

C-027

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL GEN HGF EN LA PATOGENIA DE LA LEUCEMIA AGUDA PROMIELOCÍTICA

A. Aires, N.C. Gutiérrez, M.C. Chillón, E.M. Ocio, P. Maiso, S. Tabera, M. Delgado, M.B. González, J.F. San Miguel

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca y Centro de Investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca

Introducción: El análisis de la expresión génica mediante microarrays ha demostrado que el factor de crecimiento hepatocítico (HGF) presenta una expresión significativamente aumentada en las leucemias agudas promielocíticas (LAP), de manera exclusiva respecto a los otros subtipos de leucemias agudas mieloblásticas.

Objetivo: Investigar la función de HGF en los blastos promielocíticos mediante la tecnología de RNA interferente.

Material y métodos: Los experimentos se realizaron sobre la línea NB4 (DMSZ nº ACC 207) derivada de una LAP. Las células se cultivaron en suspensión en el medio RPMI 1640 suplementado con SBF al 10% y antibióticos, a 37°C en una estufa de CO₂ al 5%. Para silenciar *HGF* se utilizó el siRNA "ON-TARGETplus SMARTpool" correspondiente de Dharmacon. La transfección se llevó a cabo mediante el sistema de nucleofección de Amaxa. Se transfectaron un total de 2×10^6 células con 5mg de siRNA frente a *HGF* utilizando el programa X-01 y el reactivo "Cell Line Nucleofector Solution V". Para comprobar la eficiencia de la electroporación se utilizó el vector pmaxGFP. El nivel de silenciamiento alcanzado se examinó mediante RT-PCR cuantitativa (TaqMan) en las células recogidas a las 6, 9, 12, 24, 36 y 48 horas de la transfección (experimentos en duplicado). Con el fin de conocer las repercusiones del silenciamiento de la expresión del gen *HGF* sobre el transcriptoma de los blastos promielocíticos, se llevaron a cabo microarrays de expresión con el chip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix).

Resultados: La eficiencia de la transfección en los blastos de la línea NB4 fue del 85%. El silenciamiento máximo del gen *HGF* valorado mediante RT-PCR se consiguió a las 6 h: se observó una reducción en la expresión de *HGF* superior al 90%, que se mantenía hasta las 24 h en todos los experimentos. El análisis de la expresión génica mediante microarrays confirmó la disminución en los niveles de expresión de *HGF* hasta valores mínimos. Además, el silenciamiento de *HGF* provocó cambios en la expresión de 82 genes: la mayoría de estos genes tenían funciones relacionadas con el crecimiento y proliferación celular, con la génesis del cáncer y con el desarrollo del sistema hematopoyético. Diecisiete de los genes desregulados después de silenciar *HGF* forman parte de las rutas biológicas en las que participa este factor de crecimiento: entre ellos destacan *THBS1* (trombospondina), *RHOQ* (miembro de la superfamilia de *RAS*), *CXCL2* (quemoquina) y *FOSL2* (miembro de la familia *FOS*).

Conclusiones: El bloqueo de la acción de *HGF* en los blastos de la LAP origina cambios de expresión en genes relacionados con el desarrollo tumoral. Estos hallazgos preliminares apuntan a que la desregulación de la vía de señalización *HGF/MET*, pieza clave en la génesis de diversos tumores, también puede estar implicada en la patogenia de la LAP.

Financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria PI051801. A. Aires es becaria de la "Fundação para a Ciência e Tecnologia" (Portugal).