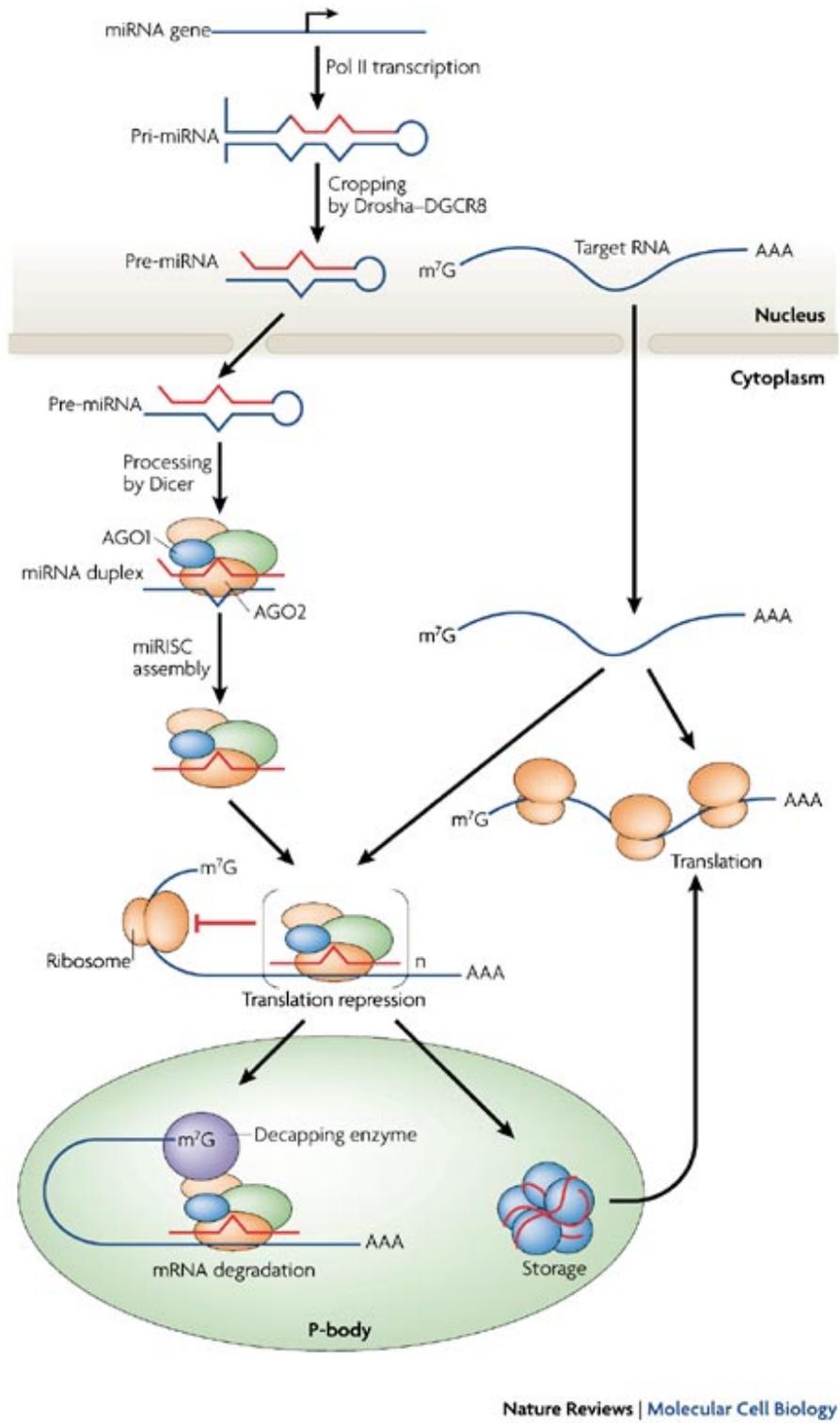
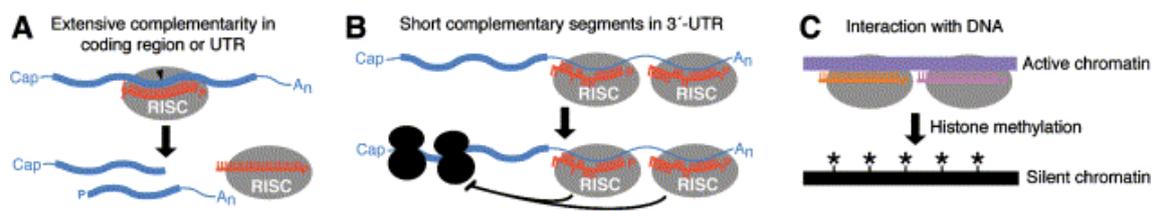


Figura 6. Vía de actuación de los miRNAs en los *P-bodies* (Rana TM, 2007).

Por otro lado, algunos siRNAs pueden unirse al DNA y realizar no sólo represión postranscripcional sino también represión transcripcional. Esto apunta a que los miRNAs podrían también actuar de esta manera. Además, los miRNAs podrían estar relacionados con la regulación de la estructura de la cromatina. En este sentido, la reciente predicción de genes diana de miRNAs entre los cuales hay proteínas modificadoras de histonas, entre ellas histonas metiltransferasas, *methyl CpG-binding proteins* y histonas deacetilasas<sup>37</sup>, apoyaría esta hipótesis (Figura 7).



**Figura 7. Resumen de los diferentes mecanismos de actuación de los miRNAs (Bartel DP, 2004).**

Los miRNAs tiene 3 mecanismos principales de actuación: A) destrucción del mRNA por la unión de forma complementaria a este; B) Inhibición de la traducción si la unión a la zona UTR 3' no es totalmente complementaria. C) Interacción con el DNA que provoca la silenciación de la cromatina.

## RNA interferencia. Otros tipos de RNAs pequeños

La RNA interferencia (RNAi) es un fenómeno muy específico de silenciamiento génico iniciado o disparado por moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA). Esto se descubrió primero en *C. elegans*<sup>38</sup> y en seguida hizo preguntarse a la comunidad científica si este efecto de los RNAi podía usarse para silenciar genes en otros organismos.

La RNAi es un fenómeno de defensa natural encontrado en hongos, plantas y animales. En todos estos reinos, largas moléculas de dsRNA exógeno activa la RNAi. Cuando esta herramienta de inhibición de la expresión se quiso probar en mamíferos, se vio que la entrada de largas moléculas en la célula de dsRNA inducía la activación de la inmunidad innata contra virus, por activación de la vía del interferón. Al introducir las moléculas de dsRNA en la célula se activaba PKR, una proteína quinasa dependiente de dsRNA, que causaba una destrucción inespecífica de RNA y la inhibición de la síntesis proteica<sup>39</sup>. Analizando la maquinaria que actuaba en estos mecanismos se observó que eran complejos proteicos bastante conservados entre especies y que la degradación del mRNA diana venía guiada por fragmentos de RNA de 21-23nt que provenían de largas moléculas de RNA. De esta manera se pudo concluir que moléculas cortas de RNA inducían en mamíferos la interferencia del RNA sin activar la respuesta de la PKR<sup>40, 41</sup>. La RNAi ha emergido como una nueva manera de controlar la expresión génica a nivel postranscripcional, siendo explotada como una herramienta para investigar funciones génicas.

Hay varios tipos de RNAs pequeños endógenos identificados: *Small interfering RNAs* (siRNAs), *Trans-acting siRNAs* (tasiRNAs), *Tiny noncoding RNAs* (tncRNAs), *Small scan RNA* (scnRNAs), *Repeat-associated small interfering RNAs* (rasiRNAs), *Piwi-interacting RNAs* (piRNAs), y miRNAs (Tabla 1). La biogénesis de estos pequeños RNAs es en mayor parte dependiente de la enzima RNasa III Dicer, exceptuando los rasiRNAs y los piRNAs, que parecen formarse independientemente de Dicer. En mamíferos encontramos los siRNAs y los miRNAs. También los piRNAs, pero estos son de expresión exclusiva de la línea germinal.

Por su tamaño y estructura química los miRNAs son como los siRNAs. Como podemos ver en la figura 8 estas dos clases de RNAs no codificantes derivan de distintos tipos de precursores inmediatos: largas (cientos o miles de bases) moléculas de doble cadena en el caso de los siRNAs, y cortos (60-80 nucleótidos) pre-miRNA stem-loops en el caso

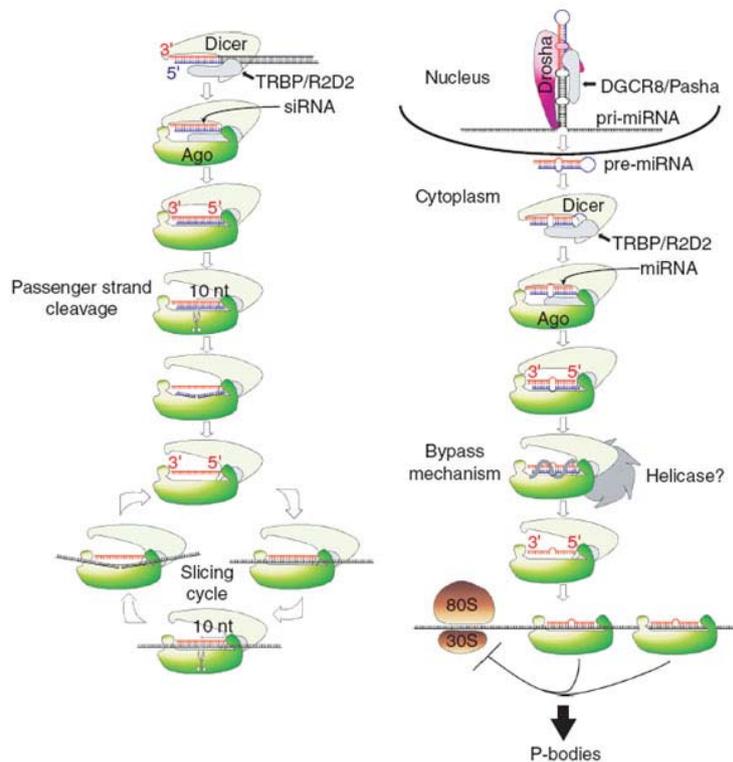
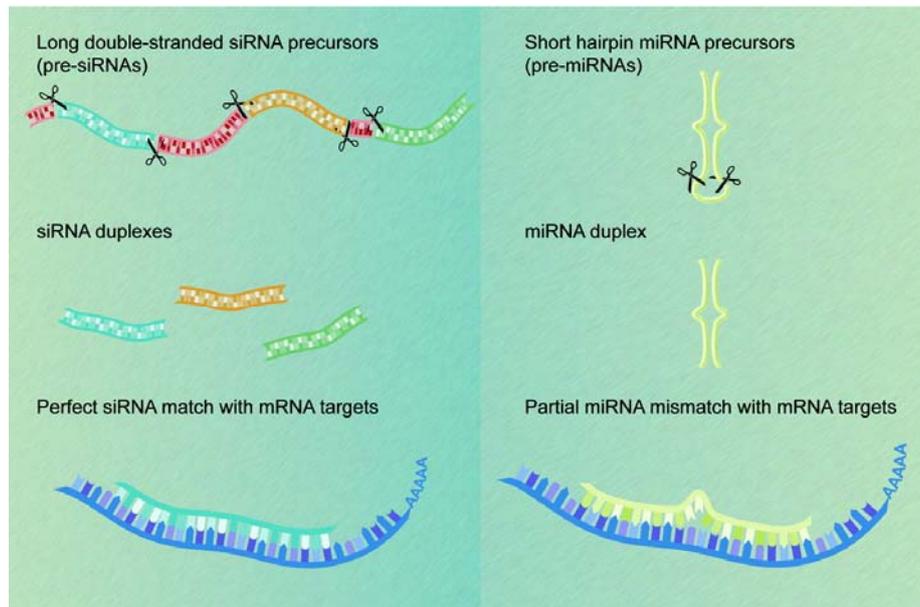
de los miRNAs. Sin embargo, la producción y función de estos pequeños RNAs tiene factores en común como las endonucleasas como Dicer, las cuales cortan de forma específica dsRNA, y las proteínas de unión a RNAs pequeños de la familia de los Argonautas, los cuales dirigen a las moléculas diana hacia el complejo RISC.

Por otro lado los siRNAs reconocen y se unen a su mRNA diana con una complementariedad perfecta, mientras que los miRNA suelen unirse de forma no tan complementaria, con algunos nucleótidos desemparejados, y como se ha explicado, dependiendo de la complementariedad tendrán un mecanismo de acción u otro. De forma mayoritaria en mamíferos, el siRNA provoca la degradación del mRNA, mientras que el miRNA suele actuar inhibiendo la traducción. Se ha descrito además, que los siRNAs pueden tener un papel en la regulación de la estructura de la cromatina, por unión directa al DNA<sup>42, 43</sup> (Figura 8).

Clase	Descripción	Tamaño (nt)	Especie	Modo de acción
siRNA	Small interfering RNA	~20-24	Mamíferos, At, Dm, Sp, Ce	Complementariedad perfecta con su mRNA diana. Se puede unir a cualquier parte del mensajero. Provoca la degradación del mRNA.
miRNA	MicroRNA	~20-24	Mamíferos, At, Dm, Sp, Ce	Ver: Mecanismos de acción de los miRNAs.
tasiRNA	Trans-acting siRNA	~24	At, Dm, Sp	Actúan como los siRNA degradando mRNA. Pero actúan en <i>trans</i> , actuando sobre mRNAs de otros genes de los que son derivados.
tncRNA	Tiny non-coding RNA	~20-21	Ce	Como los tasiRNA. Pueden también facilitar la supresión traduccional.
scnRNA	Small scan RNA	~28	Tt	Actúan en eliminación de DNA.
rasiRNA	Repeat-associated small interfering RNA	~24-29	At, Dm, Sp, Ce	Provocan silenciamiento transcripcional vía remodelación de la cromatina.
piRNA	Piwi-interacting RNA	~26-31	Mamíferos	Se expresan de forma específica en la línea germinal, con función en la gametogénesis.

**Tabla 1. RNAs pequeños identificados en mamíferos o en otras especies.**

La biogénesis de estos pequeños RNAs es en mayor parte dependiente de la enzima RNasa III Dicer, excepto para los RasiRNAs y piRNAs que parecen formarse de forma independiente de Dicer. At, *A. thaliana*; Dm, *D. melanogaster*; Sp, *S. pombe*; Ce, *C. elegans*; Tt, *T. thermophila*.



**Figura 8. Diferencias en la biogénesis y actuación entre miRNAs y siRNAs (Shivdasani RA. 2006).**

Los siRNAs (izquierda) derivan de largas moléculas de dsRNA endógeno. El procesamiento de estas moléculas de dsRNA precursoras puede generar muchos siRNAs diferentes de ambas cadenas. Por otro lado (derecha), el procesamiento de las cortas cadenas en horquilla de los pre-miRNAs produce una molécula de miRNA de cadena sencilla de uno de los brazos del precursor. Ambas moléculas acaban produciendo el silenciamiento de la expresión de un gen.

## **Identificación de las dianas de los miRNAs**

Cada miRNA puede tener muchos mRNAs diana y cada mRNA puede estar regulado por más de un miRNA. Debido a que la identificación experimental de dianas de los miRNAs es difícil, ha habido un aumento en la predicción bioinformática de dianas. Los primeros resultados de estas predicciones fueron muy diversos, aunque los últimos análisis sugieren que por lo menos una cierta clase de dianas conservadas de miRNAs pueden ser predichas con cierta seguridad y esta clase abarca el 30% o más de todos los genes humanos, cuando consideramos unas 60 familias conservadas de miRNAs de vertebrados<sup>37</sup>.

En el 2003 empezó la primera ronda de predicción de dianas de miRNAs, descubriendo por vía bioinformática que el miRNA *bantam* de la mosca, regula negativamente el gen proapoptótico *hid*<sup>44</sup>. Otros grupos empezaron también a publicar predicciones de dianas de miRNAs en *D. melanogaster* y en vertebrados. Estas primeras predicciones se basaron en un pequeño conjunto de sitios de unión del miRNA que se veía en las dianas validadas experimentalmente, todos ellos localizados en la región UTR 3'. Los programas de predicción iniciales evaluaban el grado de complementariedad con el mRNA diana y la energía libre predicha del complejo mRNA/miRNA.

Una de las contribuciones más importantes para el reconocimiento de nuevas dianas fue el descubrimiento de secuencias cortas de unos 6-8pb consecutivas en el miRNA que se unían al mRNA diana con una complementariedad Watson-Crick<sup>45, 46</sup> perfecta. Estas zonas de unión suelen encontrarse en la región 5' del miRNA, y se las conoce con el nombre de semilla (*seed sequence*).

A pesar de que todos estos métodos tienen unas bases en común, pequeñas diferencias en los algoritmos de predicción provocan gran diversidad de resultados en la predicción de dianas. A parte de las diferencias en los algoritmos es importante tener en cuenta que no es sencillo definir la región UTR 3' de un gen. En este sentido, diferentes bases de datos pueden diferir de forma considerable y también pueden no tener en cuenta a menudo las isoformas específicas de tejido. Otro problema, era como incorporar en las predicciones la longitud de la secuencia UTR 3' en la puntuación que se le asigna a un sitio diana, ya que si una región UTR 3' es muy larga, no es sorprendente encontrar sitios de unión que sean por casualidad, inespecíficos. Además, no se sabe si un sitio localizado en una región UTR 3' corta tendrá mayor o menor eficacia en la represión de la diana que un sitio localizado en una región UTR 3' larga. Finalmente, el contenido

nucleotídico de una región UTR 3' es muy variado, cosa que tendrá que tenerse también en cuenta en la búsqueda de dianas. Casi todos los algoritmos usan sitios diana conservados evolutivamente, como filtro biológico.

Todos estos métodos basados en el análisis de la secuencia genómica, predicen crudamente unos pocos cientos de dianas posibles para todos los miRNAs en cada animal, pero sólo una pequeña fracción de estos tienen un soporte experimental y el solapamiento entre los sitios diana predichos por diferentes algoritmos es marginal.

Una nueva generación de programas de predicción de dianas emerge en 2005, basados principalmente en experimentos sistemáticos de mutación de sitios diana<sup>47, 48</sup> y en un análisis bioinformático más extenso que añade las ventajas de las comparaciones de secuencias entre especies, gracias a la reciente disponibilidad de alineamientos genómicos de alta calidad de varios metazoos secuenciados recientemente. Los experimentos de mutaciones indican que existen por lo menos dos clases de sitios diana de miRNAs (Figura 9). Una clase de sitios diana del miRNA que muestran una perfecta complementariedad Watson-Crick en el extremo 5' del miRNA y que no requieren mayores uniones de bases (Figura 9a). La otra clase tiene uniones imperfectas en la región 5', pero lo compensa con uniones adicionales en el extremo 3' del miRNA (Figura 9b). El número de sitios diana estadísticamente detectables en el primer grupo parece ser de un orden de magnitud mayor que el número de sitios del segundo grupo. Además, sitios conservados en el primer grupo cubren una fracción mayor de genes en vertebrados, moscas y nemátodos<sup>37, 47, 49</sup>. Se ha propuesto que la incorporación de la estructura secundaria de la región UTR 3' podría ayudar a predecir dianas de miRNAs biológicamente importantes<sup>50</sup>. Otro problema es que otros factores de unión al mRNA pueden estar actuando cambiando la estructura secundaria, como por ejemplo las proteínas que se unen al mRNA y lo circularizan durante la traducción.

Actualmente es difícil juzgar cuales de los algoritmos produce la mejor predicción, y tal como podemos ver en la tabla 2 tenemos diferentes bases de datos que nos facilitan dianas predichas de miRNAs en diferentes especies. En una de ellas, Tarbase, encontramos las dianas que se han validado experimentalmente.

Ha sido ampliamente propuesto que varios miRNAs pueden actuar juntos para regular un mismo mRNA. Esta idea ha sido corroborada por experimentos *in vitro*<sup>51</sup>, así como por la observación de que muchas regiones UTR 3' presentan sitios de unión para diferentes miRNAs<sup>47, 51, 52</sup>. Se ha observado también en varios casos que múltiples sitios de unión para el mismo miRNA provocan un aumento de la represión y esto ha sido

incorporado en algunos de los algoritmos de predicción. A pesar de todo esto no está muy claro si diferentes miRNAs actúan *in vivo* de forma sinérgica, aunque hay evidencias *in vitro* de que diferentes miRNAs coexpresados pueden regular el gen murino *Mtpn* de forma dependiente de concentración<sup>52</sup>. Análisis computacionales han mostrado que múltiples sitios de unión para diferentes miRNAs de la mosca en la misma región UTR 3' están distribuidos de forma diferente de lo que se esperaría por casualidad<sup>53</sup>.

También podría suceder que la presencia de sitios para diferentes miRNAs en la misma región UTR 3', sólo indicara que el mRNA esta regulado de forma independiente por los diferentes miRNAs en diferentes tejidos o durante diferentes espacios temporales, como por ejemplo durante el desarrollo embrionario.

Otros factores que se han ido incluyendo en algunos algoritmos de predicción son el grado de conservación entre especies tanto de la región UTR 3', como de los posibles sitios diana de miRNAs que tenga. También se ha estudiado la correlación de expresión de miRNAs con la expresión de mRNAs a través de estudios de microarrays. En este sentido se sabía que los miRNAs podían actuar degradando el mRNA, con lo cual se podían realizar análisis antes y después de inhibir la expresión de un determinado miRNA (*knockdown*) y seguir como cambiaban los niveles de determinados mRNAs<sup>54</sup>. Observaron que no sólo había mRNAs que aumentaban al eliminar la expresión del miRNA específico, sino que también había algunos mRNAs que disminuían, debido a que el miRNA estaba actuando de forma indirecta en la activación de la expresión de estos mRNAs. Por lo tanto, estos mRNAs evitaran tener motivos de unión en su región UTR 3' de este miRNA, de forma que aquí se estaban identificando anti-dianas<sup>55</sup>, la identificación de las cuales es tan importante como la identificación de las dianas en sí. El otro punto importante es la integración de las predichas relaciones regulatorias de los miRNAs en los datos genómicos funcionales conocidos<sup>56</sup>. Así como también de datos cuantitativos de los niveles de expresión de estos miRNAs en diferentes tejidos o periodos.

Todos estos últimos puntos, se han intentado también incluir en algunos algoritmos de predicción, de forma que hay una interacción cada vez mayor entre los datos experimentales que se van produciendo y los algoritmos de predicción.



<b>Base de Datos</b>	<b>Dirección Web</b>	<b>Características</b>
<i>MIRBASE</i>	<a href="http://microrna.sanger.ac.uk/">http://microrna.sanger.ac.uk/</a>	<i>Secuencias, dianas y registro</i>
<i>TARGETSCAN</i>	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>	<i>Dianas predichas de miRNAs</i>
<i>TARBASE</i>	<a href="http://www.diana.pcbi.upenn.edu/tarbase.html">http://www.diana.pcbi.upenn.edu/tarbase.html</a>	<i>Dianas validadas experimentalmente</i>
<i>MIRANDA</i>	<a href="http://www.microrna.org/">http://www.microrna.org/</a>	<i>Dianas predichas</i>
<i>miRNAMap</i>	<a href="http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/">http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/</a>	<i>Dianas, localización y estructura</i>
<i>miRGen</i>	<a href="http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html">http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html</a>	<i>Organización genómica y función. Clusters de miRNAs.</i>
<i>DIANA-MicroT Analyzer</i>	<a href="http://diana.pcbi.upenn.edu/">http://diana.pcbi.upenn.edu/</a>	<i>Predicción de dianas de miRNAs</i>
<i>Programas Análisis dianas</i>		
<i>David Database</i>	<a href="http://david.abcc.ncifcrf.gov/">http://david.abcc.ncifcrf.gov/</a>	<i>Agrupación funcional</i>
<i>Genig</i>	<a href="http://algggen.lsi.upc.es/recerca/visual/genig/intro-genig.html">http://algggen.lsi.upc.es/recerca/visual/genig/intro-genig.html</a>	<i>Agrupación mediante interacciones descritas</i>

**Tabla 2.** Bases de datos de microRNAs humanos y de predicción de dianas. También se muestran programas utilizados en el análisis de grandes grupos de genes, tanto para su agrupación funcional como de sus interacciones intergenómicas.

## **Regulación de la expresión de los miRNAs**

El genoma humano contiene más de 1000 genes que codifican para miRNAs, cosa que constituye aproximadamente el 1-5% de los genes expresados<sup>57</sup>. Estos miRNAs están conservados filogenéticamente y a menudo se organizan en tandem o en clusters<sup>4</sup>. Estas organizaciones pueden tener una particular importancia en el control de la expresión génica y en la propia expresión de estos miRNAs, ya que cuando un grupo de miRNAs de secuencias similares se encuentra agrupado en un cluster, los productos de la expresión de estos miRNAs se pueden sincronizar para regular un conjunto de mRNA dianas. Sin embargo, estos clusters pueden contener también miRNAs con diferentes secuencias, que se dirigirán cada uno hacia sus dianas específicas.

Aproximadamente la mitad de los genes de los miRNAs (52.5%) se encuentran localizados en o cerca de sitios frágiles, o en regiones genómicas asociadas a cáncer<sup>58</sup>. Estos sitios son preferencialmente zonas de intercambio de cromatina, de translocaciones, deleciones, amplificaciones o de integraciones de DNAs plasmídicos y de virus asociados a tumores, los cuales frecuentemente causan la expresión aberrante de miRNAs durante la patogénesis. Por ejemplo, miR-15a y miR-16a están frecuentemente deleccionados y/o infraexpresados en pacientes con Leucemia linfoblástica crónica (LLC). Estos están situados en 13q14, región que aparece deleccionada en muchos casos de LLC<sup>58</sup>. Esto refuerza que la expresión aberrante de miRNAs en algunos casos viene producida por los defectos intrínsecos que acompañan al desarrollo del tumor.

Llegados a este punto, cabe preguntarse quien regula la expresión de estas moléculas reguladoras de muchos de los procesos celulares, y aunque todavía poco se conoce, hay algunos ejemplos: la vía de señalización LIN-12/Notch regula la expresión del gen *MIRN16*<sup>59</sup>. Esto parece mostrar que la regulación de la expresión de los miRNAs sigue el modelo clásico de control de la expresión de los mRNAs. Otro ejemplo, es el caso de *MIRN146* que contiene en su región UTR 5' tres secuencias consenso de unión de *NFkB*, cosa que muestra que *MIRN146* es un gen dependiente de *NFkB*. Si estos ejemplos son casos únicos, o si son el modelo común que sigue la regulación de la expresión de los miRNAs, son preguntas que necesitan todavía ser contestadas.

## Control epigenético de la expresión de miRNAs

Se conocen varios mecanismos por los cuales determinados miRNAs pueden verse sobreexpresados o infraexpresados. Como acabamos de ver, cualquier mecanismo que pueda provocar la sobreexpresión o infraexpresión de un gen, como la amplificación génica o la delección, podrá afectar a los niveles de miRNAs.

El hecho de que los mecanismos epigenéticos puedan controlar la expresión de muchos genes que codifican para proteína y que los miRNAs sean generalmente transcritos por la Pol II, hace razonable pensar que la epigenética pueda jugar un papel fundamental en el control de la expresión de los miRNAs. Saito et al<sup>60</sup>, mostraron que los mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA y las modificaciones de histonas, pueden afectar a la expresión de miRNAs. En concreto, vieron que miR-127 se veía remarcablemente sobreexpresado en líneas celulares tumorales después del tratamiento con 5-Aza-CdR (un potente inhibidor de la metilación) y 4-phenylbutyic acid (un inhibidor de las histonas deacetilasas). Estos dos fármacos juntos producen una reducción de los niveles de metilación de la célula y una mayor apertura de la estructura de la cromatina, induciendo de esta forma la re-expresión de genes que han sido silenciados epigenéticamente. El descubrimiento de que miR-127, entre otros muchos miRNAs, podía ser expresado después de la aplicación de este tratamiento, sugería que mecanismos epigenéticos pueden controlar la expresión de miRNAs. Scott et al<sup>61</sup>, también mostraron que el tratamiento de la línea celular SKBr3 de cáncer de mama con el inhibidor de histona deacetilasa LAQ824 provocaba un cambio rápido en su patrón de expresión de miRNAs.

Muchos miRNAs están localizados en los intrones de genes que codifican para proteínas<sup>62</sup>. Se cree que estos miRNAs están coregulados con sus genes huésped<sup>63</sup>, aunque es posible que estos miRNAs puedan tener sus propios promotores. El descubrimiento de que las islas CpG dentro de los intrones puedan actuar como promotores, sugiere que quizás miRNAs intrónicos que tengan islas CpG *upstream* dentro del mismo intrón, podrían ser transcritas de sus propios promotores regulados por metilación del DNA.

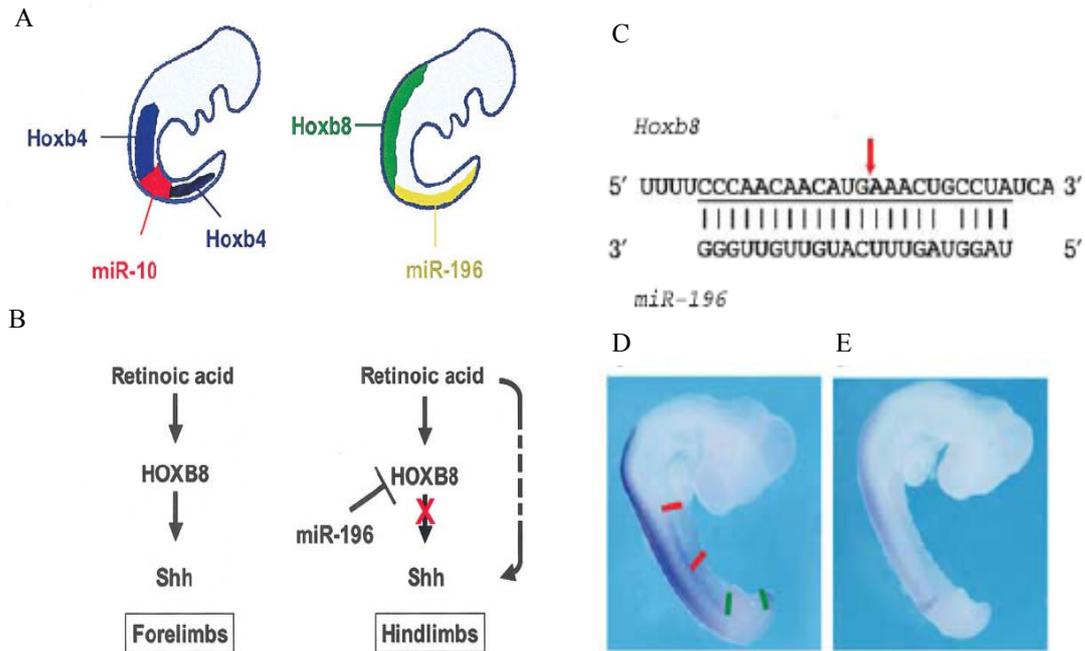
## ***Embriogénesis y miRNAs***

El desarrollo animal requiere el establecimiento de una red espacio-temporal de expresión génica elevadamente regulada para poder convertir el cigoto totipotente, en un animal que contenga varios tejidos especializados que funcionan de forma concertada. La expresión desordenada de los genes envueltos en el desarrollo puede ser la causa de muchas enfermedades hereditarias, entre las que se incluye el cáncer.

La evidencia más importante sobre si los miRNAs están involucrados en el desarrollo embrionario temprano, viene dada por el estudio de la deficiencia de Dicer en estas etapas. El resultado de mutar Dicer en embriones de invertebrados y en el pez cebra indican que los miRNAs son necesarios para un desarrollo embrionario normal<sup>64-67</sup>. Embriones con el enzima Dicer mutado son letales por parada temprana en el desarrollo,<sup>66</sup> ya que ocurren anomalías en la diferenciación subsiguiente y en el proceso morfogénico<sup>67</sup>. Los primeros estudios que se hicieron para determinar de la importancia de los miRNAs en el desarrollo embrionario de los mamíferos, empezaron con la generación de embriones de ratón nulos para Dicer-1<sup>68</sup> y Argonauta-2<sup>69</sup>. En los embriones con falta de Dicer se observó letalidad alrededor del día embrionario 7.5 y incapacidad para la derivación de células madre embrionarias. Todo esto indicaba que los miRNAs son necesarios para el desarrollo embrionario temprano y para el mantenimiento de las poblaciones de células madre pluripotentes en el embrión.

Estudios de hibridación *in situ* también mostraron que Dicer-1 y los miembros de la familia Argonauta en los días embrionarios 11.5-14.5 en ratón, se expresan de forma diferente y dinámica<sup>70</sup>. De forma interesante se observó que los diferentes miembros de la familia Argonauta se expresaban en regiones preferentemente diferentes, con lo cual pueden jugar un papel distinto sobre la regulación de los miRNAs.

Para comprender la necesidad de Dicer y de los miRNAs en el desarrollo tardío, Harfe y colaboradores<sup>71</sup> crearon un alelo condicional de Dicer, al cual se le podía inducir la delección. Utilizando este modelo se comprobó la importancia de Dicer en el desarrollo de las extremidades<sup>70</sup> (Figura 10). MiR-196 y miR-10 son los primeros miRNAs que se han detectado regulando el desarrollo de las extremidades en mamíferos actuando sobre los genes Hox<sup>72, 73</sup> (Figura 10).



**Figura 10. MiR-10 y miR-196 actúan en la formación de las extremidades vía genes Hox. (A y B de Lee CT. et al 2006; C y D de Hornstein E. et al 2005)**

A) Esquema donde se muestra la expresión de *Hoxb4* en el embrión de ratón en las regiones donde no se expresa miR-10 y expresión de *Hoxb8* en la región donde no se expresa miR-196. B) La formación de extremidad superior o inferior viene controlada por la vía del gen *Sonic hedgehog* activado por *Hoxb8*. Dependiendo de la presencia de miR-196 se desarrollan extremidades superiores (miR-196 bajo) o extremidades inferiores (miR-196 alto). C) Región UTR 3' del gen *Hoxb8* con la secuencia complementaria de miR-196 unida. D) *Whole mount* de la expresión del gen *Hoxb8* en embrión de pez cebra. Vemos expresión de *Hoxb8* en la región superior, marcada entre dos rallas rojas, mientras que no vemos expresión en la parte inferior, entre rayas verdes. E) Al infectar con RCAS::miR-196 y aumentar los niveles de este miRNA, vemos que desaparece casi por completo la expresión de *Hoxb8*.

También se han realizado estudios de los patrones globales de expresión de miRNAs por diferentes técnicas, analizando los diferentes estadios de desarrollo embrionario del ratón. Se han analizado embriones enteros de 9.5, 10.5 y 11.5 días embrionarios<sup>74</sup>. El análisis jerárquico de clusters reveló que el patrón de miRNAs variaba bastante en los tres estadios analizados. Vieron además un grupo de miRNAs, que incluía a miR-20 y miR-193, que mostraban una expresión específica en el día 10.5, cosa que sugería que este grupo de miRNAs podía jugar un papel importante en la transición embrionaria que ocurre en el día embrionario 10.5 del ratón.

Se han realizado también estudios de la expresión de miRNAs en células madre embrionarias de ratón y humanas, observándose unos patrones específicos de expresión de miRNAs en estas células<sup>75-77</sup>. Además se han comparado las expresiones relativas de miRNAs en células madre embrionarias con la expresión en cuerpos embrioides para deducir las diferencias de expresión. Con esto se ha descrito, un juego de miRNAs específico de células madre embrionarias, que no se expresan en los cuerpos embrioides<sup>75, 76</sup>.

Utilizando una técnica más sensible como es la RT-PCR, Strauss et al, estudiaron el patrón de expresión de 248 miRNAs en 13 líneas diferentes de células madre y en sus correspondientes cuerpos embrioides. También analizaron un panel de tejidos somáticos. En este trabajo describieron un juego de miRNAs específico de célula madre, pero al contrario que en los trabajos anteriores, no vieron un juego de miRNAs que fuera específico de células madre y que excluyera a los cuerpos embrioides. Aún así, este juego de miRNAs no se observó en ningún tejido somático, sugiriendo que podían ser específicos del estadio de preimplantación del desarrollo. Ningún tipo celular postimplantación exhibía una firma de miRNAs similar a la de las células madre embrionarias. Parece que la expresión de los miRNAs puede ser importante para comprender la identidad de estas células.

Hasta ahora se había sugerido que el patrón de expresión de mRNAs durante el desarrollo estaba restringido, pero no parece coincidir con la expresión vista en la firma de miRNAs, que no parece estar restringida. Con lo cual parece que hay una interacción entre la transcripción de mRNAs y la de microRNAs esencial para el correcto desarrollo embrionario.

Hay otros ejemplos claros de cómo los miRNAs actúan en el desarrollo de estructuras embrionarias como es el caso del desarrollo neuronal o la diferenciación de los músculos esqueléticos y cardíaco.

En el primer caso hay varios estudios, los primeros en *C. elegans*<sup>78, 79</sup> y los últimos en ratón<sup>6, 78</sup>, en que se muestra la importancia de los miRNAs en el desarrollo y diferenciación neuronal. Se vio que las neuronas embrionarias estaban enriquecidas de miR-124 y miR-128. Por otro lado se vieron que miR-23, miR-26 y miR-29 eran muy abundantes en astrocitos, y otros como miR-125 y miR-9 eran ubicuos. Esta distribución divergente de miRNAs puede contribuir a una localización apropiada de la composición proteica requerida para muchos tipos especializados de compartimentos neuronales. MiRNAs neuronales específicos, pueden conducir a las células neuronales progenitoras hacia diferentes tipos de diferenciación: la aparición de la expresión de miR-124a provoca que la célula neuronal progenitora se diferencie hacia neurona, mientras que el mantenimiento de la expresión de miR-23 mantiene la célula como astrocito, aboliéndose la expresión de este miRNA en la neurona diferenciada<sup>80</sup>.

En el segundo caso encontramos 2 miRNAs: miR-1 y miR-133, que sólo se detectan en músculo esquelético y cardíaco<sup>81</sup>. En el desarrollo embrionario del corazón de ratón, miR-1 aparece fuertemente expresado y tiene como diana a Hand2<sup>82</sup>. Parece que miR-133 tiene un papel indirecto en la regulación de la síntesis de miR-1<sup>83</sup>. Otro miRNA interesante en el desarrollo del músculo es miR-138, que se observa enriquecido en mioblasto momentos antes de que los factores requeridos para la diferenciación aparezcan, y no se encuentra expresado en células musculares diferenciadas. La represión de éste durante el desarrollo puede derivar en defectos en la diferenciación de los mioblastos<sup>83</sup>.

Papeles específicos de los miRNAs han sido también caracterizados en la hematopoyesis, de los cuales hablaremos más adelante, así como también en la organogénesis de la piel y el pulmón<sup>70, 84-86</sup>.

En resumen, los microRNAs juegan un papel importante y necesario durante el desarrollo embrionario y el desarrollo tisular. Así como también, están implicados en mantener la identidad de las células madre embrionarias y en regular su diferenciación y automantenimiento. Estos microRNAs son altamente específicos de tipo celular y de tejido, de forma que cada línea celular del organismo tiene un patrón de expresión específico.

## ***miRNAs y cáncer***

La importancia de los miRNAs en cáncer viene verificada por el descubrimiento de que la mayoría de los miRNAs humanos se encuentran localizados en regiones genómicas asociadas a cáncer<sup>87</sup>, y hay una evidencia creciente que sugiere que la expresión anormal de miRNAs es una característica común de los procesos neoplásicos<sup>88</sup>. Además se ha sugerido que los patrones de expresión de miRNAs pueden distinguir cánceres según su diagnóstico y estadio de desarrollo, de forma mucho más precisa que los estudios tradicionales de expresión génica<sup>89</sup>.

Los miRNAs juegan un papel directo en la oncogénesis, ya pudiendo actuar como oncogenes o bien actuando como genes supresores de tumores. La expresión aberrante de estos miRNAs se ha asociado con muchos tipos de cánceres, incluyendo tumores sólidos y hematopoyéticos. En algunos casos la expresión aberrante se ha asociado a alteraciones cromosómicas, pero en general parece que los mecanismos por los cuales se ve alterada su expresión permanecen sin aclarar debido a una falta de comprensión total de los mecanismos que regulan la expresión de los miRNAs.

## **miRNAs en tumores sólidos**

### *miRNAs con actividad supresora de tumor*

La familia de miRNAs let-7a tiene un papel importante en la patogénesis del cáncer de pulmón. En este sentido se vio que su expresión estaba reducida en cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC)<sup>90</sup> y niveles bajos de let-7 correlacionaban con baja supervivencia postoperatoria independientemente del estadio clínico. En este mismo trabajo se observó que la sobreexpresión de let-7 en la línea celular A549 de adenoma de pulmón inhibía la proliferación, cosa que indicaba que let-7 actuaba como un gen supresor de tumor. Analizando posibles genes diana se vio que su función de gen supresor de tumor la ejercía vía el oncogén *RAS*<sup>91</sup>, inhibiendo la expresión del mismo.

### *miRNAs con actividad oncogénica*

Los miRNAs miR-372 y miR-373 tienen función oncogénica en tumores testiculares de línea germinal humanos<sup>92</sup>. Estudios funcionales muestran que su función oncogénica la realizan a través de la inhibición de *CDK2*, una quinasa dependiente de ciclina mediada

por p-53. De forma que estos miRNAs activan la proliferación actuando en la vía de p-53, en un tipo de tumor en que muy raramente se ve alterado p-53, con lo que se permite la activación de la proliferación con p-53 wild-type.

El loci genómico 13q21 se encuentra a menudo amplificado en neoplasias hematológicas así como también en tumores sólidos, como glioma, NSCLC, cáncer de vejiga, tumores de cabeza y cuello y en otros tumores<sup>93</sup>. La amplificación de esta región provoca una sobreexpresión de los miRNAs que componen el cluster miR-17-92: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92-1. O'Donnell y colaboradores mostraron que el factor de transcripción, c-Myc, regulaba la expresión de este cluster<sup>94</sup>. Además observaron que 2 miembros del cluster: miR-17-5p y miR-20a, regulaban negativamente la traducción de *E2F1*, un factor de transcripción regulado por c-Myc y que actuaba mediando la proliferación celular. La transcripción del cluster miR-17-92 no está sólo controlada por c-Myc, sino que está también bajo la influencia del factor de transcripción E2F1-3, la traducción del cual está regulada por miR-20a<sup>95, 96</sup>, sugiriéndose la existencia de una complicada red de conexiones genéticas que controlan la proliferación celular.

MiR-21 se encuentra sobreexpresado en numerosos tumores, como en el cáncer de mama, el glioblastoma o el pancreático<sup>97-101</sup>. La infraexpresión de este en líneas celulares de cáncer de mama o de glioblastoma mediante un anti-sense para miR-21, resulta en una disminución de la proliferación acompañada de un aumento en la apoptosis<sup>98, 101</sup>. Aparentemente este funciona como oncogén inhibiendo genes proapoptóticos como *PTEN*. La sobreexpresión de miR-21 produce una regulación negativa de *PTEN*, provocando una señal de supervivencia más activa a través de la vía de la quinasa PI-3-Akt, haciendo que las células sean menos susceptibles a entrar en apoptosis o a parada de ciclo celular. En un tumor tan resistente a la quimioterapia como el colangiocarcinoma, el tratamiento de las líneas celulares con un inhibidor de miR-21 hace que estas respondan mejor a la gemcitabina, y al contrario cuando a estas líneas se las transfecta con el precursor de miR-21, se vuelven más resistentes al tratamiento<sup>102</sup>.

Otro miRNA en el que se ha detectado variaciones en los niveles de expresión en tumores sólidos, es miR-155 que está sobreexpresado en algunos linfomas y en NSCLC<sup>103</sup> y que está infraexpresado en cáncer de páncreas<sup>100, 104</sup>. Otros miRNAs son miR-143 y miR-145 que están infraexpresados en cáncer colorectal tal como podemos ver en la tabla 3.

miRNAs	Mecanismo de acción	Tipo de cáncer	Expresión de los miRNAs
miR-15a, miR-16-1	vía <i>BCL2</i> efecto antiapoptótico	LLC	Delecionado o infraexpresado
miR-24-2, miR-195, miR-203, miR-220, miR-221, miR-213	Desconocido	LLC	Infraexpresado
miR-7-1, miR-19a, miR-136, miR-154, miR-217, miR-218-2	Desconocido	LLC	Sobreexpresado
miR-142	Activación de la expresión de <i>c-Myc</i> por translocación	LLC agresivo	Delecionado o infraexpresado
Familia let-7	Suprime la expresión del oncogén <i>Ras</i>	Cáncer de pulmón, mama, uréter y cervix	Infraexpresado
miR-17, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b, miR-92	Regula negativamente el oncogén <i>E2F1</i>	Linfomas malignos	Sobreexpresado
miR-221, miR-222, miR-146	Via <i>KIT</i>	Carcinoma papilar de tiroides	Desconocido
BIC/miR-155	Desconocida	Linfoma de Burkitt y de Hodgkin, NSCLC. Cáncer de páncreas.	Sobreexpresado. Infraexpresado
miR-26a	Desconocida	Cánceres epiteliales	Delecionado o infraexpresado
miR-143, miR-145	Desconocida	Cáncer colorectal	Infraexpresado
miR-21	Regula <i>PTEN</i>	Glioblastoma y cáncer de mama	Sobreexpresado

**Tabla 3. Principales miRNAs relacionados con cáncer.**

(LLC: Leucemia linfoblástica crónica)

## miRNAs en la hematopoyesis y en neoplasias hematológicas

### *Expresión de miRNAs en la hematopoyesis*

El papel de los miRNAs en hematopoyesis ha sido poco estudiado. Chen CZ y colaboradores<sup>84</sup> clonaron 150 miRNAs de médula ósea de ratón y encontraron que miR-181a, miR-223 y miR-142 se expresaban de forma preferencial en tejidos hematopoyéticos. MiR-181a estaba sobreexpresado en las células de línea B y cuando se expresaba de forma ectópica, causaba un incremento drástico de la proporción de células B. A pesar de que miR-223 y miR-142 estaban más altamente expresados en las líneas mieloides, la expresión ectópica de estos dos resultaba en un incremento de la proporción de células de línea T (30-50%), pero no de células B o mieloides. Cuando se analizó la expresión de los mismos miRNAs en células hematopoyéticas humanas, se vieron unos patrones de expresión un poco diferentes a los observados en ratón<sup>105</sup>. Concretamente, miR-150 estaba infraexpresado en respuesta a estimulación de las células T por ambos subconjuntos T<sub>h</sub>1 o T<sub>h</sub>2 mientras que miR-146 estaba sobreexpresado solamente en las células T<sub>h</sub>1<sup>106</sup>.

En la eritropoyesis<sup>107</sup> se observó que miR-221 y miR-222 mostraban niveles de expresión elevados en células progenitoras CD34<sup>+</sup> derivadas de cordón umbilical humano. Estos miRNAs se infraexpresaban en respuesta a diferenciación eritropoyética de estas células. Mediante análisis bioinformático, se propuso que estos miRNAs tenían como diana al gen *KIT* y se vio que los niveles de su mRNA se correlacionaban de forma inversa con los de estos dos miRNAs. Además, la expresión ectópica de estos miRNAs en cultivos eritrocitarios de células CD34<sup>+</sup> o de líneas celulares de leucemia eritrocitaria TF1 producía un enlentecimiento en el crecimiento de las mismas y disminución de los niveles de la proteína c-kit<sup>107</sup>.

En la diferenciación mieloide, miR-223 juega un papel importante en la regulación de la diferenciación de los granulocitos, en asociación con dos factores de transcripción: *NFIA* y *CEBPA*. Se vio que *NFIA* y *CEBPA* compiten por sitios de unión en la secuencia promotora del gen *MIRN223* (miR-223). La unión de *NFIA* inhibe la expresión de *MIRN223*, mientras que la unión de *CEBPA* lo sobreexpresa. Además se ha demostrado que miR-223 inhibe la traducción de *NFIA*, de forma que existe un feedback negativo que favorece la diferenciación granulocítica<sup>108</sup>. Además, también se

han observado una serie de miRNAs infraexpresados característicos de la megacariocitopoyesis: miR-10a, miR-10b, miR-126, miR-17, y miR-20<sup>109</sup>.

Un estudio de células madre progenitoras hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> (HSPC) identificó 33 miRNAs que tenían una expresión común con las células HSPC derivadas tanto de médula ósea como de sangre periférica, que incluían: miR-155, miR-181a, miR-221, miR-222 y miR-223, miR-146 y miR-16-1. Mediante análisis funcionales y bioinformáticos de los genes diana de estos miRNAs se encontró que: miR-146, miR-155 y miR-181 podían actuar previniendo la diferenciación de las células progenitoras tempranas hacia estadios más maduros, mientras que miR-16-1 podía actuar bloqueando la diferenciación hacia estadios tardíos en el desarrollo de las HSPC. MiR-221, miR-222 y miR-223 se propuso que actuaban en el control de los estadios terminales del desarrollo hematopoyético. Además se vio que miR-155 controlaba la diferenciación mieloide y eritrocitaria<sup>110</sup>.

Aparte del papel que juegan miRNAs específicos, se evaluó el papel general de los miRNAs en la hematopoyesis del ratón mediante la delección selectiva de Dicer en el timo en dos momentos diferentes: en un estadio temprano de desarrollo de las células T y en un estadio más avanzado<sup>111, 112</sup>. En ambos experimentos no se inhibió la diferenciación de las células T, pero se produjo un importante bloqueo en el desarrollo de los CD8<sup>+</sup> periféricos y se redujo el número de células CD4<sup>+</sup>, ya que en estas células se vio aumentada la apoptosis y reducida la proliferación. A pesar de que Dicer parece ser esencial para el desarrollo embrionario<sup>113</sup>, el papel de los miRNAs en la determinación de los estadios avanzados del desarrollo de los linfocitos, permanece poco claro.

#### *Expresión de miRNAs en leucemias*

Los estudios de miRNAs en leucemias se han centrado principalmente en la Leucemia linfoblástica crónica (LLC). Un estudio de los patrones de expresión de los miRNAs en 38 pacientes mostró diferencias de expresión asociadas al cariotipo y a la presencia de mutaciones en *ZAP-70* y *IgV<sub>H</sub>*<sup>114</sup>. Además, se observó que los niveles de miR-15a y miR-16-1, que estaban codificados en la región 13q14 deleccionada en el 65% de los casos de LLC, estaban infraexpresados en el 75% de los casos portadores de esta delección. Estos miRNAs actuaban sobre *BCL2* induciendo apoptosis *in vitro*, cosa que sugiere que juegan un papel como genes supresores de tumores en LLC<sup>115</sup>. Otro estudio

con 94 pacientes, definió una firma de 13 miRNAs con significancia pronóstica<sup>58</sup>. También se ha observado que miR-29 y miR-181b juegan un papel en LLC a través de la regulación del oncogén *TCL1*, que previamente se había encontrado relacionado con un fenotipo agresivo en LLC<sup>116</sup>.

En pacientes y líneas celulares de leucemia promielocítica aguda (LPA) tratados con ácido retinoico se observó un patrón de miRNAs en el cual se sobreexpresan determinados miRNAs: miR-223, miR-15a, miR-15b, let-7a, miR-342 y miR-107; y se infraexpresa miR-181b<sup>117</sup>. También se ha detectado que miR-142 puede aparecer translocado en LPA, fusionándose su zona promotora con el gen *MYC* en la translocación t(8;17)<sup>118</sup>, siendo este un fenotipo más agresivo de la enfermedad.

Se ha encontrado un caso de Leucemia linfoblástica aguda que contiene una translocación que envuelve la secuencia completa del gen *MIRN125b*, fusionándolo al loci *IGH*<sup>119</sup>.

En Leucemia mieloide crónica, el cluster miR-17-92 está sobreexpresado en líneas celulares y en pacientes. Después de tratarlos con imatinib o RNAi de BCR-ABL, se produce una disminución en los niveles de los miembros de este cluster de miRNAs. Se ha demostrado también que en líneas celulares la sobreexpresión de este cluster provoca un aumento de la proliferación<sup>120</sup>.

#### *Expresión de miRNAs en linfomas*

En el caso de los linfomas, a diferencia de con las leucemias, no ha habido una identificación de miRNAs asociados tan importante, sino que más bien ha habido un análisis más focalizado, con dos grandes grupos: el miR-155 y los componentes del cluster miR-17-92 (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, y miR-92), ambos con un papel oncogénico importante en la linfomagénesis.

Primeramente van den Berg y colaboradores (2003)<sup>121</sup> observaron que *BIC* estaba altamente expresado en un 90% de los casos de Linfoma de Hodgkin, y a raíz de eso Metzler et al (2004)<sup>122</sup> propusieron que la región filogenéticamente conservada de 138 nucleótidos codificada dentro del gen *BIC*, daba lugar a la secuencia precursora de miR-155. A continuación se vio que ambos transcritos, *BIC* y miR-155, se encontraban sobreexpresados en el linfoma difuso de células B grandes (*Difuse large B cell lymphoma*)<sup>123</sup>. De forma similar se reportó la sobreexpresión de *BIC* y de miR-155 en Linfoma de Hodgkin y en linfomas mediastínicos primarios de célula B (*primary*

*mediastinal B-cell lymphoma*)<sup>124, 125</sup>. Además del papel propuesto para miR-155 en la hematopoyesis, se ha encontrado sobreexpresado también durante la respuesta inflamatoria en los macrófagos<sup>126</sup>.

Una amplificación genómica común en los linfomas de célula B es la región 13q31. Esta región contiene la secuencia precursora del cluster miR-17-92, que incluye las secuencias de 7 miRNAs maduros<sup>127</sup>. Los miRNAs que componen este cluster estaban sobreexpresados en 4 líneas celulares que contenían esta amplificación, en comparación con 5 líneas celulares que no la contenían. Asimismo se observó que en el 65% de 46 casos de linfomas (13 de los cuales eran DLBCL) sobreexpresaban el cluster. Parece ser que la sobreexpresión de estos miRNAs es mucho más común en las neoplasias hematológicas de lo que se hubiera esperado inicialmente, observándose en líneas de células B, en líneas de células T y en líneas celulares mieloides. También se han observado casos sin la amplificación 13q31 que sobreexpresan miR-17-92, por lo tanto otros mecanismos pueden estar actuando en su sobreexpresión<sup>104</sup>. La sobreexpresión de este cluster en ratón acelera el proceso de limfomagénesis<sup>127</sup>, básicamente suprimiendo la muerte celular, aunque sólo incrementa la limfomagénesis cuando se expresan todos los miRNAs del cluster en conjunto, pero no como miRNAs individuales, teniendo un efecto cooperativo. Parece que su sobreexpresión viene dada por una unión de *MYC*<sup>94</sup> y su efecto se produce a través de *E2F1*, un factor de transcripción pro-apoptótico.

En el linfoma difuso de células grandes (DLBCL), el análisis del patrón de miRNAs en líneas celulares y posteriormente en casos de pacientes, mostró que miR-155, miR-21 y miR-221 estaban sobreexpresados en los casos con el inmunofenotipo ABC en comparación con los del inmunofenotipo GCB. Además, los niveles de miR-21 servían de marcador pronóstico en este subtipo de linfoma<sup>128</sup>.

## ***Infecciones virales y miRNAs***

Los miRNAs tienen varias características que los hacen una opción atractiva para los virus en la regulación de la expresión génica. La primera es su tamaño pequeño, que les permite estar fácilmente codificados en los genomas virales, donde el espacio es algo de vital importancia. Otra característica importante es que los miRNAs no son inmunogénicos y tienen la ventaja de ser un mecanismo ubicuo de regulación en el propio huésped. Y la última característica importante, es que con un miRNA se puede alterar el patrón de expresión de un gran número de genes<sup>129</sup>.

Los miRNAs podrían actuar en la patogénesis viral de diferentes modos: mediante una regulación de la expresión de genes virales por miRNAs de la célula huésped, mediante una regulación de la expresión de genes virales por miRNAs virales, o por una regulación de la expresión de genes del huésped por miRNAs virales. Además algunos virus, de forma particular en plantas y eucariotas inferiores, pueden codificar unos factores (RNAs y proteínas) que pueden inhibir la vía endógena de RNAi.

Desde el descubrimiento de lin-4 mediante análisis bioinformático se fueron descubriendo nuevos miRNAs, y no se tardó mucho en identificar miRNAs producidos por secuencias codificadas en virus. En 2004 Pfeffer et al<sup>130</sup>, identificó miRNAs del virus de Epstein Barr (VEB), también conocido como herpesvirus-4 humano (HHV-4), un miembro de la familia de los  $\gamma$ -herpesvirus que infecta de forma preferente células B. Estos miRNAs se encontraron agrupados en 2 clusters dentro del genoma de VEB. El primero y más grande contenía 14 miRNAs, de BART-1 a BART-14, contenidos en la zona intrónica BamH1-A. El segundo contenía 3 miRNAs localizados dentro de la regiones UTR 5' y 3' de BamH1-H<sup>130, 131</sup>. La función de estos miRNAs no está todavía muy clara. El análisis del genoma humano en busca de posibles sitios diana para los miRNAs del VEB mostró una lista de genes envueltos en la regulación de la proliferación y la apoptosis de las células B, de citoquinas específicas de célula B, de reguladores transcripcionales, y componentes de vías de señalización.

El análisis de líneas celulares con VEB latente mostró unos patrones de expresión específicos de los miRNAs del VEB. Había 3 tipos de líneas celulares diferenciadas por el tipo de latencia del VEB (I-III), en las cuales se observó que los diferentes estadios de latencia tenían elevados niveles de miRNAs BART en todos los estadios de latencia, así como en la infección lítica. Por otro lado los miRNAs BHRF1 estaban sobreexpresados en el tipo III de latencia, pero eran casi indetectables en los tipos de latencia I y II<sup>131</sup>. De

forma interesante uno de los miRNAs del VEB, miR-BART2, podía dirigir la rotura del mRNA del gen vírico BALF5, que codifica la DNA polimerasa viral<sup>132</sup>.

Se han identificado miRNAs en otros miembros de la familia de los herpesvirus: 10 miRNAs en el virus asociado a sarcoma de Kaposi (KHSV o HHV-8), 9 miRNAs en MHV-68-9 en HCMV<sup>132-135</sup>. Se vio que las secuencias de estos miRNAs no están conservadas entre los diferentes herpesvirus, cosa que sugiere que los miRNAs expresados por los diferentes herpesvirus no están involucrados en funciones importantes del virus (replicación viral, expresión de genes virales, etc.). Estos miRNAs han evolucionado independientemente para permitir que cada virus se adapte a los tipos celulares específicos en los que el virus persiste. Sin embargo, el análisis de dos herpesvirus muy cercanos, que infectan tipos celulares muy similares, permitió la identificación de algunos miRNAs conservados<sup>136, 137</sup>. La conservación de estos miRNAs reflejaba la similitud en los ambientes celulares de los dos virus.

En la complejidad de las interacciones que se producen entre la célula huésped y el virus, los miRNAs víricos pueden por un lado estar actuando en la regulación de proteínas virales, o por otro lado hay ciertas evidencias de que pueden actuar regulando genes de la célula huésped. Otra opción que se puede dar es que miRNAs de la célula actúen regulando proteínas víricas. La inhibición de la apoptosis es una estrategia común usada por los virus para asegurar su supervivencia. En este sentido se ha observado que la expresión de un RNA no codificante en HSV-1 se asocia con el mantenimiento de la latencia viral en células neuronales<sup>138</sup>. Este RNA no codificante contenía un miRNA (miR-LAT), que era lo único que se expresaba en el periodo de latencia y que actuaba inhibiendo la apoptosis, posiblemente ejerciendo su acción sobre *TGF-β* y *SMAD3*, dos genes de entrada en apoptosis, sobre los cuales puede unirse. La expresión de estos dos genes se encontraba disminuida en las células infectadas por HSV-1, ya que el miRNA producía la rotura de estos mRNAs. Esto demuestra que a través de la interacción de un miRNA viral con genes de la célula huésped, el virus está haciendo escapar a la célula de la entrada en apoptosis y de esta forma manteniendo el estado de latencia.

Además de la actuación de estos miRNAs del virus sobre genes de la célula huésped, estos miRNAs también actúan regulando la expresión de genes virales. Un ejemplo es el caso del virus simiano 40 (SV40), en el que se ve que un miRNA propio actúa disminuyendo los productos proteicos de los genes de expresión inicial, para dar paso a los genes de segunda fase<sup>139</sup>. Otro mecanismo similar de autorregulación lo

encontramos en el caso de miR-BART2 del VEB, el cual es complementario a la región UTR 3' del gen *BALF5* que codifica para la DNA polimerasa del virus<sup>132, 140</sup>.

Las relaciones entre los virus y la célula huésped han ido coevolucionando de tal forma que no sólo los miRNAs del virus interactúan con los genes de la célula huésped, sino que los miRNAs de la célula en algunos casos interactúan con los mRNAs víricos. Un ejemplo, es el caso del virus PFV-1, en el que el miRNA celular miR-32 se une a éste silenciando la expresión de los genes virales y inhibiendo así la replicación vírica<sup>141</sup>. Un caso muy excepcional en que los miRNAs de la célula están actuando sobre el genoma viral activando su replicación y expresión, es el caso del virus de la hepatitis C (HCV) y el miR-122, miRNA que está sobreexpresado en las células hepáticas, que es necesario para la correcta expresión del RNA vírico. Este virus no era capaz de replicarse en células que no expresaran miR-122, y el efecto se revertía al añadir el miRNA<sup>142</sup>.

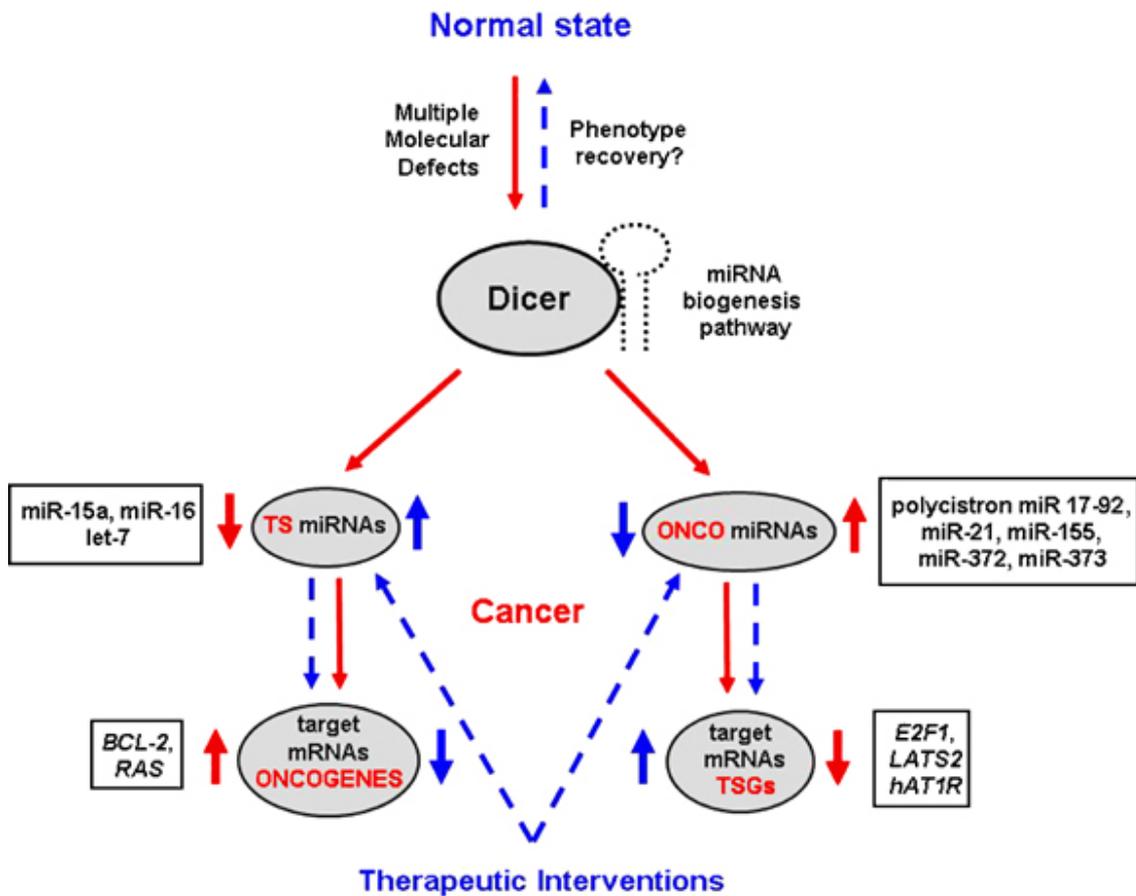
Todavía hay mucho que estudiar de la estrecha relación que se produce entre un virus y su célula huésped, pero está claro que en la intrincada red que se establece entre ellos, los miRNAs juegan un papel importante en ambas direcciones.

## ***miRNAs y terapia molecular***

El hecho de que se haya descrito una desregulación de la expresión de los miRNAs en muchos tipos de cánceres y el hecho de que pueda ser un factor común en otras enfermedades multigénicas, sugiere que la actuación sobre los miRNAs pueda abrir puertas hacia nuevas terapias. T Wurdinger y FF Costa postulan que si el defecto molecular primario de una enfermedad está en los miRNAs o en su vía, y que como consecuencia la expresión de determinados mRNAs que codifican para proteínas está desregulada, uno podría intervenir, para normalizar o corregir la expresión de miRNAs. Ésto podría resultar en la recuperación del fenotipo normal de las células desde el estado de enfermedad o incluso inducir la muerte celular por apoptosis. Por el contrario, en enfermedades en las que vemos que el problema viene dado por una desregulación de los patrones de expresión de mRNAs, pero en que el patrón de miRNAs es relativamente normal, se podría intentar normalizar utilizando miRNAs naturales o sintéticos que corrigieran estos defectos de expresión de RNA mensajero. Así pues, los miRNAs podrían tener una importante relevancia clínica (Figura 11).

El uso de metodologías de RNAs interferencia para el silenciamiento de genes diana ha contribuido a los avances en biología molecular, y actualmente los siRNAs están siendo testados en terapia experimental para una gran variedad de enfermedades y unos pocos están empezando a entrar en protocolos clínicos. El uso de siRNAs con complementariedad perfecta al mRNA diana ha revelado problemas como la frecuente observación del silenciamiento de genes adicionales, además del gen diana. Con los mecanismos de funcionamiento de los miRNAs en mente, se piensa que estos efectos son debidos a uniones imperfectas de un siRNA particular con mRNAs que no eran su diana. Recientemente, se han descrito otros mecanismos que pueden participar, como la estimulación de la respuesta de interferón por elevados niveles de siRNAs, entre otros. Los siRNAs han mostrado ser de utilidad como herramienta para el silenciamiento de un único gen. Sin embargo, en muchas patologías suelen haber envueltos múltiples genes. A pesar de todo, puede ser de ayuda el conocimiento de estos mecanismos, para enfocar el silenciamiento de múltiples genes usando el mecanismo de los miRNAs de múltiple regulación de dianas, lo cual puede ser utilizado de dos formas diferentes: para restaurar los niveles normales de miRNAs, ya sea aumentando o disminuyendo los niveles de determinados miRNAs o para diseñar miRNAs artificiales que tengan la

potencia de silenciar múltiples mRNAs desregulados, utilizando los mecanismos naturales de los miRNAs.



**Figura 11. Diferentes niveles a los que se podría intervenir terapéuticamente (Wurdinger T. 2006).**

En el tema de la modificación de los niveles de expresión de miRNAs endógenos encontramos diferentes estrategias basadas en la administración de oligonucleótidos sintéticos *antisense*, con complementariedad al miRNA maduro endógeno. Estos oligonucleótidos anti-miRNAs inactivaban específicamente los miRNAs, pero de forma poco eficaz. Versiones mejoradas de estos contienen en el extremo 5' un grupo 2'-O-metilo o un grupo 2'-O-metoxietilo. Además, también se han diseñado eficientes *locked-nucleic-acid antisense* oligonucleótidos (LNAs), sondas en las que hay una mezcla de oligonucleótidos DNA/LNA que forman fuertes uniones con su RNA complementario en las células. Estas sondas son muy útiles en estudios de hibridación in situ. También encontramos anti-miRNAs conjugados con colesterol, que tienen una

elevada eficiencia para inhibir la actividad de miRNAs en varios órganos cuando se inyectan en ratón, pudiendo tener aplicaciones terapéuticas *in vivo*.

La sobreexpresión de miRNAs endógenos se puede conseguir a través de sistemas de expresión que usen sistemas víricos o liposomales para introducirse en la célula. En estos sistemas la expresión de miRNAs se produce mediante vectores de expresión que contienen promotores para la polimerasa III. Algunos pueden también utilizar promotores de polimerasa II, pero en este último método hay una mayor eficiencia cuando se expresa el pri-miRNA en lugar del miRNA maduro. También se ha observado que los miRNAs se pueden expresar detrás de la región UTR 3' de un gen reporter, o como sucede de forma natural, estar codificados en zonas intrónicas y transcribirse a la vez que su gen huésped.

Otra intervención, es el diseño de miRNAs para disminuir las cantidades de múltiples mRNAs. La regulación de múltiples dianas mediante un miRNA diseñado artificialmente, que tenga la habilidad de unirse a sitios diana similares en diferentes mRNAs, no es una cosa sencilla. Actualmente existen programas informáticos que pueden ser usados para diseñar siRNAs dirigidos a una única diana, pero es bastante más complicado el diseño para múltiples dianas a la vez, debido a que se tienen que tener en cuenta muchos factores, entre ellos las dianas predichas, las homologías entre mRNAs y miRNAs y juntarlo todo con un esfuerzo empírico, para conseguir disminuir las cantidades de varios mRNAs a la vez, a partir de un solo miRNA.

Todas estas aproximaciones están todavía en una fase muy inicial, pero con el desarrollo de nuevas tecnologías, de nuevos algoritmos y con el avance experimental tan rápido que se está produciendo en todo el campo de regulación génica y en el descubrimiento de nuevas dianas de estos miRNAs, pronto llegará a ser una herramienta terapéutica plausible en el tratamiento de múltiples enfermedades, entre ellas algunos cánceres<sup>143</sup>.

## ***Embriogénesis y cáncer***

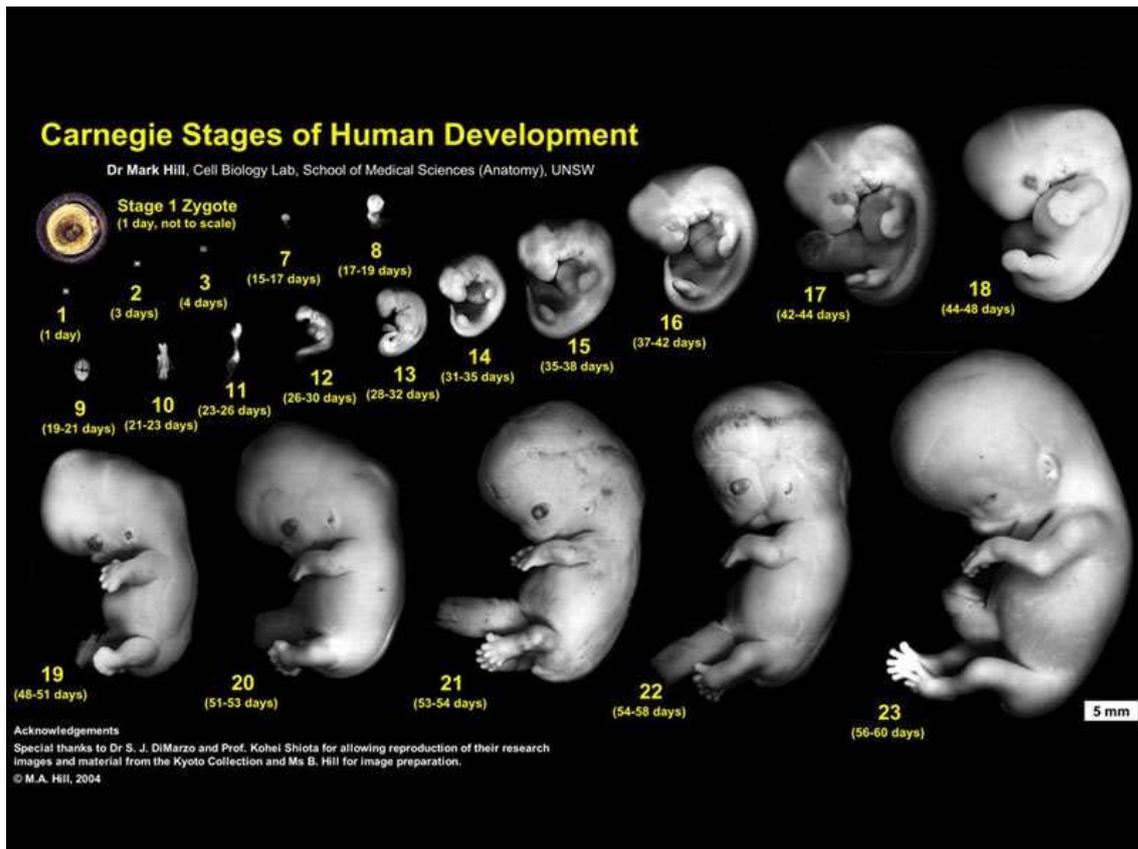
Cronológicamente el desarrollo prenatal puede dividirse en 3 grandes etapas a lo largo de los 9 meses de gestación: la formación del blastocisto, la del embrión y la del feto. Al final de esta última etapa se producirá el nacimiento.

Durante el periodo de formación del blastocisto, semanas 1ª y 2ª tras la fecundación, nos encontramos en un período caracterizado por la división celular, que termina con la formación de un blastocisto que se introduce en la mucosa de revestimiento del útero durante la implantación. Este blastocisto consiste en un disco embrionario de dos capas de células y tres membranas externas: trofoblasto/corion, amnios y saco vitelino.

El desarrollo de la mayoría de los sistemas orgánicos se produce en la siguiente etapa, en el desarrollo embrionario principal, entre la 3ª y la 8ª semana. En esta fase el embrión adopta ya una apariencia humana. Dado que éste es el período más activo de desarrollo y diferenciación del embrión, es también el período en que es más vulnerable a defectos congénitos mayores.

El periodo fetal comprende los últimos 7 meses. En esta etapa tiene lugar el crecimiento y el desarrollo de los órganos ya presentes. En general los defectos congénitos de este periodo no son tan graves, e incluyen menor tamaño, retraso mental y defectos en ojos, orejas, dientes y genitales externos.

Para la clasificación de los embriones existe un índice, el estadio de Carnegie, que clasifica los embriones, primeras 8 semanas, en 23 estadios dependiendo del grado de maduración (Figura 12). Este índice se utiliza desde que el famoso *Carnegie Institute* de Washington, empezara a clasificar y coleccionar embriones a inicios de 1900. Esta clasificación está basada en el estudio del desarrollo morfológico externo y/o interno del embrión y no es directamente dependiente de su edad o tamaño. Embriones que pueden tener diferentes edades o tamaños pueden ser asignados al mismo estadio de Carnegie basándose en su morfología externa, debido a las variaciones que tienen lugar entre individuos.



**Figura 12. Estadios de desarrollo humano según Carnegie (Hill M. 2006).**

## **Embriogénesis del colon**

La organización del sistema gastrointestinal es de las más simples en el embrión y en cambio muy compleja en el adulto.

El sistema gastrointestinal en el abdomen se desarrolla primero como un tubo suspendido mediante dos láminas, dorsal y ventral: los mesenterios. Los vasos sanguíneos, nervios autónomos, drenaje linfático y estructura del mesenterio están todos organizados de acuerdo con las subdivisiones abdominales del tracto gastrointestinal: el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior. Estas relaciones básicas persisten, sin embargo, la anatomía del adulto parece compleja a causa de cuatro procesos que se producen durante el desarrollo: 1) rotación de 90° en sentido de las agujas del reloj del intestino anterior abdominal; 2) desarrollo del omento mayor y del saco peritoneal menor a partir del mesenterio dorsal del intestino anterior abdominal; 3) rotación del intestino medio 270° alrededor de la arteria mesentérica superior, y d) crecimiento muy notable del intestino medio.

El sistema digestivo de origen endodérmico, se forma en su inicio por un plegamiento lateral del endodermo durante la cuarta semana, apareciendo una estructura tubular conocida con el nombre de tubo digestivo endodérmico primitivo. Este está delimitado en su extremo cefálico por la membrana orofaríngea y en su extremo caudal por la placa cloacal. Debido a su íntima relación con el saco vitelino a través del pedículo vitelino, puede dividirse el intestino en varias porciones: una anterior, una media comunicada con él, y una posterior como ya hemos dicho. Al final del primer mes pueden identificarse unos pequeños divertículos endodérmicos que representan los primordios de las principales glándulas digestivas. Es importante aclarar que únicamente el tubo primitivo es endodérmico, ya que en fases posteriores únicamente el revestimiento interno es endodérmico (la mucosa). El resto de los estratos de la pared intestinal (submucosa, muscular y serosa) derivan de la esplancopleura y, por esa razón son mesodérmicos. Además los dos polos del tubo digestivo (el oral y el aboral) están formados por el ectodermo.

Tal como podemos ver en la tabla 4, de las diferentes porciones intestinales derivaran las diferentes estructuras del sistema digestivo en el adulto. Aquí nos centraremos en el desarrollo del colon, que deriva del intestino medio y del intestino posterior.

<b>Porción intestinal</b>	<b>Derivados adulto</b>
INTESTINO ANTERIOR	Faringe Esófago Estomago Parte superior del duodeno Glándulas y bolsas faríngeas, tracto respiratorio, hígado y vesícula biliar, páncreas
INTESTINO MEDIO	Parte inferior del duodeno Yeyuno e íleon <b>Ciego y apéndice vermiforme</b> <b>Colon ascendente</b> <b>Mitad craneal del colon transverso</b>
INTESTINO POSTERIOR	<b>Mitad caudal del colon transverso</b> <b>Colon descendente</b> <b>Recto</b> Parte superior del canal anal

**Tabla 4. Derivados del intestino primitivo.**

El intestino medio está formado inicialmente por un asa situada frente al cordón umbilical. El intestino medio forma el intestino delgado y el intestino grueso hasta el colon descendente. Esta asa intestinal está unida, mediante el correspondiente mesenterio, a la pared posterior, y a través de él recibe la irrigación a cargo de una rama de la aorta, la arteria mesentérica superior. El asa del intestino sufre una rotación de  $180^\circ$ , en sentido vertical, siendo el eje de giro la arteria mesentérica superior. De esta forma, la rama inferior del asa se coloca, ahora, por encima. Al comienzo de la rama distal aparece una zona dilatada, el esbozo del ciego. Todo el tubo intestinal que queda proximal al primordio del ciego forma el intestino delgado. El crecimiento en longitud del intestino delgado es mucho mayor que el del intestino grueso, por lo cual se tiene que plegar formando un gran número de asas. Como la cavidad abdominal durante la primera fase del desarrollo fetal, es pequeña y está ocupada en su mayor parte por el hígado, una buena parte de estas asas intestinales se alojan, durante cierto tiempo, en el cordón umbilical, por lo tanto, fuera de la cavidad abdominal. Esto se conoce con el nombre de hernia umbilical fisiológica.

La rama distal del intestino medio se encarga de formar, primeramente, el ciego, el apéndice y el colon transverso. Como también tiene lugar un giro a la derecha del asa del intestino medio, el ciego que se encontraba junto a la pared ventral, se coloca en el lado derecho de la cavidad abdominal y lo mismo el colon, que continua al ciego, deja su posición anteroposterior para hacerse transverso, de ahí su nombre. Posteriormente crece en longitud el colon transverso, con lo que se acoda su porción cecal y se extiende por el lado derecho. De ahí que la posición definitiva del ciego sea en la fosa ilíaca derecha y la primera porción del colon corresponda al colon ascendente, situado también en el lado derecho.

Al crecer considerablemente la longitud del intestino delgado, mucho más que la pared posterior del abdomen se establece una desproporción entre el borde posterior del mesenterio, que se inserta en la pared posterior del abdomen y el borde anterior que acaba envolviendo el intestino delgado. Como consecuencia de este crecimiento del extremo distal del mesenterio, este forma una serie de pliegues, siguiendo las nansas intestinales. En esos pliegues del mesenterio se encuentran los vasos y los nervios que desde la pared posterior del abdomen han de alcanzar el intestino. El intestino grueso tiene lo mismo que el delgado, su correspondiente mesenterio, que aquí se llama mesocolon.

Es también aquí que se desarrolla el epiplón mayor, que cae a modo de delantal por delante del colon transverso, y el epiplón menor que une la curvatura menor del estomago al hígado.

Avanzando el desarrollo, el mesocolon ascendente y descendente disminuye de longitud hasta el punto de que desaparece como tal, pasando el peritoneo de la pared abdominal posterior a recubrir las caras laterales y anterior de esos tramos del colon, quedando la cara posterior desprovista de peritoneo. Esto hace que las posibilidades de desplazamiento de esas porciones del colon sean nulas. En cambio el colon transverso y el sigmoideo conservan un amplio mesenterio, por lo que son ampliamente desplazables y su posición puede variar.

Del intestino posterior se forman la porción distal del colon transverso, el colon descendente, sigmoideo, el recto y la porción superior del canal anal. Todos los derivados del intestino posterior reciben su riego de la arteria mesentérica inferior.

El colon descendente se haya en el lado izquierdo y el intestino posterior vuelve a ganar la línea media en la porción sigmoidea distal. La porción rectal, aunque ligeramente incurvada, se mantiene en el plano sagital. El conducto anal establece la unión entre la fosa anal (originada por una invaginación del ectodermo) y el recto. En la zona ectodérmica se desarrolla un esfínter, cuya musculatura no es continuación de la capa muscular del intestino, sino que se desarrolla de la somatopleura.

Período (semanas)	Procesos
3	Inicio formación intestino tubular. Inducción temprana glándulas digestivas.
4	Mayor parte intestino es tubular. Rotura membrana orofaríngea.
5	Expansión y rotación inicial del estómago; el asa intestinal empieza a formarse; son patentes el ciego y el conducto biliar.
6	Se completa la rotación del estomago, asa intestinal prominente; aparecen el alantoides y el apéndice; el tabique urorectal empieza a dividir la cloaca en recto y seno urogenital.
7	<b>Herniación del asa intestinal; rápido crecimiento del Hígado, fusión del páncreas dorsal y ventral, se completa la separación de la cloaca.</b>
8	<b>Rotación en sentido antihorario del asa intestinal herniada; recanalización del intestino; se inicia la penetración de los precursores de las neuronas parasimpáticas desde la cresta neural craneal al intestino.</b>
9	<b>Regreso del intestino herniado a la cavidad corporal; comienza la diferenciación de tipos epiteliales en el revestimiento intestinal.</b>
11	<b>Aparecen las vellosidades en el intestino delgado; se diferencian las células caliciformes</b>
16	Las vellosidades revisten todo el intestino (incluido el colon)
20	Se observan las placas de Sèller en el intestino delgado.

**Tabla 5. Etapas del desarrollo del aparato digestivo.**

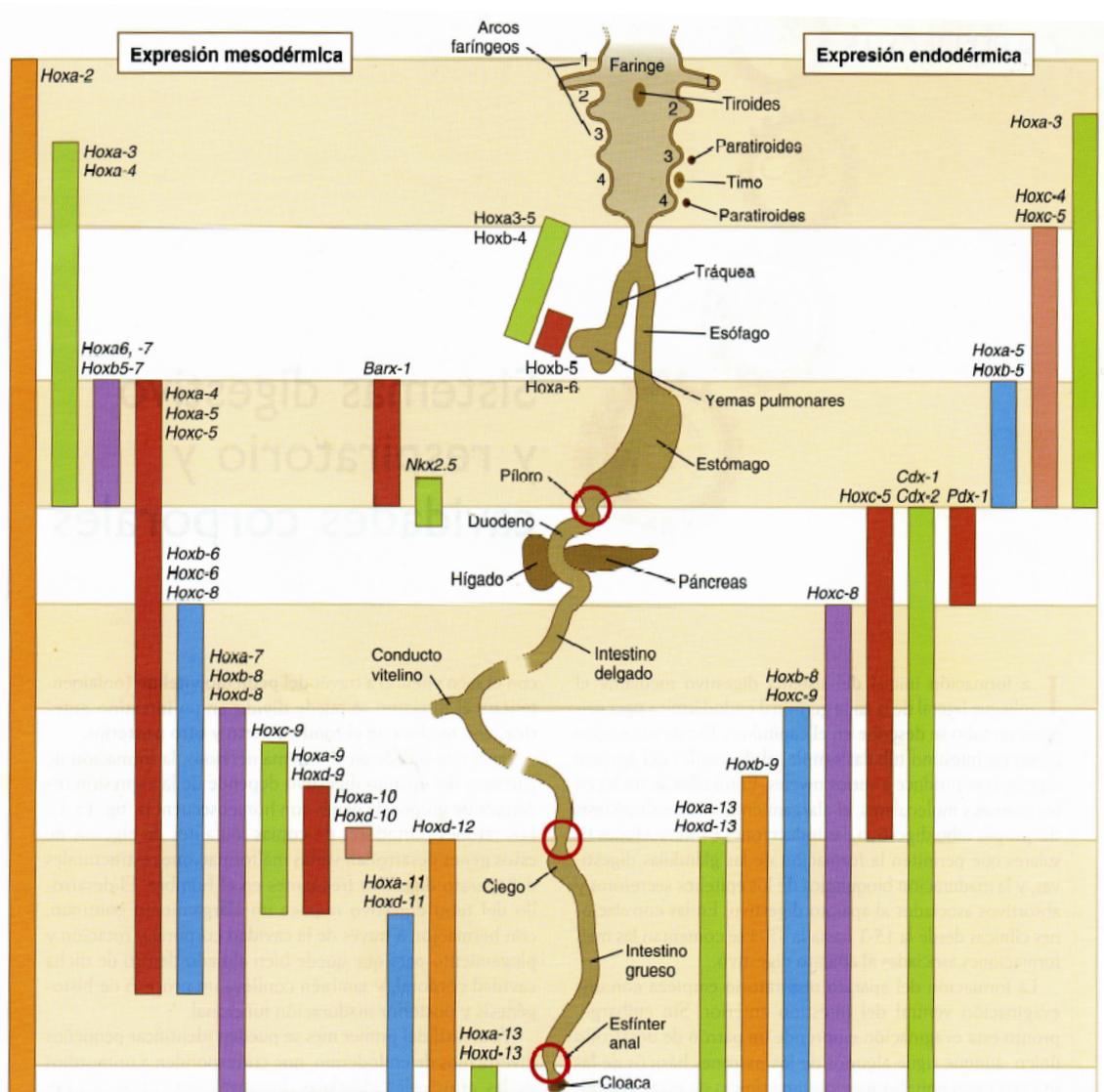
## Genes implicados en el desarrollo del colon

Durante el desarrollo del colon y del intestino se forman unos gradientes proteicos en las diferentes porciones, que provocaran el desarrollo específico de las diferentes estructuras. Las proteínas involucradas en la formación de estos gradientes, forman parte principalmente de la familia de los genes *Hox*. En el desarrollo del colon actúan principalmente dos grupos de genes *Hox*, unos en el componente endodérmico y otros en el componente mesodérmico del colon, tal como se observa en la figura 13. En concreto, en el caso de la formación del colon encontramos a *Hoxa-13*, *Hoxd-13*, *Hoxb-9*, *Hoxd-12*, *Hoxa-11*, *Hoxd-11*, *Hoxc-9*, *Hoxc-8* o *Cdx-1* y *2*, entre otros. Encontramos a genes de la familia *Hox* de todos los grupos, a, b, c y d.

Además de los miembros de la familia de los genes *Hox*, también juega un papel importante el gen *Sonic hedgehog* y los otros miembros de su vía de señalización.

En los puntos de transición entre el intestino medio abierto y las regiones anterior y posterior del intestino que se conocen con el nombre de abertura intestinal anterior y abertura intestinal posterior, respectivamente, los bordes endodérmicos de estas aberturas son zonas de expresión de la molécula de señalización *Sonic hedgehog*. En la abertura posterior, ésta molécula permitirá la expresión de otra molécula de señalización, *BMP-4* que a su vez, ésta dará paso a la aparición de un gradiente de expresión mesodérmica de los grupos parálogos 9-13 de los genes *Hox* (del grupo d): *Hoxd9* se expresa en una localización más craneal, mientras que *Hoxd13* se encuentra expresado en la zona más caudal, cerca de la cloaca. Probablemente, este gradiente tiene una función de guía en la diferenciación regional del intestino.

Probablemente los miRNAs estarán jugando un papel clave en la formación de este gradiente proteico de genes *Hox*, tal como ya hemos visto en el desarrollo de las extremidades.



**Figura 13. Expresión de los genes Hox a lo largo del tubo digestivo en desarrollo (Carlson BM. Embriología Humana y biología del desarrollo 3a Ed 2005 Elsevier).** Expresión en el mesodermo asociado al intestino (izquierda) y en el endodermo intestinal (derecha). Los círculos representan las áreas donde se encuentran los esfínteres.

## ***Histología del colon normal***

El tracto digestivo en el adulto comienza en la boca y se extiende hasta el ano. Su longitud en el hombre es de 10 a 12 metros, siendo seis o siete veces la longitud total del cuerpo. Tubo digestivo y glándulas anexas, forman el aparato digestivo que topográficamente está formado por ocho partes: la boca, la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso (o colon), el recto y el ano.

El tubo digestivo procede embriológicamente del endodermo, al igual que el aparato respiratorio y está formado por 4 capas concéntricas, que son de dentro para afuera:

1. **Capa interna o mucosa:** en la que se pueden encontrar glándulas secretoras de moco y HCl, vasos linfáticos y algunos nódulos linfoides. Incluye una **capa muscular interna** o *muscularis mucosae* compuesta de una capa circular interna y una longitudinal externa de músculo liso.
2. **Capa submucosa:** está compuesta básicamente de tejido conectivo. Esta capa contiene el llamado plexo submucoso de Meissner, que es un componente del sistema nervioso entérico que controla la motilidad de la mucosa y en menor grado la de la submucosa, y las actividades secretorias de las glándulas.
3. **Capa muscular externa:** compuesta, al igual que la *muscularis mucosae*, por una capa circular interna y otra longitudinal externa de músculo liso (excepto en el esófago, donde hay músculo estriado). Esta capa muscular tiene a su cargo los movimientos peristálticos que desplazan el contenido de la luz a lo largo del tubo digestivo. Entre sus dos capas se encuentra otro componente del sistema nervioso entérico, el plexo mientérico de Auerbach, que regula la actividad de esta capa.
4. **Capa serosa o adventicia.** Se denomina según la región del tubo digestivo que reviste, serosa si es intraperitoneal o adventicia si es retroperitoneal.

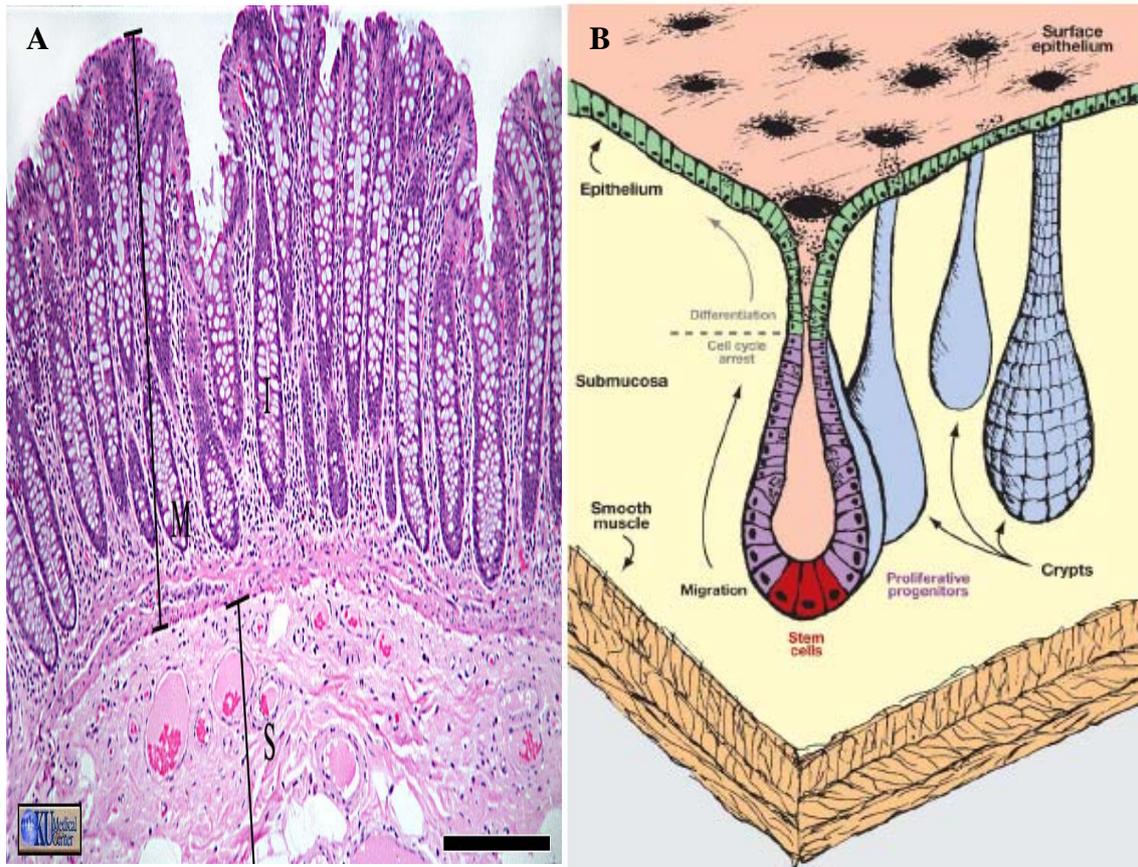
Los plexos submucoso y mientérico constituyen el sistema nervioso entérico que se distribuye a lo largo de todo el tubo digestivo, desde el esófago hasta el ano.

El intestino grueso sirve para el proceso de absorción de agua y electrolitos (las sustancias nutritivas ya han sido absorbidas en el intestino delgado) y de lugar de formación y reservorio de las heces, por lo que en su estructura histológica destaca la presencia de células epiteliales (absortivas) y glándulas de secreción de moco (células

caliciformes). En la mucosa del intestino grueso no encontramos vellosidades, solamente encontramos criptas y en lugar de las vellosidades aparece una superficie epitelial plana (Figura 14). La pared muscular es consecuentemente gruesa y capaz de una potente actividad peristáltica. Al igual que el resto del aparato gastrointestinal la musculatura propia del intestino grueso consta de dos capas: circular interna y longitudinal externa, salvo en el recto donde la capa longitudinal forma tres bandas longitudinales separadas y denominadas *teniae coli*.

Cuando el órgano no está distendido, la mucosa aparece plegada, aunque sin vellosidades definidas como las del intestino delgado. Por encima de las válvulas anales la mucosa forma pliegues longitudinales llamados columnas de Morgagni. La *muscularis mucosae* es una característica prominente de la mucosa del intestino grueso, sus contracciones rítmicas impiden el estancamiento de la secreción glandular y facilitan la expulsión del moco. Como se puede apreciar en la figura 14A las células caliciformes y absortivas se disponen en glándulas o criptas tubulares rectas densamente agrupadas, que se extienden hasta la *muscularis mucosae*. En la base de las glándulas predominan las células caliciformes, mientras que la superficie luminal está revestida casi por completo por células cilíndricas absortivas. Las células absortivas cilíndricas altas tienen núcleos ovales basales, por el contrario los núcleos de las células caliciformes son pequeños y condensados. Las células de reserva de la base substituyen continuamente al epitelio (Figura 14B). La lamina propia ocupa el espacio entre las glándulas y en ella existen numerosos vasos sanguíneos y linfáticos hacia los cuales pasa el agua absorbida por difusión pasiva. En la lámina propia existe también colágeno y linfocitos y células plasmáticas que forman parte del sistema de defensa contra los patógenos invasores, junto con los linfocitos intraepiteliales y los agregados linfoides, que al igual que las Placas de Péller, ocupan la lámina propia y la submucosa. En el intestino grueso habitan diversas bacterias comensales que degradan aún más los residuos alimenticios. En este se absorben pequeñas cantidades de vitaminas liposolubles procedentes de la actividad bacteriana.

En la tabla 6 podemos ver resumidos los principales marcadores para los diferentes tipos celulares de epitelio intestinal.



**Figure 14A:** Corte histológico de intestino grueso donde se pueden apreciar las diferentes partes: I = glándula intestinal; M = mucosa; S = Submucosa (KU Medical Center).

**Figure 14B:** Estructura del intestino grueso (Sancho, Batlle, Clevers 2004).

Las células Madre residen en el suelo de la cripta. La parada en el ciclo celular e inicio de la diferenciación se produce cuando los progenitores llegan un poco por encima de la mitad de la altura de las criptas.

<b>Marcador</b>	<b>Tipo celular</b>
<b><i>Proliferación</i></b>	
Ki67	Todas las células que proliferan
cMyc	Proliferativas- principalmente en las 2/3 partes inferiores de la cripta
NRP-B	Todas las células proliferativas de la cripta
CD44	Todas las células proliferativas de la cripta
SHH	En los bolsillos de las vellosidades en intestino delgado fetal
IHH	En los bolsillos de las vellosidades en intestino delgado fetal
Musashi-1	Células madre + células de la base de la columna
EphB3	Células madre + células de la base de la columna
EphB2	Gradiente decreciente desde la base a la parte superior de la cripta
Math-1	Caliciforme + enteroendocrino + precursores de las paneth
Hes-1	Células proliferativas
Ngn-3	Precursos enteroendocrinos
<b><i>Diferenciación</i></b>	
P21waf1/Cip1	Células en parada de ciclo celular
Ephrin-B1	Gradiente desde la superficie del epitelio a la base de la cripta
IHH	Tercio superior y superficie del epitelio en colon adulto
Carbonic anhidrase II	Tercio superior y superficie del epitelio en colon
Phospho-smad 1/5/8	Células diferenciadas en las vellosidades
Villin	Gradiente en incremento hacia los microvillis desde la cripta
Fabpi/FabpL	Enterocitos
Alkaline phosphatase	Borde de cepillo-enterocitos
Sucrose isomaltase	Borde de cepillo-enterocitos
Math-1	Caliciformes maduras, enteroendocrinas y células de paneth
Muc2	Células caliciformes
NeuroD/Beta	Células enteroendocrinas
Synaptophysin	Células enteroendocrinas
Secretin	Células enteroendocrinas
Serotonin	Células enteroendocrinas
Lysozyme	Células paneth
Cryptdins	Células paneth
EphB3	Células paneth

**Tabla 6. Marcadores conocidos para los diferentes tipos celulares intestinales.**

## **Cáncer colorectal**

Probablemente el cáncer colorectal es el tipo de cáncer en el cual se tiene un mayor conocimiento sobre los genes que se ven afectados por las mutaciones que aparecen a causa del proceso tumoral, su función en estado normal y el efecto carcinogénico que tienen al mutarse. La mayoría de las mutaciones son de origen somático y aparecen en el tejido durante el proceso de carcinogénesis. A pesar de eso, en muchos casos puede tener un origen hereditario, que viene dado por mutaciones que afectan la línea germinal que predisponen a la aparición del cáncer.

## **Epidemiología**

El cáncer colorectal es el segundo cáncer más común tanto en términos de incidencia (13,2%) como de mortalidad (203.000 muertes en el 2004) en Europa<sup>144</sup> y la resección quirúrgica del cáncer primario sigue siendo la principal opción curativa. Sin embargo, después de una aparente curación post-cirugía, aproximadamente el 50% de los pacientes sufren recaída por metástasis, que en muchos casos acaba produciendo la muerte del paciente.

Tradicionalmente se ha dividido el cáncer colorectal en casos esporádicos y en casos familiares (hereditarios). La proporción de los casos familiares se considera que está alrededor de un 20-25%.

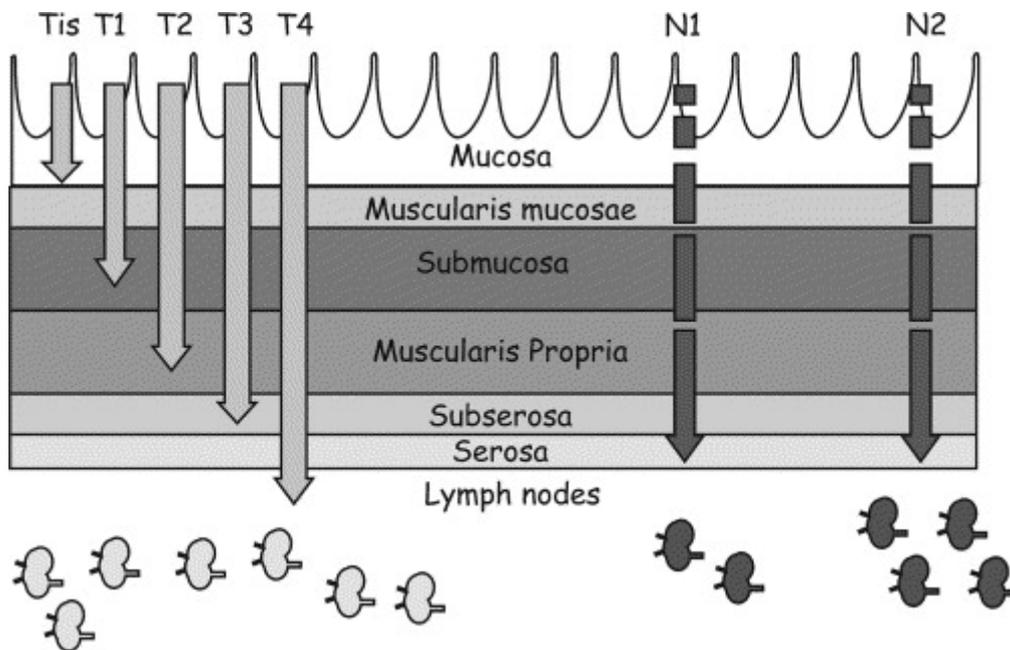
Los principales factores de riesgo para el cáncer colorectal (CRC) son:

- La **Edad**: a mayor edad mayor riesgo. El 90% de los casos se dan en personas mayores de 50 años.
- La **dieta**: las dietas altas en grasas y bajas en fibras parecen tener relación con el CRC.
- La presencia de **pólipos**: los pólipos son formaciones anormales benignas en la pared interna del colon y recto. Son bastante comunes en las personas que tienen más de 50 años. Algunos tipos de pólipos, llamados adenomas, aumentan el riesgo de una persona a desarrollar CRC.
- La **historia médica personal**: los estudios demuestran que las mujeres con una historia de cáncer de ovario y de útero tienen mayor riesgo de desarrollar CRC.

- La **historia médica familiar**: los parientes de primer grado (padres, hermanos, hijos) de una persona que ha padecido cáncer colorectal tienen mayor riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. El riesgo incrementa conforme aumenta el número de miembros de la familia diagnosticados con CRC antes de los 60 años.
- Haber tenido una **colitis ulcerosa** o una **enfermedad de Crohn**: enfermedades inflamatorias crónicas del colon que aumentan el riesgo de sufrir CRC.

### Histopatología y estadio

La probabilidad de curación del cáncer colorectal después de la cirugía está directamente relacionada con el estadio de la enfermedad. El sistema que se utiliza es el TNM, que describe la expansión del tumor en relación a las capas de la pared del colon o recto, los ganglios linfáticos y órganos cercanos o alejados (Fig. 15).



**Figura 15. Representación del sistema TNM de estadiaje en cáncer colorectal (Bustin SA & Mueller R, 2006).**

De la formula TNM, la categoría T describe la extensión del tumor a través de las diferentes capas que forman la pared del colon o recto. La categoría N indica si hay detección del tumor o no en los ganglios linfáticos más próximos y, si es así, cuantos ganglios linfáticos están afectados. La categoría M indica si el cáncer se ha extendido o no a otros órganos como el hígado, pulmones o ganglios linfáticos alejados, es decir si existe metástasis. Una vez se le ha determinado al paciente el TNM, este nos determinará el estadio de la enfermedad, que nos permitirá predecir supervivencia <sup>145</sup> (Tabla 7).

Estadio	TNM	Supervivencia a los 5 años
I	T1, N0, M0 ó T2, N0, M0	93%
IIA	T3, N0, M0	85%
IIB	T4, N0, M0	72%
IIIA	T1-2, N1, M0	83%
IIIB	T3-4, N1, M0	64%
IIIC	Cualquier T, N2, M0	44%
IV	Cualquier T, cualquier N, M1	8%

**Tabla 7. Supervivencia a los 5 años dependiendo del estadio de la enfermedad.**

Respecto a la categoría T, hablamos de Tis cuando el cáncer está en su estadio más inicial, no ha crecido más allá de la capa de mucosa inicial del colon o del recto. Este estadio se conoce también como *carcinoma in situ*. En la categoría T1, el cáncer se extiende a través de la mucosa y de la muscular mucosa dentro del tejido conectivo de la submucosa. En T2 el cáncer ha crecido a través de la submucosa, y se extiende dentro de la capa muscular propia. En T3 atraviesa ya la muscular propia llegando a la subserosa, pero todavía no llega a otros órganos o tejidos vecinos. En T4 el cáncer ya se ha extendido hacia otros órganos o tejidos, habiendo atravesado ya la subserosa y también la capa serosa. Por lo que a la categoría N respecta, hablamos de N1 cuando

encontramos células tumorales en 1-3 ganglios linfáticos cercanos y de N2 cuando las encontramos en 4 o más ganglios linfáticos.

La afectación de los ganglios linfáticos es el marcador pronóstico más importante para la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad, aunque hay una heterogeneidad considerable dentro de cada estadio tumoral <sup>146</sup>: en el estadio I el 10-15% de los pacientes sufrirán una recaída, en estadio II este número aumenta a un 25% y a un 65% en los pacientes de estadio III<sup>147, 148</sup>. A un porcentaje significativo de pacientes N0 les fallará el tratamiento y morirán por diseminación de la enfermedad.

La clasificación exacta de los pacientes con un estadio determinado en un grupo pronóstico u otro es de gran importancia debido a la aparición de quimioterapias adyuvantes más efectivas, que se administran después del proceso quirúrgico de extracción del tumor. La administración de quimioterapia adyuvante post-cirugía ha llegado a ser un estándar para todos los pacientes de estadio III (N1 o N2) produciendo una reducción del 30-40% en la recaída y en la mortalidad de éstos respecto a los tratados únicamente con cirugía <sup>149, 150</sup>. Evidencias recientes, no apoyan la aplicación de la quimioterapia adyuvante en pacientes con tumores de estadio II (N0), a pesar de que las características morfológicas parecen identificar a un grupo de alto riesgo dentro de los pacientes de estadio II, los cuales tienen un desarrollo de la enfermedad similar a los pacientes de estadio III<sup>151</sup>.

En resumen, a pesar de que la histopatología nos permite clasificar en estadios a los pacientes, esta no permite identificar de forma precisa pacientes concretos con mayor riesgo de fallo en el tratamiento. Esto se cree que es debido a la existencia de enfermedad oculta submicroscópica, que es capaz de evadir al sistema inmune, invadiendo los canales vasculares y que acaba desarrollándose en una neoplasia macroscópica <sup>152</sup>.

## **Cáncer de colon hereditario**

De todos los pacientes con cáncer colorectal, un 20% presentan un riesgo familiar, mientras que un 5-10% lo heredan de forma autosómica<sup>153</sup>. Las formas hereditarias de cáncer colorectal se pueden dividir en 2 categorías basándonos en la presencia de poliposis, dos ejemplos de las cuales son la poliposis adenomatosa familiar y el cáncer colorectal hereditario no poliposo.

### *Poliposis adenomatosa familiar (PAF)*

Esta se caracteriza por la aparición de 100-2500 adenomas en el la zona colorectal. Suelen aparecer en el final de la infancia o en la adolescencia y de forma inevitable, si no se tratan, estos adenomas derivaran hacia adenocarcinomas en la etapa adulta. La penetrancia es del 100%.

Estos tumores colorectales presentan de forma característica inestabilidad cromosómica, cariotipo aneuploide y tienen mutaciones en importantes genes supresores de tumores y oncogenes como *APC*, *KRAS* y *TP53*. Son bastante agresivos en términos de invasibilidad y metástasis. La PAF presenta un tipo de herencia autosómica dominante causada por mutaciones del gen supresor de tumores *APC*. La inactivación de este gen ocurre también en una gran proporción de cánceres colorectales esporádicos.

### *Cáncer colorectal hereditario no polipósico (Síndrome de Lynch)*

Este es un síndrome autosómico dominante que predispone a múltiples cánceres primarios sin una poliposis intestinal. Es de localización predominante en el colon-recto proximal y presentan unas características patológicas específicas<sup>154</sup>. La edad media de aparición es de 40-45 años.

La principal característica de estos tumores es la inestabilidad de microsatélites<sup>155</sup>. Los microsatélites son pequeñas regiones genómicas donde pequeñas secuencias de DNA o nucleótidos únicos se repiten. Durante la replicación del DNA las mutaciones aparecen en estas regiones, produciendo un alargamiento o acortamiento de las mismas. Estudios familiares han permitido identificar mutaciones en 5 genes diferentes de reparación del DNA de la vía *mismatch*: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*<sup>156-160</sup>. Mutaciones en *MLH1* y *MSH2* aparecen en el 90% de las mutaciones encontradas en estos tumores. Mutaciones causadas por inestabilidad de microsatélites se han identificado en los genes *CTNNB1*, en *TGFBR2* y en el gen proapoptótico *BAX*<sup>161</sup>. También pueden aparecer mutaciones en *APC* como consecuencia de la inestabilidad de microsatélites<sup>162</sup>.

### *Hamartomatous polyposis syndromes*

Se caracteriza por un crecimiento anormal de tejido normal, que suele incluir componentes mesenquimáticos, aunque elementos endodérmicos o ectodérmicos

pueden también estar incluidos <sup>163</sup>. Ejemplos típicos de este síndrome son el síndrome juvenil de poliposis (JPS) y el síndrome de Peutz-Jeghers, los cuales se asocian a un incremento del riesgo de aparición de neoplasias intestinales y no intestinales. El JPS se asocia con mutaciones del gen *SMAD-4* <sup>164</sup> y del gen *BMP1A* <sup>165</sup>. Aproximadamente el 80% de las familias con el síndrome de Peutz-Jeghers son portadoras de alteraciones germinales en el gen *LKB1/STK11* <sup>166</sup>.

## **Cáncer de colon esporádico**

Aproximadamente el 50% de la población occidental desarrolla un adenoma alrededor de los 70 años, por lo cual el riesgo de cáncer colorectal esporádico está alrededor del 5% <sup>167</sup>.

Se ha observado que existen diferentes estadios en la progresión de la enfermedad (desde las lesiones benignas iniciales, hasta el tumor totalmente metastático) con diferentes alteraciones genéticas presentes en los diferentes estadios<sup>168</sup>. Existe un modelo que propone que el tumor colorectal se origina como resultado de la activación mutacional de oncogenes junto con la inactivación de genes supresores de tumores. Además propone que son necesarias mutaciones en diferentes genes y que éstas ocurren en una secuencia preferencial, de forma que la acumulación de cambios y el orden cronológico en que se producen, determina las propiedades biológicas del tumor. Debido a la aparición de las diferentes mutaciones, se progresa desde un adenoma inicial a un carcinoma.

En la secuencia que va de Adenoma a Carcinoma, la lesión más pequeña identificable es la *Aberrant crypt focus* (ACF). Estas son pequeñas lesiones con características histológicas variables que van de la hiperplasia a la displasia<sup>169</sup>. Se han descrito dos tipos de ACF: el más común está asociado con una cripta hiper celular o hiperplástica que se desarrollará en un carcinoma maligno y el segundo tipo, el ACF displásico, aparece normalmente en mucosa de colon asociada a carcinoma. En el caso de los de tipo displásico la mayoría tienen mutaciones de *APC*, mientras que los hiperplásicos aparecen por mutaciones de *K-RAS* <sup>170</sup> (Figura 16).

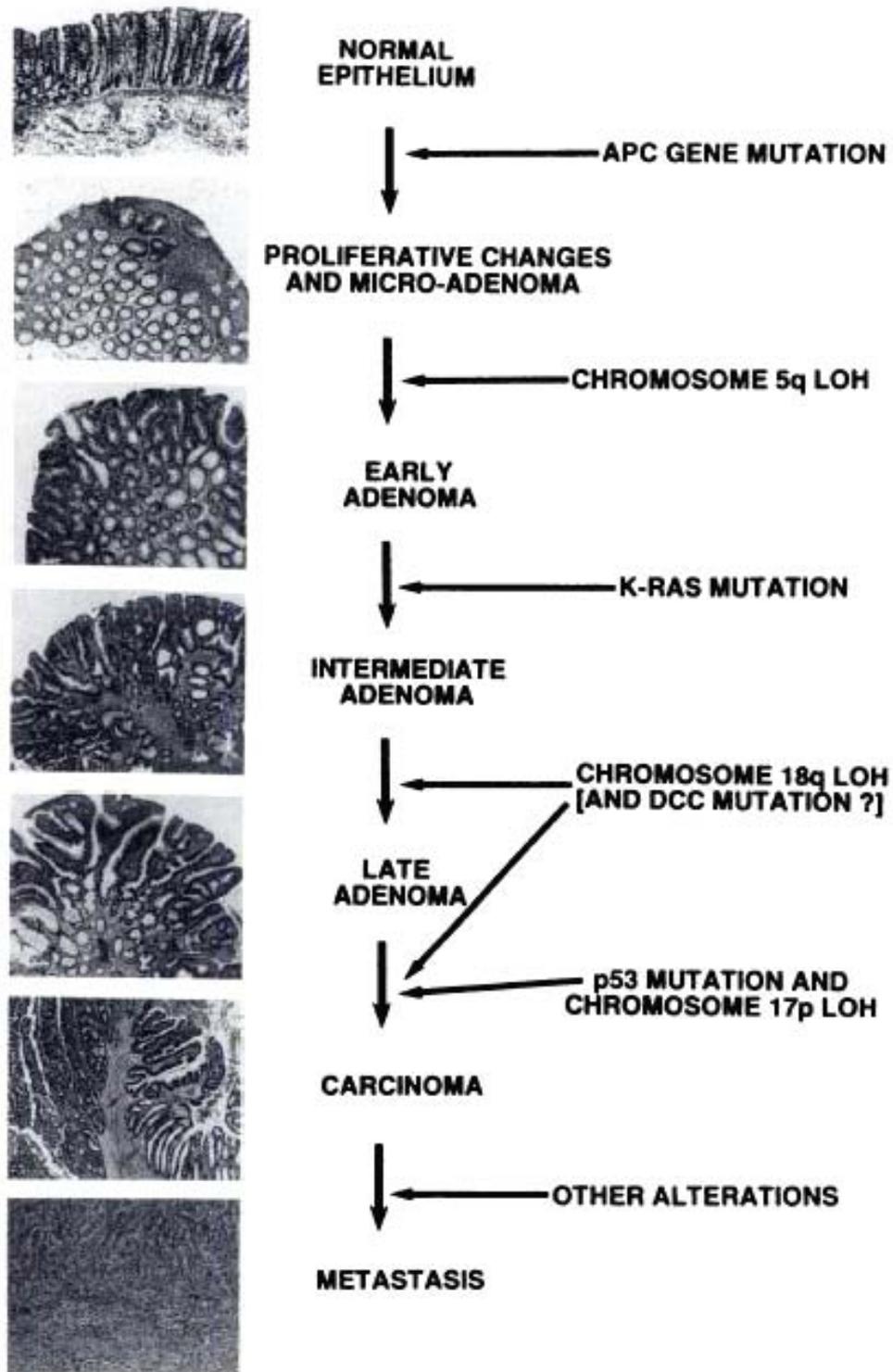


Figura 16. Secuencia de aparición de mutaciones e histología en la progresión del cáncer colorectal (Fearon ER & Jones PA, 1992).

Dos modelos diferentes se han propuesto para explicar el origen y crecimiento de las ACF displásicas o los pólipos de una única cripta:

- Vogelstein y colaboradores sugirieron que las células con mutaciones en *APC* localizadas en la superficie del epitelio del colon, se distribuían lateralmente y hacia abajo para formar nuevas criptas <sup>171</sup>.
- Wright y colaboradores propusieron recientemente otro modelo, donde los adenomas de una sola cripta crecían de forma desmesurada <sup>172</sup>.

La expansión de los ACF displásicos acaba dando lugar a grandes adenomas de varios centímetros. Estos adenomas pueden crecer como estructuras polipoides o no. Una gran proporción de adenomas de >1cm tienen mutaciones de activación en el oncogén *RAS* o mutaciones complementarias en *B-RAF*. Además la adquisición de mutaciones de inactivación en la vía de señalización de *TGF-β* (principalmente en *SMAD-4*, pero también en *TGFBR2*) confiere características malignas adicionales en las células del adenoma.

En un estadio avanzado, el Adenoma progresa hacia un *Carcinoma in situ*, donde las células tumorales presentan características malignas como patrones cribiformes, presencia de células atípicas, desmoplasia, y en el caso de los adenomas polipoides invasión de la base de la pared del colon. En el 50% de los tumores tenemos una inactivación del gen *TP53* <sup>173</sup>, lo cual provoca la aparición de alteraciones genéticas adicionales como consecuencia de daños en el DNA e inestabilidad genética. Aquí se utiliza el estadiaje por TNM para clasificar los diferentes carcinomas colorectales.

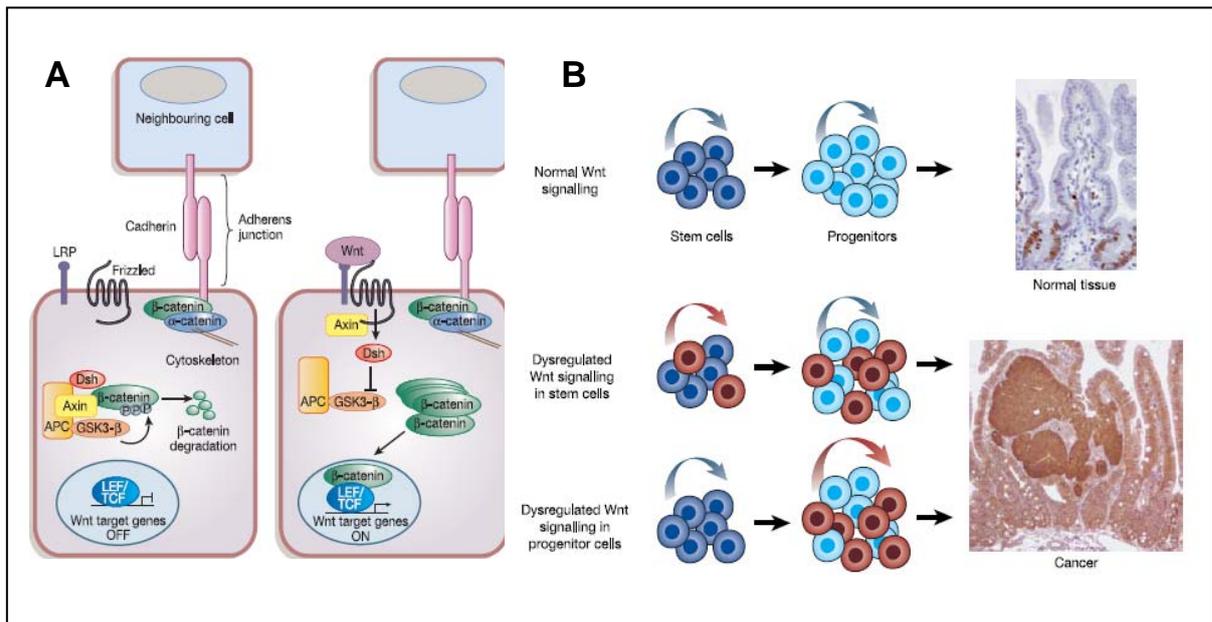
La progresión del cáncer colorectal puede comprenderse en términos darwinianos de evolución <sup>174</sup>, ya que los tumores colorectales se desarrollan pasando por toda una serie de puntos restrictivos, en los cuales solamente aquellas células que adquieren las mutaciones correctas se consiguen expandir. En todo este proceso, la inestabilidad genómica provee de un continuo conjunto de mutaciones que permiten la rápida adaptación del tumor.

## Vías de Señalización involucradas en el desarrollo intestinal y el cáncer

### WNT

La cascada regulatoria de la vía *WNT* es un importante elemento regulador de las células madre y en muchos tejidos la activación de esta vía está relacionada con algunos tumores. La vía de *WNT* está totalmente involucrada en el mantenimiento y crecimiento de las células madre y cancerosas intestinales.

En ausencia de Wnt, la casina quinasa-1 y GSK3- $\beta$ , ambas residentes en el complejo proteico APC, provocan la fosforilación de la  $\beta$ -catenina, cosa que provoca su ubiquitinización y rápida destrucción por el proteosoma. La unión de Wnt a su receptor bloquea la actividad quinasa intrínseca del complejo APC, provocando una acumulación de  $\beta$ -catenina en la célula que se transloca hacia el núcleo donde se unirá a proteínas de unión al DNA de la familia *TCF/LEF*, activando la transcripción de una serie de genes <sup>175</sup> (Figura 17).



**Figura 17. Vía de señalización de WNT (Reya T. & Clevers H. 2005).**

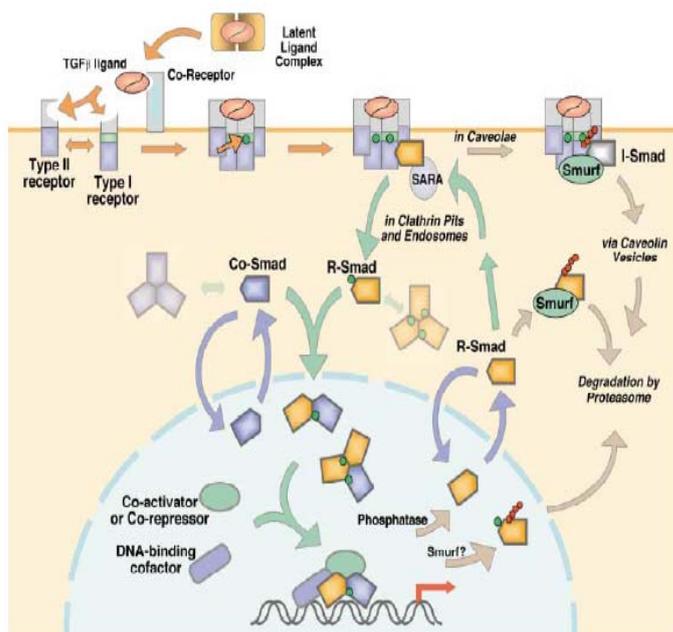
A) Vía de señalización de *WNT*; y B) La vía de señalización de *WNT* participa en la proliferación y renovación de las células madre (azul oscuro) o de los progenitores (azul claro) durante el desarrollo de varios tejidos. El descontrol de la señalización de *WNT* (flecha roja) dirige hacia una renovación constitutiva y aberrante de las células madre, pudiendo dirigir hacia la formación de tejido canceroso (células en rojo).

Múltiples estudios genéticos han implicado a la vía de *WNT* en la proliferación de las células progenitoras del epitelio intestinal<sup>176-178</sup>. Las células proliferativas del fondo de las criptas del intestino delgado y del colon acumulan  $\beta$ -catenina nuclear (Figura 17). Mutaciones activadoras de la vía de *WNT* pueden llevar a la formación de un cáncer colorectal en humanos. Además mutaciones en *TCF4* (miembro de la familia *TCF/LEF* de expresión intestinal) inducen pérdida de los compartimientos proliferativos en el intestino delgado<sup>179</sup>. También se ha observado que la inhibición de la actividad beta-catenina/*TCF4* en células CRC produce el cambio de un fenotipo en forma de cripta a un fenotipo diferenciado de vellosidad epitelial<sup>180, 181</sup>.

En las primeras fases de la carcinogénesis del CRC las mutaciones en el gen *APC* eliminan la capacidad de disminuir los niveles citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina<sup>182, 183</sup> y esto inhibe la actividad transcripcional de *TCF4*<sup>184, 185</sup>. Mutaciones en otros componentes de la vía de *WNT* también pueden conllevar esta inactivación inapropiada de *TCF4*. Parece ser que las células de CRC comparten el tipo de actividad  $\beta$ -catenina/*TCF4* con las células normales proliferantes de las criptas<sup>181</sup>. Las células de adenoma representan la transformación de las células progenitoras de la cripta.

### *TGF- $\beta$*

La superfamilia de factores de crecimiento *TGF- $\beta$*  regula procesos muy diversos que incluyen desarrollo embrionario, angiogénesis, proliferación y diferenciación celular<sup>186</sup>.



**Figura 18. Vía de señalización de *TGF- $\beta$*  (Shi Y. & Massagué J. 2003)**

Esta familia comprende las proteínas TGF- $\beta$ , las proteínas BMP (*Bone morphogenetic proteins*) y las activinas. Los mensajeros intracelulares de esta vía de señalización son las proteínas SMAD, entre ellas SMAD-4. Estos complejos proteicos podrán translocarse al núcleo donde actuarán regulando la transcripción génica de determinados genes específicos.

En la secuencia de la carcinogénesis colorectal, mutaciones inactivadoras de los componentes de la vía de señalización TGF- $\beta$  han sido identificadas en la transición adenoma-carcinoma<sup>168</sup>. Las mutaciones más comunes inactivan el receptor TGF- $\beta$  II (*TGFBR2*). También de forma frecuente se encuentran mutaciones en *SMAD-2* y *SMAD-4*<sup>187, 188</sup>.

El análisis de mutaciones en modelos animales de los diferentes componentes de la vía, sugiere que la falta de señal de la vía de TGF- $\beta$  en el microambiente del intestino, fácilmente contribuye a la progresión de lesiones preexistentes iniciales.

#### *K-RAS/B-RAF*

Tres genes *RAS* (*H-RAS*, *K-RAS*, y *N-RAS*) codifican para una molécula de 21 kDa que trabaja controlando los intercambios GDP/GTP. La transducción de señales en esta vía por debajo de RAS viene dada por diferentes proteínas efectoras, pero la vía clásica está formada por tres quinasas conservadas evolutivamente: RAF, MEK y MAPK. La activación de RAS por unión de GTP provoca la formación de un complejo RAS-RAF, que se transloca a la membrana donde RAF es activado. RAF activo fosforila y activa MEK1 y MEK2, los cuales activan a las MAPKs p42 y p44, éstas una vez activadas se translocan al núcleo donde fosforilarán un conjunto de factores de transcripción. La activación de la vía de *RAS-RAF-MAPK* generalmente promueve crecimiento celular y supervivencia<sup>189, 190</sup>.

Mutaciones de activación en *K-RAS* son encontradas en 1/3 de todos los cánceres humanos, y en CRC la frecuencia varía entre un 38% y un 50%<sup>191</sup>. Las mutaciones activadoras en *K-RAS* y *B-RAF* se detectan en adenomas grandes y carcinomas (> 1cm)<sup>192, 193</sup>, cosa que implica que la vía de *RAS-RAF-MAPK* juega más bien un papel en la progresión maligna, que no en la iniciación tumoral.

## *LKB*

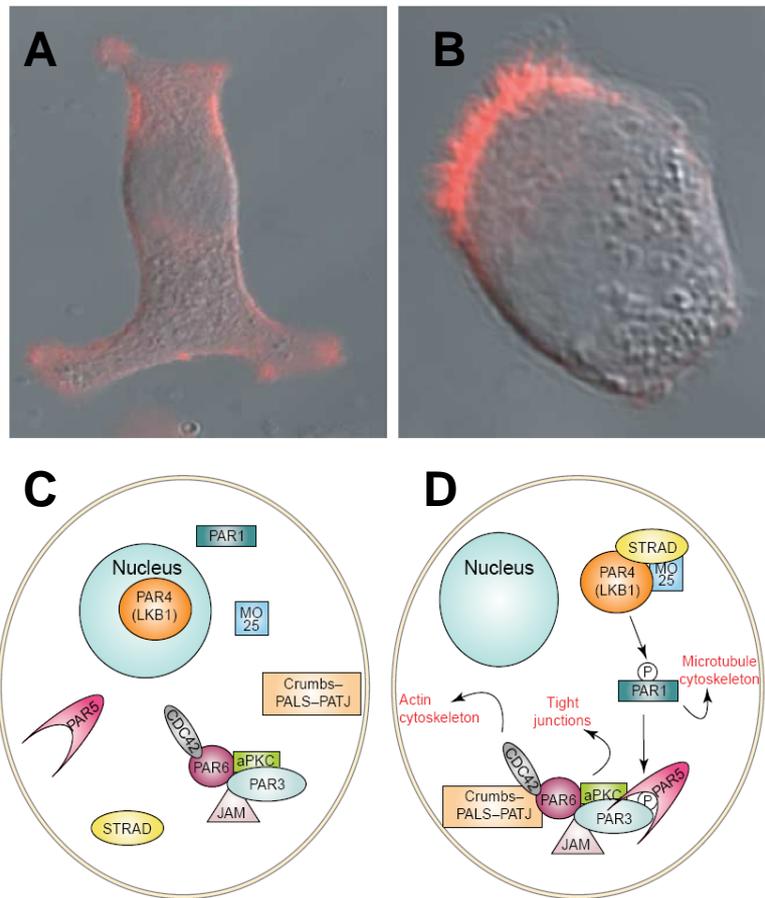
Aproximadamente el 80% de las familias con síndrome de Peutz-Jeghers tienen mutaciones germinales de inactivación en *LKB1*, hecho que define a *LKB1* como un gen supresor de tumores. Esta proteína está implicada en una gran variedad de procesos celulares, que incluyen el control de la parada de ciclo celular, la apoptosis mediada por p53, la señalización por Wnt, la señalización por TGF- $\beta$ , la transformación inducida por Ras, y el metabolismo energético<sup>194</sup>. Esta proteína requiere de otras dos proteínas para ser activa: STRAD y MO25. STRAD es una pseudoquinasa que actúa estabilizando, activando y translocando LKB1 del núcleo al citoplasma<sup>195</sup>.

LKB1 juega un importante papel en la polarización celular, junto con PAR-1. La activación de la expresión de LKB1 inducida por STRAD en las células epiteliales intestinales, dirige hacia la ejecución de un programa completo de polarización celular, que incluye la formación de un borde en cepillo, la relocalización de proteínas de unión que rodean este borde en cepillo, y la correcta colocación de proteínas para definir el extremo apical y basolateral. Sorprendentemente, LKB1 activada es capaz de inducir esta polarización en una célula aislada<sup>196</sup>. La pérdida de la polaridad en células epiteliales mutadas es el último paso de la transformación neoplásica (Figura 19).

## *Notch/bHLH*

La vía de señalización de Notch controla el patrón espacial de la célula. Notch codifica para un receptor proteico transmembrana. Encontramos 4 receptores Notch (Notch 1-4) y cinco ligandos (Delta-like 1, 3, y 4; Jagged 1 y 2), que son también moléculas transmembrana. La interacción del receptor Notch y su ligando resulta en una rotura proteolítica del receptor, que libera el *Notch intracelular domain* (NICD), que se transloca al núcleo donde se unirá al factor de transcripción CSL (CBF1/RBPjk). Este factor de forma normal actúa como represor de la transcripción, pero al unirse al NICD se activa de nuevo la transcripción<sup>197</sup>.

Los 4 linajes de células epiteliales que surgen de las células madre del fondo de las criptas, se determinan mediante decisiones consecutivas de tipo binario<sup>198</sup>, que probablemente podrían venir controladas por la vía de señalización de Notch<sup>199</sup>. A pesar de eso, no se han descrito hasta la fecha alteraciones en la vía del Notch en los procesos neoplásicos intestinales.

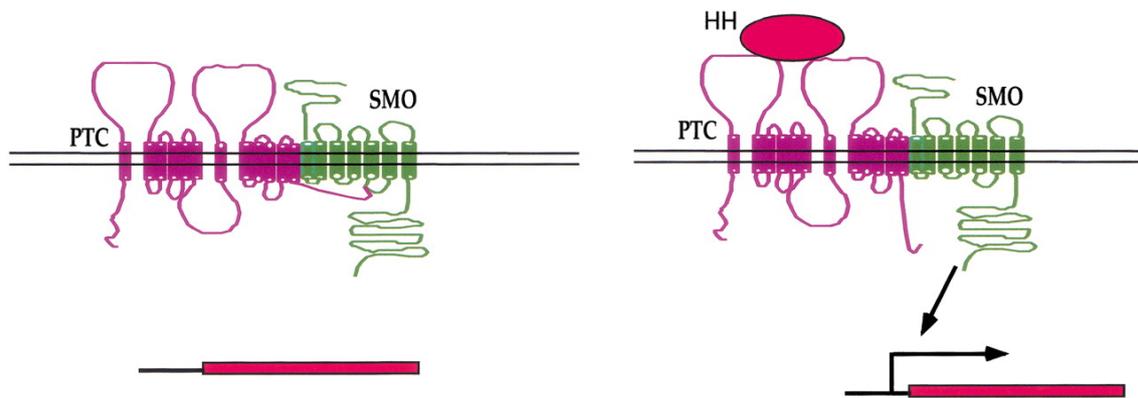


**Figura 19. Efecto y vía de actuación de LKB1 (Baas AF. et al. 2004).**

A y B): Reorganización del citoesqueleto de actina después de la activación de LKB1 mediante STRAD. A) Antes de la activación de LKB1, la actina esta distribuida de forma igual por todo el cortex celular. B) Después de la inducción por STRAD, la actina forma un borde en forma de cepillo del cual los orgánulos se sitúan lejos. C y D) Inducción de la polarización en célula epitelial por la vía de las proteínas PAR al recibir una señal de polarización. C) Antes de la señal de polarización LKB1 permanece en el núcleo. D) Después de recibir la señal de polarización, se activa LKB1 mediante STRAD-MO25 y se transloca del núcleo al citoplasma. LKB1-STRAD-MO25 fosforila y activa a PAR1 el cual a su turno fosforila a PAR3, creando sitios de unión para PAR5.

## Hedgehog

Las proteínas secretadas Hedgehog (HH) actúan a través de tres proteínas transmembrana diferentes, en las células que responden a las señales Hedgehog: Smoothened (SMO), Patched (PTCH), y Hedgehog-interacting protein (HIP). En ausencia de los ligandos PTCH bloquea la actividad de SMO, pero una vez se une el ligando al receptor PTCH, este bloqueo desaparece provocándose la activación de una cascada de señalización que culmina con la translocación de miembros de la familia GLI del citoplasma al núcleo de la célula, activando la expresión de determinados genes diana en estas células que responden a la señal de HH<sup>200</sup>.



**Figura 20. Actuación de los receptores Hedgehog.**

Los ligandos HH actúan como morfógenos durante el desarrollo de varias estructuras, entre ellas el tracto digestivo, controlando la especificidad celular de manera dependiente de concentración.

Aunque parece tener importancia, no se han encontrado mutaciones en miembros de esta vía en el CRC. Sin embargo, en un trabajo realizado por nuestro grupo se pudo observar una sobreexpresión de *Sonic hedgehog* en muestras tumorales de pacientes de CRC, en comparación con su propio tejido normal<sup>201</sup>. Estos datos indican que *Sonic hedgehog* juega un papel importante en el CRC.

## **Linfoma de Hodgkin**

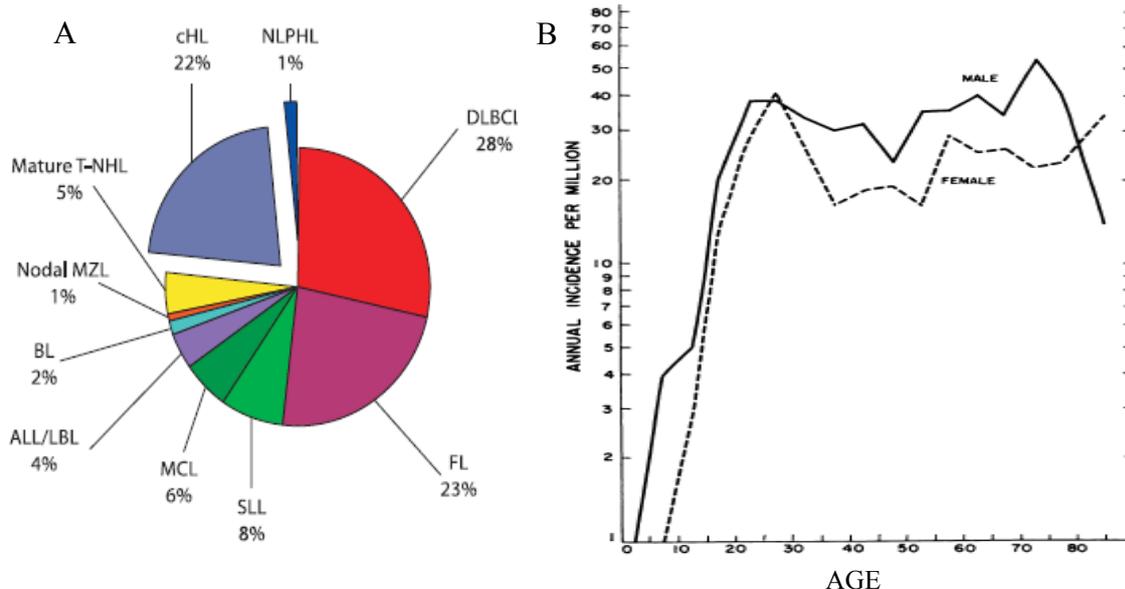
El linfoma de Hodgkin (LH) es una neoplasia infrecuente del sistema linfático que se caracteriza por la presencia de relativamente pocas células tumorales, células de Hodgkin y de Reed-Sternberg, y por un importante microambiente de células no neoplásicas.

Mucho se ha investigado y publicado desde que en 1832 el cirujano Thomas Hodgkin, del londinense *Guy's Hospital*, describiera unos cuantos casos de una enfermedad ganglionar mortal, que afectaba a los ganglios linfáticos y al bazo, y fueran presentados años más tarde ante la Sociedad Inglesa de Cirujanos con el título: “*On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen*”. A finales del siglo XIX y principios del XX, los doctores Carl Sternberg y Dorothy Reed describieron la histopatología con sus células características. El origen clonal de estas células, generalmente derivadas de las células B del centro germinal del ganglio linfático, se demostró en la década pasada.

## **Epidemiología**

El linfoma de Hodgkin clásico (LHc) representa el 20-25% de todos los linfomas nodales en Europa, siendo uno de los linfomas más frecuentes en occidente y que a menudo afecta a jóvenes adultos. Cada año en España se producen unos 1000 casos nuevos de linfoma de Hodgkin, y en el año 2002 fallecieron 216 personas por LH como causa primaria. La proporción de la incidencia anual promedia en hombres respecto a mujeres es de 1,7:1 y la incidencia anual promedio ajustada por edad es de 2-4 casos/100.000 habitantes, manteniéndose constante en los últimos 15 años.

Clásicamente se ha descrito que en occidente la distribución de edad del LH tiene una forma bimodal, con un pico al comienzo de la edad adulta y el otro en la tercera edad (Figura 21). El predominio de subtipos histológicos difiere según la edad: en jóvenes adultos el subtipo predominante es la esclerosis nodular, mientras que los subtipos de celularidad mixta y rico en linfocitos aumentan con la edad.



**Figura 21. A) Frecuencia del linfoma de Hodgkin clásico en la población respecto a otros tipos de linfoma (Tzankov A. & Dirnhofer S. 2006) y B) distribución bimodal de los casos de LH respecto a la edad (MacMAHON B. 1966).**

La distribución por edad y las diferencias geográficas en la epidemiología descriptiva del LHc puede reflejar diferencias en la etiología y sugiere una estrecha relación entre LHc y un agente infeccioso, siendo el VEB el principal sospechoso. Dependiendo del área geográfica, de un 20 a un 100% de los casos de LHc aparecen asociados con el tipo de infección por VEB A o B, encontrándose la mayor prevalencia documentada en pacientes inmunocomprometidos, niños de países en desarrollo, adultos > 55 años de países del este y pacientes con el subtipo celularidad mixta. Es importante remarcar que la infección por VEB de las células de Hodgkin y Reed Sternberg es clonal, sugiriendo que su presencia es previa a la transformación maligna y puede tener un papel en el proceso de linfomagénesis. Además, la proteína LMP-1 del VEB puede inmortalizar células B. Individuos que en el pasado han sufrido una mononucleosis infecciosa tienen de 3 a 4 veces aumentado el riesgo de sufrir LHc. Otra de las evidencias que apuntan hacia la teoría de las causas ambientales en el LHc, principalmente agentes infecciosos, es la agrupación en grupos. De todos modos, la interrelación entre LHc y los agentes infecciosos es compleja y dependiente de características genéticas e inmunológicas.

El riesgo relativo de desarrollar un LHc incrementa: aproximadamente 100 veces en gemelos monocigóticos, de 10 a 20 veces en pacientes con LLC, 10 veces en individuos

con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), 7 veces en gemelos <45 años de edad, 6 veces en pacientes que han sido sometidos a un trasplante allogenico de medula ósea, así como también en pacientes con el síndrome autoinmune linfoproliferativo y en esclerosis múltiple. Finalmente, la incidencia de LHc está incrementada en niños inmunodeficientes, particularmente en aquellos con ataxia-teleangiectasia y con síndromes de Wiskott-Aldrich y Bloom's. Además, considerando el incremento en incidencia en pacientes con LLC, las evidencias indican, una asociación con el pretratamiento con Fludarabina.

## **Histopatología**

El linfoma de Hodgkin se diferencia de la mayoría de neoplasias malignas por su especial composición celular. Se caracteriza por una población tumoral en minoría rodeada por un importante microambiente formado principalmente por células inflamatorias. Las células neoplásicas, células de Hodgkin y de Reed-Sternberg (H/RS), conforman menos del 1% de la celularidad total; mientras que el componente no neoplásico más abundante está constituido por linfocitos, histiocitos, eosinófilos y células plasmáticas. El paradigma del diagnóstico del linfoma de Hodgkin son las células gigantes atípicas, las células de H/RS, aunque el LH abarca una gran variedad en cuanto a manifestaciones morfológicas. Por un lado, el LH puede confundirse con entidades benignas como la hiperplasia folicular, los centros germinales progresivamente transformados, la variante plasmocelular de la enfermedad de Castelman y algunas enfermedades granulomatosas. Por otro lado, el LH puede simular a los linfomas no Hodgkinianos, al carcinoma pobremente diferenciado, al melanoma maligno o al sarcoma. El diagnóstico del LH no es siempre fácil, aunque con los avances en el conocimiento de las lesiones moleculares que acompañan al desarrollo de los procesos linfoproliferativos y la disposición de amplios paneles de anticuerpos monoclonales que funcionan en tejidos procesados rutinariamente, se ha mejorado en su diagnóstico y clasificación.

La nueva clasificación de la OMS<sup>202</sup> para los tumores hematopoyéticos reconoce que el LH es un verdadero linfoma, distinto en cuanto a sus características clínicas y su respuesta al tratamiento de los procesos linfoproliferativos malignos denominados Linfoma no Hodgkin. Según la clasificación de la OMS el LH se divide en dos grandes categorías: el LHc y el LH de predominio linfocítico nodular (LHPLN) conocido

también como paragranuloma nodular. El LHc engloba a los subtipos esclerosis nodular (EN), celularidad mixta (CM), rico en linfocitos (RL) y depleción linfoide (DL).

Para el diagnóstico de LHc la detección de las células de H/RS, grandes células multinucleadas en el caso de las de RS y mononucleadas en el caso de las de Hodgkin, no es suficiente y es necesario complementarlo con un inmunofenotipo específico (CD30+, CD15+/-, BSAP<sup>weakly</sup>+, CD45RA-), con un fondo determinado complementario.

### *Subtipos morfológicos de linfoma de Hodgkin clásico*

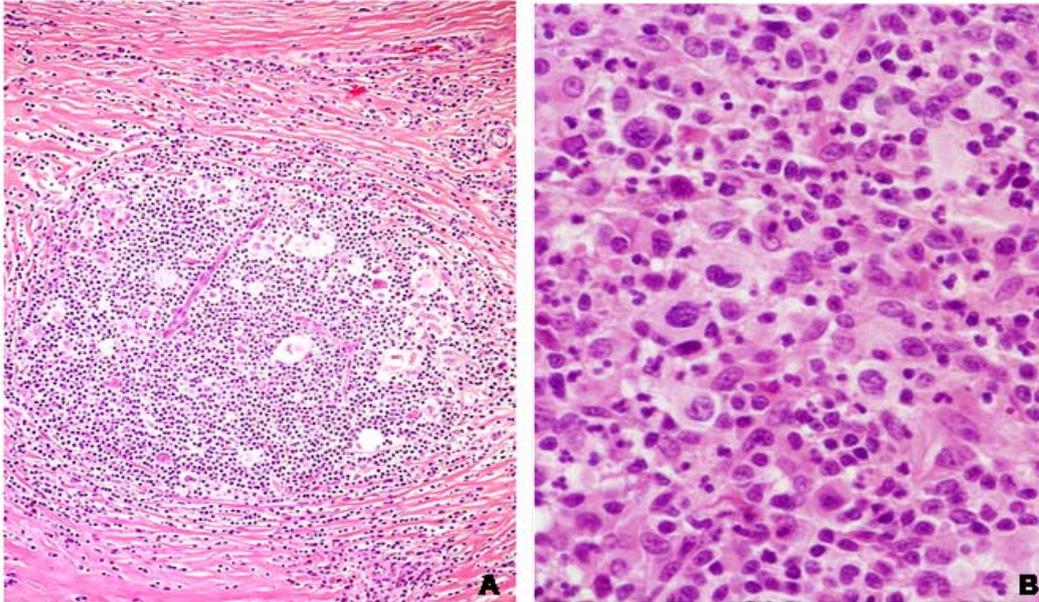
#### Esclerosis nodular

En el LHc tipo esclerosis nodular se observa un patrón parcialmente nodular debido a la presencia de bandas fibrosas de colágeno junto a áreas difusas. En lesiones iniciales, la fibrosis puede envolver solamente la cápsula del ganglio linfático. La célula característica es la variante lacunar de la célula de Reed-Sternberg (Figura 22). Estas células tienen un núcleo multilobulado, con núcleos pequeños y abundante citoplasma pálido que se retrae en el tejido fijado en formol y produce un espacio vacío (laguna). Las células lacunares suelen ser abundantes, se observan también células de Reed-Sternberg, pero estas suelen ser escasas. El componente no neoplásico contiene linfocitos, histiocitos, células plasmáticas, eosinófilos y neutrófilos. Es frecuente la presencia de necrosis, siendo más numerosas las células neoplásicas alrededor de los focos necróticos. Dependiendo del número y lo atípicas que sean las células neoplásicas, podemos hablar de esclerosis nodular tipo I o tipo II, aunque este gradiente, como propuso el grupo británico “*British National Lymphoma Investigation Group*”<sup>203</sup>, ha sido suprimido por no aportar diferencias al tratamiento y ser de poca importancia práctica<sup>204, 205</sup>.

#### Celularidad mixta

En el LH celularidad mixta el infiltrado es difuso y las células neoplásicas son del tipo H/RS clásico (Figura 22). Es el subtipo que más comúnmente va acompañado de la infección por VEB<sup>206</sup>.

Tanto el subtipo esclerosis nodular como celularidad mixta, pueden afectar focalmente a las áreas interfoliculares de los ganglios linfáticos y se pueden acompañar de hiperplasia folicular con cambios involutivos que simulan enfermedad de Castelman.



**Figura 22. A: Esclerosis nodular; B: Celularidad mixta.**

#### LHc rico en linfocitos

El LH rico en linfocitos presenta cierto parecido con el LH de predominio linfocítico nodular, debido al predominio de linfocitos pequeños en el infiltrado, pero a diferencia en éste las células neoplásicas eran del tipo H/RS clásico o lacunar. Una proporción pequeña de estos casos puede tener un patrón de crecimiento vagamente nodular, con centros germinales en los nódulos y células neoplásicas en el manto de los folículos y en las áreas interfoliculares. El inmunofenotipo es de gran ayuda para diferenciar ciertos casos de los de LHPLN.

#### Depleción linfoide

En este subtipo las células neoplásicas son numerosas y de aspecto sarcomatoso, siendo el infiltrado no neoplásico muy escaso.

## Inmunofenotipo

Las células de Hodgkin y de Reed-Sternberg se caracterizan por un inmunofenotipo variable e inconstante, con una remarcable pérdida de antígenos asociados a células B y expresión de antígenos de otros linajes celulares. Solamente una pequeña proporción (20-30%) de las células de H/RS expresan marcadores típicos de célula B como CD19, CD20, CD22, y CD79a. Marcadores inapropiados de célula T, células dendríticas y granulocitos como CD2, CD4, CD5, CD8, granzima, CD15 o fascina pueden detectarse en las células de H/RS. Es importante remarcar, que las células de H/RS no muestran expresión de CD45RA y del antígeno epitelial de membrana (EMA). Estos marcadores son importantes ya que permiten diferenciar al LH en el diagnóstico de otros tipos de linfomas. Otros antígenos importantes, que son básicos para la determinación del diagnóstico de LHc son: CD30 (Ber-H2) y CD15. Además, se ha observado que hay una correlación entre CD30 y el factor nuclear de supervivencia *NF- $\kappa$ B*, el cual puede ser activado *in vitro* por CD30, indicando la importancia de CD30 en el LHc. La introducción de nuevas tecnologías, entre ellas los microarrays, nos han proporcionado enormes cantidades de información sobre el inmunofenotipo de las células de H/RS (Tabla 8), que se resume de la siguiente manera: el 40% de los casos de LHc expresan marcadores de superficie de células B en las células de H/RS y aproximadamente un 10% marcadores de células T. Entre estos marcadores podemos destacar a BASP (Pax-5) que es necesario para el mantenimiento de la identidad de célula B y que se expresa débilmente en la mayoría de las células de H/RS. Además, las células de H/RS no expresan *Oct-2* y *BOB.1* y permanecen completamente negativas para *PU.1*.

<b>Marcador</b>	<b>Expresión Cualitativa/Cuantitativa</b>
<b><i>Marcador de células B</i></b>	
BSAP	Positividad débil / >95 de los casos, >70% de las H/RS
CD19	Positivo / 20% de los casos, <50% de las H/RS
CD20	Positivo / 30% de los casos, 40% de las H/RS
CD21	Positivo / 10-40% de los casos, 10-60% de las H/RS
CD22	Positivo / 20% de los casos
CD23	Positivo / 30% de los casos
CD79a	Positivo / 10% de los casos, 20% de las H/RS
CD138	Positivo / 1% de los casos
<b><i>Marcador de células T</i></b>	
CD2	Positivo / 4% de los casos, 40% de las H/RS
CD3	Positivo / 1% de los casos, 40% de las H/RS
CD4	Positivo / 2% de los casos, 40% de las H/RS
CD5	Positivo / <1% de los casos, 40% de las H/RS
CD8	Positivo / <1% de los casos, 40% de las H/RS
Granzyme	Positivo / 18% de los casos, 10-50% de las H/RS
TIA-1	Positivo / 10% de los casos
<b><i>Marcadores de activación</i></b>	
CD25	Positivo / casi todos los casos
CD30	Positivo / 99% de los casos, >99% de las H/RS
CD40	Positivo / 70-100% de los casos
<b><i>Marcadores inapropiados de linaje</i></b>	
CD15	Positivo / >70% de los casos, 5-95% de las H/RS
EMA	Positividad débil en <5% de los casos
Fascina	Positivo / 100% de los casos
<b><i>Otros marcadores</i></b>	
ALK1	Negativo
BCL6	Positivo / 10% de los casos, >10% de las H/RS
CD43	Negativo
CD45RA	Negativo
MUM1	Positivo / 100% de los casos, >10% de las H/RS
Vimentina	Positivo en todas las H/RS

**Tabla 8. Marcadores de célula de Hodgkin/Reed-Sternberg.**

## Biología molecular de las células de Hodgkin y Reed-Sternberg

Debido a la coexpresión aberrante de marcadores de varios linajes celulares, como granulocitos, linfocitos T y B o células dendríticas, el origen celular de las células de H/RS ha sido un enigma durante décadas. Por aislamiento de células de H/RS de secciones de tejidos con LH y su posterior análisis por PCR para amplificar genes de Inmunoglobulinas (Ig) V reordenadas, se pudo descubrir que las células de H/RS tenían un origen clónico derivado de células B, en las que se había producido un reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas V<sup>207-211</sup>. Se observó que la mayoría de casos de LHc y de LH de predominio linfocítico nodular tenían mutaciones somáticas de inactivación y reordenamientos en los genes de las Ig en la región V, cosa que sugería un origen en la célula B de centro germinal (CG), ya que hipermutaciones somáticas de los genes de las Ig tienen lugar de forma específica en las células B de los CG. Las células de H/RS presentan una falta de expresión de Ig que se explica por mutaciones en el gen de las Ig que inactivan parcialmente la transcripción de Ig<sup>208, 211-214</sup>. Por otro lado, puede ser debida a la ausencia de activadores claves de la transcripción de Ig como *Oct-2*, *BOB.1* y *PU.1*<sup>215-219</sup>. Otra causa que se ha encontrado *in vitro* es la inactivación de la transcripción por hipermetilación de la región promotora de las Ig<sup>220</sup>. De esta manera, las células de H/RS ni producen Ig, ni tienen un receptor de antígeno de célula B (BCR) funcional. En condiciones normales estas células B de centro germinal sin un BCR funcional entrarían en apoptosis y serían eliminadas<sup>221, 222</sup>, pero las células de H/RS desarrollan mecanismos para escapar de la apoptosis<sup>223</sup> o bien son rescatadas por la infección del VEB<sup>224, 225</sup>. Este escape de la apoptosis representa el mayor evento oncogénico en el proceso de linfomagénesis en el LH.

En raros casos (~2%) las células de H/RS derivan de células T<sup>226, 227</sup>.

A pesar de que las células de H/RS derivan de células B, análisis de expresión de microarrays de líneas celulares, muestran que han perdido la expresión de la mayoría de marcadores de célula B, característica única entre los linfomas de célula B<sup>228</sup>. Esto reforzaría la hipótesis de que estas células BCR negativas evitan la entrada en apoptosis y sobreviven.

Las alteraciones genéticas relacionadas con la patogénesis del LH son todavía bastante desconocidas. En muchos casos, pero no en todos, muestran alteraciones numéricas de cromosomas, así como amplificaciones y deleciones de regiones cromosómicas<sup>229, 230</sup>.

Varias de estas aberraciones cromosómicas son recurrentes, como la ganancia de 2p y 9p, pero la identificación de los genes relevantes está todavía pendiente. Se han identificado alteraciones genéticas que contribuyen a la activación constitutiva de la vía de *NF-kB*<sup>231-234</sup>. Además, en los últimos años se ha reportado la expresión aberrante de múltiples proteínas y la activación de vías de señalización que contribuyen a la supervivencia de las células de H/RS. En concreto la activación aberrante: de *Notch1*, de múltiples receptores Tirosina Quinasas, de las vías de *PI3K/AKT* y *MEK/ERK*, y de los factores de transcripción *NF-kB*, *STAT* y *AP-1*. La inhibición experimental de varios de estos módulos de señalización revela la importancia de su activación constitutiva en las células de H/RS, para el mantenimiento de su supervivencia y proliferación (Tabla 9).

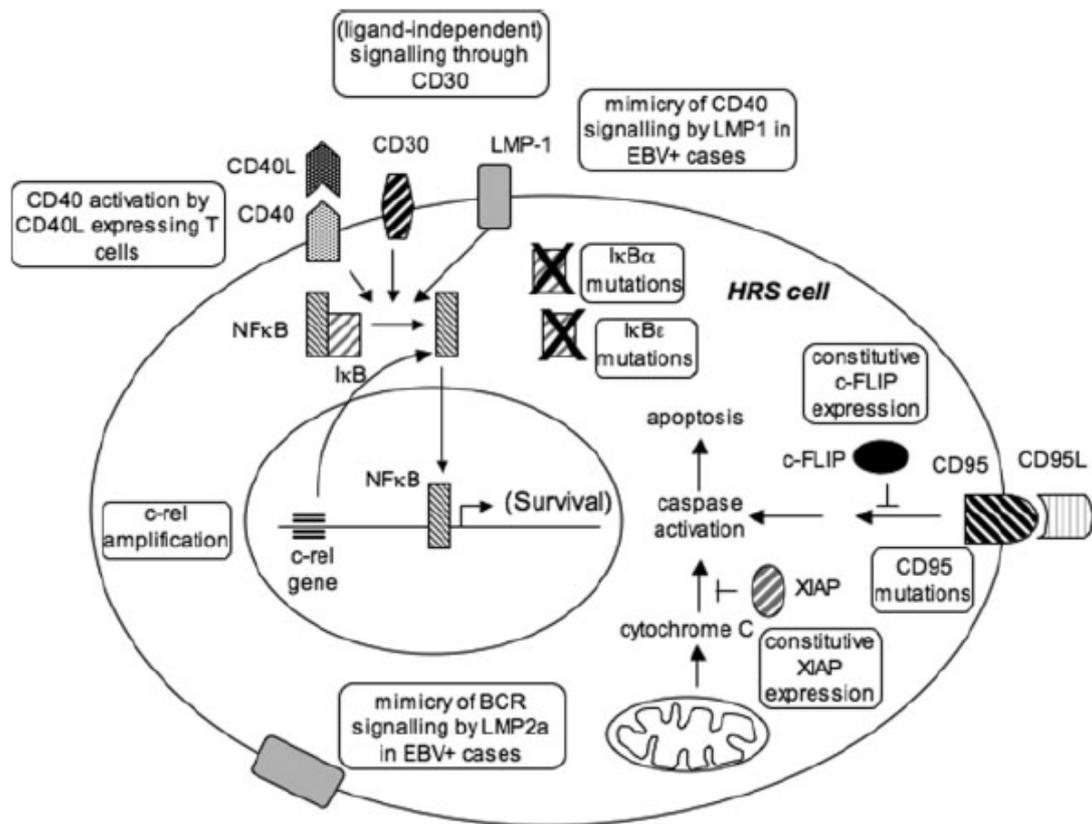
Vía de señalización	Efecto propuesto de la activación
<i>JAK-STAT</i>	Induce la proliferación y promueve supervivencia.
<i>AP-1</i>	Induce proliferación.
<i>Notch1</i>	Induce proliferación, inhibe apoptosis y posiblemente reduce fenotipo de célula B.
<i>MAPK/ERK</i>	Induce proliferación y inhibe apoptosis.
<i>PI3K/AKT</i>	Promueve supervivencia.
<i>NF-kB</i>	Inhibe apoptosis, induce proliferación, recluta células T hacia el linfoma y promueve diseminación.
Receptores de Tirosina Quinasas: <i>PDGFRA</i> , <i>DDR2</i> , <i>EPHB1</i> , <i>RON</i> , <i>TRKB</i> , <i>TRKA</i> y <i>MET</i> .	Induce proliferación, otros.

**Tabla 9. Vías de señalización, factores de transcripción activados constitutivamente en las células de H/RS y efectos propuestos de la activación.**

Por otro lado, el punto clave es el escape de las células de H/RS de la entrada en apoptosis, y varias de las vías que están activas de forma constitutiva contribuyen a la supervivencia de estas células, siendo quizá *NF-kB*, el factor más importante (Figura 23). Hay dos vías principales de activación de la apoptosis, una extrínseca a través de un receptor de membrana como los de la familia del Tumor necrosis factor (*TNF*) y una intrínseca que provoca la liberación de proteínas proapoptóticas de la mitocondria. Ambas vías convergen a nivel de la caspasa 3 y 7, las cuales son activadas por rotura de su forma inactiva (procaspasa) por la caspasa 9, y provocan la entrada en apoptosis. Las células de H/RS expresan *CD95* (Fas) y otros miembros de la familia de los *TNFR* como *TNF-R1*, *TRAIL-R1* y *TRAIL-R2*<sup>235, 236</sup>. Las células de H/RS también expresan *CD95* ligando<sup>237, 238</sup>, pero aun así se han mostrado resistentes a la inducción de muerte celular por esta vía en estudios *in vitro*<sup>239</sup>. En algunos casos, en muy baja frecuencia, se han encontrado mutaciones en el gen *CD95* que causan esta resistencia<sup>235, 240</sup>. Cabe destacar la detección de elevados niveles de expresión de la proteína celular inhibitoria FLICE (c-FLIP) en las células de H/RS<sup>235, 241</sup>, una proteína que regula negativamente la entrada en apoptosis vía *CD95*, interfiriendo en la formación del complejo DISC. El Knockdown para c-FLIP resulta en una sensibilización de las líneas celulares derivadas de LH a la inducción de muerte celular vía *CD95*, cosa que implica que c-FLIP juega un papel central en la prevención de la entrada en apoptosis mediada por *CD95* en las células de H/RS<sup>241, 242</sup> (Fig. 23).

Las células de H/RS también muestran malfuncionamiento en la vía intrínseca de apoptosis. La actividad de las caspasas está modulada por las proteínas inhibitoras de apoptosis. Las proteínas XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) se unen a las caspasas 3, 7 y 9, y inhiben su actividad proteolítica. La sobreexpresión de éstas por diferentes estímulos provoca la inhibición de la apoptosis y recientemente se ha detectado su expresión en líneas celulares de LH y en células de H/RS provenientes de biopsias<sup>243</sup>. La inhibición de las proteínas XIAP en células de LH, restaura de nuevo la sensibilidad de las células a la entrada de apoptosis vía caspasa 3<sup>243</sup>.

La sobreexpresión de c-FLIP en las células de H/RS puede ser debida a la actividad constitutiva de *NF-kB*<sup>244</sup>, pero la expresión de las proteínas XIAP parece ser independiente de la activación de *NF-kB*<sup>245</sup>.



**Figura 23. Mecanismos antiapoptóticos en las células de H/RS (Bräuninger A. et al. 2006).**

## Virus de Epstein Barr y su papel en el linfoma de Hodgkin

El VEB es un herpesvirus de tipo gamma 1 que está presente en el 90% de la población adulta mundial. La infección ocurre normalmente de forma subclínica en la infancia temprana, aunque la primoinfección clínicamente aparente es la mononucleosis infecciosa, que generalmente afecta a los individuos que no han tenido contacto con el VEB hasta la juventud. Su puerta de entrada es la orofaringe (a través de la saliva) y después de la primoinfección los individuos se convierten en portadores de la infección durante toda la vida.

El virus infecta inicialmente las células epiteliales de la orofaringe utilizando para penetrar en ellas la glicoproteína 350/ 220 de su envoltura que se une al receptor celular CD21. Con la producción de nuevos viriones se infectan las células contiguas. Durante esta fase el VEB infecta a los linfocitos B y prolifera en sangre periférica y ganglios linfáticos. Después de la infección primaria, el VEB permanece presente en una

pequeña población de linfocitos B, en una situación de relativa inactividad conocida como infección latente. En el ciclo lítico se produce replicación, síntesis proteica y génesis de nuevos viriones, mientras que en la fase de latencia se producen sólo algunas proteínas y no se desarrollan viriones. Durante la fase latente se expresan de forma constante dos RNAs no codificantes, EBER-1 y 2, y las proteínas latentes: los antígenos nucleares EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C y LP, y las proteínas de membrana celular LMP-1, 2A y 2B. Todas estas proteínas no se expresan a la vez en la misma célula huésped, y dependiendo de los genes expresados se han descrito 3 tipos diferentes de latencia (Tabla 10), que se observan en las diferentes líneas celulares y en las diferentes patologías asociadas al VEB. En el linfoma de Hodgkin encontramos el tipo de latencia II, con la expresión de EBNA-1, LMP-1, LMP-2A/B y EBERS. Las diferencias entre los genes que codifican las proteínas EBNA2, 3A y 3C permiten distinguir los dos subtipos de VEB, denominados VEB 1 y 2.

	<b>EBNA-1</b>	<b>EBNA-2</b>	<b>LMP-1</b>	<b>LMP-2</b>	<b>EBERS</b>
<b>Latencia I</b>	+	-	-	-	+
<b>Latencia II</b>	+	-	+	+	+
<b>Latencia III</b>	+	+	+	+	+

**Tabla 10. Proteínas que se expresan en los diferentes tipos de latencia del VEB.**

La persistencia del VEB en la fase de latencia en los linfocitos B infectados o en tejidos, se ve favorecida por el bajo número de proteínas que se sintetizan, lo que reduce las posibilidades de que sean reconocidas por las células T citotóxicas, con lo que esquivan la respuesta inmune. Una de las proteínas que se expresan en mayor cantidad es LMP 1, la cual juega un papel importante ya que es capaz de alterar funciones críticas de la célula B, como la transcripción génica, el control del ciclo celular y la regulación de la apoptosis. Es mediante esta proteína que el VEB garantiza la supervivencia de la célula infectada y la suya propia<sup>246</sup>.

Aproximadamente en un 40% de los casos de LHc, las células de H/RS están infectadas por VEB<sup>246</sup>. El VEB muestra un patrón monoclonal de infección y persiste a través del curso de la enfermedad, cosa que sugiere que juega un papel importante en el proceso de patogénesis<sup>247</sup>. Durante su infección, el VEB en el LHc expresa: EBNA-1 que es importante para la replicación del genoma viral, LMP-1 que mimetiza al receptor CD40

activado que tiene un papel importante en la diferenciación de los linfocitos B y en la supervivencia de las células B de centro germinal<sup>248</sup> y activa *NFkB*, y LMP-2a que es una proteína relacionada con la familia src de las tirosina quinasas que participa en el control del ciclo lítico del VEB y además puede reemplazar la función del BCR siendo una señal de supervivencia esencial para las células B<sup>249, 250</sup>. LMP-2 puede estar rescatando a las células de CG que tengan mutaciones desventajosas de la apoptosis<sup>251</sup>. A pesar de todo esto, no está todavía muy claro si el VEB es capaz de rescatar las células BCR deficientes de la entrada en apoptosis en los CG. Tres estudios abordaron esta cuestión<sup>252-254</sup>, y observaron que VEB era capaz de rescatar de la entrada en apoptosis. No obstante, los estudios tenían la limitación de que el tipo de latencia que mostraba el VEB en el rescate era el tipo III con la expresión de 9 proteínas, mientras que en el LH expresa el tipo II con la expresión de sólo 3 proteínas. Una de las explicaciones para este hecho podría ser que en el rescate inicial se expresara la latencia III y después ésta pasara a II<sup>252</sup>. Además, las dos proteínas probablemente más importantes en el rescate de las células B y en el proceso de linfomagénesis, LMP-1 y LMP-2a, se expresan en los dos tipos de latencia. La supervivencia de las células deficientes de BCR a través de la infección del VEB demuestra el papel central del VEB en los estadios tempranos de la patogénesis del LH.

Hay también evidencias recientes de que otros virus, como el de la rubéola, pueden estar también relacionados en la patogénesis del linfoma de Hodgkin, aunque serán necesarios más estudios para su confirmación<sup>255, 256</sup>.